

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861453

研究課題名(和文)アラミンシグナルを介した角膜潰瘍形成の分子機序解明

研究課題名(英文)The mechanism of corneal ulcer and corneal fibrosis mediated by alarmin signaling pathway

研究代表者

折田 朋子 (ORITA, Tomoko)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50467792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：角膜上皮細胞あるいは角膜線維芽細胞を凍結、融解させてネクローシスを誘導、細胞抽出液を採取すると主にIL-1 β 、HMGB-1などが検出された。これらアラミン分子はNF- κ B、MAPKを活性化した。同定したアラミン分子を用いヒドロキシプロリンを測定するとコラーゲン分機能が有意に促進された。またMMP2、3、9で発現上昇がみられコラーゲン融解促進作用が示唆された。角膜上皮細胞のバリアー機能へのアラミン分子の作用を検討したところ、TERの低下、ZO-1、occludin、E-cadherin、 β -cateninの発現を抑制し、アラミン分子はバリアー機能を落とす作用があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Alarmins were obtained as the materials released from HCE and HKC cells after freezing and thawing. The alarmins contained mainly IL-1 β , HMGB-1. They activated NF- κ B and MAPK signaling pathway. Next we examined the hydroxyproline assay and the expression of MMP-2, 3 and 9. The alarmins induced hydroxyproline and the expression of MMP-2, 3, 9 as well. This indicates the alarmins promoted collagen degradation. Finally we evaluated the effects of alarmins to the barrier function in HCE. The alarmins reduced TER and inhibited the expression of ZO-1, occludin, E-cadherin and β -catenin. This indicates that the alarmins may involve in barrier dysfunction in HCE cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：角膜性角膜腫瘍 自然免疫 コラーゲン分解 アラミン分子 角膜線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

角膜は無色透明な無血管組織であり、良好な視機能を維持するにはその透明性保持が非常に重要である。角膜は、角膜上皮、実質、内皮層の大きく三層構造からなり、なかでも角膜実質が全体の厚みの90%を占め、I型コラーゲンと角膜実質細胞からなる、角膜の透明性に大きく寄与している。角膜表層を覆いバリアーとして主に働く角膜上皮は、外界からの角膜実質への直接侵襲を防ぎ、角膜透明性維持に関与している。それ故、病原微生物による角膜上皮欠損や角膜上皮炎などの角膜上皮障害は、感染性角膜潰瘍などの角膜実質障害の発症機序に密接な関係がある。このように角膜上皮及びそれに続く実質のホメオスタシスに破綻をきたし、発症すると考えられる感染性角膜潰瘍は、临床上頻度が多く、非常に重大な疾患である。さらに角膜潰瘍が治癒してもしばしば角膜実質に永続的な実質混濁を残し、視機能低下をきたすことがある。研究者らは、角膜の透明性に大きく寄与する角膜潰瘍に焦点をあて研究を進めてきた。角膜潰瘍の本態は、角膜実質を構成するI型コラーゲンの過剰分解であると考えられる。角膜潰瘍の成因は、アレルギー、自己免疫疾患などによる非感染性と病原微生物などによる感染性とに大きく二分され、いずれ場合も角膜上皮障害に続いて、角膜実質融解が生じることにより潰瘍を発症する。これまでの病理組織学的検討から、角膜潰瘍周辺では、角膜実質細胞、角膜線維芽細胞(活性化角膜実質細胞)、浸潤してきた炎症細胞が認められる。このことから感染性角膜潰瘍は、病原微生物に加え、角膜実質固有細胞、浸潤細胞および実質を構成する細胞外基質のコラーゲンが相互作用し、最終的に角膜実質のコラーゲンのリモデリングや細胞障害の拡大により、潰瘍、線維化を生じると考えられる。研究者らの研究室では、角膜実質を模倣したI型コラーゲンをを用いた三次元培養系にて、角膜線維芽細胞がコラーゲン分解の中心的役割を果たすことを世界で初めて報告してきた。さらに研究者は、角膜線維芽細胞が細菌、ウイルス及び真菌の病原体由来の構成成分であるLPS, PolyI:C, Zymosan や炎症性サイトカインなどに反応し、種々のサイトカイン、ケモカイン、炎症性接着分子及びコラーゲン分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)の発現、分泌を亢進することを明らかにした。LPS, PolyI:C, Zymosan は、自然免疫を活性化するToll様受容体(Toll-like receptor: TLR)のリガンドであり、申請者はこれらのリガンドによる角膜線維芽細胞の活性化のシグナル伝達経路についても明らかにした。これまでの結果から角膜線維芽細胞は、感染において自然免疫の基点として働くことが示唆された。近年、感染や外傷などで障害を受け、壊死した細胞から細胞内分子が放出され、自然免疫系を活性化させることが明らかになってきた。壊死

細胞より放出された細胞内分子の多くは、TLRsによって認識される。このように、侵襲や障害局所の壊死細胞から遊離してきて、周辺細胞の自然免疫を誘導する分子をアラミンと呼ぶ。アラミンは組織修復に関与する一方で、局所炎症をオートクライン、パラクライン的にさらに増悪させる。

临床上、感染初期なら感染性角膜潰瘍は、実際に抗菌薬のみで治療が可能であるが、ある程度進行した角膜潰瘍では、抗菌薬のみでは治癒にいたらず、さらに潰瘍形成が進行することで角膜の癒痕形成に至ることがある。つまり、抗菌薬による病原微生物の死滅のみでは、角膜潰瘍形成は十分に阻害できないことを示唆する。このことは、未だ角膜潰瘍治療の特異的な薬剤が存在しないことを示唆している。そこで本研究では、角膜線維芽細胞を基点とした自然免疫系の活性化を介した細胞障害に焦点をあて、感染性角膜潰瘍形成の分子機構を明らかにし、感染性角膜潰瘍および癒痕形成を抑制する新たな感染性角膜潰瘍治療薬の確立を目指す。

2. 研究の目的

感染性角膜潰瘍は、種々の病原微生物が角膜に感染し傷害が角膜深部に広がり形成される。感染性角膜潰瘍は感染初期なら抗菌剤による治療が容易であるが、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、さらに進行する例をよく臨床の場でみかける。また、感染性角膜潰瘍は、たとえ治癒してもしばしば角膜実質に永続的な癒痕、混濁をきたし、著しい視力障害をきたすことがある。このことは、病原微生物の死滅のみでは角膜潰瘍形成及び癒痕化は十分に阻害できないことを示唆する。本研究の目的は、自然免疫に焦点をあて、感染性角膜潰瘍形成及び癒痕化の病態解明を行い、より特異的な治療法を開発することである。

3. 研究の方法

感染性角膜潰瘍の自然免疫を介する局所炎症の分子メカニズムの解明を行い、新規の角膜潰瘍治療薬の開発を目的として研究を遂行する。壊死に陥った角膜上皮細胞ならびに角膜線維芽細胞より放出されるアラミン分子を同定し、これが健常な角膜の角膜上皮細胞、角膜実質細胞にどのように作用するのかを検討する。さらにアラミンによるシグナル伝達経路の検討を行う。ウサギ角膜潰瘍モデルで最終的にin vivoにおけるその角膜潰瘍形成への作用を検討する。

4. 研究成果

角膜上皮細胞あるいは角膜線維芽細胞を凍結、融解させることでネクローシスを誘導し、そこから細胞抽出液を採取しアラミン分子を検出した。主にIL-1, HMGB-1などが検出された。これらアラミン分子は、NF- κ B, MAPKを活性化した。次に、同定したアラミン

ン分子を用い、ヒドロキシプロリンを測定し、コラーゲン分機能が有意に促進されていることがわかった。また、MMP2, 3, 9 で発現上昇がみられ、コラーゲン融解促進作用があることが示唆された。次に角膜上皮細胞のバリアー機能へのアラミン分子の作用を検討したところ、TER の低下、ZO-1, occludin, E-cadherin, -catenin の発現は抑制されており、アラミン分子はバリアー機能を落とす作用があることが示唆された。

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 6 件)

Liu Y, Kimura K, Orita T, Suzuki K, Teranishi S, Mori T, Sonoda KH: Inhibition by a retinoic acid receptor agonist of extracellular matrix remodeling mediated by human Tenon fibroblasts. *Mol Vis* 21: 1368-1377, 2015, 査読有

