

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791255

研究課題名 (和文) 春季カタルの巨大乳頭形成における MCP-1 作用機序に関する検討

研究課題名 (英文) The effect of MCP-1 on the pathogenesis of giant papillae formation of the conjunctiva in vernal keratoconjunctivitis

研究代表者

藤津 揚一朗 (FUJITSU YOUICHIRO)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80448290

研究成果の概要 (和文)：春季カタルにおける巨大乳頭は、その病態形成に重要な役割を果たしている。近年アレルギー疾患においても MCP-1 の関与が示唆されている。そこで結膜線維芽細胞における MCP-1 受容体 (CCR2) の発現を確認し、MAPK などの細胞内シグナル伝達を介した反応をする事が分かった。さらに、MCP-1 により細胞増殖がその濃度依存性に亢進し、かつ細胞外マトリックスであるフィブロネクチンや procollagen type I C-peptide, III型コラーゲンなどの蛋白産生も濃度依存的に亢進させる事が分かった。

研究成果の概要 (英文)：Vernal keratoconjunctivitis is characterized by giant papilla formation. Increased expression of MCP-1 was also reported in the conjunctiva of patients with vernal keratoconjunctivitis. Human conjunctival fibroblasts express CCR2, and MCP-1 stimulates both the proliferation of and the production of extracellular matrix proteins such as fibronectin, procollagen type I C-peptide and type III collagen, in the dose dependent manner by these cells through MAPK pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：春季カタル, 巨大乳頭, MCP-1

1. 研究開始当初の背景

本研究は、アレルギー性結膜疾患、特に、有効な治療法が無く、結膜だけでなく角膜にも

病変を形成し、永続的な視力障害を来たしうる、春季カタルの病態解明を目的としている。アレルギー性結膜疾患の内、アレルギー性結

膜炎は、永続的な視力障害を残さない。しかしながら、春季カタルでは、結膜に増殖性変化である巨大乳頭を形成し、それに起因して引き起こされる角膜病変により、永続する重篤な視覚障害を生じうる。春季カタルに特徴的な巨大乳頭は、結膜線維芽細胞の増殖、細胞外マトリックスに占めるプロテオグリカンの減少およびコラーゲンの割合の増加、その中でもⅢ型コラーゲンの占める割合が増加しており、Th2 サイトカインである IL-4, IL-13 がその病態形成に重要な役割を果たしていることを報告した。また、近年ケモカインの1つである MCP-1 が種々の臓器でアレルギー疾患における病態形成に重要な役割を果たしていることが報告されており、春季カタルの病態形成にも重要な役割を演じていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の究極の目的は、春季カタルにおける巨大乳頭形成の病態を理解し、新たな治療法を開発していく事である。

3. 研究の方法

(1) ヒト結膜線維芽細胞表面に MCP-1 受容体 (CCR2) が存在していることを RT-PCR 法および Flowcytometry を用いて検出する。

(2) 受容体に結合した MCP-1 が結膜線維芽細胞において細胞内シグナル伝達を行っているか知る目的で、種々の信号伝達系蛋白のリン酸化を multiplex array 法および immunoblotting 法を用いて検討する。

(3) MCP-1 などのケモカインを培養ヒト結膜線維芽細胞に種々の濃度で添加し、比色定量法を利用した非放射性的生細胞測定システムにより細胞増殖能に与える影響について検討する。

(4) また、これらのケモカインを結膜線維芽細胞に種々の濃度で添加し、得られた上清中の procollagen type 1 C-peptide およびフィブロネクチンを測定し、これらのサイトカインがコラーゲンおよびフィブロネクチン合成に与える影響について検討する。

(5) さらに、これらのサイトカインを結膜線維芽細胞に添加して培養し、抽出した RNA を用い mRNA レベルにおける I 型コラーゲンおよびⅢ型コラーゲン mRNA の発現について検討する。

4. 研究成果

(1) 春季カタルの巨大乳頭形成における MCP-1 の作用について検討した。結膜線維芽細胞自体に、MCP-1 受容体である CCR2 の発現を認めた (図 1 A, B)。

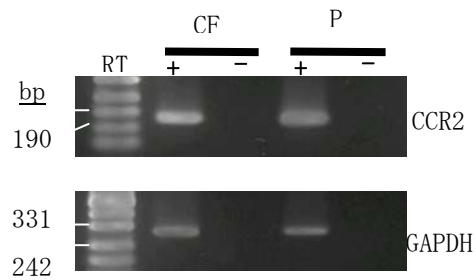


図 1 A (RT-PCR)

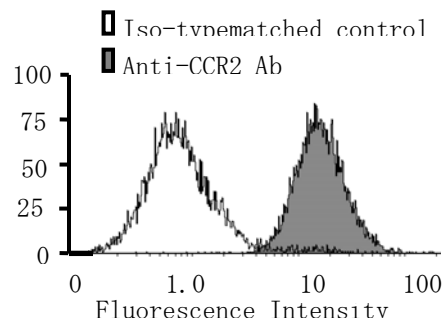


図 1 B (flowcytometry)

(2) 細胞内シグナルの解析から、MCP-1 の刺激により、ERK 1, ERK 2, p 38 MAPK, JNK のリン酸化を認めたことから、MAPK を介した直接的な反応である事が分かった (図 2)。

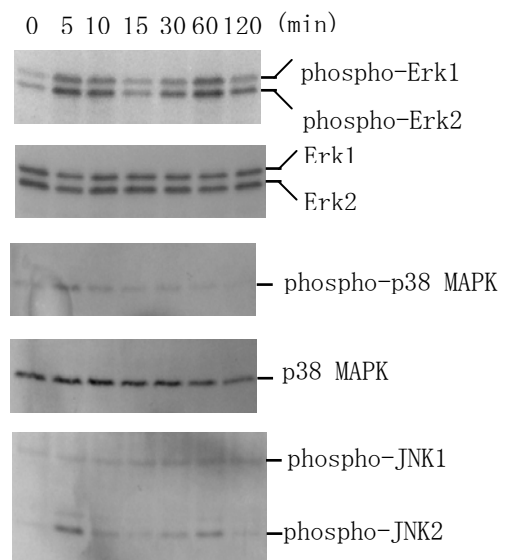


図 2 (immunoblotting)

(3) 結膜線維芽細胞をMCP-1で種々の濃度で刺激することにより、濃度依存的に結膜線維芽細胞の増殖を亢進することがわかった。MCP-1濃度10 ng/mlから無添加時に比し有意な細胞増殖を認めた。(図3)

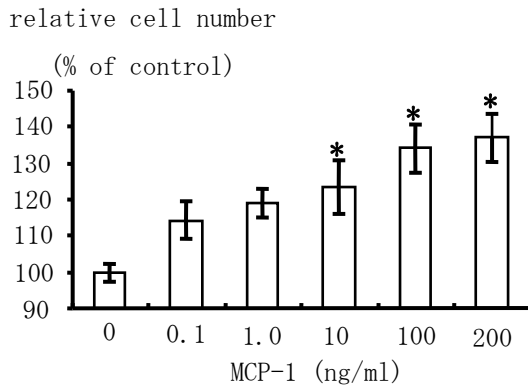


図3 (MTS Assay)

(4) MCP-1は細胞外マトリックスである procollagen type I やフィブロネクチン, III型コラーゲンなどの蛋白レベルでの産生を濃度依存的に亢進させている事が分かった(図4A, B, C)。procollagen type IはMCP-1の1.0 ng/mlの濃度から、フィブロネクチンは100ng/mlの濃度から、III型コラーゲンは、200ng/mlの濃度から有意に細胞外マトリックス産生を亢進した。

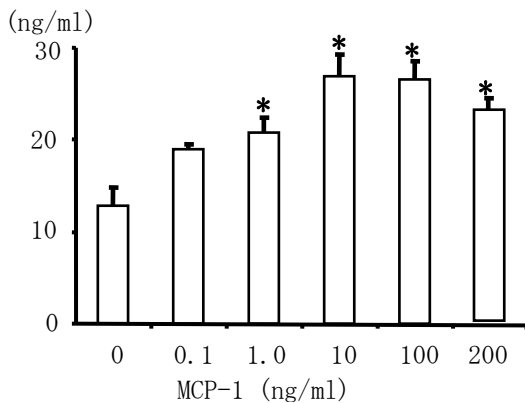


図4A (procollagen type I)

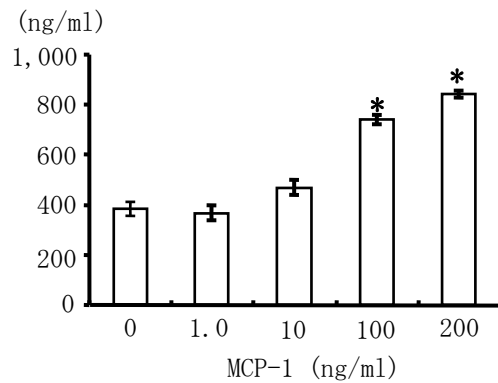


図4B (フィブロネクチン)

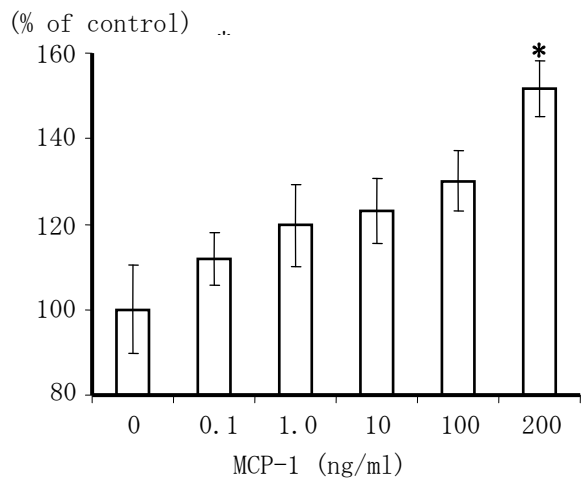


図4C (III型コラーゲン)
(+ascorbic acid)

(5) MCP-1はmRNAレベルでも、procollagen type I やフィブロネクチン, III型コラーゲンなどを濃度依存的に亢進させている事が分かった(図5A, B, C)。procollagen type I やフィブロネクチン, III型コラーゲンなど、いずれも10ng/mlの濃度から有意にmRNAの発現を亢進した。

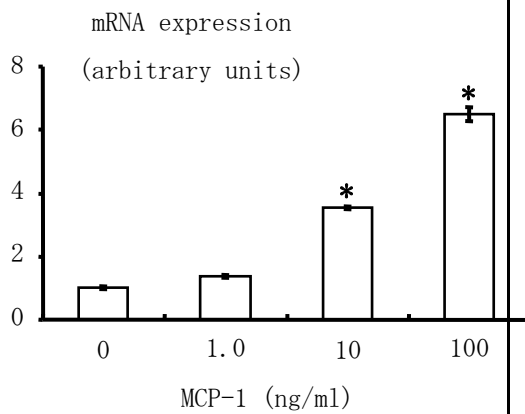


図5A (procollagen type I)

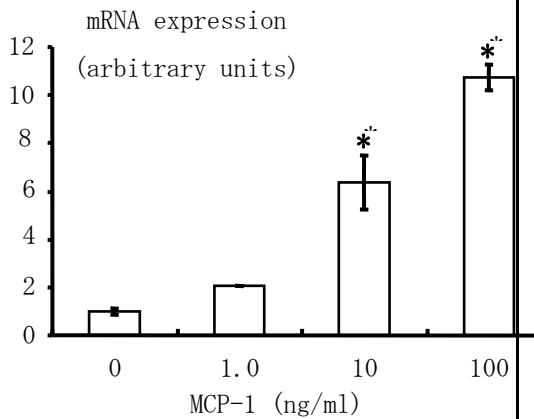


図5B (フィブロネクチン)

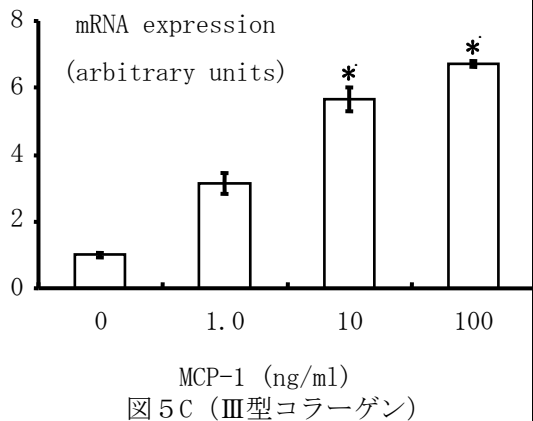


図5C (Ⅲ型コラーゲン)

本研究により、免疫細胞に対して作用すると考えられている MCP-1 が、レセプターを介して結膜組織固有の細胞である結膜線維芽細胞に直接作用し、結膜線維芽細胞を増殖させるだけでなく、細胞外マトリックスの産生も亢進させることで、結膜巨大乳頭形成などの春季カタルの病態形成に強く関与していると考えられた。MCP-1 の結膜線維芽細胞と細胞外マトリックスに対する作用を明確にしたことは、春季カタルにおける発症機序の解明に大きく寄与し、また予防や治療法の開発につながると思われる。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤津 揚一郎 (FUJITSU YOUICHIROU)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80448290

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし