

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18381

研究課題名（和文）感染による角膜内皮細胞の機能変換の病態解明

研究課題名（英文）Elucidation of pathological conditions which infection-induced functional transformation of corneal endothelial cells

研究代表者

春木 智子（HARUKI, Tomoko）

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90838153

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：水疱性角膜症は、角膜内皮細胞の機能不全により発症し、失明に至る疾患である。角膜内皮細胞の損失と間葉転換は、機能不全の大きな原因であり、老化やウイルス感染などの炎症をきっかけに誘導される。本研究では、ウイルス感染をきっかけにいかの間葉転換が起こりえるかを角膜内皮細胞を用いて明らかにした。また、このような炎症機転による内皮機能不全を防止しうる可能性のある標的探索を行った。これらの標的候補は将来の創薬候補となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

角膜のウイルス感染症や炎症性疾患は、慢性かつ再発性に発症し、角膜内皮機能不全を起こす疾患である。治療には、角膜移植が必要であるが、拒絶反応リスクや再度の機能不全を起こしやすい。予防対策を講じるには、いかにこのような病態が生じるのかを分子レベルで理解する必要があるが、これまでその機序の詳細は明らかではなかった。本研究は、その機序の一端を明らかにし、新たな治療標的を探索した。この知見をもとに、開発を進めることにより、難治性角膜疾患の視力予後を改善できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Bullous keratopathy is a disease caused by dysfunction of corneal endothelial cells, leading to blindness. Corneal endothelial cell loss and mesenchymal transition are major causes of dysfunction and are induced by inflammation such as aging and viral infection. In this study, we used corneal endothelial cells to clarify how stromal transformation can be triggered by viral infection. We also searched for potential targets that could prevent endothelial dysfunction caused by this inflammatory process. These potential targets may be candidates for future drug discovery.

研究分野：角膜感染症

キーワード：間葉転換 角膜 角膜内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴い、角膜内皮は機能不全を起こしやすい症例を散見するようになる。また、単純ヘルペス (HSV)、サイトメガロウイルス (CMV) は、眼球に感染すれば持続的かつ慢性的に再発を繰り返し、角膜内皮機能障害の大きな原因となる。これまでの研究の中で、CMV の角膜への感染により生じる角膜内皮炎は、経過が極めて長く数十年の経過後、最終的には水疱性角膜症に至るケースも多いことを明らかにしてきた。一方、こうしたウイルス感染により、何故角膜内皮細胞が機能不全を起こしていくのかその詳細は分かっていない。

そこで、ウイルス感染を制御するため、感染に対して内皮が発動する防御機構自体が内皮の性質を変えてしまい、正常な内皮の機能を発揮できなくなるのではないかと考えた。

例えば、角膜内皮細胞の機能不全の重要な機序として細胞の間葉転換がある。ヒト角膜内皮細胞を培養する場合、継代を繰り返すと、増殖能の低下とともにやがて間葉転換を起こし、線維芽細胞様に変化してしまう。この場合、もはや角膜内皮細胞の形態を再度とることはない。間葉転換は、創傷治癒の促進、アポトーシスに対する耐性、薬剤耐性、移動能といった機能を細胞に与えるが、角膜内皮細胞の場合、線維化、内皮機能不全という大きな問題を生じる。つまり、ストレスにさらされた細胞に間葉転換が起これば、増殖機能や生存を維持することと引き替えに正常機能を喪失する。

角膜内皮細胞において、間葉転換のスイッチをいれるシグナルとして角膜内皮障害を起こすような刺激群、つまり上記のような HSV や CMV などウイルスの前房内や内皮側での再燃が考えられ、さらに老化促進が加わり、内皮の機能不全をきたすのではと考えている。

これまで、培養ヒト角膜内皮細胞に HSV や CMV を感染させ、その包括的転写応答を解析してきた。いずれもその主たる応答は、抗ウイルス作用 (インターフェロン応答や抗原提示の活性化) であった。一方、二つ目の主要なネットワークは、胚発生、器官分化に関連する機能を持っていた。そこで、角膜内皮細胞は、ウイルス感染後、抗ウイルス作用に加え、このネットワークを発動し、内皮細胞自身の形や機能を変化させ、自らの命を守る機能をもつのではと考えた。炎症機序においては、間葉転換誘導に重要な役割を果たすことが知られている分子群が一端を担い、間葉転換を通じてこの機能が発動されると想定された。そこで、間葉転換を制御すれば、角膜内皮の機能不全防止の新たなストラテジーとなる可能性がある。

2. 研究の目的

水疱性角膜症は、失明をきたす疾患であり、角膜内皮の機能不全によって引き続き起こされる。そこで、角膜内皮が機能不全を起こす機序、さらにその進行を防止する対策が求められる。临床上、角膜内皮が機能不全を起こしやすい病態は、ウイルス感染、偽落屑症候群、レーザー虹彩切開術後、老化などが該当する。そこで、これらに共通する病態を想定した。その結果、老化という背景のもと、併発して発症した炎症機序が重要ではないかと考えた。临床上、ヘルペスウイルス科のウイルスは、慢性かつ再発性の炎症性病態をきたし、角膜内皮細胞の損失をきたしやすい。

しかし、ウイルス感染や加齢により、なにゆえ角膜内皮が機能不全を起こしていくのかその詳細は分かっていない。

角膜内皮の機能不全の重要な機序として細胞の間葉転換がある。ストレスにさらされた細胞に間葉転換が起これば、増殖機能や生存を維持することと引き替えに正常機能を喪失する。そこで、間葉転換を制御すれば、角膜内皮の機能不全を抑制できる可能性がある。このためには、まず、ウイルス感染を含めた外部刺激により、角膜内皮細胞が間葉転換を起こすのか、さらにそのメカニズムを解明する必要がある。さらに、間葉転換の制御ストラテジーの立案を試み、新たな治療戦略の探索につなげることを目的とする。

角膜内皮の機能不全の機序として間葉転換に着目し、間葉転換のスイッチをいれるシグナルは何かを明らかにする。次に、その機序を防止あるいはもとに戻したりすることができる可能性がある創薬ターゲットがあるのかに関して検証することを目的とする。

3. 研究の方法

培養角膜内皮細胞を用い、炎症性に間葉転換が誘導されるかどうかを検証した。そこで、まず角膜内皮細胞においてウイルス感染後、間葉転換が誘導されるのか検証を行った。この際のウイルス感染モデルには、HSV-1 感染を用いた。

間葉転換の評価には、Vimentin や E-cadherin の発現を用い、RT-PCR 及び免疫蛍光染色により評価を行った。

次に、角膜内皮細胞が、HSV 感染後、間葉転換を起こす機序の探索に入った。まず、HSV 感染後、角膜内皮細胞において、間葉転換に関連する転写ネットワークを探索候補とした。このネ

ネットワークにおいて、多くの間葉転換関連分子と有意な関連をもつ分子を Network 解析の手法で探索した。

次に、この候補遺伝子の阻害あるいは遺伝子編集を用いてその機能を阻害した。間葉転換に関与する因子として、転写因子の重要性が示唆される。転写因子の活性化評価には、結合部位のプロモーター活性を用いて評価した。プロモーター活性の評価には、ルシフェラーゼを下流にもつレンチウイルス reporter あるいはプラスミド reporter を角膜内皮細胞に transfect し評価した。

HSV 感染後の間葉転換には、Wnt 経路の活性化を想定した。このため、Wnt 経路を阻害する化合物を候補物質として、Wnt 経路のレポーター活性評価及び間葉転換の阻害作用を評価した。

4. 研究成果

角膜内皮細胞に対するウイルス感染刺激が間葉転換を起こすか検討した。これには、HSV-1 感染後の角膜内皮細胞を用いた。間葉転換の指標として Vimentin、E-cadherin の発現を用いて評価したところ、HSV 感染は、TGF- β よりも強い間葉転換誘導能を惹起した。

次に角膜内皮細胞感染刺激モデルを用いて転写ネットワーク解析を行った。まず、HSV 感染においては、角膜内皮において強いインターフェロン応答が誘導されていた。一方、間葉転換にかかわる責任分子候補としては、Wnt family member 1 (WNT1)、Notch、Smad などの分子群の関与を *in silico* で見いだした。以上より、HSV-1 感染が Wnt をはじめとする間葉転換に関わる分子群を誘導することが確認できた。

次に間葉転換に関してマスター制御因子の探索を試みた。感染後、転写ネットワークは、インターフェロン応答を主とする反応を呈する。つまり、炎症と間葉転換は関連している可能性が高い。このため、まず炎症を制御するマスター因子の候補抽出を行った。その結果、ケモカインをはじめとする多くの炎症性サイトカインを含め上流で有意に制御する因子として interferon regulatory factor 7 (IRF7) を抽出した。

上皮間葉転換においては、上皮細胞は、間葉様細胞に変化し、もとは戻らない。一方、最近では、間葉転換を起こした細胞が上皮に戻る上皮間葉可塑性の概念が提唱されている。上皮間葉可塑性は、一般に悪性腫瘍においてみられ、免疫チェックポイント阻害剤への抵抗性を賦与する。特に、上皮間葉可塑性は、抗原提示能や MHC class I の抑制を介して、こうしたホストの腫瘍免疫に対する抵抗性を獲得する重要なメカニズムであることが判明しつつある。このことを鑑みると、間葉転換を制御する上で、発動される抗原提示機能は、重要な機能である可能性が高い。

このような考えのもと、角膜内皮細胞が、HSV 感染後、抗原提示能がまず誘導されるかを検証し IRF7 の寄与を検証した。その結果、IRF7 欠損は、角膜内皮細胞の抗原提示能を完全に抑制した。さらに興味深いことに IRF7 欠損により MHC class I 発現誘導すらも抑制された。

以上より、IRF7 は、抗原提示機能の抑制からの解除機構に関与する分子であることが判明した。こうした抗原提示機能の可塑性は、上皮間葉可塑性を有する細胞の特徴でもある。

次に、IRF7 欠損が、HSV 感染により誘導される間葉転換に関連する因子群の発現に関与するかを検討した。対象には、ZEB1、ZEB2、SNAIL、SLUG、TWIST、Notch、DLL1、KLF-4、 α -SMA を検討した。間葉転換の評価には Vimentin や E-Cadherin のタンパク発現、局在を免疫染色を用いて検討した。その結果、IRF7 欠損は、ウイルス感染誘導性の間葉転換に必須であることが判明した。

一方、IRF7 が間葉転換の制御に直接寄与するのか間接的なのかの詳細は明らかではない。そこでまず転写レベルにおける寄与、転写後調節への寄与への検証を始めた。まず、HSV 感染後角膜内皮細胞における転写ネットワークモデルを用いて、IRF7 による Vimentin、E-cadherin 発現が、間接的であるのか、直接的であるのかの検討を行った。その結果、直接の転写調節の可能性は低いことが判明した。次に、間接的な調節因子の誘導を考慮して有意な関連を持つ分子の探索を行ったところ、間葉転換に寄与しうる分子 X を見だし、IRF7 により実際に誘導されることも確認した。

あわせて、間葉転換を抑制する分子の探索も平行して行った。Wnt 経路を主として抑制する化合物 A を用いて検証したところ、プロモーター活性の抑制とともに、Vimentin や E-Cadherin 発現が抑制された。このことは、この化合物 A が実際の角膜内皮細胞の間葉転換抑制に使える可能性があることを示している。

ウイルス感染後、Wnt 経路関連分子の誘導はみられた。しかし、HSV 感染後角膜内皮細胞においてみられる Wnt/ β -catenin 経路のプロモーター活性誘導は、IRF7 欠損において抑制されなかった。このことは、感染後に IRF7 を介して生じる間葉転換は、おそらく Wnt/ β -catenin 経路を介さない経路が主体であることが示唆された。

一方、ネットワーク解析においては、分子 X は、直接 Wnt 経路との直接的調節関係を認めなかった。このため、分子 X が IRF7 により誘導される Wnt 非依存性間葉転換の実際の制御因子である可能性を考えた。現在、分子 X の阻害剤あるいは過剰発現を用いて、Wnt 非依存性間葉転換の調節機能の検証を進めつつある。

まとめると、X の阻害剤や化合物 A は、角膜内皮細胞の炎症性間葉転換を制御できる可能性がある創薬標的候補として検証を進めている。

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 0件）

1. 著者名 Ohtani F, Miyazaki D, Shimizu Y, Haruki T, Yamagami S, Inoue Y	4. 巻 11
2. 論文標題 Role of interferon regulatory factor 7 in corneal endothelial cells after HSV-1 infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-95823-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------