

令和 2 年 6 月 12 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：15K10877

研究課題名(和文) ムチン16の常在細菌と点眼防腐剤に対する眼表面炎症制御での役割の解明

研究課題名(英文) The role of Muc16 in the regulation of ocular surface inflammation

研究代表者

白井 久美 (Shirai, Kumi)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70326370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ムチン減少による結膜炎増強の機序解明を目的として、Muc16欠損による点眼薬防腐剤BAC(塩化ベンザルコニウム)点眼後の眼表面への影響、およびMuc16欠損によるTLR(Toll-like receptor)系の活性化への影響の有無について調べた。BACの暴露による結膜炎反応とMuc16の関連は確認されなかった。眼表面常在細菌の菌体成分であるLPS(Lipopolysaccharide)やPGN(peptidoglycan)の暴露による結膜炎反応とMuc16の関連は確認されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ムチンMuc16減少による結膜炎増強は、点眼薬防腐剤BAC暴露に影響されなかった。また眼表面での常在細菌(菌体成分)に対する自然免疫TLR系の活性化と結膜炎制御におけるムチンMuc16の有無の影響は確認されなかった。

これらの結果より、今後は別の観点から、ムチンMuc16減少による結膜炎増強の機序解明、さらにはムチンMuc16のドライアイ診療での役割評価を目指すことが必要である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of loss of Muc16 to ocular surface following administration of BAC (benzalkonium chloride) and to activation of TLR (Toll-like receptor) to elucidate the mechanism of enhancement of conjunctival inflammation induced by a decrease in mucin. Muc16 is not related to conjunctival inflammation following administration of BAC. Muc16 is not related to conjunctival inflammation induced LPS or PGN, commensal bacterial components.

研究分野：眼細胞生物学

キーワード：ムチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1)①ムチン (Muc) は生体粘膜表面に広く存在し、感染防御、恒常性維持に重要である。消化管や気道の粘膜では常在菌であってもムチン層の障害で上皮表層に達すると免疫系が活性化されホメオスタシスの調節が障害され、感染と炎症が生じる。②申請者は Muc16 ノックアウト (Muc16-KO) マウスでは、サブクリニカルに結膜に慢性炎症が惹起され、二次的に角膜の恒常性が破綻していることを報告した (Shirai K et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014)。これはムチンの抗炎症作用を示し、ドライアイの病態理解の一助となる結果である。さらに、幼若 Muc16-KO マウスではこの結膜の炎症増強が観察されなかったことから、同マウスでの結膜炎惹起には結膜常在菌の関与が想定されるものの詳細な機序は解明できていない。眼表面ムチンも消化管同様に常在細菌の上皮さらには上皮下組織への侵入を阻止している可能性が想定できる。

(2)①粘膜上皮では Toll-like receptor (TLR) が菌体成分である LPS (Lipopolysaccharide) や peptidoglycan (PGN) を認識し、細胞内のシグナル伝達機構を活性化させ、サイトカインの産生を促し、その後の免疫応答や炎症を誘導する。ムチン類は TLR シグナルの作用に阻害的と考えられている。②一方、点眼薬に含まれる塩化ベンザルコニウム (BAC) に代表される防腐剤成分には眼表面に対する障害作用がある。実験的にマウスに BAC 点眼を継続するとドライアイと結膜炎が惹起されると報告されている。

以上より、眼表面での常在細菌 (菌体成分) に対する自然免疫と結膜炎制御でのムチン Muc16 の役割、さらにムチン減少による結膜炎増強が BAC 点眼に影響されるかについての解明が必要であると考えた。

## 2. 研究の目的

ムチン減少による結膜炎増強の機序解明を目指す。さらに結膜炎制御から見たムチンのドライアイ診療での役割を評価する。

(1) 点眼薬防腐剤 BAC 暴露による結膜炎反応の状態を検討する。またムチン減少による結膜炎増強が、点眼薬防腐剤の暴露で変化するか否かを検討する。

(2) Muc16 ノックダウンヒト培養角膜上皮細胞と Muc16-KO マウスでの菌体成分である LPS (Lipopolysaccharide) や PGN (peptidoglycan) の暴露による結膜炎反応の状態を検討する。眼表面での常在細菌 (菌体成分) に対する自然免疫と結膜炎制御でのムチン Muc16 の役割について解明する。

## 3. 研究の方法

(1) Muc16 欠損による BAC 点眼後の眼表面への影響の有無について調べる。Muc16-KO マウスと野生型マウスで、防腐剤成分である 0.02% BAC を 1 日 1 回、2 週間点眼。  
①角膜および結膜の上皮障害の程度を両群で比較、検討。②リン酸化 Stat3 の免疫組織学的局在を両群で比較、検討。③結膜組織、角膜組織で Western blot 法によってリン酸化 Stat3 の発現について、両群で比較、検討。④結膜組織、角膜組織で Muc1、Muc4、Muc5AC の mRNA の発現量を real-time RT-PCR で測定し、両群で比較、検討。⑤培養初代ヒト角膜上皮細胞および SV40 不活化培養ヒト角膜上皮細胞において、0.02% BAC 添加群と非添加群を作成し、48 時間後に、MUC16、MUC1、MUC4 の発現量を real-time RT-PCR で測定し、両群で比較、検討。

(2) Muc16 欠損による TLR 系の活性化への影響の有無について調べる。  
① Muc16-KO マウスと野生型マウスで、結膜および角膜上皮細胞における TLR の発現を免疫組織化学、Real-time RT-PCR で検討し両群で比較、検討。  
② Muc16-KO マウスと野生型マウスに TLR が認識する LPS または PGN を 1 日 2 回、1 週間点眼し、IL-6、NF- $\kappa$ B、リン酸化 RelA、リン酸化 Stat3 の免疫組織学的局在および結膜組織、角膜組織で IL-6、TNF $\alpha$  の発現を Real-time RT-PCR で測定し両群で比較、検討。  
③ siRNA-Muc16 ノックダウン角膜上皮培養細胞とコントロール siRNA 細胞に緑膿菌からの LPS または黄色ぶどう球菌からの PGN を 24 時間暴露して炎症反応を検討。暴露 24 時間後に IL-6、TNF $\alpha$  の発現を Real-time RT-PCR で、48 時間後に ELISA で測定し両群で比較、検討。暴露後 30 分から 6 時間まで経時的に炎症性シグナル伝達 (NF- $\kappa$ B リン酸化 RelA とリン酸化 Stat3) の活性化をウェスタンブロットで検討。

## 4. 研究成果

(1) Muc16-KO マウスと野生型マウスに塩化ベンザルコニウム (BAC) を点眼後の、眼表面の炎症性反応の有無。点眼薬防腐剤成分である 0.02% BAC 5  $\mu$ l を 1 日 1 回、2 週間点眼し 2 週間後に以下を

検討した。

①眼表面をフルオレセインで染色し実体顕微鏡で観察した。フルオレセインの染色状態から、角膜および結膜の上皮障害の程度を確認し、両群で比較、検討した。両群とも角膜および結膜びらんが散在しており、差はみられなかった。

②屠殺、眼球摘出、4%パラフォルムアルデヒド固定によるパラフィン包埋を行いパラフィン連続切片を作成し、炎症性シグナル伝達因子リン酸化Stat3の免疫組織学的局在を両群で比較、検討した。両群とも結膜組織にリン酸化Stat3が認められたが、Muc16-K0マウスでは、より免疫染色性が強かった。また新鮮凍結ブロックを作成し、炎症性シグナル伝達因子Stat3の免疫染色を行ったが、陽性所見はみられなかった。

③屠殺、眼球摘出、結膜組織および角膜組織を摘出し、Westernblot法でリン酸化Stat3の発現について、両群で比較、検討した。野生型マウスで発現が多く認められた。

④Muc16-K0マウスと野生型マウスで、防腐剤成分である0.02% 塩化ベンザルコニウム (BAC) 5  $\mu$  l を1日1回、2週間点眼し、屠殺・眼球摘出した。結膜組織、角膜組織をわけて採取。mRNAを抽出し、Muc1、Muc4、Muc5ACの mRNAの発現量をTaqMan real-time RT-PCRで測定した。Muc16-K0マウスと野生型マウスで、Muc1、Muc4、Muc5ACの mRNAの発現量に有意差はみられなかった。

⑤培養初代ヒト角膜上皮細胞およびSV40不死化培養ヒト角膜上皮細胞 (Araki-Sasaki ヒト角膜上皮株) において、0.02% BAC添加群と非添加群を作成し、48時間後に、MUC16、MUC1、MUC4の mRNAの発現に差がみられるか、TaqMan real-time RT-PCRで検討した。培養初代ヒト角膜上皮細胞およびSV40不死化培養ヒト角膜上皮細胞 (Araki-Sasaki ヒト角膜上皮株) のどちらも、0.02% BAC添加群では非添加群よりもMUC16、MUC1、MUC4の mRNAの発現量はやや少ないが、有意差はみられなかった。

以上より Muc16 発現抑制により BAC 点眼後の状態に、有意差は得られなかった。

(2)Muc16欠損による自然免疫機構の代表Toll Like Receptor系の活性化への影響の有無。

①Muc16-K0マウスと野生型マウスでパラフィン連続切片を作成し、結膜および角膜上皮細胞におけるToll Like Receptorの免疫組織化学的局在を両群で比較、検討した。Muc16-K0マウスと野生型マウスの両群とも、結膜および角膜上皮にToll Like Receptor 2、Toll Like Receptor 5の発現がみられた。またMuc16-K0マウスと野生型マウスを屠殺、眼球摘出し結膜組織、角膜組織をわけて採取。mRNAを抽出し、Toll Like Receptorの mRNAの発現をTaqMan Real-time RT-PCRで測定し両群で比較、検討した。Muc16-K0マウスと野生型マウスの両群で結膜組織および角膜組織のToll Like Receptor 2、Toll Like Receptor 5の mRNAの発現量に有意差はみられなかった。

②Muc16-K0マウスと野生型マウスにLPS(Lipopolysaccharide) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO、1000 ng/ml、5  $\mu$  l) またはPGN(peptidoglycan) (Fluka, Buchs, Switzerland、1000 ng/ml、5  $\mu$  l) を1日2回点眼投与し、1週間後にと殺、眼球摘出した。(a)または(b)を行った。(a)摘出眼球でパラフィン連続切片を作成し、IL-6、NF- $\kappa$ B リン酸化RelA、リン酸化Stat3の免疫組織学的局在をMuc16-K0マウスと野生型マウスの両群で比較、検討。LPS点眼では、Muc16-K0マウスと野生型マウスの両群で、結膜、角膜においてIL-6、NF- $\kappa$ B、リン酸化RelA、リン酸化Stat3の染色性をわずかに認めた。PGN点眼でもMuc16-K0マウスと野生型マウスの両群で、結膜、角膜においてIL-6、NF- $\kappa$ B リン酸化RelA、リン酸化Stat3の染色性をわずかに認めた。(b)摘出眼球から結膜組織、角膜組織をわけて採取。mRNAを抽出し、IL-6、TNF  $\alpha$  の発現をTaqMan Real-time RT-PCRで測定し、Muc16-K0マウスと野生型マウスの両群で比較、検討した。LPS点眼では、Muc16-K0マウスにおいて、IL-6、TNF  $\alpha$  の発現は野生型マウスと比較してやや発現量が多かったが、有意差はみられなかった。PGN点眼では、Muc16-K0マウスと野生型マウスの両群で、IL-6、TNF  $\alpha$  の発現に差はなかった。

③siRNAによりMuc16発現をノックダウンしたSV40不死化培養ヒト角膜上皮細胞 (Araki-Sasaki ヒト角膜上皮株) を用いた。ノックダウン効率はSigmaキットによるRNA抽出後のTaqMan real-time RT-PCRとウエスタンブロットで確認した。(C群) コントロールsiRNA細胞、(M群) siRNA-Muc16ノックダウン角膜上皮培養細胞とした。両群にLPS (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO、1000 ng/ml) またはPGN(Fluka, Buchs, Switzerland、1000 ng/ml)を24時間暴露した。24時間後にIL-6、TNF  $\alpha$  の発現をTaqMan Real-time RT-PCRで、48時間後にELISAで測定し両群で比較した。LPSまたはPGN暴露後、30分から6時間まで経時的に炎症性シグナル伝達(NF- $\kappa$ B リン酸化RelAとリン酸化Stat3)の活性化をウエスタンブロットで検討した。24時間後 RT-PCR、48時間後ELISAともIL-6およびTNF  $\alpha$  の発現量はLPS暴露後、PGN暴露後においてM群でやや多かったが、有意差はなかった。0分から6時間までのNF- $\kappa$ B リン酸化RelAとリン酸化Stat3は両群とも増加していた。M群でやや多かったが、有意差はなかった。

以上より、Muc16 発現抑制により炎症性反応の増強の可能性はあるが、有意差は得られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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)	
研究分担者	岡田 由香  (Okada Yuka)  (50264891)	和歌山県立医科大学・医学部・准教授    (24701)	