

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18401

研究課題名（和文）Endo180が角膜実質細胞におけるコラーゲン収縮能に果たす役割

研究課題名（英文）Role for the Endo180 in collagen gel contraction mediated by corneal fibroblasts

研究代表者

高橋 彩（Takahashi, Aya）

近畿大学・奈良病院・講師

研究者番号：70460889

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：Endo180は間葉系細胞に発現し、断片化コラーゲンの取り込みに関与するコラーゲンレセプターのひとつである。本研究では、角膜線維芽細胞によるコラーゲンゲル収縮は抗Endo180抗体により有意に抑制され、Endo180が角膜線維芽細胞によるコラーゲンゲル収縮に関与していることが明らかになった。またEndo180はuPAにより切断され、コラーゲンと角膜線維芽細胞の相互作用を抑制することによりTGF β /Smad3 signalを減弱させ、SMAの発現を抑制的に制御することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

角膜は光の屈折を担う組織であり、視力の維持のためには透明であることが重要である。角膜感染症の後、角膜実質が癒着性に治癒すると角膜は混濁し視力低下をきたす。本研究では角膜実質におけるEndo180の発現や役割を明らかにして角膜実質細胞の筋線維芽細胞への形質転換やコラーゲン収縮能に与える影響を検討することで角膜実質の癒着形成や組織収縮の抑制を目的とし、将来的には角膜の不可逆的な混濁による視力予後の改善および患者のQOLの改善に役立つことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Endo180 is a receptor for collagen that mediates its cellular internalization and also known as urokinase-type plasminogen activator (uPA) receptor-associated protein (uPARAP). In this study, anti-Endo180 antibody significantly inhibited the gel contraction induced by corneal fibroblasts, suggesting that Endo180 directly participate collagen gel contraction by corneal fibroblasts. We also found that Endo180 is cleaved by uPA and attenuates TGF β /Smad3 signal by suppressing the interaction between collagen and corneal fibroblasts, and negatively regulates SMA expression.

研究分野：角膜

キーワード：Endo180 コラーゲン 角膜実質細胞 角膜線維芽細胞 uPA TGF SMA

研究課題名

Endo180 が角膜実質細胞におけるコラーゲン収縮能に果たす役割

Role for the Endo180 in collagen gel contraction mediated by corneal fibroblasts

研究成果の概要

Endo180 は間葉系細胞に発現し、断片化コラーゲンの取り込みに関与するコラーゲンレセプターのひとつである。本研究では、角膜線維芽細胞によるコラーゲンゲル収縮は抗 Endo180 抗体により有意に抑制され、Endo180 が角膜線維芽細胞によるコラーゲンゲル収縮に関与していることが明らかになった。また Endo180 は uPA により切断され、コラーゲンと角膜線維芽細胞の相互作用を抑制することにより TGF- β /Smad3 signal を減弱させ、SMA の発現を抑制的に制御することが明らかになった。

Endo180 is a receptor for collagen that mediates its cellular internalization and also known as urokinase-type plasminogen activator (uPA) receptor-associated protein (uPARAP). In this study, anti-Endo180 antibody significantly inhibited the gel contraction induced by corneal fibroblasts, suggesting that Endo180 directly participate collagen gel contraction by corneal fibroblasts. We also found that Endo180 is cleaved by uPA and attenuates TGF- β /Smad3 signal by suppressing the interaction between collagen and corneal fibroblasts, and negatively regulates SMA expression.

