

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592571

研究課題名(和文) 神経-角膜上皮細胞の共培養システムによる神経麻痺性角膜症の病態解明

研究課題名(英文) Analysis of neuroparalytic keratitids using coculture system of neural and corneal epithelial cells

研究代表者

高 知愛 (Ji-Ae, Ko)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・講師

研究者番号：70314797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲン膜を用いた共培養系で、神経細胞と角膜上皮細胞の共培養を行った結果、神経細胞の存在により、角膜上皮細胞の最も重要な機能であるバリアー機能の為に上皮細胞の重層化が促進されることを明らかにしました。さらに、それに伴って、接着タンパク質であるN-cadherinの発現を増加していることを見出しました。このような結果は三叉神経から分泌される神経ペプチド、substance P あるいは、CGRPの刺激によっても同様でした。このようなことから、角膜上皮細胞の重要な機能には神経細胞の存在、特に神経細胞から分泌される神経ペプチドが重要であることを明らかにし、この共培養系の有用性を確認できました。

研究成果の概要(英文)：With the use of a coculture system based on a collagen vitrigel membrane, we have investigated the effects of neural cells on human corneal epithelial (HCE) cells. We found that the presence of neural cells promoted the stratification of HCE cells as well as up-regulated expression of the junction protein N-cadherin. These effects of neural cells were mimicked by conditioned medium prepared from differentiating PC12 cells or by neuropeptides (substance P and CGRP) released from trigeminal nerve cells. Furthermore, antagonists of these neuropeptides inhibited the stimulatory effects of trigeminal neurons on the stratification of and N-cadherin expression by HCE cells. Our results thus indicate that neuropeptides released from trigeminal neurons up-regulate N-cadherin expression in and promote the stratification of corneal epithelial cells, and they therefore suggest that such neurons may play an important role in the maintenance of corneal homeostasis and repair of corneal damage.

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

- (1) 角膜は、生体内でもっとも神経終末の密度の高い組織である。これらの細胞はそれぞれ、発生学的由来が大きく異なるにも関わらず、角膜の最も重要な生理機能であるその透明性の維持、上皮細胞によるバリアー機能などに重要であり、近年、申請者の研究から角膜上皮細胞-実質細胞の相互作用については様々なことが明らかになってきた。そこで、神経細胞(神経線維)の角膜生理機能維持に対する役割は重要であるが、そのメカニズムは未知であるため、解明の必然性が課題になっている。
- (2) 角膜への知覚神経支配は角膜の構造維持や創傷治癒に大きな役割を果たしている。臨床的にも角膜知覚が低下している症例では、角膜上皮の創傷治癒が遅延し、いわゆる神経麻痺性角膜症を発病する。しかし、何らかの神経因子の関与は想定できるが、その究極な治療法などは未だに確立されていない。
- (3) 近年、培養細胞内に生体内環境を付与することを目指して、「コラーゲンビトリゲル膜」が開発され、さまざまな組織において再生医療あるいは創薬研究への応用に向けての *in vitro* の細胞間の情報交換の解明の研究が進められている。
- (4) 実際、申請者の最近の研究で、角膜上皮細胞と実質細胞の相互作用を調べ

るために、コラーゲンビトリ膜を用い共培養を試み、互いの細胞の存在下で角膜上皮細胞ではタイトジャンクション蛋白質の発現、実質細胞では Connexin43, N-cadherin の発現、つまり、接着因子の発現に影響を与えることとその発現の制御に関わっている因子 (IGF-1, EGF など) を明らかにしている。

## 2. 研究の目的

本研究の究極の目的は、*in vitro* での角膜再生およびその正常構造と機能の維持機構を明確にし、角膜再生の条件を突き止めること、さらに、神経麻痺性角膜症の様な疾患に対して、その病態解明をすることとする。この様な目的を達成する以下の様に平成 23 年度～25 年度に渡り、その成果を成している。

- (1) 神経細胞から角膜上皮細胞に作用する因子の同定; 共培養系において、神経細胞の有無で角膜上皮細胞内で現れる現象を見出して、そこから想定できる、つまり、影響に関わっていると今までの報告から思われる既知の因子に対して、その培養液中に追加、あるいは inhibitor の処理など、conditioning medium を用い、角膜上皮細胞内での分化マーカーなどの蛋白質の発現変化、あるいは生理現象での変化などを明らかにし、その調節機構を明確にする。
- (2) 共培養における神経細胞と培養環境との関係; 共培養内で動いている因子を同定した上で、その影響に加わって実際に生理現象に近い環境での影響、つまり酸素など

が神経細胞と角膜上皮細胞の共存の際に与える影響を明らかにする。

### 3. 研究の方法

- (1) 株化神経細胞(PC12)と角膜上皮細胞との共培養の解析のために、まずは、株化の神経細胞(PC12)と角膜上皮細胞との共培養を試みた。今まで、神経細胞と他の細胞との共培養に関しては報告があまりないため、培養環境(培地、サプリメントなど)を確立させる必要性があり、培養系が確立された後は、その培養系を使い、神経細胞の有、無で角膜上皮細胞内に起こる様々な因子の発現の変化を Western Blot 法、蛍光抗体法、また、RT-PCR 法により解析した。
- (2) プライマリー神経細胞(三叉神経)と角膜上皮細胞の共培養法を用いた解析； 神経細胞との共培養系を確立させながら、さらに、in vivo 状態での神経細胞(三叉神経)を用いて角膜上皮細胞との共培養系も立ち上げた。そこで、その共培養系でも株化神経細胞(PC12)を用いた結果と同様の結果が得られるかどうか解析を行った。その時に三叉神経の有、無で角膜上皮細胞内で起こる様々な因子の発現変化を上記の様に Western Blot 法、蛍光抗体法、また、RT-PCR 法により解析した。
- (3) 共培養系における神経細胞から分泌される角膜上皮細胞への制御因子の同定； 角膜上皮細胞と神経細胞(PC12、または、三叉神経)の共培養の結果から得られた角膜上皮細胞内の生理現象(特に、角膜上

皮細胞の重層化など)を元に神経細胞と共培養した際に、角膜上皮細胞だけの単独培養の medium から神経細胞から分泌される因子、あるいはその因子に反応する角膜上皮細胞側の相互作用因子を角膜上皮細胞の今までの報告されているいくつかの神経栄養因子、神経ペプチドを用いて、培地のサプリメントとして、用い、更に、その抑制剤も投与することで、角膜上皮細胞内の生理現象を抑える因子のスクリーニングを行い、その角膜上皮細胞での重層化に影響を与えている神経ペプチドを同定した。

- (4) 動物モデルを使った in vivo 実験； さらに、上記の様な in vitro 系で明らかになった神経細胞からの分泌される神経ペプチドを成体ラット角膜創傷治癒モデル(上皮剥離、切開)系を使って、in vivo 系での解析も行った。
- (5) サイトカインによる制御機構； 角膜創傷治癒には角膜内で働いている炎症性サイトカインや成長因子が大きく関与していると考えられることから、この様なサイトカイン、成長因子らの動きが共培養系でどう作用するのかを Bio-Plex を用いて解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 平成 23 年度

研究初年度は、神経細胞と角膜上皮細胞の共培養における細胞間生理現象の解析の為に、まず、その共培養系の確立を試みた。

- 1) まずは神経細胞として、株化された神経細胞、PC12を用いた。培養条件で、PC12 細胞を神経細胞に分化させ、その上、分化された神経

細胞と角膜上皮細胞との共培養をコラーゲン膜を用いて、成功させた。この際に、共培養に必要な、様々な因子の特定と共に、共培養の成功の有無を Westren Blot 法、RT-PCR 法、蛍光抗体法などを用いて確認した。

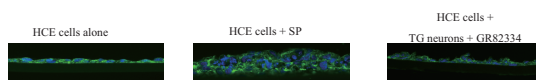
2) 上記の様に、株化神経細胞と角膜上皮細胞との共培養が成功したのを元に、in vivo 状態での神経細胞、三叉神経細胞を動物から直接分離し、その神経初代培養と角膜上皮細胞の共培養を試み、成功させた。この際も、株化神経細胞でと同様に、共培養の成功の有無を Westren Blot 法、RT-PCR 法、蛍光抗体法などを用いて確認した。この様な研究申請初年度の成果を学会などで報告している。

### (2) 平成 24 年度

平成 23 年度の成果を元に、確立された神経細胞と角膜細胞との共培養系を用いて、まずは、角膜創傷治癒に働いている角膜内の炎症性サイトカインや成長因子を調べた。この実験では、共培養での主に、その発現の変化が顕著であるものをを見出す為に Multi-Plex assay 法により解析した。その結果、様々なサイトカインの中で、炎症性サイトカインの一つである、IL-6 の発現が神経細胞の存在下で、大きく増加していることが明らかになった。さらに、その IL-6 の発現の増加と共に、matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) の発現も顕著に増加していることを明らかにした。このことより、神経細胞の存在が角膜創傷治癒過程で様々な因子を刺激し、角膜内の恒常性に重要な役割を果たしていることが証明できた。この様な成果を平成 23 年度と同様に学会、または学術誌において報告している。

### (3) 平成 25 年度

平成 24 年度の共培養では株化神経細胞を用いて、解析を行った。その成果、方法を元に、本来明らかにすべきである生体内の神経、角膜内の三叉神経を用いることに試みた。ラットの三叉神経を分離し、コラーゲン膜状での培養法を確立させ、その上に角膜上皮細胞との共培養を試み、様々な培養条件を突き止めることを見出した。その上、今年度の一番の成果としては、三叉神経と角膜上皮細胞との共培養において、角膜上皮細胞の機能のうち、一番大事とされるバリアー機能には欠かせない角膜上皮細胞での重要な生理現象、重層化に三叉神経が必須であることを見出した。更に、神経細胞の存在下で、重層化の促進と共に、上皮細胞の分化に重要であるアドヘレンス接着タンパク質である N-cadherin の発現が促進されることが明らかになった。また、この様な神経細胞の機能は、三叉神経細胞から分泌されると予想される様々な神経ペプチドを用いて、調べた結果、神経ペプチドの中でも Substance P あるいは、CGRP がその機能を果たしていることを明らかにした。それを確実に証明する為に、共培養系に、それぞれの神経ペプチドの阻害剤で刺激した結果、角膜上皮細胞の重層化の促進、あるいは、接着蛋白質 N-cadherin の発現促進などは抑えられ、三叉神経から分泌される、Substance P あるいは、CGRP がもつとも角膜上皮細胞の重層化に関与していることが示唆された。以上の結果を毎年と同じく学会、論文などで報告している。



5. 主な発表論文など

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) Ko J.-A., Mizuno Y., Ohki C., Chikama T., Sonoda KH., Kiuchi Y.  
Neuropeptides released from trigeminal neurons promote the stratification of human corneal epithelial cells. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 査読有, 55, 2014, 125-133.
- 2) Hirata J., Ko J.-A., Mochizuki H., Funaishi K., Yamane K., Sonoda KH., Kiuchi Y.  
Oxidative stress regulates expression of claudin-1 in human RPE cells. *Central European Journal of Biology*, 査読有, 9, 2013, 461-468.
- 3) Nakamura-Shibasaki M., Ko J.-A., Takenaka J., Chikama T., Sonoda KH., Kiuchi Y.  
Matrix metalloproteinase and cytokine expression in Tenon fibroblasts during scar formation after glaucoma filtration or implant surgery in rats. *Cell Biochemistry & Function*, 査読有, 31, 2013, 482-488.
- 4) Ko J.-A., Chikama T., Sonoda KH., Kiuchi Y.  
Up-regulation of matrix metalloproteinase-1 and interleukin-6 expression in cocultures of corneal fibroblasts and neural cells. *Biochemistry Biophysical Research Communication*, 査読有, 419, 2012, 537-542.
- 5) Ko J.-A., Mizuno Y., Shibasaki M., Yamane K., Chikama T., Sonoda KH., Kiuchi Y.  
Differential expression of semaphorin3A and

its receptors during mouse retinal development. *Cell Biochemistry & Function*, 査読有, 30, 2012, 563-568.

[学会発表] (計 7 件)

- 1) Ko J.-A., Ohki C., Chikama T., Kiuchi Y.  
Neuropeptides Released from Trigeminal Neurons Promote the Stratification of Human Corneal Epithelial Cells. The American Society for Cell Biology, 2013, Dec 16th, New Orleans, USA
- 2) Ko J.-A., Ohki C., Chikama T., Kiuchi Y.  
Neuropeptide from trigeminal nerve promotes the stratification of human corneal epithelial cells.  
The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2013, May 6th, Seattle, USA
- 3) 高知愛、多木千寛、近間泰一郎、木内良明  
三叉神経の神経ペプチドによる培養角膜上皮細胞の重層化促進作用 日本眼科学会総会、2013、4月4日、東京国際フォーラム
- 4) Ko J.-A., Shibasaki M., Chikama T., Yamane K., Kiuchi Y.  
Up-regulation of semaphorin4A expression in retinal pigment epithelial cell by neural cells.  
The American Society for Cell Biology, 2012, Dec 17th, San Francisco, USA
- 5) Ko J.-A., Chikama T., Yamane K., Kiuchi Y.  
Effects of neural cells on the expression of semaphorin4A in cocultured retinal pigment epithelial cells. The American Society for Cell Biology, 2011, Dec 6th, Denver, USA

6) Ko J.-A., Chikama T., Sonoda KH.

Neural cells promotes the stratification of corneal epithelial cells by coculture system.

The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2011, May, 1st Fort Lauderdale, USA

7) 高知愛、近間泰一郎、園田康平

神経細胞による培養角膜上皮細胞の重層化促進作用 日本眼科学会総会、2011、5月13日、東京国際フォーラム

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高 知愛 (KO, Ji-Ae)

広島大学・医歯薬保健学研究院 (医)・講師

研究者番号: 70314797

### (2) 研究分担者

近間 泰一郎 (CHIKAMA, Tai-ichiro)

広島大学・医歯薬保健学研究院 (医)・准教授

研究者番号: 00263765

園田 康平 (SONODA, Koh-Hei)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号: 10294943