

平成 21 年 3 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791299
 研究課題名 (和文) ヒト培養角膜内皮細胞を用いた角膜内皮炎モデルの作成
 研究課題名 (英文) A model of corneal endotheliitis
 研究代表者
 杉岡 孝二 (SUGIOKA KOJI)
 近畿大学・医学部・助教
 研究者番号：50399119

研究成果の概要：培養ヒト角膜内皮細胞は、HSV-1 に対して感受性が高いことを確認した。角膜内皮炎が少ないのは低感受性によるものではなく前房内の免疫反応の役割が大きいと考えられた。培養角膜実質細胞では CTGF の産生量は TGF- β の濃度依存性に増加した。また CTGF は TGF- β の存在下で角膜実質細胞におけるフィブロネクチンの産生に対して促進的に働き、角膜実質細胞におけるフィブロネクチンの産生に関与していると考えられた。しかしながら、 α -SMA の産生および、コラーゲンゲルの収縮に対しては TGF- β の添加の有無に関わらず影響を与えなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	150,000	1,750,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：endotheliitis, HSV-1, wound healing, CTGF

1. 研究開始当初の背景

角膜内皮炎は、1982 年に Khodadoust らにより "presumed autoimmune corneal endotheliopathy" として報告され、現在では角膜内皮の直接の炎症とそれに伴う角膜浮腫をきたす、臨床的に頻度の少ない進行性の疾患として認識されるようになった。その臨

床像は極めて多彩であり、様々な分類がされているが、代表的なものとして、linear や diffuse の形態を示し、急激に進行するタイプ、緩やかに病巣が拡大していく focal, multifocal タイプなどがある。一般的に比較的臨床頻度が高く、可逆性の角膜内皮障害と角膜実質浮腫を特徴とする Disciform

keratitis と呼ばれる疾患が、自己免疫反応が主体であり、ウイルスの複製は主要要素でないと考えられるのに対し、角膜内皮炎は、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) の感染、増殖に起因し、それに伴う自己免疫反応が病態を促進させると考えられている。しかしながら角膜内皮炎の臨床症例からの HSV-1 感染の証明は困難であり、主病因として HSV-1 は示唆されてはいるが、いまだにはっきりと断定はされていない。一方、角膜内皮炎における自己免疫反応のシステムについては Zheng らが、ウサギ前房内に HSV-1 を注入し実験的ウサギ角膜内皮炎を作成することにより説明している。その中で彼らは HSV-1 注入の前に HSV-1 抗原を前房内に注入しておくことにより、前房関連性免疫偏位 (ACAID) を誘導したときにのみ角膜内皮炎様の臨床像が観察されたことを報告している。内皮炎の発症には事前に HSV-1 特異的 ACAID の存在が必要である、という彼らの説は内皮炎の臨床頻度の少ないことの裏づけに成りうると考えられる。彼らはまた、ウサギ角膜内皮炎モデルの病巣がヒト角膜内皮炎と同様に、角膜内皮のみに限局されて拡がり、虹彩などの前房組織には認められなかったことについて、ACAID 関連の抗原特異的遷延型遅延反応の欠陥が角膜内皮層の HSV-1 感染の拡がりを促進させ、また前房内の抗原特異的抗体の力値の上昇が他の前房組織への HSV-1 感染の拡がりを抑制したのではないかと推測している。この ACAID 様メカニズムが眼球内で生体防御機構として働き、角膜内皮炎の臨床頻度の低さ、独特の病態を説明可能にしている一方で、角膜内皮細胞自体においても、HSV-1 の初感染、または 2 次的な感染の広がりに対して感受性が悪いと考えられてきた。すなわち角膜内皮炎がそのほかのヘルペス性角膜炎等に比較して

臨床頻度の低い理由として、角膜内皮細胞自体のウイルスに対する感受性が低いことが考えられ、他の前房組織への病巣の広がりには角膜内皮細胞における HSV-1 複製能力の低さや、細胞から前房水へのウイルス粒子の放散量の少なさにより説明できると考えられてきた。一方、ウイルス感染などにおいて角膜にダメージが生じた際には、角膜実質細胞からは種々の成長因子や細胞外マトリックスが分泌され、組織の修復を図る。その中でも TGF-beta は alpha-SMA の発現の促進、細胞外マトリックスの分泌などに関与し、角膜実質細胞においても創傷治癒過程において重要な働きをすることは良く知られている。また TGF-beta はその多様な機能から、それぞれの働きに対して、多くの下流の因子が関与していることがわかっている。CTGF (connective tissue growth factor) は TGF-beta の下流に位置し、mitogen や chemoattractant として臍静脈の内皮細胞の上清から見つかった蛋白質であり、TGF-beta が線維化の開始に関わるのに対し、CTGF は線維化の維持に関与しているとされており、その機能には fibroblast の増殖、ECM の産生の促進および細胞の接着、伸展などが報告されている。

