

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 元 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20295

研究課題名（和文）流体力学的アプローチによる瞬目時摩擦刺激に対する角膜上皮細胞の応答

研究課題名（英文）Signaling induced by mechanical stimulation of fluid shear stress in cultured corneal epithelial cells

研究代表者

宇都宮 嗣了 (Utsunomiya, Tsugiaki)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号：50646065

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）：現在のドライアイの治療は対症療法であり、病態解明に基づいた治療の確立には至っていない。ドライアイなど眼表面疾患において瞬目による摩擦力の重要性が着目され、瞬目による摩擦は流体力学的に剪断応力（シェアストレス）として捉えることが可能である。平行平板型流れ負荷装置を用いた水流シェアストレスによって培養細胞に定量的に長時間にわたって機械的刺激を負荷する実験手法を培養ヒト角膜上皮細胞に応用し、瞬目の摩擦による角膜上皮への慢性的な機械的刺激を再現した。機械的刺激負荷後の培養ヒト角膜上皮細胞においてTGF- β のシグナル伝達が活性化されることを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のドライアイ治療は対症療法であり、病態解明に基づいた治療の確立には至っていない。ドライアイ等の眼表面疾患において瞬目による摩擦力の重要性が着目され、瞬目による摩擦力は流体力学的に捉えることが可能である。水流によって培養細胞に定量的に長時間にわたって機械的刺激を負荷する実験手法を培養ヒト角膜上皮細胞に応用し、瞬目の摩擦による角膜上皮への慢性的な機械的刺激を再現、培養ヒト角膜上皮細胞において機械的刺激負荷によってTGF- β のシグナル伝達が活性化されることがわかった。機械的刺激負荷後のシグナル伝達を解析することで、ドライアイ等眼表面疾患の病態解明、新薬開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Because blinking is regarded as mechanical stimulation of fluid shear stress on the corneal epithelial cells, we investigated the effects of fluid shear stress on cultured human corneal epithelial cells (HCECs). The HCECs were exposed to shear stress with the parallel-plate type of flow chamber, which exposed the cells to variable levels of laminar shear stress. Fluid shear stress on the HCECs affected TGF- β signaling, which was associated with delayed wound healing. Mechanical stress by blinking might involve TGF- β signaling, and activation of TGF- β might be a key factor in wound healing of the corneal epithelium. Further studies should investigate the molecular mechanism induced shear stress.

研究分野：眼科角膜領域

キーワード：角膜上皮細胞 シェアストレス TGF β ドライアイ

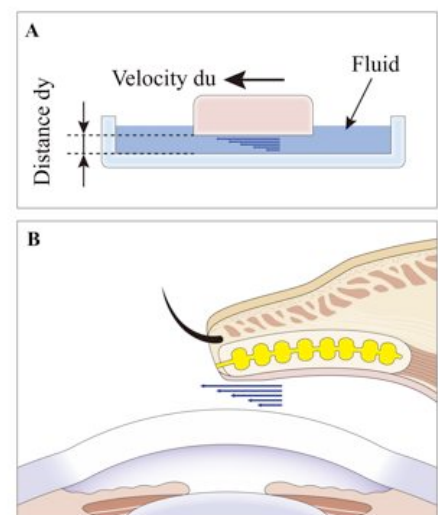
様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

角膜上皮は瞬目時に上眼瞼の摩擦による機械的刺激を受けている。瞬目の摩擦は眼球表面の角膜上皮と眼瞼裏面の眼瞼結膜上皮の間に存在する涙液層の改善により軽減されることが明らかとなっているが、現在のドライアイの治療は一時的な対症療法であり、病態解明に基づいた治療の確立には至っていない。瞬目の摩擦による機械的刺激は物理的に角膜上皮を障害するだけでなく、何らかのシグナル伝達に関与している可能性があるが、それらの詳細は明らかとなっていない。従来のin vivoの実験モデルでは強制瞬目によって機械的刺激を負荷することは可能であるものの定量的に長時間負荷することが難しく、炎症や浸透圧変化などの因子も加わってしまうため結果の解釈が複雑となる。in vitroで機械的刺激を加えたとする実験モデルもピペットで細胞に培地を上から数回かけるだけの手技であり、定量的な機械的刺激とは言い難いものであった。これらの課題を解決した実験モデルは確立されておらず、眼表面摩擦が角膜上皮に及ぼす分子生物学的メカニズムの詳細は未解明なままであった。

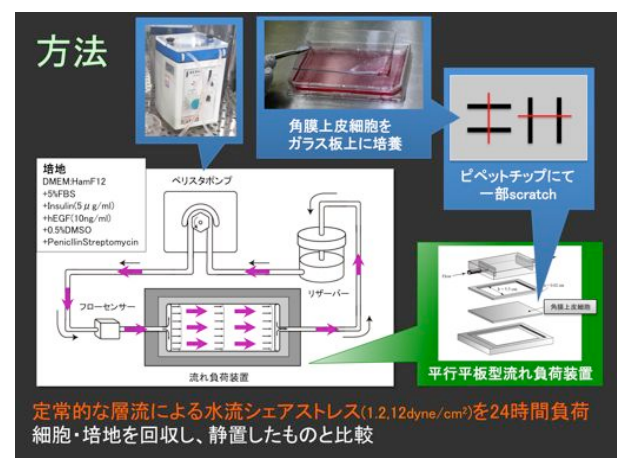
2. 研究の目的

上眼瞼結膜上皮と角膜上皮の間に涙液が存在することから、瞬目による摩擦は流体力学的に剪断応力（シアストレス）として捉えることが可能である。（シアストレス）＝（液体の粘性）×（速度勾配）、この公式を眼表面に置き換えると、（瞬目によるシアストレス）＝（涙液の粘性）×（瞬目時の上眼瞼速度）／（眼瞼結膜上皮と角膜上皮の間に存在する涙液の厚み）と考えることが出来る。我々は平行平板型流れ負荷装置を用いた水流シアストレスによって培養細胞に定量的に長時間にわたって機械的刺激を負荷する実験系を培養ヒト角膜上皮細胞に応用し、瞬目の摩擦による角膜上皮への慢性的な機械的刺激を再現することで、瞬目による機械的刺激に対する角膜上皮の応答を明らかにすることを目的とした。



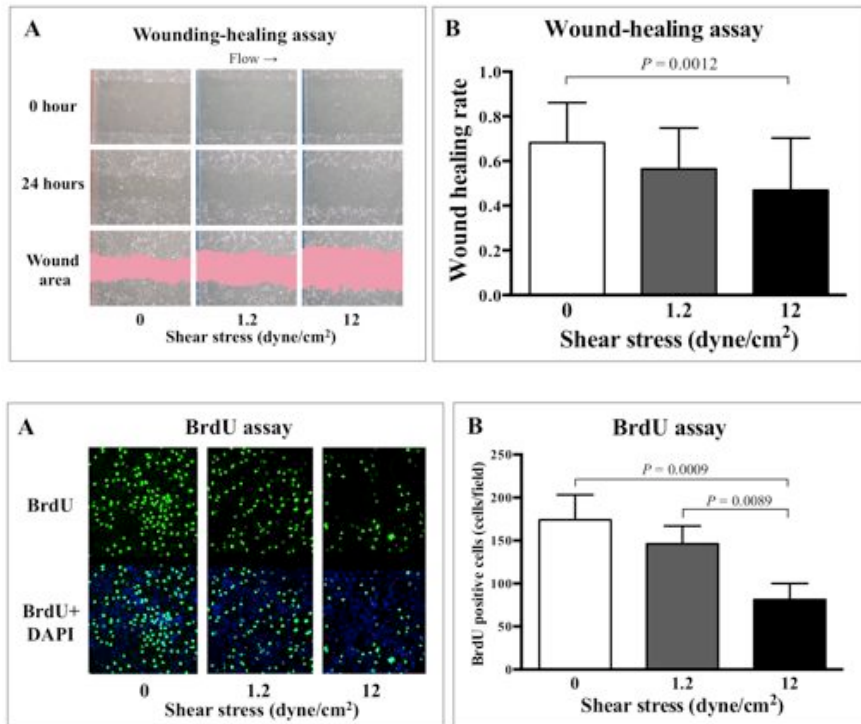
3. 研究の方法

ヒト角膜上皮細胞をスライドグラス上に培養、ピペットチップで一部を剥離して平行平板型流れ負荷装置に設置、ペリスタポンプを用いて水流を生じさせ、定常的な層流によるシアストレス（12, 1.2dyne/cm²）を24時間細胞に負荷した。剥離部の撮影をした後、負荷後の細胞、培地上清を採取した。Wound healing assayにて創傷治癒を、BrdU assayにて細胞増殖を評価した。また、real time PCRにて増殖因子のmRNA発現を、ELISAにて培地上清中のTGFβ1蛋白濃度を、ウェスタンブロッティングにてSMAD2のリン酸化を検討した。

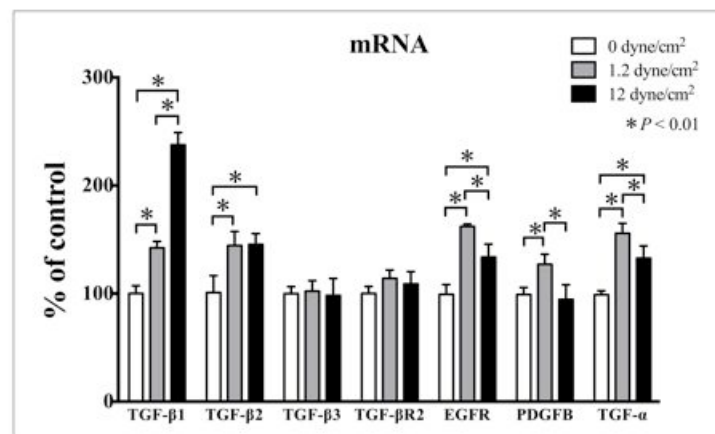


4. 研究成果

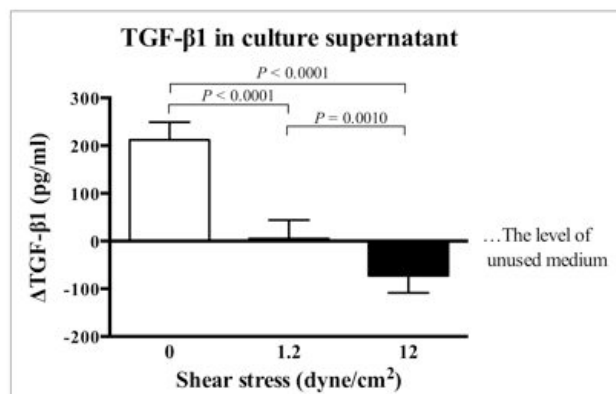
静置した細胞と比較し、創傷治癒は 12dyne/cm² 負荷後の細胞で有意に遅延し、細胞増殖も有意に低下した。



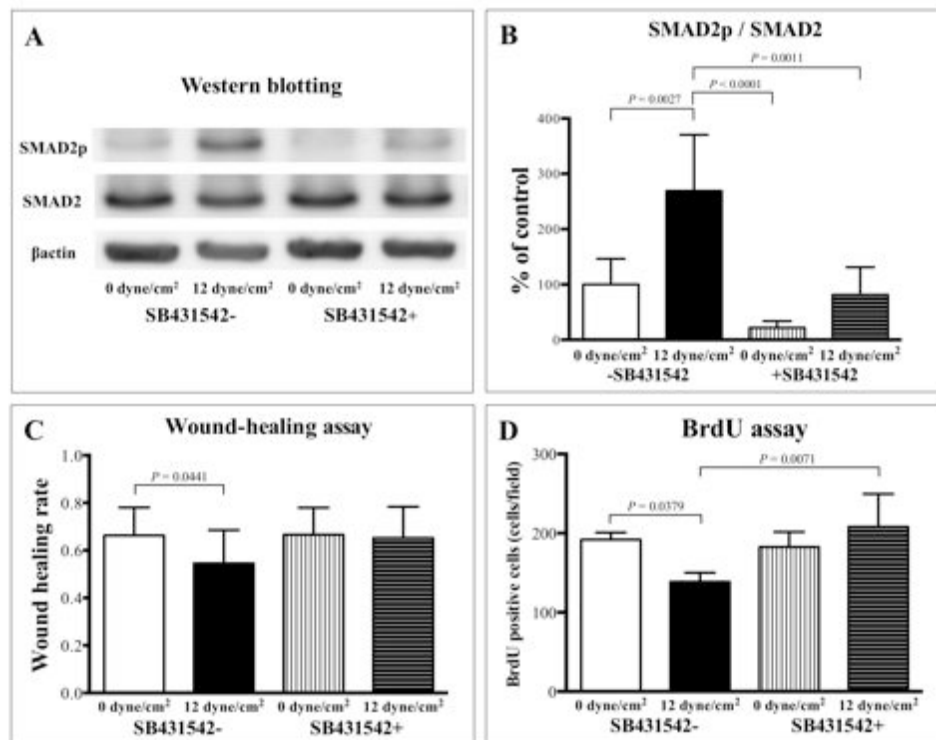
増殖因子のうち TGF β 1 が最も著明な変化を示し、mRNA 発現は 12dyne/cm² 負荷後の細胞で 2.38 ± 0.11 倍、1.2dyne/cm² で 1.42 ± 0.06 倍に増加した。



培地上清中 TGF β 1 濃度は使用前培地中濃度と比較して、静置したもので $+212 \pm 38$ pg/ml、12dyne/cm² で -73 ± 36 pg/ml、1.2dyne/cm² で $+5 \pm 39$ pg/ml であった。



TGF β の下流である SMAD2 のリン酸化は 12dyne/cm² 負荷後の細胞で 2.20 ± 0.60 倍、1.2dyne/cm² で 1.54 ± 0.34 倍に有意に増加した。TGF β receptor inhibitor である SB431542 を用いて同様の実験を行ったところ、12dyne/cm² 負荷後の細胞でも SMAD2 のリン酸化は認めず、創傷治癒遅延や細胞増殖低下も見られなかった。



考察

涙液を眼表面全体に行き渡らせるために瞬目は必須であるが、瞬目時に角膜上皮と眼瞼結膜上皮の間には摩擦が生じてしまう。角膜上皮と眼瞼結膜上皮の間には涙液が存在することから、瞬目による摩擦を流体力学的にシェアストレスとして考察することが可能である。粘性流体を挟んだ移動物体によって引き起こされるシェアストレスは液体の粘性×速度勾配で求められることから、瞬目時に角膜上皮にかかるシェアストレスは涙液の粘性×瞬目速度／涙液厚で求められる。本研究は流れ負荷装置を用いて角膜上皮細胞に定量的にシェアストレスを負荷することにより、シェアストレスが角膜上皮細胞の TGF β シグナルに関与することを見出した。TGF β は多機能なサイトカインであり、眼表面では角膜上皮、結膜上皮、涙腺から分泌されて涙液中に認められ、角膜上皮、結膜上皮にはその receptor も発現している。TGF β は epidermal growth factor に誘導された角膜上皮細胞の増殖や遊走を阻害することが報告されており、本研究のシェアストレスによる角膜上皮細胞の創傷治癒遅延や細胞増殖の減少は TGF β receptor inhibitor を用いて認めなくなったことから、これらの変化は TGF β のシグナル伝達を介していると考えられた。TGF β の多くは Latency-associated peptide (LAP) と結合した潜在型で存在している。LAP の解離によって活性型となることで TGF β receptor への結合が可能となることから、潜在型 TGF β の活性化機序は TGF β 経路のシグナル調節に重要であるとされている。本研究ではシェアストレスを負荷すると TGF β の下流である SMAD2 のリン酸化が増加したが、培地上清中 TGF β 1 濃度は使用前培地中濃度と比較して低下していた。本研究は角膜上皮細胞のみが存在する閉鎖回路にて培地を循環させていることから、潜在型 TGF β が活性化して receptor に結合し

た結果、培地中の TGF β 濃度が低下した可能性が考えられる。潜在型 TGF β の活性化機序が角膜上皮細胞においてシェアストレスによる TGF β シグナル伝達に重要である可能性があり、さらなる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 2 件）

Effects of diquafosol ophthalmic solution on quality of life in dry eye assessed using the Dry Eye-related Quality-of-life Score Questionnaire: effectiveness in patients while reading and using visual display terminals.

Utsunomiya T, Kawahara A, Hanada K, Yoshida A.

Cornea. 2017;36(8): 908-914. doi: 10.1097/ICO.0000000000001241.

Transforming Growth Factor- β Signaling Cascade Induced by Mechanical Stimulation of Fluid Shear Stress in Cultured Corneal Epithelial Cells.

Utsunomiya T, Ishibazawa A, Nagaoka T, Hanada K, Yokota H, Ishii N, Yoshida A.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016;57(14): 6382-6388. doi: 10.1167/iovs.16-20638.

〔学会発表〕（計 4 件）

・ 角膜カンファランス 2018 - 第 42 回日本角膜学会総会/第 34 回日本角膜移植学会
宇都宮 嗣了, 石羽澤 明弘, 横山一弘, 松本千恵美, 花田 一臣, 吉田 晃敏.

流体力学的アプローチを用いた瞬目摩擦刺激による角膜上皮細胞の ANGPTL4 発現上昇

・ The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)

Utsunomiya T, Ishibazawa A, Nagaoka T, Hanada K, Yoshida A.

Effects of mechanical stimulation of fluid shear stress in cultured corneal epithelial cells.

・ 角膜カンファランス 2016 - 第 40 回日本角膜学会総会/第 32 回日本角膜移植学会
宇都宮 嗣了, 石羽澤 明弘, 長岡 泰司, 花田 一臣, 吉田 晃敏.

流体力学的アプローチによる瞬目時摩擦刺激に対する角膜上皮細胞の応答: TGF β .

・ 第 120 回日本眼科学会総会

宇都宮 嗣了, 石羽澤 明弘, 長岡 泰司, 花田 一臣, 吉田 晃敏.

流体力学的アプローチによる瞬目時摩擦刺激に対する角膜上皮細胞の応答: TGF β , MMP.

〔その他〕

ホームページ: <http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/optha/>

6. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名: 長岡泰司、花田一臣、石居信人、石羽澤明弘、松本千恵美

ローマ字氏名: Taiji Nagaoka, Kazuomi Hanada, Nobuhito Ishii, Akihiro Ishibazawa, Chiemi Matsumoto