

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18885

研究課題名(和文) スフィンゴシン1リン酸受容体3を標的にした角膜の血管新生と癒痕化の抑制戦略の樹立

研究課題名(英文) Establishment of a strategy to suppress corneal angiogenesis and opacity by targeting sphingosine 1-phosphate receptor 3

研究代表者

安田 慎吾 (Yasuda, Shingo)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20772271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：角膜刺激によって誘発されるTGFb1はSPK1活性化を介してS1P産生を増加させ、S1Pの上昇は角膜上皮細胞に強く発現するS1PR3を介しVEGF-A発現レベルを上昇させ血管新生を促進した。血管内皮細胞にもS1PR3は発現しており、HRMEC、HUVECを用いた実験を行った。両血管内皮細胞ではS1Pを付加するとVEGF-A、VE-cadherinのmRNA発現レベルに変化はなかったが、S1PR3阻害剤付加では低下した。このことから血管内皮細胞においては内因性のS1PはS1PR3を介してVEGF-A、VE-cadherinに関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の角膜混濁の主たる治療方法は混濁後の角膜をどのように治療するかが主に検討されており、その唯一の治療方法は角膜移植とされている。以前は角膜移植の方法は全層角膜移植のみであったが、現在では角膜実質で障害が限局している場合に対する表層・深層角膜移植や、逆に角膜内皮に障害が限局している場合に対する角膜内皮移植などが普及している。しかしどの移植方法も炎症後に起こりうる混濁を予防するような治療ではなく、すでに可逆性のない状態まで進行した角膜に対する治療である。本研究では外傷を受けた角膜が今後起こりうる血管新生・混濁を予防するというを目的としており、既存の方法とは異なる治療方針である。

研究成果の概要(英文)：TGFb1 induced by corneal stimulation increased S1P production through SPK1 activation, and S1P elevation increased VEGF-A expression level through S1PR3, which is strongly expressed in corneal epithelial cells, and promoted angiogenesis. S1PR3 is also expressed in vascular endothelial cells, and experiments using HRMEC and HUVEC were performed. In both vascular endothelial cells, addition of S1P did not change mRNA expression levels of VEGF-A and VE-cadherin, but addition of S1PR3 inhibitor reduced them. This suggests that endogenous S1P is involved in VEGF-A and VE-cadherin via S1PR3 in vascular endothelial cells.

研究分野：眼科

キーワード：眼創傷治癒 角膜血管新生 角膜混濁 S1P S1PR3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

角膜実質の外傷、感染などに伴う高度な炎症は血管新生と線維瘢痕化により混濁治癒をきたす。スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)はスフィンゴ脂質代謝産物の脂質メディエーターとして炎症、血管新生や組織線維化に深く関与している。皮膚創傷治癒などと異なり、角膜での血管新生は視機能にとって好ましくないばかりか、角膜移植時の免疫担当細胞の供給源となりうる。他臓器においてS1Pの発現抑制が血管新生や炎症の抑制につながるとの報告があるが、S1P発現と角膜における血管新生と線維瘢痕化の関係についての報告は無い。本申請では線維・瘢痕化や血管新生に強く関与するS1P受容体であるS1P receptor 3(以下S1PR3)欠失マウスを用いてS1PR3の抑制が角膜実質の創傷治癒において線維・瘢痕化、血管新生、炎症を抑制するか否かをin vivoとin vitroの研究で検討し、S1PR3の制御による角膜透明治癒や血管新生への影響を解明する。本研究の課題の成果は創傷治癒反応による混濁の新たな予防医療への貢献が期待できる。

2. 研究の目的

現在眼科領域において黄斑変性症などの血管新生抑制目的にVEGF阻害剤が使用されているが心臓・脳血管閉塞の重篤な合併症があり、適応使用が硝子体注射に限られている。今回着目したスフィンゴシン-1-リン酸(Sphingosine-1-phosphate:S1P)は脂質の一種であり、生体内で様々な生理活性を持つ重要な脂質メディエーターとして知られている。その受容体はSphingosine-1-phosphate receptor:S1PRと呼ばれており、現在までにS1PR1~5のサブタイプが発見されている。既報ではin vitroではその中の1つのサブタイプであるS1PR3は血管新生に関与する因子であると言われているが、in vivoにおける実験はあまり行われていない。本研究では角膜創傷治癒の新規治療開拓として、マウス角膜新生血管におけるS1PR3の役割を検討した。

3. 研究の方法

(1)マウス眼球でのS1PR3局在

正常マウス角膜S1PR3染色を行った。また正常マウス角膜に電気熱凝固を行い血管新生モデルを作成し、新生血管内でのS1PR3発現を観察した。

(2)S1PR3の有無での新生血管の程度・角膜内の各種マーカー発現比較検討

C57BL/6(WT)マウス、S1PR3ノックアウト(KO)マウスの角膜中央部の電気熱凝固によって血管新生を誘導した。3日後、7日後、14日後の隅角からの新生血管の距離を測定しWT,KO間で比較検討した。同モデルを用いて熱凝固3日後の細胞マーカー(TGF- β 1,VEGF-A,VEGF-B)、サイトカイン(SMA,MP0,F4/80)のmRNA発現レベルをRT-PCRを用いて比較検討した。熱凝固3,7,14日後のWT,KOマウスを切片化しVEGF-A染色を行った。

(3)TGF- β 1-Smad3経路によるSphingosine kinase1産生の検討

マウス角膜上皮細胞(TKE2)、マウス眼fibroblastを培養しTGF- β 1,SIS3(Smad3阻害剤)を付加でのsphingosine kinase-1(SK1)mRNA発現レベルをRT-PCRを用いて比較検討した。

(4)S1P,S1PR3付加による実質細胞でのVEGF-A発現の検討

マウス角膜上皮細胞(TKE2)、マウス眼fibroblastを培養しS1P,S1PR3阻害剤を付加でのVEGF-A mRNA発現レベルをRT-PCRを用いて比較検討した。

(5)腹腔内マクロファージでのVEGF-A発現の比較検討

5%oyster glycogenを腹腔内注射し炎症を惹起したWT,KOマウスから、腹腔内マクロファージを回収しVEGF-AのmRNA発現レベルをRT-PCRにて比較検討した。

(6)血管様構造構築モデルを用いてのS1P,S1PR3阻害剤の効果検討

ヒト網膜毛細血管内皮細胞(HRMEC)をマトリゲル上に播種し三次元血管構造モデルを作成した。S1P,S1PR3阻害剤を付加し、S1Pが血管内皮細胞の管腔構造進展に対する影響、S1PR3阻害によって生じる影響を検討した。

(7)血管内皮細胞におけるS1P,S1PR3阻害剤付加後VEGF-A発現の検討

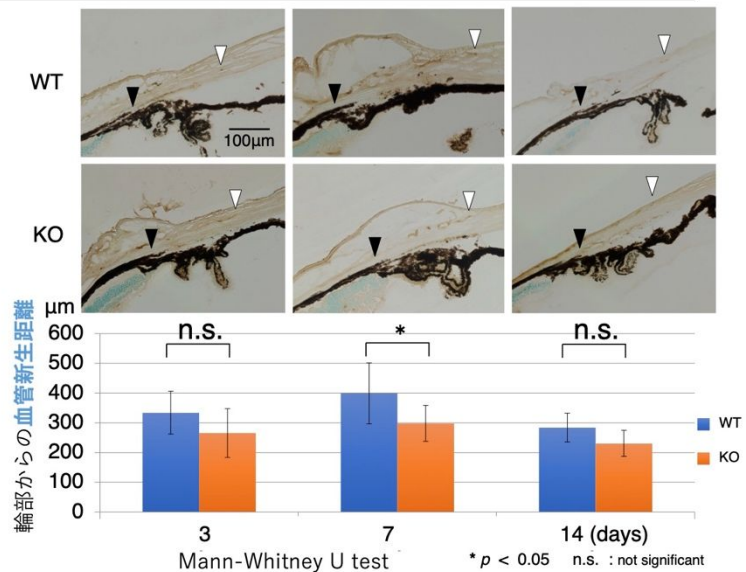
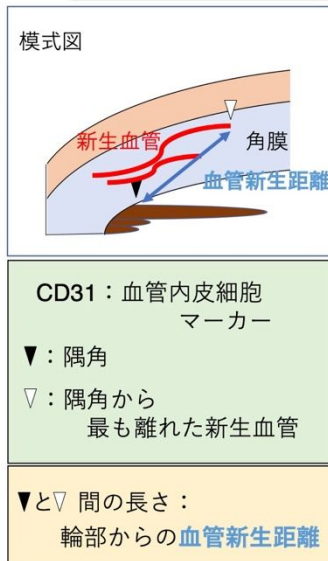
ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いてS1P,S1PR3阻害剤を付加しVEGF-AのmRNA発現レベルをRT-PCRにて比較検討した。

4. 研究成果

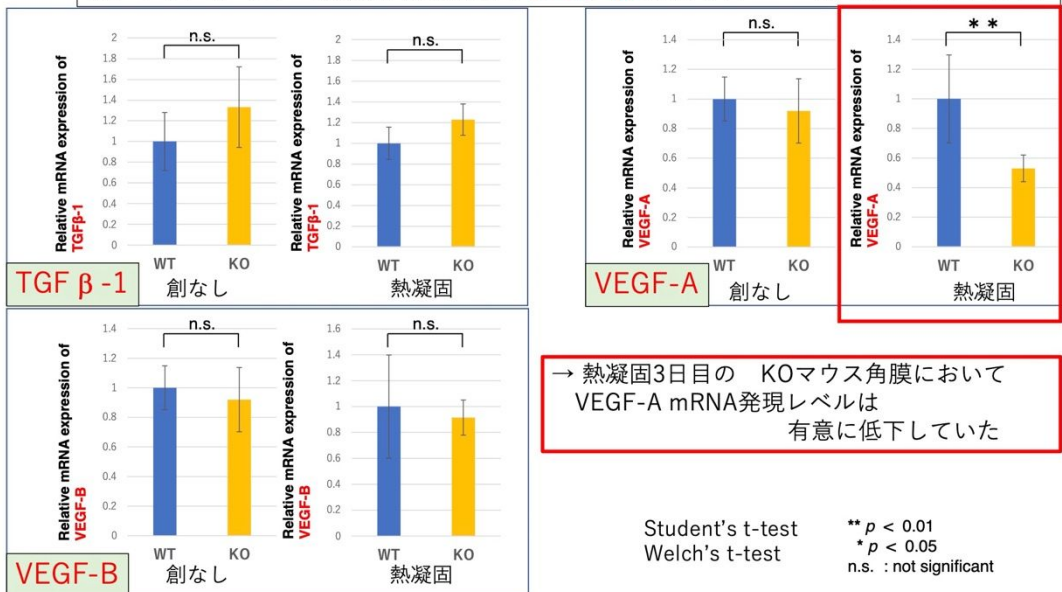
(1)正常マウス角膜ではS1PR3は角膜上皮細胞(中央部>輪部)に多く発現していた。誘発した新生血管において血管内皮細胞内でS1PR3が発現していた。

(2)熱凝固3日後のマウス角膜において角膜実質内の新生血管はS1PR3の欠損によって抑制された。(p<0.05)。電気熱凝固後のマウス角膜でVEGF-AのmRNA発現レベルはKOマウスで有意に抑制されていた。(p<0.05)免疫染色ではVEGF-Aは熱凝固後3日後で角膜上皮に強く発現しており、WTにおいてKOより強く発現しているように観察できた。

定量的評価：KOマウスにおいて熱凝固7日目の角膜血管新生は抑制された

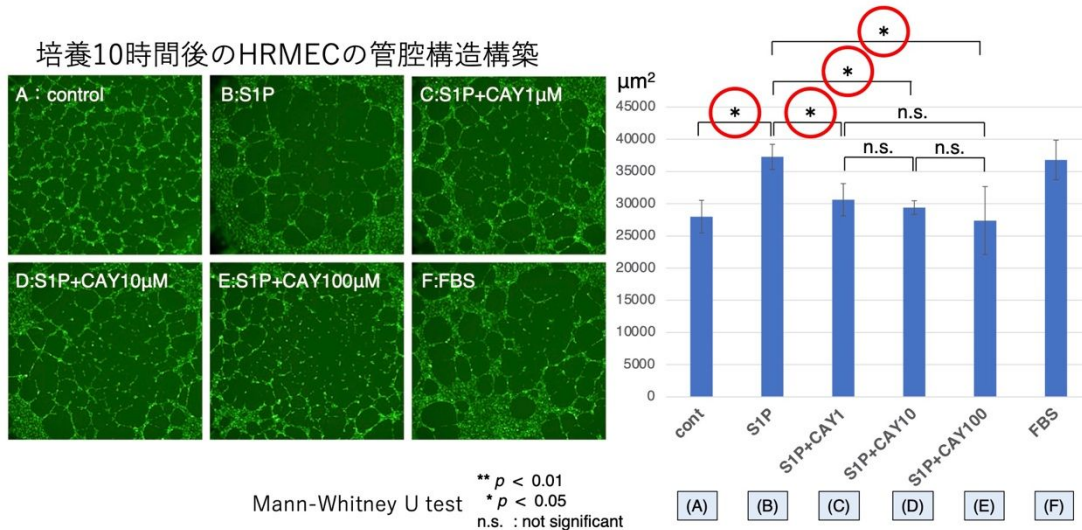


KOマウスにおいて熱凝固後角膜のVEGF-A mRNAレベルは有意に低下した



- (3)TKE2においてTGF β 1付加でSK1のmRNA発現レベルは有意に増加した($p < 0.05$)、TGF β 1に加えてSIS3付加したがTGF β 1単剤と比べて有意な差を認めなかった。FibroblastにおいてTGF β 1付加でSK1のmRNA発現レベルは有意に増加した($p < 0.05$)、またTGF β 1に加えてSIS3付加することでTGF β 1単剤と比べて有意な低下を認めた。($p < 0.05$)
- (4)TKE-2においてはS1P付加でVEGF-A mRNA発現レベルは有意に増加し($p < 0.01$)、S1PR3阻害剤付加で有意に減少した。($p < 0.01$)FibroblastにおいてはS1P,S1PR3阻害剤付加で有意な差はなかった。
- (5)KOマウスから回収したマクロファージではWTと比較してVEGF-A mRNA発現レベルは有意に低下していた。($p < 0.05$)
- (6)HRMECはマトリゲル上で蜂の巣様の管腔構造を形成した。S1P付加によって管腔構造は有意に増大し($p < 0.05$)、S1Pに加えてS1PR3阻害剤を付加することで管腔構造は有意に減少した($p < 0.05$)。今回の濃度では濃度依存的な変化は認められなかった。

HRMEC管腔構造構築はS1Pによって促進し、S1PR3阻害剤で抑制された



(7)HUVEC においては S1P 付加では VEGF-A mRNA 発現レベルには有意な変化を認めなかった。S1PR3 阻害剤を付加すると VEGF-A mRNA 発現レベルは有意に低下した($p < 0.05$)。

【考察】

S1PR3 KO マウスにおいて角膜の血管新生は抑制されていた。S1PR3 はマウス角膜では角膜上皮細胞と血管内皮細胞に局在を認めたため、角膜実質細胞・血管内皮細胞の両側面から in vitro での検討を行った。

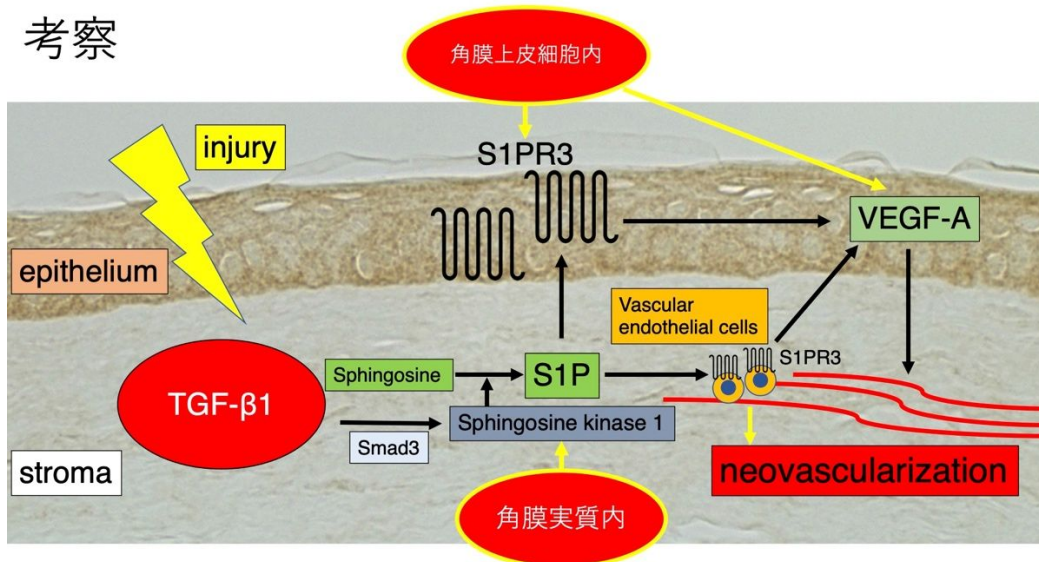
角膜実質細胞

角膜上皮細胞・Fibroblast を用いた培養実験では、TGF- β 1-Smad3 経路を介した Sphingosine kinase1 の発現は Fibroblast で認められ、角膜上皮細胞では認められなかった。一方 S1PR3 経路を介した VEGF-A の発現は角膜上皮細胞で認められ、Fibroblast で認められなかった。既存の報告では角膜実質の血管新生は VEGF-A が強く関与していると報告されており、電気熱凝固後マウス角膜で VEGF-A が有意に上昇していることから角膜新生血管には VEGF-A が関与していると考えられる。以上のことから外的刺激によって TGF- β 1 が発現すると Fibroblast で Sphingosine kinase1 が発現し、Sphingosine kinase1 は S1P を産生し、角膜上皮細胞に強く発現している S1PR3 を介して VEGF-A を発現するという経路を認めた。実際に電気熱凝固後の角膜切片でも VEGF-A は角膜上皮に強く発現していることを確認した。

血管内皮細胞

HRMEC を用いた実験では S1PR3 を介して S1P が血管様構造の構築を促進していた。HUVEC を用いた実験では S1P は S1PR3 を介して VEGF-A を促進していた。血管内皮細胞においても S1P は S1PR3 を介して VEGF-A を発現し血管新生を促進していた。

考察



【結論】

S1P は角膜実質細胞・血管内皮細胞の両方において S1PR3 を介して VEGF-A を促進し、角膜内の血管新生を促進する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yasuda Shingo, Sumioka Takayoshi, Iwanishi Hiroki, Okada Yuka, Miyajima Masayasu, Ichikawa Kana, Reinach Peter S., Saika Shizuya	4. 巻 101
2. 論文標題 Loss of sphingosine 1-phosphate receptor 3 gene function impairs injury-induced stromal angiogenesis in mouse cornea	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 245 ~ 257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-020-00505-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 雑賀司珠也 安田慎吾
2. 発表標題 細胞リン脂質成分を介する上皮-実質相互作用による角膜炎症と血管新生制御
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田慎吾
2. 発表標題 マウス角膜血管新生におけるスフィンゴシン-1-リン酸受容体3 (S1PR3) の役割
3. 学会等名 角膜カンファレンス2021 シンポジウム発表
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安田慎吾 住岡孝吉 岡田由香 宮嶋正康 市川佳奈 雑賀司珠也
2. 発表標題 マウス角膜血管新生におけるスフィンゴシン-1-リン酸受容体3の役割
3. 学会等名 2019年 日本眼科学会 総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田慎吾 住岡孝吉 岡田由香 宮嶋正康 市川佳奈 雑賀司珠也
2. 発表標題 マウス角膜血管新生におけるスフィンゴシン-1-リン酸受容体3の役割
3. 学会等名 2019年 臨床眼科学会 学術展示優秀賞
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田慎吾,住岡孝吉,岩西弘樹,岡田由香,宮嶋正康,市川佳奈,雑賀司珠也
2. 発表標題 Signals from sphingosine-1-phosphate receptor type 3 involvement in vascular formation by endothelium and in VEGF expression in macrophages in vitro.
3. 学会等名 ARVO2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関