

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：平成 23 年 ～ 平成 24 年

課題番号：23659805

研究課題名 眼表面感染症・炎症性疾患におけるシンデカンの役割の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the role of syndecans in infectious or inflammatory diseases of ocular surface

研究代表者 天野 史郎 (AMANO SHIRO)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80193027

研究成果の概要（和文）：

培養ヒト角膜・結膜上皮シートを用いた実験、ノックアウトマウスを用いた実験、臨床サンプルを用いた実験を行った。

- (1) 培養細胞シートでの検討。ヒト primary 培養角膜・結膜上皮シート、ヒト不死化角膜上皮細胞 (SV40cell) シートに IL-1b を添加したところシンデカン 4 の発現量の有意な増加を ELISA 法にて検出できた。シンデカン 1 は primary 結膜上皮細胞シートにおいて IL-1b 添加により有意な増加が認められた。
- (2) 動物実験。Syndecan4 のノックアウトマウスと wild type のマウスでの角膜創傷治癒速度の違いを検討した。物理的創傷モデルでは 2 群間に有意差がなかった。炎症を伴う上皮創傷作成モデル（アルカリ負荷、実質内 LPS 注射等）においても 2 群間で創傷治癒速度には差がなかった。血管やリンパ管新生は Syndecan4 hetero KO マウスより homo KO マウスで多かった。
- (3) 臨床サンプルの検討。角結膜疾患のある患者、健常者を対象として、東大病院及び関連病院眼科にて採取した 136 眼分の涙液中の syndecan-4 の濃度の測定を行った。男性 52 人、女性 84 人より採取した。右眼 70 眼、左目 66 眼より採取した。平均年齢は 66 ± 18 歳であった。測定感度内は 120 眼であった。Syndecan-4 の平均涙液中濃度は 3485 ± 3537 pg/ml であった。活動性のある感染症の患者では 2965 ± 4497 pg/ml であった。

研究成果の概要（英文）：

Three kinds of experiments were performed: experiments using cultured human corneal or conjunctival epithelial cell sheets, experiments using syndecan-4 knockout mice, and experiments using clinical samples.

- (1) Evaluation using cultured cell sheet. Syndecan-4 was significantly increased by IL-1b in human primary cultured corneal or conjunctival cell sheets and human SV40-immortalized corneal cell sheets.
- (2) Animal experiments. The speed of wound healing in the cornea was compared in syndecan-4 knockout mice and wild type mice. The speed of corneal wound healing in the physical wound model was similar in the two kinds of mice. The speed of

corneal wound healing in the inflammatory wound model (alkali burn and LPS injection into corneal stroma) was similar in the two kinds of mice as well. Angiogenesis and lymphangiogenesis were increased in syndecan-4 homo-knockout mice compared to syndecan-4 hetero-knockout mice.

(3) Evaluation on clinical samples. The concentration of syndecan-4 in the tear was measured in patients with ocular surface diseases and healthy volunteers. Tear was collected in 52 male and 84 female. The average age was 66 ± 18 years. The average concentration of syndecan-4 in the tear was 3485 ± 3537 pg/ml. The average concentration of syndecan-4 in the tear in patients with active ocular surface inflammation was 2965 ± 4497 pg/ml.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：シンデカン、涙液、角膜上皮、創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

細胞膜貫通型ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるシンデカン・ファミリー（シンデカン1-4）は、多くの組織に発現し、細胞外基質、増殖因子、増殖因子受容体などの受容体あるいは共受容体として働いている。またシンデカンの細胞外領域は酵素により切り離されて、細胞外にある様々な可溶性因子や病原体と結合して、生物活性を発揮する。これまでの研究で、シンデカンは、様々な癌細胞の接着、増殖などを促進する事、ウイルスや細菌などの病原体と結合して病原体の病原性を高める事、創傷治癒過程においては創傷治癒を促進する因子として働いている事などが明らかにされてきた。我々はこれまでの動物実験において、角結膜の上皮にはシンデカン1,4が豊富に発現しており、シンデカン1,4のダブルノックアウトマウスでは、角膜が強く白濁し、角膜内に旺盛な血管侵入と炎症所見がある事を明らかにした。さらにシンデカン1ノックアウトマウスでは角膜

への緑濃菌感染への抵抗性が高まる事を明らかにした。こうした我々のこれまでの研究結果から、シンデカンが眼表面の様々な病態に関与している可能性が強く示唆されるが、これまで眼疾患におけるシンデカンの役割を検討した研究は全くない。

2. 研究の目的

失明原因となっている眼表面の感染性・炎症性疾患において、細胞膜貫通型ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるシンデカン・ファミリー（シンデカン1-4）の果たす役割を解明すること。

3. 研究の方法

(1) In vitro

ヒト primary 角膜上皮細胞、結膜上皮細胞を無血清培地にて培養し重層化シートを作成した。

シート作成法としては、まずヒト primary 角膜上皮細胞、結膜上皮細胞を得るための眼球

は輸入したものをを用いた。輪部組織を眼球から注意深く切除し、0.02%のタイプ1Aコラゲナーゼを基本培地(DMEM-F12; Wako, Tokyo, Japan)に添加し37°Cで一晩静置した。細胞をコートしたチューブ(Sumilon Stem Full)に集め、37°Cで10分の0.05%のトリプシン/EDTAの中でピペッティングし単細胞へ分離した。培地でトリプシン/EDTAを洗った後に、20ng/mlのEGFおよびB27添加した基本培地へ細胞を 2.4×10^4 cell/wellの密度で12 well culture dishes (Corning® Transwell®)の上部wellに播種した。5%のCO₂/95%の空気の中で37°Cで維持した。培地を適宜交換し約3週間かけて重層化シートを作成した。ヒト不死化角膜上皮細胞(SV40cell)も基本的には同様にシートを作成したが、分裂が早いので播種してから約2週間で作成した。

作成したシートを用いて、角膜上皮で細菌等くるのは上皮側からであるので、IL-1 β を0.1ng/mlもしくは1ng/ml上部well培地に加え12時間炎症負荷をかけ、上部wellの上清を採取し炎症負荷によるSyndecan 1, 4の濃度変化をELISA法にて測定した。有意差の検定はWilcoxon検定を用いた。

(2) 動物実験

Syndecan4ノックアウトマウスを用いて角膜上皮創傷治癒への影響をみた。

①生後9-11週のSyndecan4 hetero KO mouse 6匹及びhomo KO mouse 6匹と野生型マウス1-2匹(1匹途中で死亡)を用いて麻酔下で1.5mmトレパンにてできるだけ角膜中央にマーキングを行い、rust removerにて角膜上皮を剥ぎまずは単なる物理的損傷におけるwound healingをみる実験を行なった。

②生後10週の野生型マウス2匹、生後12週のSyndecan4 hetero KOマウス2匹及びhomo KOマウス2匹を用いてアルカリによるwound

healing及び血管・リンパ管新生をみる実験を行なった。麻酔下で3mmの濾紙に1MのNaOHを4 μ l浸し、角膜中央部から上方輪部にかかるように60secおいた後洗浄した。Wound作成後1, 2, 3, 6, 8, 10, 14日後にwound healingや血管侵入を麻酔下で観察した。Wound作成後14日後に固定し血管とリンパ管を免疫染色した。

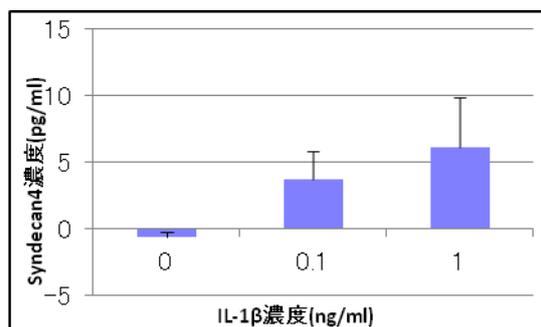
③生後17週のSyndecan4 hetero KOマウス2匹及びhomo KOマウス2匹を用いてLPSを角膜実質内注射によるwound healing及び血管・リンパ管新生をみる実験を行なった。麻酔下でLPSを角膜実質内に注射した。2.5 μ l(LPS5 μ g)注射し、注射後1, 3, 7, 14日後に上皮の状態や血管侵入を麻酔下で観察した。注射後14日後に固定し血管とリンパ管を免疫染色した。

(3)臨床研究 角結膜疾患のある患者、健常者を対象として、涙液中におけるSyndecan4の発現を測定する。測定はELISA法で行った。

4. 研究成果

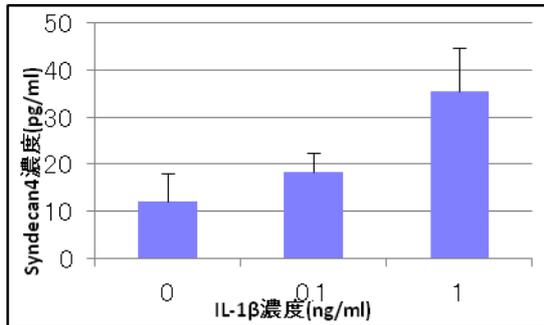
(1) in vitro

①ヒトprimary角膜上皮細胞でのシンデカン4濃度の変化



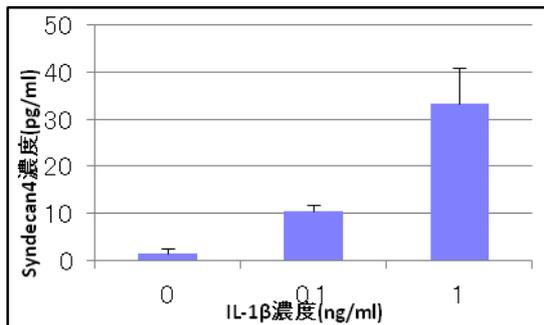
負荷後の上清中のSyndecan4濃度。平均値+標準偏差を示す。0はn=7、他はN=6。0と比較し0.1と1に有意差あり。0.1と1の刺激ではなし。

②ヒト不死化角膜上皮細胞 (SV40 cell) でのシンデカン4濃度の変化



負荷後の上清中の Syndecan4 濃度。平均値+標準偏差を示す。0 は n=8、他は n=7。0 と比較し 0.1 と 1 に有意差あり。0.1 と 1 の刺激でも有意差があった。

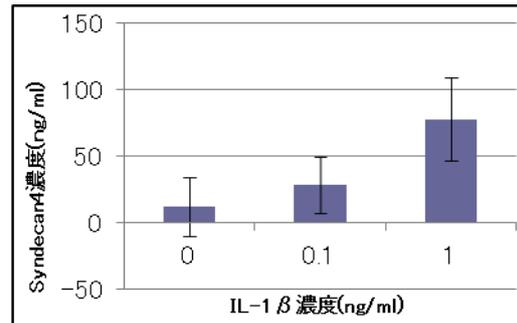
③ヒト primary 結膜上皮細胞でのシンデカン4濃度の変化



負荷後の上清中の Syndecan4 濃度。平均値+標準偏差を示す。各 n=7。0 と比較し 0.1 の刺激では有意差なし (P=0.055)。0 と 1 に有意差あり。0.1 と 1 の刺激でも有意差があった。

ヒト primary 培養角膜・結膜上皮シート、ヒト不死化角膜上皮細胞 (SV40cell) シートをを用いて炎症刺激によるシンデカン4の発現量の有意な増加を ELISA 法にて検出できた。

④ヒト primary 結膜上皮細胞でのシンデカン1濃度の変化



負荷後の上清中の Syndecan1 濃度。平均値+標準偏差を示す。0 は n=5、他は N=6。0 と比較し 1 に有意差あり。0.1 と 1 の刺激でも有意差があった。

シンデカン1についてはヒト primary 角膜上皮細胞、ヒト不死化角膜上皮細胞シートでは感度外であったが、ヒト primary 結膜上皮細胞シートにおいては炎症刺激により Syndecan1 の有意な増加が認められた。

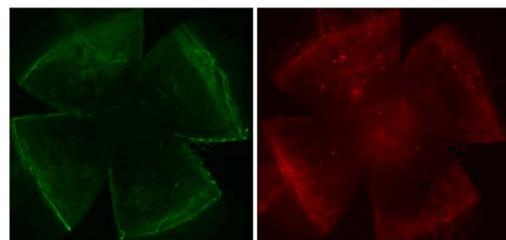
(2)動物実験

Syndecan4 のノックアウトマウスと wild type のマウスでの創傷治癒速度の違いを検討した。

① 単なる物理的創傷モデルでは2群間に wound healing に有意差がなかった。

② アルカリ負荷モデルにおいても2群間で wound healing には差がなかった。血管やリンパ管新生はばらつきがかなりあったが、やや Syndecan4 hetero KO マウスより homo KO マウスで多かった。

染色例を以下に示す。(左リンパ管、右血管)



炎症を伴う上皮創傷作成モデルとしてアルカリ負荷は負荷を均等にかけるのがやや困難でかなりばらつきがでるため、実質内 LPS 注射をしていくこととした。

③K0 マウスではあまり血管やリンパ管新生がおこっておらず、練習用に用いた $5\mu\text{l}$ (LPS $10\mu\text{g}$) 注射した野生型マウスではおこっていたため、実質内注射の量が少ないのではないかと考えられた。今後マウスの繁殖を待ち注射量を $5\mu\text{l}$ (LPS $10\mu\text{g}$) として実験していこうとしている。

(3)臨床研究

角結膜疾患のある患者、健常者を対象として、東大病院及び関連病院眼科にて採取した 136 眼分の涙液中の測定を今までに行った。男性 52 人、女性 84 人より採取した。右眼 70 眼、左眼 66 眼より採取した。平均年齢は 66 ± 18 歳であった。測定感度内は 120 眼であった。涙液中濃度は $3485\pm 3537\text{pg/ml}$ であった。活動性のある感染症の患者では $2965\pm 4497\text{pg/ml}$ であった。流涙のためかえって濃度が薄くなっている可能性も示唆された。またばらつきも大きく様々な疾患の患者で測定しているため、どのような疾患で有意に増加するかを明らかにする結果にはいたっていない。今後さらに n を増やし疾患毎にグループ解析していこうとしている。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

天野 史郎 (AMANO SHIRO)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号 : 80193027

(2)研究分担者 なし

()

研究者番号 :

(3)連携研究者 なし

()

研究者番号 :