研究成果の学術的意義や社会的意義

角膜は光の屈折を担う組織であり、視力の維持のためには透明であることが重要である。角膜感染症の後、角膜実質が瘢痕性に治癒すると角膜は混濁し視力低下をきたす。本研究では角膜実質における Endo180 の発現や役割を明らかにして角膜実質細胞の筋線維芽細胞への形質転換やコラーゲン収縮能に与える影響を検討することで角膜実質の瘢痕形成や組織収縮の抑制を目的とし、将来的には角膜の不可逆的な混濁による視力予後の改善および患者の QOL の改善に役立つことが期待できる。

キーワード Endo180 コラーゲン 角膜実質細胞 角膜線維芽細胞 uPA TGF
SMA

1) 研究開始当初の背景

角膜は光学的に屈折性を有する臓器であり、透明性を維持することは視力を維持する上で非常に重要である。感染や外傷などで角膜実質に創傷が加わると創傷部周囲の角膜実質細胞が活性化して角膜実質の瘢痕形成および創収縮を生じて角膜は混濁し、角膜形状にも変化を生じて屈折に大きく影響をうける。過度の創収縮は不可逆的な視力低下をきたす原因となるため創収縮のコントロールをすることは角膜創傷治癒過程

において重要であると考えられる。Endo180 は別名ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体関連タンパク質(uPARAP)としても知られるマクロファージのマンノース受容体ファミリーであり、コラーゲンと結合し細胞内への取り込みに重要な役割を果たし uPA/uPA 受容体(uPAR)と複合体を形成することが明らかとなっている。我々は過去に、角膜実質細胞が分泌する uPA が細胞を介するコラーゲン分解に重要な役割を果たしていることを報告した(文献)。また、角膜実質細胞は創傷や炎症の刺激により線維芽細胞に形質転換し、さらに TGF β の刺激により筋線維芽細胞に形質転換することが報告されており、この形質転換は創収縮に深く関与していると考えられている。

2) 研究の目的

本研究では、コラーゲン受容体である Endo180 が角膜実質のコラーゲンの収縮に与える影響について検討する。また角膜線維芽細胞において Endo180 が SMA の発現調節にどのような役割を果たすかを検討して角膜実質の瘢痕形成および創収縮に与える影響を明らかにする。また Endo180 の障害が組織収縮抑制などの不可逆的な角膜混濁制御を目標とした新たな治療薬開発の標的になるかどうかを模索する。

3) 研究の方法

(ア) 本研究は近畿大学医学部動物実験委員会の承認をうけ、動物の愛護および管理に関する法律、基本指針に基づいて作成された近畿大学医学部動物実験規定に準じて実施した。

(イ) uPA 遺伝子欠損マウス(uPA^{-/-})及びその野生型マウス(uPA^{+/+})から分離培養(文献)した角膜線維芽細胞を培養して用いた。

(ウ) 角膜実質細胞のコラーゲン収縮モデルの作成

野生型マウスの角膜実質細胞をコラーゲングル内に3次元培養し、抗 Endo180 抗体(0, 0.02, 0.2, 2 μ g/mL)を含む血清無添加 MEM 培養液を重層して5日間コラーゲングルを浮遊培養後、ゲルの面積変化を計測した。

(エ) Western blot 法

uPA 遺伝子欠損マウス(uPA^{-/-})及びその野生型マウス(uPA^{+/+})の角膜線維芽細胞において Endo180 の発現形式を検討した。また、SMA および TGF β 1 の発現についても検討した。抗 Endo180 抗体、抗 uPAR 抗体を添加し、SMA および TGF β 1 の発現変化について検討を行った。

(オ) 蛍光免疫染色

実験動物は uPA^{+/+} と uPA^{-/-} マウスを用いた。角膜実質に非穿孔性の外傷を作成し、1日後、4日後の組織切片を作成して、創部に発現する SMA および p-smad3 について蛍光免疫染色で検討した。

(カ) 統計解析

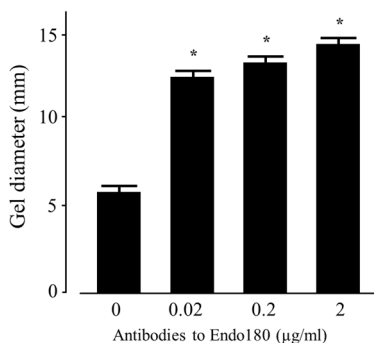
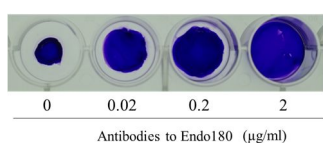
データは平均値 \pm 標準誤差で表した。統計学的有意差検定は Dunnett comparison

test、unpaired Student's t test および two-way ANOVA で行った。

4) 研究成果

抗 Endo180 抗体によるコラーゲンゲル収縮抑制作用

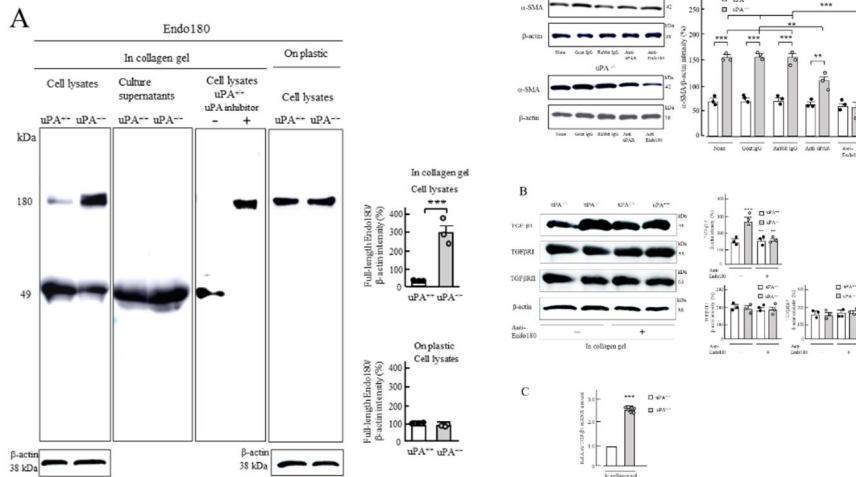
Endo180 が角膜線維芽細胞を包埋したコラーゲンゲルの収縮に及ぼす影響を検討するため、抗 Endo180 抗体を濃度別に添加してゲル収縮の程度を検討したところ、抗 Endo180 抗体の濃度依存性にゲルの収縮が抑制された。このことから、Endo180 はコラーゲンゲルの収縮に促進的に働くことが明らかとなった。



論文 から引用

uPA 遺伝子欠損マウス (uPA^{-/-}) 及びその野生型マウス (uPA^{+/+}) から分離培養した角膜線維芽細胞を用いて、uPA による Endo180 及び uPAR、TGF β 、SMA 発現の調節に果たす役割を検討した。コラーゲンの影響についても検討するため、角膜線維芽細胞をゲル内培養とプラスチック上培養に分けて比較検討した。

全長 Endo180 (180 kDa) は uPA^{+/+} のゲル内培養ではわずかに検出できなかったが uPA^{-/-} では多量に検出した。一方、低分子量の Endo180 (49kDa) は uPA^{+/+} のゲル内培養では uPA^{-/-} と比較して多く発現していた。プラスチック上培養では全長 Endo180 が uPA^{-/-}、uPA^{+/+} 間で発現の差はなく、低分子量の Endo180 の発現は認めなかった。このことからコラーゲン培養下で uPA は全長 Endo180 を減少させ低分子量の Endo180 の発現を増加させることが明らかとなった。またこの作用は uPA inhibitor によって阻害され uPA の働きにより調節されていると考えられた。さらに uPAR と Endo180 がコラーゲンゲル内培養下で SMA および TGF β の発現に關与するかどうかを検討した。uPA^{+/+} と比較して uPA^{-/-} で SMA の発現量は増加し、TGF β も亢進していた。抗 Endo180 抗体の添加により、uPA^{-/-} の SMA 及び TGF β の発現は有意に抑制された。また TGF β の受容体 (TGF β R1 および TGF β R2) に対しては uPA^{-/-}、uPA^{+/+} 間で発現の差はなく、抗 Endo180 抗体の添加によっても影響がなかった。TGF β シグナル伝達阻害剤は、uPA^{-/-} の Smad3 リン酸化および SMA 発現を有意に抑制した。その結果 uPA の欠損がコラーゲンと Endo180 の間の相互作用を促進し、TGF β シグナル伝達を介した SMA の発現を増加させる可能性が示唆された。



文献 から引用

uPA^{+/+}と uPA^{-/-}マウスの角膜実質に非穿孔性の外傷を作成し、1日後、4日後の組織切片を作成して、創部に発現する SMA および p-smad3 について蛍光免疫染色を行った。コントロールとして創を作成しない uPA^{+/+}と uPA^{-/-}マウスについても同様に染色を行った。その結果コントロールでは、SMA と p-smad3 とも染色されず、vimentin は角膜実質で染色がみられたが、uPA^{+/+}と uPA^{-/-}で差異は認めなかった。SMA は1日後では uPA^{+/+}と uPA^{-/-}ともに淡く染色され、4日後では増強した。uPA^{-/-}では uPA^{+/+}と比較してより発現の増強がみられた。p-smad3 も同様、1日後では uPA^{+/+}と uPA^{-/-}ともに淡く染色され、4日後では増強した。uPA^{-/-}では uPA^{+/+}と比較してより発現の増強がみられた。

以上のことから角膜実質細胞において uPA は Endo180 と uPAR を介して TGF および smad3 系を抑制し SMA の発現を抑制的に制御する可能性が示唆された。

5) 文献

Sugioka K, Kodama-Takahashi A, Yoshida K, Aomatsu K, Okada K, Nishida T, Shimomura Y. Extracellular Collagen Promotes Interleukin-1 -Induced Urokinase-Type Plasminogen Activator Production by Human Corneal Fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017 Mar 1;58(3):1487-98.

Sugioka K, Kodama A, Yoshida K, Okada K, Mishima H, Aomatsu K, Matsuo O, Shimomura Y. The roles of urokinase-type plasminogen activator in leukocyte infiltration and inflammatory responses in mice corneas treated with lipopolysaccharide. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014 Jul 24;55(8):5338-50.

Nishida K, Sugioka K, Murakami J, Kodama-Takahashi A, Nanri I, Mishima H, Nishida T, Kusaka S. Requirement of collagen receptor Endo180 for the promotion of collagen gel contraction by corneal fibroblasts. *Exp Eye Res.* 2020;191:107933.

Sugioka K, Nishida T, Kodama-Takahashi A, Murakami J, Mano F, Okada K, Fukuda M, Kusaka S. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) negatively regulates α -smooth muscle actin expression via Endo180 and the uPA receptor in corneal fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2022;323:104-115

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 1. 著者名 Nishida Koichi, Sugioka Koji, Murakami Junko, Kodama-Takahashi Aya, Nanri Isamu, Mishima Hiroshi, Nishida Teruo, Kusaka Shunji | 4. 巻 191 |
| 2. 論文標題 Requirement for the collagen receptor Endo180 in collagen gel contraction mediated by corneal fibroblasts | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Experimental Eye Research | 6. 最初と最後の頁 107933 ~ 107933 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2020.107933 | 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 - |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 1. 著者名 Sugioka Koji, Nishida Teruo, Kodama-Takahashi Aya, Murakami Junko, Mano Fukutaro, Okada Kiyotaka, Fukuda Masahiko, Kusaka Shunji | 4. 巻 323 |
| 2. 論文標題 Urokinase-type plasminogen activator negatively regulates -smooth muscle actin expression via Endo180 and the uPA receptor in corneal fibroblasts | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology | 6. 最初と最後の頁 C104 ~ C115 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpcell.00432.2021 | 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|