

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592572

研究課題名(和文) 感染性角膜潰瘍発症の分子機序に基づいた新たな治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of new drugs based on molecular mechanism for infectious corneal ulcer

研究代表者

木村 和博 (KIMURA, Kazuhiro)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60335255

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)：角膜実質のコラーゲン分解は、角膜潰瘍形成に寄与している。さらに、角膜実質のresident細胞である角膜線維芽細胞がその中心的な役割を果たす。眼組織でのリモデリングにSex-hormoneの関与が示唆されてきた。そこで我々は角膜線維芽細胞を用いSex-hormoneによる細胞外マトリックスであるコラーゲン(CoI)の分解への作用を検討した。女性ホルモンのEstrogen, progesteroneは、CoI分解を濃度依存性に抑制した。これらはIL-1によるMMP-1, -2, -3, -9の発現、活性の亢進を濃度依存性に抑制し、MAPK経路のp38MAPKのリン酸化を有意に抑制した。

研究成果の概要(英文)：Collagen degradation of corneal stroma relates to the etiology of corneal ulceration. Moreover, Corneal fibroblasts contribute to collagen remodeling in the corneal stroma in part by mediating collagen degradation. Corneal structure is influenced by sex hormone status, we examined the effects of sex hormones on collagen degradation by corneal fibroblasts. 17beta-Estradiol and progesterone, female sex hormones, inhibited interleukin (IL)-1beta-induced collagen degradation, whereas testosterone and DHEA had no such effect. MMP expression and activation in corneal fibroblasts exposed to IL-1beta were also inhibited by them. They inhibited the IL-1beta-induced phosphorylation of p38 MAPK without affecting that of the MAPKs ERK or JNK. 17beta-Estradiol also inhibited the IL-1beta-induced phosphorylation of I kappa B-alpha. Female sex hormones inhibited MMP expression and activity in IL-1beta-stimulated corneal fibroblasts and thereby suppressed collagen degradation by these cells.

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：角膜潰瘍 感染 コラーゲン分解 MMP

1. 研究開始当初の背景

角膜潰瘍はその原因から感染と非感染性に区別されるが、その病態は同一だと考えられる。角膜潰瘍は、角膜実質固有細胞、浸潤細胞および細胞外基質のコラーゲンが互いに影響し最終的に角膜実質のコラーゲンが融解することで生じると考えられる。病変部において、resident細胞としての角膜実質細胞、浸潤してくる炎症細胞および病原微生物がお互いに相互作用する。中でも resident細胞として活性化した角膜実質細胞(角膜線維芽細胞)がその中心的役割をはたしている。感染性角膜潰瘍の治療について、感染初期では抗菌薬が著効するが、ある程度進行した角膜潰瘍ではすぐには治癒にいたらず角膜穿孔などさらに病状が進行することをしばしば臨床の場でみかける。このことは、抗菌剤による病原微生物の死滅のみでは、角膜潰瘍形成および進行は十分に阻害できないことを示唆する。現状では、感染に対する抗菌剤による治療はできるが、角膜潰瘍形成に対する特異的な薬剤が存在しないことを示唆している。

2. 研究の目的

感染性角膜潰瘍は、临床上頻度が多く、治療により角膜潰瘍がたとえ治癒しても、治癒後にしばしば角膜実質に永続的な混濁をきたし、著しい視力障害をきたすことがある。ある程度進行した角膜潰瘍ではすぐには治癒にいたらず、さらに進行する例をしばしば臨床の場でみかける。このことが最終的な角膜混濁の大きな要因となっていることと考えられる。

本研究の目的は、多方面からの角膜潰瘍の病態解明を行い、より特異的な治療法を模索検討することである。角膜実質細胞、角膜線維芽細胞、浸潤炎症細胞と細胞外マトリックスなどそれぞれの相互作用による角膜潰瘍への関与およびそのメカニズムを詳細に解析する。さらに角膜線維芽細胞を中心とした三次元培養系を用いてコラーゲン分解促進を制御するコラーゲン分解抑制因子のスクリーニングを行う。

3. 研究の方法

ヒト角膜より角膜実質細胞を採取し、血清存在下で培養し角膜線維芽細胞を作出する。この角膜線維芽細胞をI型コラーゲン内で三次元培養し、角膜実質を模倣した培養系をつくる。これまでの研究から角膜潰瘍形成に関与する因子の一つに炎症性サイトカインのIL-1が報告され

ている。そこで、この三次元培養系にIL-1を添加し、コラーゲン分解が促進することを確認し、このアッセイ系に種々の化合物を加え、コラーゲン分解抑制を指標として、ゲル分解抑制因子を検討する。さらにコラーゲン分解に関与するプロテアーゼ特にマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)の発現、活性化に対する影響をウエスタンブロット法、サイモグラフィ法にて確認する。IL-1によって活性化されるMAPK系を中心としたシグナル伝達経路について、ゲル分解抑制因子の作用を特異抗体を用いてウエスタンブロット法にて検討する。さらに化合物の角膜線維芽細胞の増殖および細胞死への影響をBrdUの取り込み並びにLDHの分泌により測定する。また、グラム陰性桿菌菌体外毒素であるLPSを用いたウサギ角膜炎モデルを作出し、ゲル分解抑制因子の点眼による角膜炎および角膜潰瘍形成への作用を検眼鏡的検査並びに組織学的解析にて検討する。

4. 研究成果

角膜線維芽細胞を持ったI型コラーゲンゲル三次元培養系における、IL-1誘導コラーゲン分解を抑制する化合物のスクリーニングを行った結果、女性ホルモンのEstrogen, progesteroneにその活性が有意であることが明らかになった。これらの作用は、濃度及び時間依存性であった。一方で、同じ性ホルモンである男性ホルモンのアンドロゲンにはこのような作用は認められなかった。さらに、女性ホルモンのEstrogen, progesteroneは、IL-1によって分泌発現が促進するMMP-1, -2, -3, -9の発現、活性の亢進を濃度依存性に抑制した。IL-1によって活性化されたMAPK経路への女性ホルモンのEstrogen, progesteroneの作用を検討したところ、p38MAPKのリン酸化を有意に抑制した。また、女性ホルモンのEstrogen, progesteroneは、角膜線維芽細胞におけるBrdUの取り込み並びにLDHの分泌に明らかな影響はなく、細胞増殖や細胞死には作用しないことが明らかになった。

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 10件)

Kimura K, Orita T, Morishige N, Nishida T, Sonoda KH. Role of the JNK Signaling Pathway in Downregulation of Connexin43 by TNF- in Human Corneal Fibroblasts. *Curr Eye Res*

38(9): 926-32, 2013, 査読有
Kimura K, Morita Y, Orita T, Haruta J, Takeji Y, Sonoda KH. Protection of human corneal epithelial cells from TNF- α -induced disruption of barrier function by rebamipide. Invest Ophthalmol Vis Sci. 54(4): 2752-60, 2013, 査読有
Orita T, Kimura K, Nishida T, Sonoda KH. Cytokine and chemokine secretion induced by poly(I:C) through NF- κ B and phosphoinositide 3-kinase signaling pathways in human corneal fibroblasts. Curr Eye Res. 38(1): 53-9, 2013, 査読有
Zhou H, Kimura K, Orita T, Nishida T, Sonoda KH: Inhibition by medroxyprogesterone acetate of interleukin-1 α -induced collagen degradation by corneal fibroblasts. Investigative Ophthalmology & Visual Science 53(7): 4213-4219, 2012, 査読有
Kimura K, Orita T, Nomi N, Fujitsu Y, Nishida T, Sonoda KH: Identification of common secreted factors in human corneal fibroblasts exposed to LPS, poly(I:C), or zymosan. Exp Eye Res 96(1): 157-162, 2012, 査読有
木村 和博, 園田 康平: 内科医のための眼科の知識. 日本臨床内科医会誌 26(2): 242-245, 2011, 査読有
Kimura K, Teranishi S, Kawamoto K, Nishida T: Protective effect of dexamethasone against hypoxia-induced disruption of barrier function in human corneal epithelial cells. Exp Eye Res. 92(5): 388-93. 2011, 査読有
Kimura K, Teranishi S, Orita T, Zhou H, Nishida T: Role of β -Pix in corneal epithelial cell migration on fibronectin. Investigative Ophthalmology & Visual Science 52(6): 3181-6, 2011, 査読有
木村 和博: 眼表面炎症疾患による角膜の細胞間接着機構への作用. 眼炎症学会誌 13(0): 7-11, 2011, 査読有
木村 和博: 炎症性サイトカイン tumor necrosis factor- α による培養角膜上皮バリアー破綻の機構. 日本眼科学会雑誌 14(11): 935-943, 2011, 査読有

〔学会発表〕(計 10件)

木村 和博: 角膜混濁を伴う緑内障インプラント手術における 23G 内視鏡の使用例. 第 12 回中四国眼科手術フォーラム, 広島県(シエラトン広島),

2013/11/09

木村 和博, 折田 朋子, 能美 典正, 藤津 揚一朗, 西田 輝夫, 園田 康平: 角膜実質細胞における Gap junction 阻害剤のコラーゲン分解への影響. 第 45 回日本結合組織学会学術大会・第 60 回マトリックス研究会大会合同学術大会, 和歌山県(和歌山県立医科大学), 2013/06/28

木村 和博, 折田 朋子, 永井 智彦, 能美 典正, 藤津 揚一朗, 鈴木 克佳, 園田 康平: 網膜色素上皮細胞における Sex hormone によるコラーゲンゲル収縮への作用. 日本眼科学会総会, 東京都(東京都国際フォーラム), 2013/04/04

木村 和博, 園田 康平: レチノイン酸による角膜潰瘍形成抑制の分子機序. 山口大学研究推進体「ストレス」成果報告シンポジウム, 山口県(山口大学), 2013/02/08

Orita T, Kimura K, Sonoda KH: Role of the JNK Signaling Pathway in Down-Regulation of Connexin43 by TNF- α in Human Corneal Fibroblasts. 2012 ARVO Annual Meeting, FLORIDA, USA, 2012/05/06

木村 和博, 折田 朋子, 能美 典正, 藤津 揚一朗, 西田 輝夫, 園田 康平: 角膜線維芽細胞における Medroxyprogesterone Acetate によるコラーゲン分解抑制作用. 第 116 回日本眼科学会総会, 東京都(東京国際フォーラム), 2012/04/05

木村 和博: Sex-hormone のコラーゲンゲル分解・収縮への作用. 第 16 回眼科分子生物学研究会, 熊本県(八千代座交流施設), 2012/02/11

木村 和博: 角膜感染症における角膜実質細胞の機能. 第 48 回日本眼感染症学会, 京都府(京都国際会館), 2011/07/08

寺西 慎一郎, 近間 泰一郎, 木村 和博, 園田 康平: 角膜上皮細胞に対するホウ酸の影響. 第 115 回日本眼科学会総会, 東京都(東京国際フォーラム), 2011/05/13

木村 和博, 寺西 慎一郎, 折田 朋子, 西田 輝夫, 園田 康平: β -PIX の活性化を介したフィブロネクチンによる細胞移動の制御. 第 115 回日本眼科学会総会, 東京都, 2011/05/13

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 和博 (KIMURA, Kazuhiro)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60335255

(2) 研究分担者

園田 康平 (SONODA, Koh-Hei)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：1029493

(3) 連携研究者

()

研究者番号：