Liu Y, Kimura K, Orita T, Sonoda KH: Necrosis-Induced Sterile Inflammation Mediated by Interleukin-1 in Retinal Pigment Epithelial Cells. *PLoS One* 10(12): e0144460-e0144460, 2015, 査読有

Kimura K, Orita T, Liu Y, Yang Y, Tokuda K, Kurakazu T, Noda T, Yanai R, Morishige N, Takeda A, Ishibashi T, Sonoda KH: Attenuation of EMT in RPE cells and subretinal fibrosis by an RAR-agonist. *J Mol Med(Berl)* 93(7): 749-758, 2015, 査読有

Liu Y, Kimura K, Orita T, Teranishi S, Suzuki K, Sonoda KH: All-trans-retinoic acid inhibition of transforming growth factor- β -induced collagen gel contraction mediated by human Tenon fibroblasts: role of matrix metalloproteinases. *Br J Ophthalmol* 99(4): 561-565, 2015, 査読有

Liu Y, Kimura K, Orita T, Teranishi S, Suzuki K, Sonoda KH: Inhibition by All-Trans-Retinoic Acid of Transforming Growth Factor- β -Induced Collagen Gel Contraction Mediated by Human Tenon Fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55(7): 4199-4205, 2014, 査読有

Kimura K, Orita T, Fujitsu Y, Liu Y, Wakuta M, Morishige N, Suzuki K, Sonoda KH: Inhibition by female sex hormones of collagen gel contraction mediated by retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55(4): 2621-2630, 2014, 査読有

[学会発表](計 20 件)

福村 美帆, 湧田 真紀子, 能美 なな実, 播磨 希, 折田 朋子, 柳井 亮二, 木村 和博, 園田 康平: アフリベルセプト硝子体内注射直後の眼圧上昇による視神経乳頭血流の長期予後. 第 54 回日本網膜硝子体学会総会・第 32 回日本眼循環学会合同学会, 東京都(東京国際フォーラム), 2015/12/05

能美 なな実, 福村 美帆, 湧田 真紀子, 播磨 希, 折田 朋子, 柳井 亮二, 木村 和博, 園田 康平: 滲出型加齢黄斑変性に対する treat and extend 法による 1 年間のアフリベルセプトの治療実績. 第 54 回日本網膜硝子体学会総会・第 32 回日本眼循環学会合同学会, 東京都(東京国際フォーラム), 2015/12/05

湧田 真紀子, 福村 美帆, 能美 なな実, 播磨 希, 折田 朋子, 柳井 亮二, 木村 和博, 園田 康平: 加齢黄斑変性に対するアフリベルセプト投与の黄斑部血流への影響と網脈絡膜厚との関連. 第 54 回日本網膜硝子体学会総会・第 32 回日本眼循環学会合同学会, 東京都(東京国際フォーラム), 2015/12/05

庄田 裕美, 柳井 亮二, 能美 なな実, 内 翔平, 原田 大輔, 折田 朋子, 木村 和博, 園田 康平: サイトメガロウイルス網膜炎後に発症した immune recovery uveitis の 2 症例. 第 54 回日本網膜硝子体学会総会・第 32 回日本眼循環学会合同学会, 東京都(東京国際フォーラム), 2015/12/05

折田 朋子: 糖尿病雁合併症とその治療. 『眼と糖尿病』研究会, 山口県(ANA クラウンプラザホテル), 2015/11/30

能美 なな実, 福村 美帆, 湧田 真紀子, 播磨 希, 折田 朋子, 柳井 亮二, 木村 和博, 園田 康平: 当院での滲出型加齢黄斑変性に対する aflibercept の Treat and extend 法による 1 年治療成績. 第 126 回山口県眼科医会秋季総会並びに集談会, 山口県(翠山荘), 2015/11/01

松永 道男, 能美 なな実, 播磨 希, 折田 朋子, 山本 和隆, 柳井 亮二, 木村 和博, 園田 康平: 対光反応が診断に有用であった視神経髄膜腫の一例. 第 126 回山口県眼科医会秋季総会並びに集談会, 山口県(翠山荘), 2015/11/01

太田 真実, 寺西 慎一郎, 白石 理江, 徳久 佳代子, 折田 朋子, 鈴木 克佳, 園田 康平: バルベルト緑内障インプラント手術における前房内挿入型チューブの硝子体腔内留置法の経験. 第 60 回山口眼科手術懇話会, 山口県(山口大学附属病院), 2015/10/03

松永 道男, 柳井 亮二, 折田 朋子, 湧田 真紀子, 播磨 希, 波多野 誠, 木村 和博, 園田 康平: 黄斑円孔, および黄斑円孔網膜剥離に対し Inverted ILM flapping 法を用いた 2 症例. 第 60

回山口眼科手術懇話会, 山口県(山口大学附属病院), 2015/10/03
 岩本 菜奈子, 野田 健, 播磨 希, 折田 朋子, 柳井 亮二, 木村 和博, 園田 康平: Candida tropicalis による内因性真菌性眼内炎の一例. 第 49 回日本眼炎症学会, 大阪府(コングレコンベンションセンター), 2015/07/11
 折田 朋子, 木村 和博, 園田 康平: 角膜実質細胞における ATRA のコラーゲン分解制御による角膜潰瘍抑制作用. 第 49 回日本眼炎症学会, 大阪府(コングレコンベンションセンター), 2015/07/10
 松永 道男, 能美 なな実, 播磨 希, 折田 朋子, 木村 和博, 山本 和隆, 柳井 亮二, 園田 康平: AZOOR や MEWDS と鑑別を要した視神経髄膜腫の一例. 第 49 回日本眼炎症学会, 大阪府(コングレコンベンションセンター), 2015/07/10
 小林 正明, 山城 知恵美, 白石 理江, 折田 朋子, 寺西 慎一郎, 柳井 亮二, 木村 和博, 鈴木 克佳, 園田 康平: Pit-macular 症候群に対して硝子体手術を施行した一例. 第 59 回山口眼科手術懇話会, 山口県(霜仁会館), 2015/07/02
 折田 朋子, 木村 和博, 播磨 希, 山城 知恵美, 湧田 真紀子, 柳井 亮二, 園田 康平: マウス網膜色素上皮細胞のコラーゲン収縮に対する PGE2 の作用. 第 119 回日本眼科学会, 北海道(さっぽろ芸文館), 2015/04/17
 山城 知恵美, 木村 和博, 劉 洋, 折田 朋子, 寺西 慎一郎, 鈴木 克佳, 園田 康平: テノン囊線維芽細胞における All-trans retinoic acid のコラーゲン収縮抑制効果. 第 119 回日本眼科学会, 北海道(ロイトン札幌), 2015/04/16
 小林 由佳, 木村 和博, 折田 朋子, 園田 康平, 松山 茂生, 富士本 一志, 山内 一彦: 糖尿病黄斑浮腫と増殖糖尿病網膜症における硝子体中の血管新生関連因子発現の差異. 第 53 回日本網膜硝子体学会総会・第 31 回日本眼循環学会合同学会, 大阪府(大阪国際会議場), 2014/11/29
 木村 和博, 守田 裕希子, 折田 朋子, 藤津 揚一郎, 園田 康平: 結膜原発と考えられたメルケル細胞癌の 1 例. 第 68 回日本臨床眼科学会, 兵庫県(神戸ポートピアホテル・神戸国際展示場), 2014/11/16
 緒方 惟彦, 波多野 誠, 折田 朋子, 柳井 亮二, 藤津 揚一郎, 木村 和博, 園田 康平: 化膿性脊椎炎に併発した内因性細菌性眼内炎の 1 例. フォーラム 2014 東京 第 48 回日本眼炎症学会, 東京都(東京国際フォーラム), 2014/07/04
 折田 朋子: インフリキシマブ投与中のベーチェット病ぶどう膜炎患者の網膜剥離に対し硝子体手術を施行した 1 例. 第

8 回九州ベーチェット病フォーラム, 福岡県(ホテル日航福岡), 2014/06/21
 Orita T, Kimura K, Hatano M, Wakuta M, Fujitsu Y, Sonoda KH: Role of female sex hormones in collagen gel contraction mediated by retinal pigment epithelial cells. ARVO, USA Orlando (Orange County Convention Center), 2014/05/04
 [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

折田 朋子 (ORITA, Tomoko)
 山口大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号: 50467792

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: