

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20264

研究課題名(和文) コラーゲン線維配列解析を基軸とした角膜透明性治癒機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of corneal transparency healing mechanism based on collagen fiber sequence analysis

研究代表者

守田 裕希子 (MORITA, Yukiko)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30725669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：平成27年度にはゲル収縮実験にて、CsnBがTGF- β の働きを阻害していることを解明した。また培養ヒト角膜実質細胞(HKC)を用いて、SMAの発現について確認をした。TGF- β 刺激をしたHKCではSMAが多く発現し、TGF- β +CsnB刺激を行ったものは、TGF- β 刺激のみのHKCと比べてSMAの発現がわずかであり、CsnBにより角膜実質細胞の筋線維芽細胞への分化転換を抑制する事を解明した。平成28年度には角膜切創モデルを用いてCsnBおよびLY2157299による癒痕抑制について評価を行ったが、結果に再現性が得られなかった。

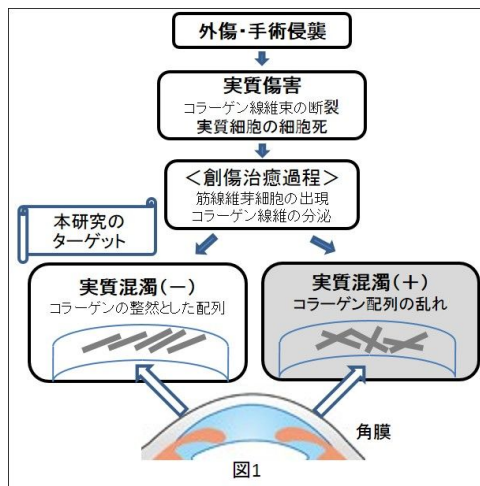
研究成果の概要(英文)：In FY2005, we clarified that CsnB inhibits the action of TGF- β by gel shrinkage experiment. Expression of SMA was also confirmed using cultured human corneal stromal cells (HKC). In TGF- β -stimulated HKC, SMA was expressed abundantly, and TGF- β + CsnB stimulated cells showed only slight expression of SMA compared to HGF with only TGF- β stimulation, and CsnB induced apoptosis of keratocyte and inhibited the transdifferentiation into myofibroblasts. In FY2008, scar suppression by CsnB and LY 215 7299 was evaluated using a corneal incisional wound model, but reproducibility was not obtained in the results.

研究分野：眼科学

キーワード：生体分子 医療・福祉

1. 研究開始当初の背景

外傷や手術など角膜に侵襲が加わるとその傷害部位の角膜実質細胞は細胞死をきたし、コラーゲン線維構造は断裂する。その後の創傷治癒過程では、創傷が回復する部位に実質細胞から分化転換した筋線維芽細胞が出現し、コラーゲンを分泌しながら傷を閉じていくが、その過程で筋線維芽細胞から分泌されるコラーゲンは整然とした線維構造を形成せず、筋線維芽細胞と相まって癒痕を形成していく。角膜実質の創傷治癒のキープレーヤーは、筋線維芽細胞であり、筋線維芽細胞が創傷部位に出現し消失していくことは知られているが、角膜実質のコラーゲン線維構造をどのように回復していくか、ということは明らかになっていない。筋線維芽細胞は創傷治癒が完了すると消失していくが、水疱性角膜症では角膜実質内に筋線維芽細胞が長期間にわたって存在して、角膜実質内の癒痕形成に関与していると考えられる。したがって、角膜実質の創傷治癒を検討するうえで筋線維芽細胞の出現とコラーゲン線維構造の回復はリンクさせて考えるべき現象であると考えている。創傷治癒過程において、角膜実質混濁を残さずに治癒をする症例と角膜実質混濁を残す症例を臨床の現場ではしばしば経験するが、そのターニングポイントについてはいまだ説明されていない。



2. 研究の目的

透明性を有する角膜の創傷治癒過程において、癒痕形成は著明な視力障害の原因となる。角膜の透明性を維持するには、コラーゲンの整然とした配列が重要である。コラーゲン配列は、第2次高調波発生(Second Harmonic Generation: SHG)を用いることにより3次元解析を行うことが出来、我々はSHGを用い様々な角膜疾患におけるコラーゲン構造の解析を行ってきた。本研究では、透明治癒、混濁治癒両方の角膜傷害モデルを作成し、SHGを用いて創傷治癒過程を観察することで、癒痕形成に関与する因子を同定し、“角膜を混濁させない”治療方法の開発を最終目的とする。

3. 研究の方法

平成27年度には、癒痕形成動物モデル(角膜切創モデル:透明治癒モデル,癒痕形成モデル)を作成し、角膜傷害を受けた癒痕部位における角膜実質細胞の分化転換および角膜実質コラーゲンの立体構造についてwhole-mount法および凍結切片を用いて癒痕の評価を行う。観察にはレーザー共焦点顕微鏡、SHG顕微鏡システムを用い、定量にはWestern blot法を用いる。平成28年度には、癒痕形成動物モデル(角膜切創モデル)を用い、角膜傷害を受けた癒痕部位における癒痕形成を抑制させる薬物投与を行い、角膜実質細胞の分化転換および角膜実質コラーゲンの立体構造についてwhole-mount法および凍結切片を用いて癒痕の評価を行う。観察にはレーザー共焦点顕微鏡、SHG顕微鏡システムを用い、定量にはWestern blot法を用いる。

4. 研究成果

癒痕抑制をきたす薬剤として、NR4A1 agonistであるCytosprone B (CsnB)に着目した。NR4A1はTGF-シグナル伝達の内因性阻害因子および抗線維化治療の標的候補となり、SP1、SIN3A、CoREST、LSD1、HDAC1からなる抑制性複合体をTGF-の標的である遺伝子に集合させ、TGF-の線維化誘導作用を制限することが報告されていたためである。平成27年度にはヒト線維芽細胞を用いて、TGF-刺激、CsnB刺激、TGF- + CsnB刺激を行うと、1mMのCsnB存在下では、筋線維芽細胞のマーカであるSMAの発現が抑制されていた(図2)。Western blot法を用いてSMAの発現についてWestern blot法を用いて確認をした。TGF-刺激をしたHKCではSMAが多く発現し、TGF- + CsnB刺激を行ったものは、TGF-刺激のみのHKCと比べてSMAの発現がわずかであり、CsnBにより角膜実質細胞の筋線維芽細胞への分化転換を抑制する事を解明した(図3)。ゲル収縮実験にて、TGF- 10ng/ml刺激、TGF- 10ng/ml+CsnB 1mM刺激、TGF- +LY2157299 1mM刺激、刺激なしでゲル収縮の結果を比較検討した。TGF- 10ng/ml刺激で収縮していたゲルと比較し、TGF- 10ng/ml+LY2157299 1mM刺激ではゲル収縮の程度は変わらず、TGF- +CsnBではゲル収縮抑制をかけることがわかった。これによりCsnBがTGF-の働きを阻害していることを解明した。また同様の実験をTGF-阻害剤であるLY2157299を用いて検討した。LY2157299はWestern blot法やゲル収縮の実験においても、TGF-の働きを阻害する結果にはならなかった。平成28年度には角膜切創モデルを用いてCsnBおよびLY2157299による癒痕抑制について評価を行ったが、結果に再現性が得られなかった。

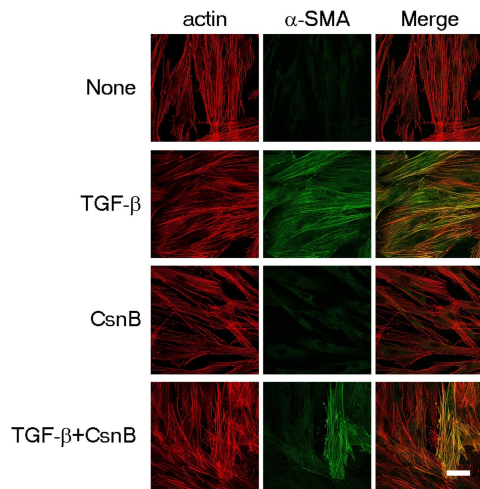
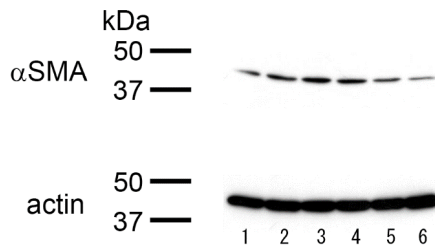


図 2



- 1: control
 2: TGFβ+0mM CsnB
 3: TGFβ+0.001mM CsnB
 4: TGFβ+0.01mM CsnB
 5: TGFβ+0.1mM CsnB
 6: TGFβ+1mM CsnB

図 3

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3件)

Morishige N, Murata S, Nakamura Y, Azumi H, Shin-Gyou-Uchi R, Oki KT, Morita Y, Sonoda KH: Coordinated regulation of palladin and -smooth muscle actin by transforming growth factor- in human corneal fibroblasts. Invest Ophthalmol Vis Sci 57(7): 3360-3368, 2016. 査読有

DOI:10.1167/ivos.15-18763

Morishige N, Morita Y, Yamada N, Sonoda KH: Differential Changes in Intraocular Pressure and Corneal Manifestations in Individuals With Viral Endotheliitis After Keratoplasty. Cornea 35(5): 602-606, 2016. 査読有

DOI:10.1097/ICO.0000000000000794

Morita Y, Morishige N, Yamada N, Ohta M, Sonoda KH, Nishida T: Recovery of the Corneal Stroma Associated With Rapid Reepithelialization Induced by the Fibronectin-Derived Peptide PHSRN in 2 Cases of Corneal Perforation Due to a Persistent Epithelial Defect. Cornea 34(11): 1504-1507, 2015. 査読有

DOI:10.1097/ICO.0000000000000592

[学会発表](計20件)

筒井 紗季, 森 賢一郎, 内 翔平, 守田 裕希子, 山田 直之, 柳井 亮二, 木村 和博: 山口大学における感染性角膜炎に対する網羅的 PCR の経験. 第 174 回九州大学眼科研究会, 福岡県(九州大学), 2017/03/18

守田 裕希子, 山田 直之, 森重 直行, 西田 輝夫, 木村 和博: 糖尿病動物モデルを用いたフィブロネクチン部分ペプチド PHSRN 点眼の角膜上皮欠損治癒促進効果の検討. 第 21 回眼科分子生物学研究会, 山口県(ホテルかめ福), 2017/03/11

筒井 紗季, 森 賢一郎, 岩本 菜奈子, 内 翔平, 守田 裕希子, 山田 直之: 診断に苦慮した両眼性角膜炎の一例. 第 128 回山口県眼科医会秋季総会並びに集談会, 山口県(翠山荘), 2016/11/13

太田 真実, 守田 裕希子, 山田 直之, 森重 直行: 病巣部の calcification を切除し治癒した角膜上皮欠損の一例. 第 70 回日本臨床眼科学会, 京都府(国立京都国際会館), 2016/11/05

岩本 菜奈子, 守田 裕希子, 山田 直之, 森重 直行: 角膜移植後眼球破裂の重症度分類の提案. 第 70 回日本臨床眼科学会, 京都府(国立京都国際会館), 2016/11/03

森 賢一郎, 守田 裕希子, 山田 直之,
森重 直行: 治療的角膜移植の治療成績
について. 第 62 回山口眼科手術懇話会,
山口県(霜仁会館), 2016/10/08

森 賢一郎, 守田 裕希子, 山田 直之,
森重 直行, 園田 康平: 山口大学にお
ける治療的角膜移植の治療成績. 第 54 回
六大学合同眼科研究会, 福岡県(九州大
学), 2016/09/03

守田 裕希子: 糖尿病動物モデルにおけ
るフィブロンectin部分ペプチド PHSRN
点眼の角膜上皮創傷治癒促進効果. 第
20 回眼創傷治癒研究会, 福岡県(九州大
学), 2016/08/20

守田 裕希子, 宇高 健一, 元満 浩信,
柳井 亮二, 植田 喜一, 園田 康平:
角膜移植眼に対するツインベルベルト
ーリックと LVC の使用経験. 第 59 回日本
コンタクトレンズ学会総会, 東京都(東
京国際フォーラム), 2016/07/03

太田 真実, 守田 裕希子, 山田 直之,
森重 直行: 遷延性角膜上皮欠損に対す
る外科的療法. 第 61 回山口眼科手術懇話
会, 山口県(霜仁会館), 2016/06/18

守田 裕希子, 山田 直之, 森重 直行:
睫毛刺激が原因であった難治性角膜炎の
一例. 第 86 回九州眼科学会, 福岡県(ア
ククロス福岡), 2016/05/27

Morita Y, Morishige N, Yamada N, Sonoda
KH: Differential changes in
intraocular pressure and corneal
manifestations in individuals with
viral endotheliitis after
keratoplasty. ARVO 2016, USA(Seattle),
2016/05/01

森重 直行, 守田 裕希子, 口分田 啓,
黒田 栞, 園田 康平: 糖尿病動物モデル
における PHSRN 点眼の角膜上皮欠損治
癒促進効果. 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, 長野県(軽井沢プリンスホ
テルウエスト), 2016/02/20

守田 裕希子, 太田 真実, 山田 直之,
森重 直行, 園田 康平: 角膜移植後に
発症した前房内炎症眼の病型と臨床所見.
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,
長野県(軽井沢プリンスホテルウエスト),
2016/02/18

守田 裕希子: 格子状角膜ジストロフィ
型に対する新しい治療法: 角膜上皮搔
爬とフィブロンectin点眼. 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

守田 裕希子, 岩本 菜奈子, 山田 直
之, 森重 直行, 園田 康平: 前房水か
ら HSV-DNA を検出した角膜移植眼の臨床
像. 第 69 回日本臨床眼科学会, 愛知県(名
古屋国際会議場), 2015/10/22

Morita Y, Morishige N, Yamada N, Iwamoto

N, Ohta M, Teranishi SI, Suzuki K, Sonoda
KH: Outcome of Descemet Stripping
Endothelial Keratoplasty (DSAEK) in
Patients with or without a history of
trabeculectomy. The 8th Joint Meeting
of JAPAN-CHINA-KOREA Ophthalmologists,
福岡県(ヒルトン福岡シーホーク),
2015/10/17

岩本 菜奈子, 守田 裕希子, 山田 直
之, 森重 直行, 園田 康平: 角膜移植
後眼球破裂の検討. 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

守田 裕希子, 岩本 菜奈子, 山田 直
之, 森重 直行, 園田 康平: 角膜内皮
移植術後の角膜実質構造の変化. 第 59 回
山口眼科手術懇話会, 山口県(霜仁会館),
2015/07/02

Morita Y, Morishige N, Yamada N, Okamura
N, Ohta M, Teranishi S, Suzuki K, Sonoda
KH: Outcome of Descemet Stripping
Endothelial Keratoplasty (DSAEK) in
Patients with Previous Trabeculectomy.
ARVO 2015, USA (Denver), 2015/05/04

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

守田 裕希子 (MORITA, Yukiko)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 3 0 7 2 5 6 6 9

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし