

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592244

研究課題名（和文）

喫煙による涙腺・眼表面ダメージのメカニズム解明

研究課題名（英文）

Assessment of the lacrimal and ocular surface damage mechanism related to smoking

研究代表者

村戸 ドール（MURAT DOGRU）

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：60385284

研究成果の概要(和文):喫煙は多くの疾患や健康被害の原因や増悪因子として考えられており、特に肺における閉塞性肺疾患や肺癌などの影響がよく知られている。眼表面は肺と同じくタバコの煙を含め外界からの影響を受けている。シトクロム P450(CYP)酵素系は眼表面に存在し、外因子に伴う障害を防ぐ作用も知られているが CYP1A1 および CYP2A6 系は肺癌発症に関係することも報告されている。我々は6週齢雄SDラットをチャンバー内に入れ、シリンジを用いてチャンバー内に主流煙を添加することにより曝露した。曝露後、フルオレセイン染色液を用いて蛍光染色法により角膜障害を、綿糸法により涙液量を測定した。次に角膜および涙腺を摘出し、シトクロム P450 (P450) 1A1, P4501B1 および 2B2 の mRNA 発現変動をリアルタイム PCR 法により測定した。タバコ煙曝露ラットは角膜上皮障害が生じ、涙液量の著大な低下が認められた。角膜の免疫染色において角膜上皮障害を示す CYP1A1 および 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine の酸化ストレスにより発現が上昇することが認められた。これらの結果は喫煙が角膜だけでなく涙腺にも影響したことを示唆する。

研究成果の概要(英文): Smoking is a serious public health problem around the world and causes many diseases such as chronic obstructive pulmonary disease, lung cancer, and some eye diseases. Cytochrome P450s (CYPs) are xenobiotic metabolizing enzymes and are distributed in the corneas, protecting the ocular surface against chemical compounds in the environment. Although CYPs are principally detoxification enzymes, CYP1A1 and CYP2A6 are known to participate in the induction of lung cancer by smoking. We studied the participation of CYPs in corneal dysfunction caused by exposure to mainstream cigarette smoke (MCS) in a smoking rat model. Six-week-old male Sprague-Dawley rats were exposed to MCS. Exposure to MCS caused corneal damage and lacrimal gland dysfunction. Immunohistochemical analysis revealed that CYP1A1 expression was upregulated in the corneal epithelium and ducts of the lacrimal glands, accompanied by an increase in production of reactive oxygen species (ROS). An increase in 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, which is a marker of oxidative DNA damage, was detected only in areas where CYP1A1 was expressed, whereas the level of hexanoyl-lysine adduct, which is an initial marker of oxidative damage of phospholipids, did not increase. Exposure to MCS damaged the corneas

and lacrimal glands probably through DNA oxidation by ROS produced by CYP1A1. Although the influence of other components in MCS remains unclear, CYPs, especially CYP1A1, probably participate in corneal damage and lacrimal gland dysfunction induced by smoking.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

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

眼表面は外界に接しているため、紫外線、気流、酸素、自動車の排気ガスを含む多種の化学物質など、様々な影響を受けている。また喫煙は日常的に行われているため、喫煙による主流煙や副流煙は眼球表面に影響を与える環境因子として大きなものの一つと考えられる。喫煙は多くの疾患の原因や増悪因子として考えられており、特に肺における喫煙の影響に関する研究は広く行われている。喫煙はドライアイの危険因子であることも指摘されてきたが眼球表面は肺と同じく外界からの影響を受けているにもかかわらず、研究は進展していない。

2. 研究の目的

受動喫煙モデル(ラット)を作成し、喫煙が涙液機能、眼表面および涙腺に与える影響・障害のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

6週齢雄SDラットをチャンバー内に入れ、シリンジを用いてチャンバー内に主流煙を添加することにより曝露した。5日間曝露後、

1%フルオレセイン染色液を用いて蛍光染色法により角膜障害を、綿糸法により涙液量を測定した。次に角膜および涙腺を摘出し、MMP-9、ヘムオキシゲナーゼ-1、シトクロムP450(P450)1A1, P4501B1および2B2における免疫染色を行い、またこれらのmRNA発現変動をリアルタイムPCR法により測定した。

4. 研究成果

タバコ煙暴露ラットは角膜上皮障害が生じ、涙液量の著名な低下が認められた(図1a:タバコ煙非暴露ラットの角膜フルオレセイン写真でわずかな上皮障害を認めるのに対し、1bに示すタバコ煙暴露ラットでは著しい角膜上皮障害を認めた。図1cは煙暴露に伴い上皮障害スコアの増加、図1では涙液量の経時的低下を示している。)このことは喫煙が角膜だけでなく涙腺にも影響したことを示唆する。

角膜において角膜上皮障害を示すマトリックスメタロプロテアーゼ-9(MMP-9)および酸化ストレスにより発現が上昇するヘムオキシゲナーゼ-1の上昇が認められた。喫煙者肺で強い発現上昇が認められるシトクロムP450(P450)1A1の発現が強く増大しており、

P4501B1 および 2B2 の発現も数倍増大していた。(図 2a は RT-PCR による臓器の P4501A1 の発現の写真である。C は cornea, L は liver, S は salivary gland, K は kidney, A は adrenal gland, Lg は lacrimal gland の略である。図 2b は肺組織、c は肝臓 d は角膜、e は涙腺での P4501A1 の発現を示している)。涙腺においてはリゾチーム発現が低下しており、涙腺に障害が起こっていることが示唆され、P4501A1 の発現も 4 倍程度の上昇が認められた。これらの結果は組織の免疫染色によっても確認された。涙液量の低下および涙腺における P4501A1 発現の増大が認められたことより、喫煙処理が角膜だけでなく涙腺にも影響を与えることが明らかになった。P4501A1 の発現量増大は角膜および涙腺の障害に関与し、これには酸化ストレスの上昇が関係していると考えられた。

図 1

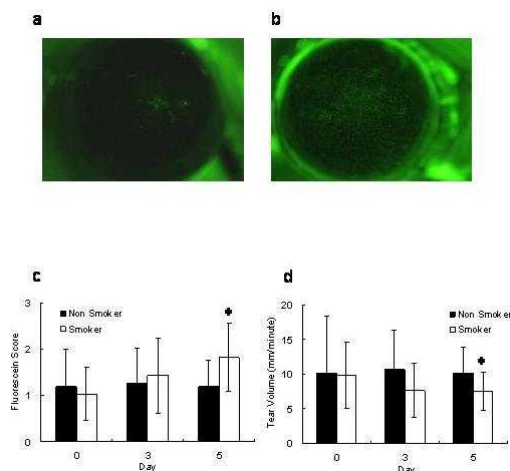
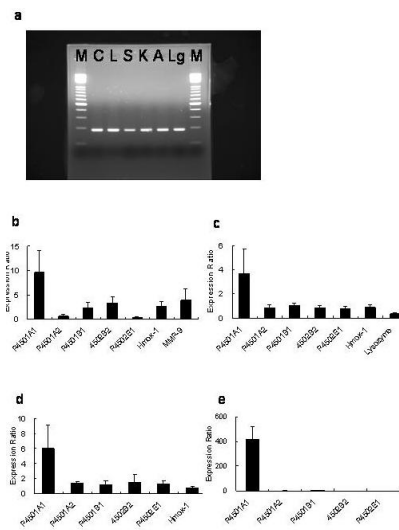


図 2



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 1 件)

Higuchi A, Ito K, Dogru M, Kitamura M, Mitani F, Kawakita T, Ogawa Y, Tsubota K. Corneal damage and lacrimal gland dysfunction in a smoking rat model. *Free Radical Biology and Medicine* 査読有 Vol.51, 2011, 2210-2216

〔学会発表〕(計 2 件)

樋口明弘. 喫煙による眼球表面への影響. 2011年日本角膜カンファレンス, 2011年2月17-19日, 東京

樋口明弘. ラットおよび NOD マウスにおける喫煙の影響. 第 19 回シェーグレン症候群学会, 2010 年 9 月 9-10 日, 東京

〔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

村戸 ドール (MURAT DOGRU)
慶應義塾大学・医学部・特任准教授
研究者番号：60385284

(2)研究分担者

樋口 明弘 (HIGUCHI AKIHIRO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20383755

(3)連携研究者

北村 正敬 (KITAMURA MASANORI)
山梨大学・医学部・教授
研究者番号：90333062