2. 研究の目的

ヒト角膜内皮細胞(HCEC)を培養し、HSV-1 の直接感染に対する HCEC の感受性を検討する。また角膜における CTGF の役割を知る目的で、培養ヒト角膜実質細胞による CTGF 産生と CTGF の培養実質細胞のフィブロネクチン、alpha-SMA の産生およびコラーゲンゲル収縮に及ぼす影響について検討する。

3. 研究の方法

ヒト角膜内皮細胞(HCEC)を培養し、HSV-1 の直接感染に対する HCEC の感受性の検討: HCEC と、対象として CV-1 細胞を、confluent

になるまで培養した。HSV-1 (McKrae 株) を 5 multiplicities of infection (MOI) と 10^{-4} MOI の濃度で感染させた。各細胞に対する HSV-1 の吸着力とウイルスの複製量を評価するために、吸着率、総ウイルス産生量の 2 項目を 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀)により検討した。さらに各細胞の confluent monolayer に HSV-1 を 10^{-4} MOI の濃度で感染させ、ウイルスの拡がりの様相を顕微鏡学的に比較した。

角膜実質細胞における CTGF の発現の検討：角膜実質細胞を無血清で 24h 培養した後、TGF- β を 5ng, 1ng/ml の濃度で添加し、72h 後に培養上清を除去し、培養細胞を PBS で洗浄後、lytic buffer を用いて溶解してサンプルを精製し、SDS-PAGE により電気泳動した後、Western blotting 法にて CTGF の存在を検出した。角膜実質細胞によるコラーゲンゲル収縮作用の検討：角膜実質細胞を包埋したコラーゲンゲル収縮モデルを作成。具体的には角膜実質細胞を 1 型コラーゲンゲル内に包埋し、DMEM 培養液内でコラーゲンゲルを浮遊培養（最終濃度 1×10^5 個）し、経時的にゲルの直径を計測することでコラーゲンゲル収縮作用を定量化した。TGF- β 、CTGF の添加によるフィブロネクチン、 α -SMA の発現を Western blotting 法にて検討：ヒト角膜実質細胞を無血清で 24h 培養した後、TGF- β (1ng/ml)単独、CTGF (130nM)単独および TGF- β (1ng/ml)と CTGF (130nM)を同時添加し、48h 後にサンプルを回収し、Western blotting 法にてフィブロネクチン、 α -SMA 蛋白を検出した。

4. 研究成果

(1) HCEC、CV-1 に対する HSV-1 の吸着

率

HSV-1 の吸着率は HCEC が 36.0%、CV-1 が 33.0%であり両者の間に有意な差を認めなかった。

(2) 総ウイルス複製量

5 MOI の濃度で播種した際の総ウイルス複製量：8 時間後から 48 時間後までのすべての計測時点でのウイルス力価は HCEC が CV-1 細胞に比べ高値であった。

ウイルス力価の最高値は HCEC が CV-1 細胞に比べ平均 4.2 倍高かった。(P<0.005)

10^{-4} MOI の濃度で播種した際の総ウイルス複製量：すべての計測時点でのウイルス力価は HCEC が CV-1 細胞に比べ高値であった。ウイルス力価の最高値の差は HCEC が CV-1 細胞に比べ平均 4.4 倍高値であった。

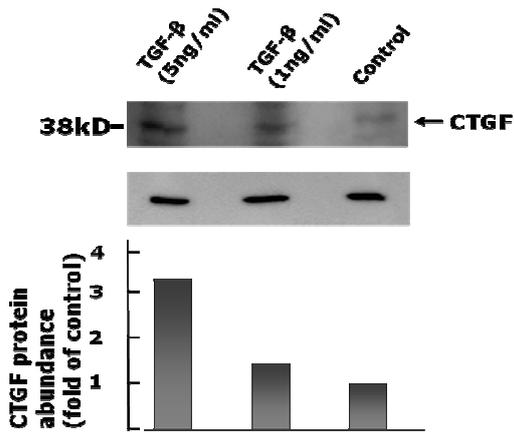
(3) HSV-1 感染様式の検討

感染 1 日後と 2 日後では顕微鏡観察、抗 HSV-1 抗体による蛍光染色観察共に HCEC と CV-1 細胞の virus plaque の形態の変化に違いを認めなかった。感染 1 日後と 2 日後では、両細胞ともウイルス抗原陽性細胞は、隣接する細胞に、細胞から細胞を伝って感染する様子が観察された。しかし感染 4 日後では HCEC は diffuse に CPE を起こし、抗原陽性細胞は HCEC 層全体に観察された。一方 CV-1 細胞では virus plaque の増大を認めたが、正常細胞との境界は明瞭であった。

(4) 角膜実質細胞における CTGF の発現：角膜実質細胞に TGF- β を添加すると CTGF の発現は濃度依存性に顕現された。

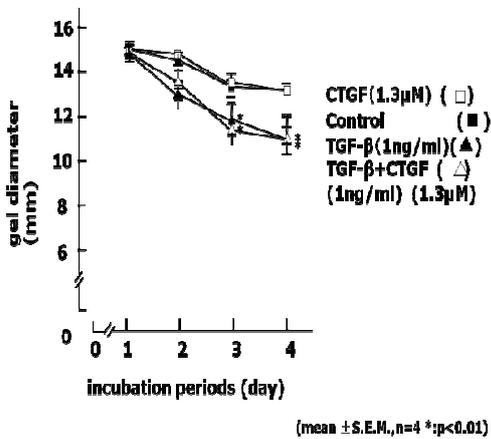
(下図)

角膜実質細胞におけるCTGFの発現

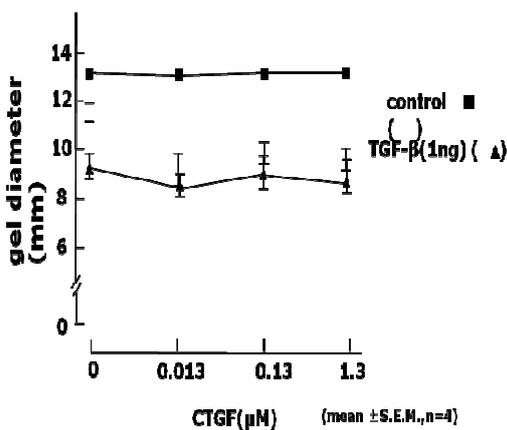


(5) コラーゲングル収縮結果 (下図)

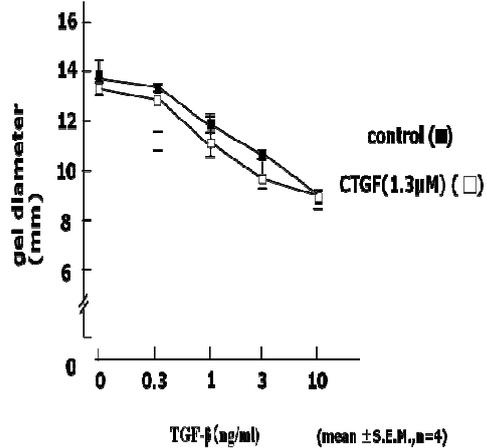
TGF-βおよびCTGFの角膜実質細胞のコラーゲングル収縮作用に及ぼす影響



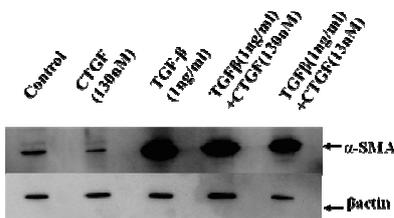
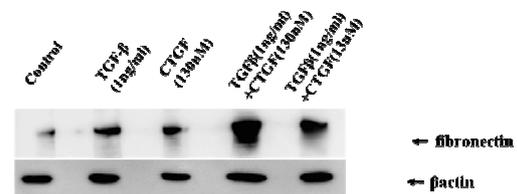
CTGF濃度がコラーゲングル収縮作用に与える影響(4日目)



TGF-β濃度がコラーゲングル収縮作用に与える影響(4日目)



(6) フィブロネクチン、alpha-SMA の発現: フィブロネクチンはコントロール、CTGF 単独添加群では発現が微弱であったが、TGF-beta と CTGF を共に添加すると濃度依存的に増強された。alpha-SMA は CTGF 単独の添加では発現に影響は与えず、TGF-beta の添加により alpha-SMA の発現は増強したが、TGF-beta 単独と TGF-beta、CTGF 共添加の間に発現の差は認めなかった。(下図)



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①杉岡孝二 (他 7 名、4 番目) A-5021: a new acyclovir analogue inhibits murine herpetic keratitis. Cornea, 査読有,27,2008,334-338

[学会発表] (計 1 件)

①杉岡孝二 CTGF effectively facilitates TGF- β induced fibronectin production in human corneal fibroblasts. Association for Research in Vision and Ophthalmology 2008 年 4 月 30 日、Fortlaudardale

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉岡 孝二 (SUGIOKA KOJI)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号 : 50399119

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし