

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K10876

研究課題名(和文) デスモゾーム・中間径フィラメント関連因子の角膜上皮での役割についての研究

研究課題名(英文) The role of desmosomes and intermediate diameter filament-related factors in the corneal epithelium

研究代表者

小門 正英 (Kokado, Masahide)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：30445085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：培養角膜上皮細胞でsiRNAを用いたEPPKのノックダウンはEカドヘリン発現を抑制し、遊走と増殖を促進した。EPPK発現低下がEカドヘリン発現低下を伴って上皮細胞の遊走を促進するという結果は癌細胞の浸潤に大きく関係する上皮細胞の上皮間葉系移行(Epithelial-mesenchymal transition; EMT)に共通する分子動態である。

Creリコンビナーゼ発現マウスとJUP flox/floxマウスから角膜上皮特異的プラコグロビン(Junctional plakoglobin; JUP)欠損マウスを交配作成し、角膜上皮の脆弱性と創傷治癒が遅延を報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

角膜特異的JUP欠損マウスでの角膜上皮の脆弱性が示されたことから細胞骨格や細胞間接着の障害が想定された。JUP遺伝子異常症例のNaxos病ではNaxos病という、エーゲ海・Naxos島の風土病として知られ、手掌などの角化症とwoolly hairという特徴的な髪の毛の異常を合併する病気があることがギリシャのProtonotarios博士らにより報告されているが、不整脈以外に眼科診療も重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Knockdown of EPPK with siRNA in cultured corneal epithelial cells suppressed E-cadherin expression and promoted migration and proliferation. The result that down-regulation of EPPK accompanied by down-regulation of E-cadherin expression promoted epithelial cell migration is a common molecular kinetics of epithelial-mesenchymal transition (EMT) of epithelial cells, which is largely related to cancer cell invasion.

Corneal epithelium-specific plakoglobin (JUP) deficient mice were cross created from Cre recombinase-expressing mice and JUP flox/flox mice and reported corneal epithelial fragility and delayed wound healing.

研究分野：創傷治癒

キーワード：創傷治癒 角膜上皮

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

角膜上皮は非角化性の4~5層から成る重層扁平上皮である。角膜上皮は、細胞間接着による安定した構造により、光学的に優れた表面構造と外来物質に対するバリア機能を維持している。角膜上皮の障害は、上皮細胞の遊走によって迅速に一次治癒した後、増殖と分化によって重層扁平構造を再構築する。角膜上皮細胞間の接着機構としてアドヘレンス・ジャンクション、デスモゾーム、タイト・ジャンクション、ギャップ・ジャンクションが知られている。角膜損傷時には重層扁平構造を再構築すなわち上皮のバリア機能の回復により、実質細胞の筋線維芽細胞への転換抑制と筋線維芽細胞の死滅によって、実質の癒痕化が回避され、透明性が回復される。Meesmann 型角膜上皮変性症での遺伝子変異が知られている角膜特異的ケラチン中間系フィラメントであるケラチン(K)12の欠損マウスでは、外力による角膜上皮構造の維持機能が低下していると報告された。一方、遷延性角膜上皮障害の病態には未知な部分が多い。上皮基底細胞の基底膜(あるいは露出した角膜実質)への接着の障害が主な病態と考えられているが、上皮欠損周辺での上皮細胞同士の接着構造の変化などは研究されていない。申請者の所属では、これまで創傷治癒過程での各種細胞間接着装置関連蛋白質の発現変化¹⁾とc-fosノックアウトマウスでの角膜上皮構造異常が細胞間デスモゾームの現象と関係がある可能性²⁾を報告してきた。申請者もデスモゾーム関連分子に焦点を当てて研究を行っている。特にエピブラキン(Epiplakin:EPPK)³⁾とプラコグロビンに注目して研究している。

2. 研究の目的

マウス in vivo 角膜上皮での機能解析を行った EPPK の機能解析の培養細胞を用いた研究での継続と角膜上皮特異的プラコグロビン遺伝子(JUP; junction plakoglobin)欠損マウスを作成し、プラコグロビンの機能解析を目的とする。

3. 研究の方法

実験 1

SV40 で不死化した培養ヒト角膜上皮細胞(HCE)を用い RNA 干渉法で EPPK をノックダウンし、角膜上皮細胞の遊走能を検討した。また遊走に関与するシグナル伝達(P38, JNK)およびケラチン6(K6)を western blotting で検討した。

実験 2

(1)雌雄を問わず(jup/jup) flox マウスと(jup/+ ; Krt12Cre/+)マウスの交配し、角膜上皮特異的プラコグロビン遺伝子欠損マウス(jup/jup, krt12)を作成した。角膜上皮の形態について光学顕微鏡、免疫組織化学で比較検討した。

(2)野生型(n=5)および角膜特異的プラコグロビン遺伝子欠損マウス(n=5)に直径 2mmの角膜上皮欠損を作製後、経時的に上皮欠損部の面積を測定し、創傷治癒への影響についての検討を行った。

(3)角膜上皮の脆弱性を野生型マウスおよび角膜上皮特異的プラコグロビン遺伝子欠損マウスの角膜上皮をブラシで2回擦過し、直後に摘出した眼球を透過電顕写真で比較検討した。

4. 研究成果

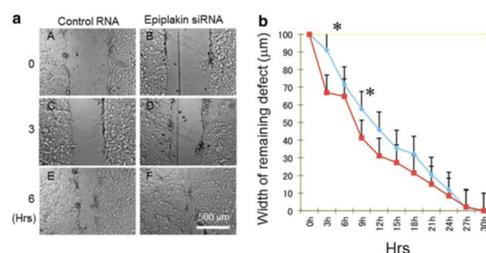
実験 1

EPPK ノックダウンで3時間後と9時間後で有意に欠損部の閉鎖が亢進していた。TGFb 添加1時間後のP38, JNK は抑制されていた。K6 は差がなかった。

これらの結果から EPPK 欠損により角膜上皮細胞の基底細胞の重層化、ケラチン線維の減少など形態に変化をもたらす。エピブラキンの欠損によりケラチン線維が減少し、このことが角膜上皮の遊走を促進し、創傷治癒の促進に関与している可能性が考えられた。

実験 2

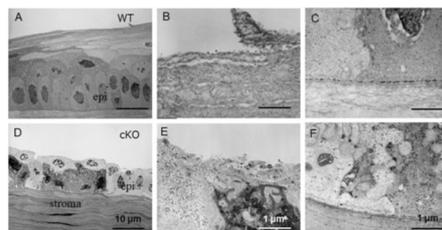
(1)JUP 遺伝子と Krt12 遺伝子の両者は共に 11 番染色体上の 0.55 cM で極近傍のため、理論上 200 分の 1 以下の確率となるところ、新生仔獣 202 匹のうち 2 匹の角膜特異的プラコグロビン遺伝子欠損マウス仔獣を得、その後コロニーを拡大した。トレイジブルー染色では、角膜上皮の表層への分化が障害されている事を示唆する上皮細胞の異常な配列(基底細胞様の細胞



が基底層より上層にも分布)で観察され、それらは基底細胞特異的のケラチン 14 陽性であった。

(2)角膜特異的のプラコグロビン遺伝子欠損マウスで 12 時間後と 30 時間後で有意に欠損部の閉鎖が抑制されていた。BrdU 免疫染色では、遺伝子欠損マウスで陽性細胞が少ない傾向を示したものの、上皮欠損作成なし、上皮欠損作成 48 時間後ともに統計学的有意差は得られなかった。プラコグロビンの欠損により創傷治癒に異常をもたらす。上皮細胞の遊走抑制が示唆された。

(3) 野生型マウスでは擦過時の角膜上皮の障害が、角膜上皮のごく表層に留まるのに対して、角膜上皮特異的のプラコグロビン遺伝子欠損マウスは角膜上皮欠損がより深い層におよび、翼細胞まで達していた。電子顕微鏡的には基底膜構造に差異は見られなかった。角膜上皮特異的のプラコグロビン遺伝子欠損マウスでの角膜上皮の脆弱性が示された。細胞骨格や細胞間接着の障害が想定された。JUP 遺伝子異常症例では不整脈以外に眼科診療も重要であると考えられた。



< 引用文献 >

Okada Y, Saika S, Shirai K, Hashizume N, Yamanaka O, Ohnishi Y, Senba E., Disappearance of Desmosomal Components in Rat Corneal Epithelium During Wound Healing, *Ophthalmologica*, 2001; 215(1):61-65

Okada Y, Senba E, Shirai K, Ueyama T, Reinach P, Saika S., Perturbed intraepithelial differentiation of corneal epithelium in c-Fos-null mice, *Jpn J Ophthalmol*, 2008; 52(1):1-7

Kokado M, Okada Y, Goto M, Ishikawa K, Miyamoto T, Yamanaka O, Fujiwara S, Saika S., Increased fragility, impaired differentiation, and acceleration of migration of corneal epithelium of epiplakin-null mice, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013; 54(5):3780-3789

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kokado M, Miyajima M, Okada Y, Ichikawa K, Yamanaka O, Liu CY, Kao WW, Shou W, Saika S.	4. 巻 98
2. 論文標題 Lack of plakoglobin impairs integrity and wound healing in corneal epithelium in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1375-1383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-018-0082-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kokado M, Okada Y, Miyamoto T, Yamanaka O, Saika S.	4. 巻 278
2. 論文標題 Effects of Epiplakin-Knockdown in Cultured Corneal Epithelial Cells	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 2028-2087
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-016-2082-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masahide. Kokado, Masayasu. Miyajima, Yuka. Okada, Osamu. Yamanaka, Chia-Yang Liu, Winston Kao, Weinian Shou, Shizuya. Saika.
2. 発表標題 Fragility of corneal epithelium induced by cornea-specific loss of plakoglobin in mice
3. 学会等名 The Association for Research in Vision and Ophthalmology（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小門正英、宮嶋正康、岡田由香、山中修、Chia-Yang Liu、Winston Kao、Weinian Shou、雑賀司珠也
2. 発表標題 角膜上皮特異的プラコグロビン欠失マウスの角膜上皮の脆弱性
3. 学会等名 日本眼科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masahide. Kokado, Masayasu. Miyajima, Yuka. Okada, Osamu. Yamanaka, Chia-Yang Liu, Winston Kao, Shizuya. Saika.
2. 発表標題 Phenotype of corenal epithelium-specific deletion of plakoglobin in mice; morphology and wound healing
3. 学会等名 The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 小門正英、宮嶋正康、岡田由香、山中修、Chia-Yang Liu、Winston Kao、雑賀司珠也
2. 発表標題 角膜上皮特異的プラコグロビン欠失マウスの角膜上皮での創傷治癒
3. 学会等名 日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 小門正英、宮嶋正康、岡田由香、山中修、Chia-Yang Liu、Winston Kao、雑賀司珠也
2. 発表標題 角膜上皮特異的プラコグロビン欠失マウスの作成とその角膜上皮の構造
3. 学会等名 日本眼科学会総会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	雑賀 司珠也 (Saika Shizuya) (40254544)	和歌山県立医科大学・医学部・教授 (24701)	

