

平成 2 6 年 6 月 1 8 日現在

機関番号：8 2 4 0 6

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：2 3 5 9 2 5 9 1

研究課題名（和文）角膜上皮細胞における紫外線暴露による p 3 8 活性化と上皮間葉系移行と細胞死の制御

研究課題名（英文）Regulation of ultraviolet-induced activation of p38, epithelial-mesenchymal transition, and apoptosis in corneal epithelial cells

研究代表者

加藤 直子（Kato, Naoko）

防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・病院・講師

研究者番号：2 0 3 9 8 6 0 5

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,000,000 円、（間接経費） 0 円

研究成果の概要（和文）：角膜上皮細胞株に紫外線照射を条件を変えて行ったが、紫外線照射直後にp38が活性化し、細胞の膜タンパクであるEカドヘリン、カテニンが減弱し、SnailのmRNAの転写が増加することは明らかになったが、その後の上皮間葉系移行のマーカーが増加せず、また細胞の増殖変化も明らかにできなかった。これまでの結果から紫外線照射単独では上皮間葉系移行を引き起こす刺激としては不十分であると考え、サイトカインの添加を試みた。しかし、TGF- β 、TNF- α の添加によって細胞形質は若干変化するものの、間葉系組織の特徴である紡錘形細胞への変化は見られず、上皮間葉系移行に特有のマーカーの継続的な発現も見られなかった。

研究成果の概要（英文）：We irradiated ultraviolet onto the cultured corneal epithelial cells with various conditions. Phosphorylation of p38, decrease of E-cadherin, beta-catenin, and upregulation of a transcriptional factor, snail occurred, however, the representative mesenchymal markers were not induced. We suspected that ultraviolet alone was insufficient for induction. We also assessed the addition of cytokines (TGF- β and/or TNF- α), however the combined stimuli with ultraviolet and cytokines did not success induction of epithelial mesenchymal transition characterized by upregulation of mesenchymal markers.

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：角膜上皮細胞 紫外線 上皮間葉系移行 アポトーシス 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

角膜は人間の身体でもっとも紫外線暴露を受ける組織の一つである。角膜と同様に外胚葉由来組織である皮膚では、紫外線暴露量に応じて扁平上皮癌などの悪性腫瘍が発生する。しかし、角膜では悪性腫瘍の発生頻度は皮膚に比べて明らかに低く、角膜で紫外線暴露との相関が疫学的に確認されている代表的な疾患は、翼状片という線維血管性増殖病変である。

申請者らは、角膜上皮幹細胞ではNカドヘリンなどの間葉系細胞マーカーを発現していることを報告している(研究業績;文献4)。これは紫外線などの刺激から上皮幹細胞を保護するための重要なメカニズムの一つである可能性がある。申請者らはまた、ヒト翼状片病変の先端部で角膜上皮細胞が間葉系細胞に類似の形質転換を起こしていることを明らかにした(研究業績;文献8)。翼状片は過剰な紫外線暴露を受けた角膜上皮前駆細胞が通常以上の上皮間葉系移行を生じた結果であると考えられる。

次に申請者らは、in vitro でこの反応を再現することを試みた。その結果、紫外線照射を受けた培養角膜上皮細胞ではEカドヘリンの膜染色の減少、カテニンの核内移行、Snailなどの上皮間葉系移行を示唆する変化が見られた。また、これらの細胞ではp38 MAPKのリン酸化が見られた(下図)。しかし、p38の阻害剤SB202190を添加してから紫外線を照射すると、角膜上皮細胞は細胞死に陥った。

以上のことより申請者らは、角膜上皮細胞では紫外線暴露を受けた際のp38の活性化が角膜上皮幹細胞の維持、すなわち間葉系シフトと細胞増殖/細胞死の調節を担っているのではないかと考えた。翼状片は間葉系にシフトしすぎた状態(上皮間葉系移行)であり、間葉系シフトの状態に関わらず細胞増殖が過剰に亢進しているのが癌、細胞増殖のサイクルが低下/細胞死の状態が上皮幹細胞疲弊(角膜輪部機能不全)など、角膜上皮細胞の形質転換のレベルと細胞増殖/細胞死のバランスは様々な病態に関わっておりその調節にp38の活性化が中心的な役割を担っていると考えられるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、角膜上皮細胞が紫外線照射を受けた際の細胞内シグナルの伝達経路とその結果としての細胞の変化に関する研究を行う。ことに、p38 MAPKを介するシグナル伝達に着目して、以下の事項を明らかにしたいと考えている(右図参照)。

(1) 紫外線曝露による角膜上皮細胞でのp38シグナル伝達経路と上皮間葉系移行と

の関わり

(2) 紫外線曝露による角膜上皮細胞でのp38シグナル伝達経路と増殖サイクル/細胞死への関わりについて

(3) 上記(1)(2)の相互作用

3. 研究の方法

マウス培養角膜上皮細胞株(TKE2)とヒト初代培養角膜上皮細胞に紫外線を照射し、p38活性化を介した細胞内シグナルの同定を行う。シグナル伝達経路が同定出来たら、次ぎはヒト培養輪部角膜上皮細胞を用いて、シグナル伝達経路の再現性を確認、さらにはヒト輪部組織の器官培養やin vivoでのマウス角膜への紫外線照射を行い再現性を確認する。同様にTKE2とヒト初代培養角膜上皮細胞に紫外線を照射し、p38を介する細胞死または増殖への細胞内シグナルの同定を行う。両者のp38活性化に伴ったシグナル伝達系がお互いに影響し合っていることと、相互作用を起こす場所を証明する。その結果、角膜上皮細胞の表現型が同変化するかを確認する。

平成23年度研究計画

1. 紫外線曝露による角膜上皮細胞の上皮間葉系移行(EMT)におけるp38の関わりを検討

マウス培養角膜上皮細胞株(TKE2)およびヒト培養角膜上皮細胞に紫外線を照射すると、Eカドヘリンとカテニンの膜染色性が損なわれ、同時にp38が活性化し、カテニンの核内移行、Snailのリン酸化が起こることはこれまでの研究結果により明らかになっている。これらの反応の前後関係について検討する。

(1) マウス角膜上皮細胞株TKE2を培養し、長波長紫外線照射を行う。照射する紫外線量はこれまでの実験結果より15~20 Jとする。

(2) p38は紫外線照射後約4~6時間でリン酸化のすることはこれまでの実験により証明されている。現時点では、右図のようなp38活性化を介する上皮間葉系移行(EMT)に至るシグナル伝達経路が想定される。ウェスタンブロッティング、免疫染色、PCRなどを用いてこれらを確認する。

(3) ヒト初代培養角膜上皮を用いて、(2)までの反応がヒト角膜上皮でも再現されることを確認する。

(4) ヒト輪部組織、またはマウス角膜に紫外線を照射し、in vivoでも同じシグナル伝達が行われることを確認する。

(5) 申請者らの予備実験によれば、培養

角膜上皮細胞では TNF は上皮間葉系移行類似の変化は殆ど起こさず、TGF- β 1 では非常にはっきりした上皮間葉系移行類似の変化が起きる。これらの炎症性サイトカイン刺激に伴って p38 が活性化するかどうかを確認し、紫外線照射による変化との相違を細胞内シグナル伝達系のレベルで検討する。

2. 紫外線曝露による角膜上皮細胞の細胞死に対する P38 の関わりの検討

紫外線照射に先立ち p38 阻害剤である SB202190 を添加しておく、紫外線照射開始 4～6 時間で細胞死が誘導される。紫外線照射に引き続き起こる p38 活性化を介する細胞死のシグナル伝達については、アポトーシスが介在すると考えられる（右図）。

(1) TKE2 を培養し、SB202190 を添加後紫外線を照射して、細胞死がアポトーシスであることを証明する（DNA ladder、Annexin V の検出、電子顕微鏡による核の形態観察などを用いる）。

(2) アポトーシスのシグナル伝達経路を同定する。Caspase 3/6/9 の検出など。

(3) ヒト初代角膜上皮細胞、ヒト角膜輪部の組織培養などで再現性を確認する。マウス角膜に in vivo で紫外線照射を行い再現性を確認する。

平成 24 年度以降は、平成 23 年度に同定した紫外線照射による上皮間葉系移行のシグナル伝達経路と細胞死のシグナル伝達経路の関わりについて検討する。上皮間葉系移行と細胞死のカスケードを同時、またはいずれか一方のみが阻害された場合、または亢進した場合の細胞の表現型の変化に着目して検討する。

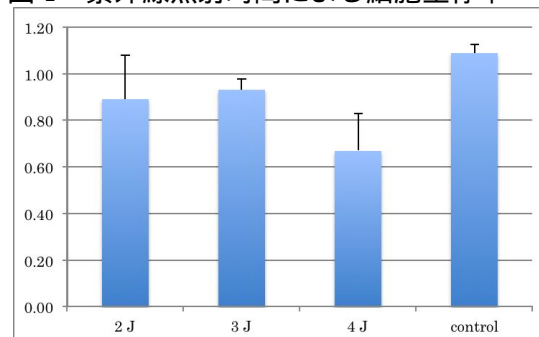
さらに、マウス角膜化学傷モデルや科学外傷後、角膜輪部機能不全などで角膜移植になり外科的に切除されたヒトの標本を用いて、免疫染色、PRT などにより仮説に基づいた P38 活性化とそれを介する細胞内シグナル伝達が起こっているかを検討する。

4. 研究成果

マウス角膜上皮細胞株(TKE2)を播種し、コンフルエントになった状態で、長波長紫外線を照射した。実験場所が慶應義塾大学より防衛医科大学校に変わったため、紫外線照射条件の検討から開始した。

その結果、長波長紫外線 2～3 J（2～3 時間照射）が細胞障害性をきたさない指摘強度であると結論付けた（図 1）。

図 1 紫外線照射時間による細胞生存率



しかし、この条件で E カドヘリン、カテニンの細胞膜染色の障害が検出されなかった。さらに、転写因子 Snail の mRNA は増幅されたが、間葉系マーカーである SMA、ビメンチンの発現は明瞭ではなかった。また、細胞の形態も明らかな上皮間葉系移行と言えるほどの変化は見られなかった。

そこで、紫外線照射単独では上皮間葉系移行を引き起こす刺激としては不十分であると考え、サイトカインの添加を試みた。さらに、GSK3beta の阻害剤である BIO も合わせて添加した。

図 2 紫外線とサイトカイン添加による上皮間葉系移行関連遺伝子の変化（PCR）

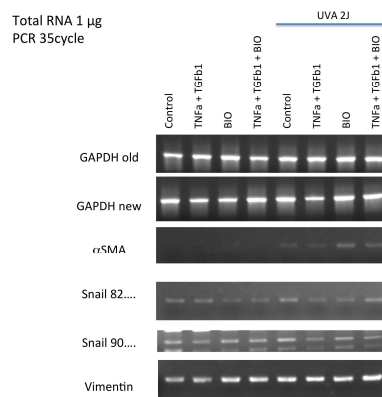
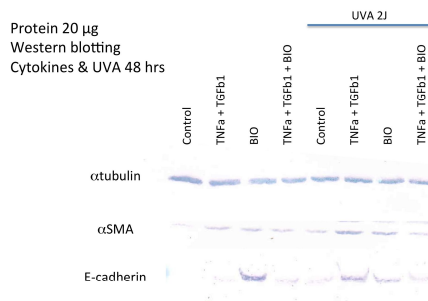


図 3 紫外線照射とサイトカイン添加による SMA とビメンチンの変化（Western blotting）

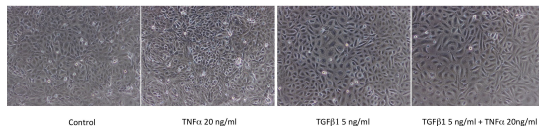
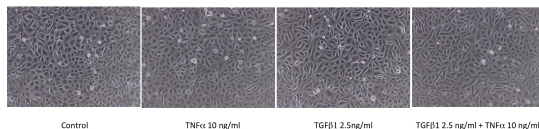


しかし、紫外線照射を行った細胞では、snailが増加、SMA、ビメンチンのmRNAは若干の増加傾向が見られたが、タンパク質の明らかな増加は確認されなかった。また、TGF、TNF、BIOの添加による一定はつかめなかった。

細胞形質は若干変化するものの、間葉系組織の特徴である紡錘形細胞への変化は見られず、上皮間葉系移行に特有のマーカーの継続的な発現も見られなかった(図4)。

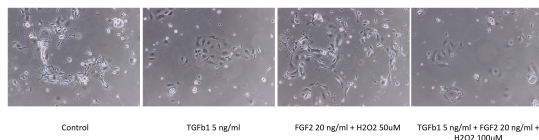
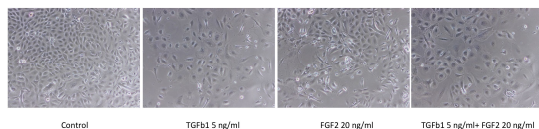
図4 紫外線照射とサイトカイン添加による角膜上皮細胞株の形態変化

120220 TKE2 TGFβ1 5 ng/ml + TNFα 10 ng/ml 3 & 6 days



マウス細胞株への紫外線照射とサイトカイン添加による上皮間葉系移行の誘導が明確でないため、過酸化水素の添加、FGFの添加等も行ったが、増殖抑制が強く見られた(図5)。

図5 サイトカイン添加120時間後の細胞形態



以上のように、角膜上皮細胞株における上皮間葉系移行の誘導に難航している。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

1. Kato N, Kubota M, Miyashita H, Kawakita T, Yoshida S, Tsubota K, Shimmura S. The role of p38 MAPK phosphorylated activation by reactive oxygen species in corneal epithelial cells. 2011 ARVO Meeting, 04/05/2011, Florida

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤直子 (Kato, Naoko)

防衛医科大学校・病院・講師

研究者番号：20398605