

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20791256  
 研究課題名（和文）環境酸素濃度に対する角膜構成細胞の増殖、細胞死、細胞機能に関する研究  
 研究課題名（英文）Investigation of ambient oxygen concentration on cell proliferation, cell death, and cell function in corneal cells  
 研究代表者  
 柳井 亮二（YANAI RYOJI）  
 山口大学・医学部・講師  
 研究者番号：10346554

研究成果の概要（和文）：培養角膜上皮細胞は高濃度の酸素により細胞増殖が抑制され、アポトーシスによる細胞死が増加した。しかしながら低濃度の酸素では細胞増殖やアポトーシスは影響を受けなかった。低酸素透過性の CL 装用により角膜上皮の ZO-1 発現が障害されるが、高酸素透過性の CL 装用では影響されなかった。角膜上皮に対する十分な酸素供給は上皮バリアー機能を維持するために重要であるが、21%を超える高濃度の環境酸素濃度は角膜上皮を傷害する。

研究成果の概要（英文）：Hyperoxia inhibited the proliferation of, and induced death by apoptosis in cultured human corneal epithelial cells. However hypoxia did not affect cell proliferation or apoptosis in those cells. The wearing of a contact lens of low oxygen permeability affected in the pattern of ZO-1. In contrast, the wearing of a rigid gas permeable contact lens did not affect in the pattern of ZO-1. Though sufficient supply of oxygen to corneal epithelium contributes stability of the epithelial barrier of corneal epithelium, hyperoxia over 21% oxygen affects corneal epithelium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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  
 眼球の最前面に存在する角膜上皮は、眼球の

物理、化学的なバリアーとして機能するため、  
 酸素による酸化ストレスを直接受けている

組織である。酸素による影響を解明することは、角膜上皮の恒常性機構や生理作用を理解する上で重要である。角膜における酸素の役割については、これまではコンタクトレンズ装用による低酸素状態による影響について研究されており、酸素不足による角膜細胞の影響を解明することで、角膜の生理に対する理解が深まってきた。しかしながら、これまで角膜と酸素の関係を研究した研究では CL 装用などによる低酸素状態がどのように角膜へ影響するかということに主眼におかれてきたため、角膜上皮細胞あるいは角膜実質細胞などの細胞に環境酸素濃度の変化が及ぼす影響についての検討は全くなされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は環境酸素濃度の変化が角膜上皮細胞、実質細胞へ与える影響を解析することにより、より深く角膜の生理機能および CL 装用による角膜構成細胞に対する影響について理解することである。

## 3. 研究の方法

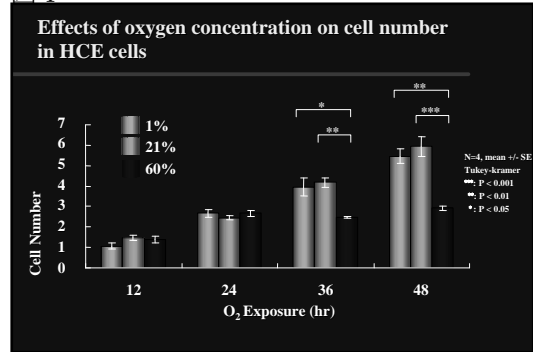
(1) SV40 を導入したヒト角膜上皮細胞を 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C で継代培養し、1, 21, 60% O<sub>2</sub> のインキュベーターで培養しその影響を解析し。

培養後に回収した細胞数の計測, BrdU の取り込みで細胞増殖を, 細胞周期の解析は抗サイクリン A, B1, D1, E 抗体を用いた Western blotting によりサイクリンの発現の程度を比較した。培養上清中の LDH 量で細胞死の程度を判定し, Annexin V 結合能を Flow cytometry により解析し, アポトーシスの程度を測定した。

(2) 日本白色家兎を用いて, 酸素透過性のないポリメチルメタクリレート (PMMA) および対照として高酸素透過性コンタクトレンズを 24 時間装用させた。24 時間後に形態学的観察は生体共焦点顕微鏡 ConfoScan を用いておこなった。過麻酔による屠殺後, 4% フォルムアルデヒドの灌流固定を行い, 角膜ブロック片を作成し, 免疫染色を行った。残りの角膜片を lysis buffer に溶出し作成したサンプルで Western Blotting, Reverse Trans-Polymerase Chain を行った。これにより, タイトジャンクション関連タンパク質の一つである ZO-1 の局在, 発現をタンパク質および RNA のレベルで評価した。

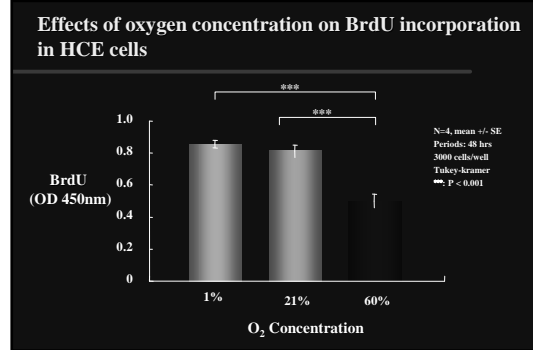
## 4. 研究成果

図 1



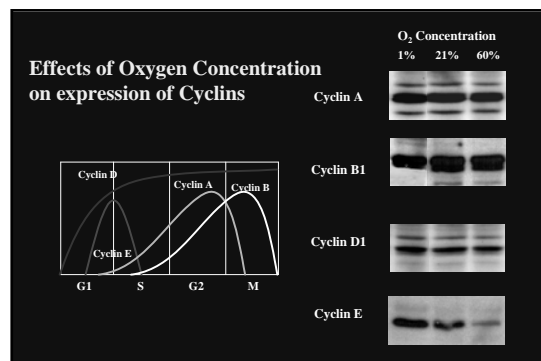
1, 21, 60%の酸素における細胞数の変化を検討した結果, 1 および 21%酸素では角膜上皮細胞は 48 時間まで時間依存的に増殖するが, 60%酸素では 24 時間以降の細胞数は増えておらず, 36 時間および 48 時間において細胞数の増加に有意な差が生じた。従って, 高濃度の酸素により細胞数の増加が抑制されることが示された。

図 2



細胞増殖能に対する酸素濃度の影響を検討すると 1 および 21%酸素に比べ 60%酸素による培養で, BrdU の取り込み量が有意に低下した。よって, 高濃度の酸素により細胞分裂が抑制され, 細胞数の増加が抑制されると考えられた。

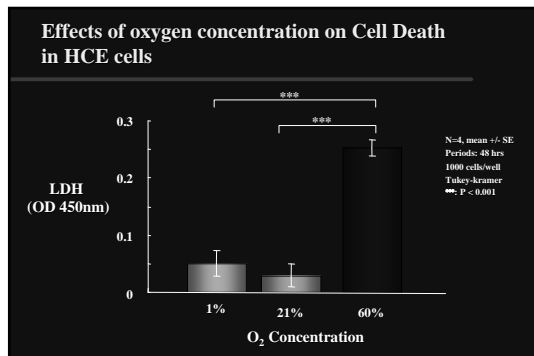
図 3



酸素濃度による細胞周期に対する影響について検討では, Cyclin A, B1, D1 は酸素濃度によらず, 一定の発現がみられるが, cyclin E は 1 および 21%酸素の場合に比べ, 60%酸

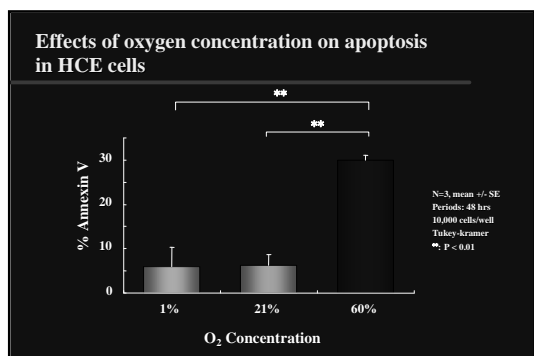
素による発現量が低下した。Cyclin E は細胞周期のうち、G1 後期から S 期の前半に増加することから、60%酸素の培養条件では 1 および 21%酸素に比べ、細胞周期のサイクルが停滞し、細胞増殖が抑えられているのではないかと考えられた。

図 4



細胞死に対する酸素濃度の影響は 1%および 21%酸素の場合に比べ、60%酸素では LDH 量が有意に増加していた。よって、60%酸素では角膜上皮細胞の細胞死が促進されていることが示された。

図 5

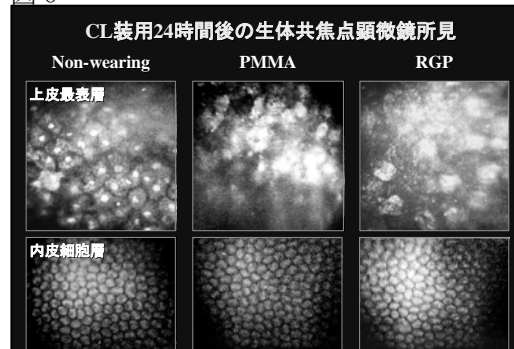


細胞死のメカニズムをさらに詳しく解明するためにアポトーシスに対する酸素濃度の影響について検討した。アポトーシスは annexin V 結合能を flow cytometry で測定した。グラフは annexin V の結合による蛍光強度が陽性だった細胞の割合を示す。1%および 21%酸素に比べ 60%酸素で annexin V 陽性率が高くなっており、apoptosis による細胞死が 60%酸素で増加していると考えられた。

以上の結果より、培養ヒト角膜上皮細胞は高濃度の酸素によって細胞増殖が抑制され、apoptosis による細胞死が促進されていることが示された。このことから高濃度の酸素による酸化ストレスにより角膜上皮細胞に対する細胞傷害を引き起こしている可能性が考えられた。

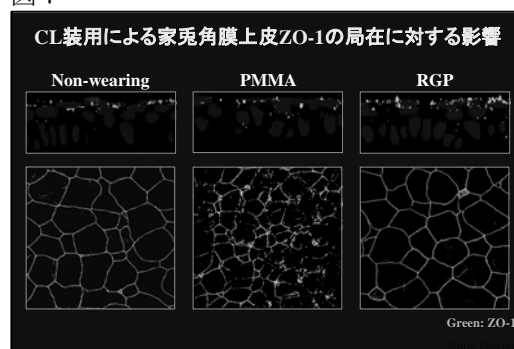
次に低酸素による in vivo における ZO-1 の発現に対する酸素濃度の影響について検討した。具体的には低酸素透過性の CL 装用による家兔角膜上皮に対する影響を細胞形態および ZO-1 の局在・発現を評価し検討した。

図 6



CL 装用 24 時間後に家兔角膜を生体共焦点顕微鏡によって観察すると上皮最表層はコンタクトレンズを装用しなかった眼 (non-wearing) では、上皮細胞は敷石状に同じ大きさの細胞が密に整列する像がみられた。PMMA 装用眼では、細胞の大きさが小さくなっているものが多く、輝度が高くなっている細胞集団や、黒く抜けた細胞集団も観察された。これらは表層細胞が脱落して、下の細胞層が観察されたり、細胞間の接着が低下して浮腫が生じているのではないかと考えられた。一方、RGP 装用眼では大きな細胞が観察され、最表層細胞の脱落が CL 装用により抑制されているのではないかと考えられた。一方、内皮細胞層では細胞の大きさや形態に CL 装用による変化は観察されず、今回の検討では内皮細胞への影響は小さいものと考えられた。

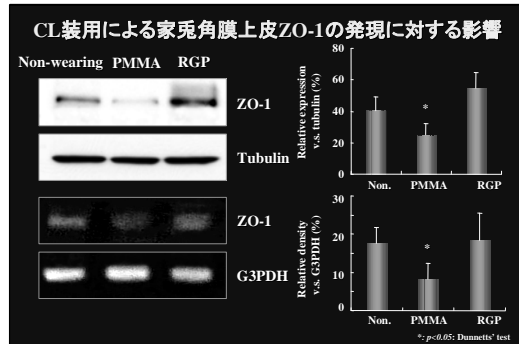
図 7



次に ZO-1 抗体を用いた免疫染色を行った。上段に角膜上皮層の冠状断、下段は上皮表層の水平断を示している。CL を装用していない群では、冠状断で ZO-1 は角膜上皮の表層部に局在し、水平断で細胞間に連続的に発現しており、スライド右の RGP 装用眼は CL を装用していない眼と同様でした。しかし、スラ

イド中央にお示しする PMMA 装用眼は冠状断で ZO-1 は角膜上皮の表層部に局在しているように観察されましたが、水平断では ZO-1 の細胞間の連続性はみられず、発現が不十分であると思われました。

図 8



さらに zo-1 の発現量を western blotting および RT-PCR で確認した。ZO-1 タンパク質の発現量は CL を装用していない場合に比べ、PMMA 群では有意に ZO-1 の発現量が低下していた。同様に ZO-1RNA の発現量も CL を装用していない場合に比べ、PMMA 群で有意に減少していた。一方、RGP 装用群ではタンパク質および RNA の両方とも ZO-1 の発現において装用無し群との有意な差はみられなかった。

今回の研究で、低酸素透過性の CL 装用により角膜上皮の ZO-1 の局在が障害されていた。しかしながら、高酸素透過性の CL 装用では ZO-1 の局在に影響はみられなかった。以上の結果から、角膜上皮のバリア機能を維持するためには酸素透過性の高い CL を装用することが重要であることが示唆された。

#### 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 2 件)

- ① Yanai R, Ko JA, Morishige N, Chikama T, Ichijima H, Nishida T, Disruption of zonula occludens-1 localization in the rabbit corneal epithelium by contact lens-induced hypoxia, Invest Ophthalmol Vis Sci., 査読有 2009, 50, pp. 4605-4610
- ② Yanai R, Liu Y, Ko JA, Nishida T, Effects of ambient oxygen concentration on the proliferation and viability of cultured human corneal epithelial cells, Exp Eye Res., 査読有 2008, 86, pp. 412-418

[学会発表] (計 3 件)

- ① Yanai R, Nishida T: Up-Regulation of ZO-1 in Cultured Human Corneal Epithelial Cells by re-oxygenation. The 4th International meeting of Clinical and Research Colloquium in Ophthalmology, Yamaguchi, Japan, 2009/3/20

- ② 柳井亮二, 権 伍勇, 高 知愛, 近間泰一郎, 西田輝夫: 再酸素化による角膜上皮細胞の ZO-1 発現に対する影響. 第 33 回角膜カンファレンス・第 25 回日本角膜移植学会, 大阪府, 2009/2/19

- ③ 柳井亮二: Myth. 1 コンタクトレンズは就寝時装用してはいけない. 第 51 回日本コンタクトレンズ学会総会, 福岡県, 2008/7/6

[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

柳井 亮二 (YANAI RYOJI)

山口大学・医学部・講師

研究者番号: 10346554

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし