

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792005

研究課題名(和文) 角膜移植後における内皮細胞死とミトコンドリアの動態

研究課題名(英文) Cyclosporin A inhibits cell death of corneal endothelial cells by protecting mitochondrial membrane potential

研究代表者

舟木 俊成 (FUNAKI, TOSHINARI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80384121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)： 私たちは培養角膜内皮細胞ではH2O2で細胞死を誘導確認できた。またミトコンドリアの膜電位のマーカーであるMitotrackerの染色においても染色を認めなかった。100nMのCsA存在下での100μM H2O2の刺激では細胞死の抑制を認めた。また同様にミトコンドリアの膜電位の低下の抑制も認めた。CsA存在下でのH2O2刺激では、培養細胞同様に膜電位低下の抑制を認めた。CsAは外科的侵襲による角膜内皮細胞のミトコンドリア膜電位の低下を抑制し、細胞死を抑制することを示唆した。今後角膜移植時における内皮細胞の保護に期待できる薬剤と考えられる。

研究成果の概要(英文)： We confirmed H2O2 induced a dose dependent increase in cell death of cultured human corneal endothelial cells(HCECs). At concentration of 100nM, Cyclosporine A(CsA) attenuated the H2O2-induced cell death of HCECs by 15%.CsA significantly inhibited the permeability transition pore(PTP) in H2O2 treated HCECs. The mitochondrial membrane potential of H2O2 treated mouse corneal cup were protected by CsA at concentration of 100nM.  
Cyclosporine A protected mitochondrial membrane potential from oxidative stress, and attenuated cell death of corneal endothelial 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： 角膜内皮細胞 角膜移植 細胞死 シクロスポリン

## 1. 研究開始当初の背景

日本移植医療における問題点は、提供者数が少ないことが問題であり、眼科領域においても慢性的なドナー不足に陥っていることが現状である。また高い生着率を誇る角膜移植においても、移植後の拒絶反応を含む移植片の機能不全が慢性的なドナー不足を助長している。移植片機能不全の要因の一つとして角膜内皮細胞が生体内で増殖しないことであり、移植後における内皮細胞の慢性的・持続的な脱落がそれを引き起こしている。

その角膜内皮細胞は生体内で増殖しない代わりに高い代謝能力を有しており、それを維持するために多数のミトコンドリアを保有している。そのため角膜内皮細胞機能を維持するためミトコンドリアは非常に重要な働きをしている。その機能低下は細胞死：アポトーシスの誘導に密接に関係しているため角膜内皮細胞とミトコンドリアの解析は非常に重要である。

また実際に我々は角膜移植後の内皮機能不全の患者から再移植時の角膜を摘出し、その内皮細胞の有無と内皮細胞の微小器官の形態を調べた結果、細胞の扁平化に伴い内皮細胞の収縮を認め細胞内小器官はミトコンドリアの縮小を認めた。細胞死の過程にはミトコンドリアの働きが恒常性の維持に関与していると考えられた。

## 2. 研究の目的

角膜移植後の内皮細胞減少とそのミトコンドリア機能およびその形態学的変化を観察しミトコンドリアの機能的・構造的変化が内皮細胞の減少の病態にどのように影響を及ぼしているかどうかを検討する。ヒト培養角膜内皮細胞を用いてミトコンドリア膜電位保護薬剤を用い内皮細胞減少を保護できるか

どうかも検討する。

## 3. 研究の方法

C57BL/6およびBalb/cマウスを用いた角膜移植モデルの角膜内皮細胞密度の解析は人の角膜移植同様 ( Bourne WM. Cornea, 2001 ) の内皮細胞密度減少の結果を得られている。このモデルを用い細胞死を中心に以下の解析を行う。

### 角膜移植術後早期における内皮細胞の減少の検討

角膜移植後は術後1週間以内はより多くの内皮細胞の減少が観察でき、ネクローシスかアポトーシス主体の病態かをより詳細に解析する。

走査型電子顕微鏡により角膜移植後の内皮細胞のアポトーシス・ネクローシスの局在を確認する ( 宿主・移植片・接合部 ) 。

免疫染色によりミトコンドリアの膜電位：Mitotracker の発現における、早期アポトーシス ( AnnexinV ) 発現の相互関係 ( 内因性あるいは外因性 ) を検討する。

### 角膜移植術後後期における内皮細胞の減少の検討

術後後期の内皮細胞の減少はアポトーシスを中心とした細胞死が考えられるが、早期と比べダイナミックな動態をみられず、死細胞の同定が困難と想定される。そのためミトコンドリアの膜電位の機能をみることによって内皮細胞の活動性を評価できる。

ミトコンドリアの局在マーカーである apoptosis induce factor や Cytochrome c などの細胞内の動態を検討することでより詳細にミトコンドリアの機能を評価できる。

角膜移植後の内皮減少には種々の外因性および内因性因子が働き、下流に存在するミ

トコンドリアの機能低下を導いていると考えられる。そこでミトコンドリアの膜電位を保護する薬剤 CsA (Childs E. Am J Surgery, 2010) を用いミトコンドリア膜電位が保護され内皮細胞減少抑制するかどうか検討する。方法としては保存角膜に CsA を投与保温する群・移植後に点眼する群・腹腔内に投与する群と 3 通りに分け、平成 23 年と同様の解析を行う。Negative control としてミトコンドリア膜電位作用を持たない免疫抑制剤：FK506 を使用する。

#### 培養ヒト角膜内皮細胞における CsA の酸化ストレスによる細胞死の保護効果の検討

CsA の投与により細胞死を抑制できるかどうかヒト培養角膜内皮細胞を用い検討した。方法 CsA の指摘濃度を調べるため CsA 濃度を 0~1000nM まで濃度を調整して細胞死の確認を PI 染色で確認した。指摘条件を決定した後に細胞死誘導物質である  $H_2O_2$  を各濃度 (0~1000 $\mu$ M) で刺激し、1 時間後に細胞死マーカーである Caspase-3/7 で染色を行い、陽性率をカウントした。次に  $H_2O_2$  と CsA の共刺激で Caspase-3/7 およびミトコンドリア膜電位のマーカーである MitoTracker Red CMXRos の染色を行い、免疫染色及び蛍光吸光度を測定した。

#### 4. 研究成果

角膜内皮細胞は加齢とともに減少するが、それは生体内でほとんど増殖しないためである。角膜移植術では移植片の内皮細胞はより一層減少するが、その減少に大きく影響を与えているのは、手術時における外科的侵襲である。そのため手術時における内皮細胞保護は移植片の生着に重要と考えられる。in vivo の系：実験系としてマウス Balb/c マウスの同

型同種移植を行い術後 1 日目の内皮細胞の動態を走査型及び透過型電子顕微鏡で確認した。in vitro の系細胞死の実験系としてヒトの培養内皮細胞の cell line を使用した。

角膜内皮細胞はミトコンドリアを多数保有している。ミトコンドリアは高い代謝性を維持することに寄与しており、またミトコンドリアの機能低下は細胞死と密接な関係があると報告されている。一方でシクロスポリン A (CsA) は従来の免疫抑制作用だけでなく、ミトコンドリアの膜電位を安定化させ細胞死を抑制していると報告されている。

目的 Balb/c マウスの同系同種角膜移植を行い術後 1 日目で角膜摘出し、電子顕微鏡にて角膜内皮細胞の観察を行った。CsA の投与により細胞死を抑制できるかどうかヒト培養角膜内皮細胞を用い検討した。方法はヒト培養角膜内皮細胞を用いて、細胞死誘導物質である  $H_2O_2$  を各濃度 (0~1000  $\mu$ M) で刺激し、1 時間後に細胞死マーカーである Caspase-3/7 で染色を行い、陽性率をカウントした。次に  $H_2O_2$  と CsA の共刺激で Caspase-3/7 およびミトコンドリア膜電位のマーカーである MitoTracker Red CMXRos の染色を行い、免疫染色及び蛍光吸光度を測定した。ヒトの全層角膜移植と同様のプロセスをふむため、ex vivo の系でマウスの角膜を用いて行った。

#### 結果

in vivo の系：マウスの角膜移植後術後 1 日目の透過型電子顕微鏡での観察では内皮細胞は膨張し破裂を認めている像と細胞が収縮している像の二つを認めた。細胞内小器官ではミトコンドリアの縮小も確認できた。リボソームやライソソームの確認は出来なかった。

術後一日目では細胞のネクローシスとアポトーシスの両方が確認できた。走査型顕微鏡では角膜内皮細胞の動態を調べ術後一日目では中心から同心円上に内皮細胞が広がっていた。中央部の内皮細胞密度は周辺部のそれと比べ約2倍の差で中央部の方が多かった。

in vitroの系：培養角膜内皮細胞では1~10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ で約50%の細胞死を誘導確認できた。100  $\mu\text{M}$ で100%の内皮細胞の細胞死を確認できた。またミトコンドリアの膜電位のマーカーであるMitotrackerの染色においても10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 以上では染色を認めなかった。CsAの指摘濃度を調べるため0~1000nMのCsAの濃度をふり1000nM以上で内皮細胞の細胞死を確認した。2 100nMのCsA存在下での100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ の刺激では細胞死の抑制を認めた。3 また同様にミトコンドリアの膜電位の低下の抑制も認めた。CsA存在下での $\text{H}_2\text{O}_2$ 刺激では、培養細胞同様に膜電位低下の抑制を認めた。4 ex vivoにおいても同様100nM CsAでの存在下での $\text{H}_2\text{O}_2$ 刺激でもミトコンドリアの膜電位の低下の抑制を認めた。

結論 CsAは外科的侵襲による角膜内皮細胞のミトコンドリア膜電位の低下を抑制し、細胞死を抑制することを示唆した。今後拒絶反応を抑制するだけでなく角膜移植周術時における内皮細胞の保護に期待できる薬剤と考えられる。

#### 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)

[学会発表](計2件)

発表者 舟木俊成

演題 シクロスポリンによる角膜内皮細胞死の抑制

発表日 2012年2月24日

角膜カンファレンス

場所 ホテルニューオータニ

発表者 Toshinari Funaki

演題 Cyclosporin A inhibits cell death of corneal endothelial cells by protecting mitochondrial membrane potential.

発表日 2013年5月6日

ARVO

場所 シアトル

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

舟木 俊成 (FUNAKI, Toshinari)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80384121