

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592045

研究課題名(和文) 角膜上皮創傷治癒過程における神経ガイダンス因子の機能解析

研究課題名(英文) Role of neural guidance factor on corneal epithelial wound healing.

研究代表者

高 知愛 (KO JIAE)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70314797

研究成果の概要(和文)：角膜実質細胞から分泌される神経ガイダンス因子(セマフォリン)は角膜上皮細胞と互いに情報を交換しながら上皮細胞の分化に必要な因子の発現を調節し、角膜の機能維持及び、上皮創傷治癒過程で重要な役割を果たしていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Semaphorin 3A released from corneal fibroblasts may play an important role in the regulation of intercellular communication between corneal epithelial cells as well as in maintenance of corneal structure, function and wound healing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：眼細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

(1) 角膜上皮細胞分化のマーカーとして、K12, ビメンチン、などが報告されているが、その分化を制御するメカニズムはまだ明らかになっていない。

(2) 角膜は、生体内でもっとも神経終末の密度の高い組織である。角膜への知覚神経支配は角膜の構造維持や創傷治癒に大きな役割を果たしている。臨床的にも角膜知覚が低下している症例では、角膜上皮の創傷治癒が遅延し、いわゆる神経麻痺性角膜症を発症する。

(3) 近年、神経細胞突起の伸張を制御する因子の一つとして Semaphorin の役割が知られている。実際 Semaphorin family の一つである Semaphorin3A は皮膚では表皮(上皮)細胞の migration を制御している。また、Semaphorin3A の受容体である Plexin の活性化が cell-matrix の interaction において focal adhesive complex と actin cytoskeleton との結合を阻害するという報告もある。(Davide, B. et.al., Stefania, A. et.al.)。

(4) 申請者の予備的研究から、正常角膜の上皮細胞では Semaphorin3A が恒常的に発現していること、培養ヒト角膜上皮細胞も Semaphorin3A を発現していることが明らかになった。

このことから、Semaphorin3A が角膜上皮細胞の分化に何らかの役割を果たしていると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 難治性角膜上皮障害の病態の解明と治療法の開発を究極の目的とし、神経ガイダンス因子が角膜上皮細胞の分化過程をどのように制御しているかを解析すること。

(2) 上皮剥離などの創傷治癒の過程で神経ガイダンス因子の発現がどのように変化するかを明らかにする。

(3) 培養細胞を用いて、角膜上皮細胞の分化過程に対する神経ガイダンス因子の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 成体ラットの角膜上皮剥離、切開などの創傷治癒モデルを用いる。この実験系では細胞の遊走が考えられるため、細胞遊走における今までの報告されているシグナル系のマーカーの因子 (FAX, Paxillin, Rho kinase) を用い、それとの共発現を検討すると同時に神経ガイダンス因子の発現をウエスタン法または蛍光抗体法による解析を行う。

(2) SV-transformed human corneal epithelial 細胞を用いて、既存の方法により培養細胞で細胞を剥がすなど創傷モデルを作り、角膜上皮細胞の治癒過程での神経ガイダンス因子の発現パターンを調べる。

(3) 図1のような培養系を用いて、培養したヒト角膜上皮細胞、実質細胞での神経ガイダンス因子の発現を si-RNA によるノックダウン、あるいは over-expression 系を用いて、細胞内で神経ガイダンス因子の発現を人工的に加えたり、増加させて、その時の細胞内で起こりうる細胞分化に重要なシグナルの変化を神経ガイダンス因子の発現と共に Western Blot, あるいは RT-PCR による手法で検討する。

(4) 神経ガイダンス因子が創傷治癒過程で様々な発現の調節をおこなっている際に活発に動いている炎症性サイトカインの発現を Multi-Plex 法による解析を行う。

4. 研究成果

(1) 角膜上皮細胞から分泌される EGF が角膜実質細胞内の神経ガイダンス因子の発現に重要な働きをしていることが明らかになった。

(2) 角膜実質細胞内の神経ガイダンス因子の強発現により、角膜実質細胞から分泌される神経ガイダンスが角膜上皮細胞内の Adherent Junction 蛋白質の発現にもっとも重要であることが明らかになった。

(3) Adherent Junction 蛋白質は上皮細胞の分化に重要な key factor であることから角膜での神経ガイダンス因子の局在の意義と角膜上皮細胞や実質細胞機能の調節に神経ガイダンス因子が大きく関連していると考えられ、角膜細胞の恒常、機能に神経性因子の役割を解明するための大きな前進であることが示唆された結果である。

(4) 今後の展望としては、図2で示している様に(予備実験段階)角膜上皮細胞、あるいは角膜実質細胞と神経細胞の直接の共培養を試み、神経細胞が角膜細胞に与える影響を突き止めることで、さらなる角膜創傷治癒のメカニズム、特に現在完治が難しいとされる神経麻痺性角膜症などの病態解明とその治療法を神経性因子の観点から明らかにされることと期待される。

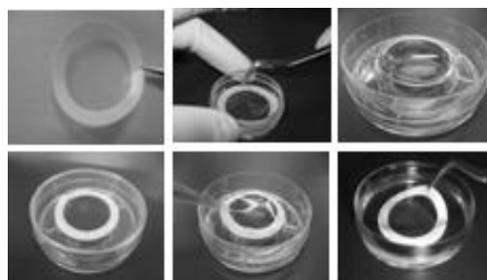


図 1

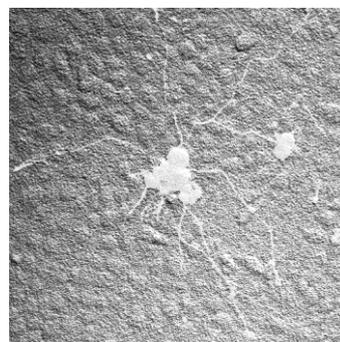


図 2

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 18 件)

①Ko J.-A., Yanai R., Chikama T.I., Nishida T. Down-Regulation of Matrix Metalloproteinase-2 in Corneal Fibroblasts by Interleukin-1 Receptor Antagonist Release from Corneal Epithelial Cells. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 査読有、in press, 2011

②Ko J.-A., Mizuno Y., Yanai R., Chikama T.I., Sonoda KH. Expression of semaphoring 3A and its receptors during mouse corneal development. Biochem. Biophysic. Res. Commun. 査読有、403、2010、305-309.

③Ko J.-A., Akamatsu Y., Yanai R., Nishida T. Effects of semaphoring 3A overexpression in corneal fibroblasts on the expression of adherens-junction proteins in corneal epithelial cells. Biochem. Biophysic. Res. Commun. 査読有、396、2010、781-786.

④ Morishige N., Ko J.-A., Morita Y., Nishida T. Expression of semaphoring 3A in the rat corneal epithelium during wound healing. Biochem. Biophysic. Res. Commun. 査読有、395、2010、451-457.

⑤Ko J.-A., Yanai R., Nishida T. IGF-1 released by corneal epithelial cells induces up-regulation of N-cadherin in corneal fibroblasts. J. Cell Physiol. 査読有、221、2009、254-261.

[学会発表] (計 7 件)

①Ko J.-A., Chikama T.I., Sonoda KH. Neural cells promotes the stratification of corneal epithelial cells by coculture system. 50th The American Society for Cell Biology, 2010, 12月13日 Philadelphia.

②Ko J.-A., Yanai R., Nishida T. IL-1RA released by corneal epithelial cells induces down-regulation of MMP-2 in cocultured corneal fibroblasts. 49th The American Society for Cell Biology, 2009, 12月6日 San Diego.

③高 知愛、柳井 亮二、森重 直行、西田 輝夫 Semaphoring 3A 強発現実質細胞による角膜上皮細胞での Adherent Junction 蛋白質の発現、第 113 回 日本眼科学会総会、2009. 4 月 16 日

④ Ko J.-A., Morishige N., Nishida T. Up-Regulation of Semaphoring 3A in Human Corneal Fibroblasts by Epidermal Growth Factor Released from Cocultured Human Corneal Epithelial Cells. 48th The American Society for Cell Biology, 2008, 12月16日 San Francisco.

⑤高 知愛、柳井 亮二、西田 輝夫 共培養による角膜実質細胞での Connexin43, N-cadherin 発現に対する角膜上皮細胞の作用、第 55 回 マトリックス研究会大会、2008. 5 月 30 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~eye/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高 知愛 (KO JI-AE)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70314797

(2)研究分担者

柳井 亮二 (YANAI RYOJI)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10346554

(3)連携研究者

なし