

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16886

研究課題名（和文）Peroxi redoxin6の角膜上皮障害とドライアイにおける保護効果の解明

研究課題名（英文）Investigation into the Protective Effects of Peroxi redoxin 6 on Corneal Epithelial Damage and Dry Eye

研究代表者

柴田 哲平（SHIBATA, Teppei）

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：70746700

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）：Prdx6点眼の角膜創傷治癒への影響をみた実験では家兎の角膜上皮欠損を作製し、Prdx6点眼とコントロール点眼を行うとPrdx6点眼はコントロール点眼に比べて角膜創傷治癒の促進効果があった。次にPrdx6投与による酸化ストレスに対する角膜上皮保護効果を解析するため角膜上皮細胞を高浸透圧にてストレスを与えた後Prdx6投与すると酸化ストレスの産生と細胞生存率の減少が有意に抑制されていた。次にヒト涙液においてPrdx6量を健康人とドライアイ患者で比較検討するためシルマー法で採取した涙液とマイクロピペットで採取した涙液でのPrdx6RNA量の比較をしたがほとんど大きな差はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

角膜上皮欠損に対してPrdx6点眼は角膜創傷治癒の促進効果があり、外傷やドライアイによる角膜びらんの治療におけるPrdx6点眼が有用な可能性がある。ヒトの角膜上皮細胞における酸化ストレスに対してPrdx6投与すると酸化ストレスの産生と細胞生存率の減少が有意に抑制されており、Prdx6がドライアイやUV、外傷における角膜上皮での酸化ストレス形成を阻害し、角膜上皮を保護する作用が確認されたため、Prdx6点眼は上記の酸化ストレスが原因の角膜上皮障害に対して効果的な可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In an experiment investigating the effect of Prdx6 eye drops on corneal wound healing, corneal epithelial defects were induced in rabbits, followed by administration of Prdx6 eye drops and control eye drops. The results showed that Prdx6 eye drops had a more pronounced effect on promoting corneal wound healing compared to the control eye drops. Next, to analyze the protective effect of Prdx6 administration against oxidative stress on corneal epithelial cells, cells subjected to high osmolarity-induced stress were treated with Prdx6. This treatment significantly suppressed the production of oxidative stress and the decrease in cell survival rate. Furthermore, to compare Prdx6 levels in human tear fluid between healthy individuals and dry eye patients, tear fluid was collected using the Schirmer I test and micropipettes. The comparison of Prdx6 RNA levels in these samples revealed no significant differences.

研究分野：ドライアイ

キーワード：抗酸化作用 ドライアイ 創傷治癒 角膜

## 1. 研究開始当初の背景

眼表面は物理的、化学的、生物的刺激要因によるストレスを受ける。酸化ストレスは眼疾患の発症、増悪因子であるが、ドライアイ (DED) においても外的、内的要因で生じた酸化ストレスがその発症要因の 1 つである。DED や薬物毒性など生じる角膜表面の傷害は、点眼や軟膏などで治癒するが、ときに遷延性角膜上皮障害、欠損に陥ることがある。抗酸化酵素である Peroxiredoxin (Prdx6) は細胞内で活性酸素種の消去、アポトーシスの抑制作用がある。Prdx6 の角膜創傷治癒効果と角膜・涙液における Prdx6 の役割を解明し難治性角膜障害や DED に対する Prdx6 の新たな治療薬としての可能性を明らかにする。

## 2. 研究の目的

眼表面で生じた酸化ストレスに対し、抗酸化タンパク Prdx6 の保護効果を明らかにし、角膜・涙液における Prdx6 の役割を解明する。我々の研究室では、水晶体において、Nrf2 抗酸化シグナルの活性化により Prdx6 発現が誘導されることを明らかにしている。

現在、Prdx6 の抗白内障効果や皮膚創傷治癒効果に関する報告はあるが、角膜障害に関する報告はわずかで、涙液や DED に関する報告はないため、学術的独自性がある研究といえる。

また、Nrf2 シグナルを活性化させる薬物やサプリメントの摂取により、Prdx6 の角膜上皮での発現上昇及び涙液分泌増加が誘導されれば、DED 治療に有効である可能性もある。本研究により、DED や種々の酸化ストレスが誘発する角膜障害に対する Prdx6 の有効性、および角膜と涙液における Prdx6 の役割を解明する。

## 3. 研究の方法

His-tag 融合蛋白に付加した TAT-Prdx6 を使用する。この TAT が担体となり蛋白が濃度依存性に細胞膜を通過することを可能にする。

本研究では、Prdx6 の SUMO 修飾を受ける領域を変異させ抗酸化能を増強させた融合蛋白 (Prdx6K122/142R) を使用した。HCEC は、不死化培養株 (hTCEpi) を使用する。Cell scratch assay にて創傷治癒を惹起し、TATPrdx6 (WT), Prdx6K122/142R, 陰性コントロールの Mutant 蛋白 (Mut-Prdx6) を投与し、その後、継時的に細胞遊走能を解析する。hTCEpi に 0-100mJ/cm<sup>2</sup> の UV-B 照射前後に、WT, Prdx6K122/142R, Mut-Prdx6 を培養液に添加する。48、96 時間後に細胞生存率と毒性を MTS アッセイと乳酸脱水素酵素 (LDH) アッセイで、アポトーシスを TUNEL アッセイで評価する。Prdx6 投与による HS 誘発性酸化ストレスに対する角膜上皮保護効果を解析する。Prdx6-KO および Prdx6 投与による角膜上皮障害に対する影響を解析する。

Prdx6-KO とコントロールのワイルドタイプマウスを用い、角膜に UVB 照射 (200-400mJ/m<sup>2</sup>) する。白色家兔の角膜表面に N-heptanol を塗布して、角膜上皮に一定面積の上皮欠損を作製する。ヒト涙液の Prdx6 発現量と DED との関係を解析する。

同意を得た DED20 名、非 DED20 名の患者より、涙液サンプルを採取し、ドライアイスにて凍結保存する。涙液の Prdx6 蛋白量の定量は、サンドイッチ ELISA 法により行う。角膜上皮障害の程度、性別、年齢、糖尿病の有無などで、Prdx6 発現量の変化を統計学的に解析する。DED ラットモデルの角膜上皮障害に対する Prdx6 点眼の効果解析する。

体重 200-250g の 5-6 週齢の Sprague-Dawley ラットを使用する。スコポラミン注射による DED 動物モデルを作製する。

9 匹のラットに 0.1 mL (15 mg/mL) のスコポラミンを 1 日 3 回 Osmicpump より 5 日間皮下投与する。3 匹ずつ 3 群に分け、TAT-Prdx6 (WT), prdx6K122/142R, Mut-Prdx6 を注射の 3 日後より、5 日間 1 日 3 回点眼し、角膜フルオレセイン染色 (CFS) スコア、涙液 MUC5AC、および LDH レベルを測定する。

#### 4 . 研究成果

Prdx6 点眼の角膜創傷治癒への影響をみるため、白色家兎の角膜表面に N-heptanol を塗布し、角膜上皮に一定面積の上皮欠損を作製した。1 日 2 回 TAT Prdx6(WT)、Prdx6K122/142R、陰性コントロールの MutPrdx6 を点眼し、1 日 1 回前眼部のフルオレセイン生体染色像を撮影し、角膜上皮のバリアー機能を解析するため電気抵抗値を測定し、創傷治癒面積と電気抵抗値、Prdx6 ノックアウトおよび Prdx6 の点眼投与が創傷治癒過程におけるバリアー機能回復に与える影響を解析した結果、TAT-Prdx6(WT)、Prdx6K122/142R 点眼を施行した家兎にフルオレセイン染色にてコントロールに比べて創傷治癒の促進効果があり、電気抵抗値でもコントロールに比べて数値の正常化が速かった。また、Prdx6 投与による HS 誘発性酸化ストレスに対する角膜上皮保護効果を解析した。培養ヒト不死化角膜上皮細胞 (hTCEpi) を使用し、HS-DED モデルとして、hTCEpi を 450mOSM の培地 (HS+ or -Prdx6) で Prdx6(+)(HS+Prdx6 群)あるいは Prdx6(-)(HS-Prdx6 群)にて ROS 産生と HMOX1 と COX2 の発現をみた実験において、HS Prdx6 群では ROS 産生が増加し細胞生存率が有意に減少したが、HS+Prdx6 群では、ROS 産生と細胞生存率の減少が有意に抑制されていた。

HS-Prdx6 群では、HMOX1 と COX2 発現が有意に上昇したが、HS+Prdx6 群では、その発現の増加が有意に減少した結果が得られた。ヒト涙液において Prdx6 量が健常人とドライアイ患者での比較検討まずは涙液量から Prdx6 を抽出する方法でなにか適しているかを確認するため、シルマー法で採取した涙液と毛細管圧を利用したマイクロピペットで採取した涙液での Prdx6 量の比較をした。方法は RtPCR にて Prdx6 の RNA 量の比較をするとほとんど大きな差はなかった。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Teppei Shibata, Masahito Ikawa, Ryo Sakasai, Yasuhito Ishigaki, Etsuko Kiyokawa, Kuniyoshi Iwabuchi, Dhirendra P Singh, Hiroshi Sasaki, Eri Kubo	4. 巻 196
2. 論文標題 Lens-specific conditional knockout of tropomyosin 1 gene in mice causes abnormal fiber differentiation and lens opacity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mechanisms of Ageing and Development	6. 最初と最後の頁 111492
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mad.2021.111492	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 該当する

1. 著者名 Teppei Shibata, Yusuke Seki, Yukiya Seida, Tsuyoshi Yoshita, Shunsuke Tsuchiya, Hiroshi Sasaki, Eri Kubo	4. 巻 34
2. 論文標題 Progressive hyperopic refractive changes after posterior capsule tear following blunt ocular trauma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology Case Reports	6. 最初と最後の頁 102032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoc.2024.102032	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴田哲平
2. 発表標題 角膜上皮創傷治癒に及ぼすPrdx6点眼の有効性
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田哲平、萩原健太、中津川宥衣、丸山美貴、柴田奈央子、柴田伸亮、水戸毅、久保江理、佐々木洋
2. 発表標題 低加入度数分節型眼内レンズの偏心により術後近視化を生じた3症例
3. 学会等名 第75回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田哲平, 石田秀俊, 柴田伸亮, 佐々木洋, 久保江理
2. 発表標題 白内障モデルラットにおける最終糖化産物(AGE)の局在
3. 学会等名 第60回日本白内障学会総会・第47回水晶体研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田哲平, 生駒透, 佐々木洋, 久保江理
2. 発表標題 水晶体の糖化・熱ストレスによる水晶体弾力性変化の測定
3. 学会等名 第350回金沢眼科集談会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柴田哲平
2. 発表標題 術後後囊混濁(PCO)の研究手法 - これからPCO研究を開始するには?
3. 学会等名 第62回日本白内障学会総会・第49回水晶体研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柴田哲平, 柴田伸亮, 武田峻, 佐々木洋, 久保江理
2. 発表標題 水晶体上皮細胞におけるPeriostinの機能解析
3. 学会等名 第127回日本眼科学会総会
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------