

機関番号：32665
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20791284
 研究課題名 (和文) 角膜における細胞外ドメインシェディングを介した病態生理機構の解明
 研究課題名 (英文) Study of pathophysiologic significance of ectodomain shedding in the cornea
 研究代表者
 崎元 暢 (SAKIMOTO TOHRU)
 日本大学・医学部・助教
 研究者番号：20465272

研究成果の概要 (和文)：細胞表面での膜型タンパク質の切断と細胞外への放出は、細胞外ドメインシェディングと呼ばれ、基質の活性化もしくは不活性化にかかわる重要なプロセスである。角膜における細胞外ドメインシェディングは、角膜上皮において主に行われ、TACE などのメタロプロテアーゼによって可溶性 TNFR1 や可溶性 IL-6R などを産生することが明らかとなった。角膜の創傷治癒や炎症制御において、細胞外ドメインシェディングが重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Ectodomain shedding is defined as the disintegration and extracellular release of membranous protein on the cell surface. This cellular process plays a role both in the activation and inactivation of the shedding substrate of shedding, and can potentially change functional characteristics of the substrate. In the cornea, we elucidated that ectodomain shedding is mainly activated in corneal epithelium, and soluble form of TNFR1 and IL-6R is produced from corneal epithelium. We speculated that this process plays an indispensable role in corneal wound healing and reducing inflammatory reactions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：細胞外ドメインシェディング、メタロプロテアーゼ、角膜

1. 研究開始当初の背景

細胞表面での膜型タンパク質の切断と細胞外への放出は、細胞外ドメインシェディング、または単にシェディングと呼ばれ、翻訳後のタンパク質の活動を制御する重要なプロセスである。メタロプロテアーゼの一種である ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) ファミリーは、このシェディングにおいて中心的な役割を果たすと考えられている。なかでも ADAM17 は、TACE {tumor necrosis

factor-alpha (TNF- α) converting enzyme} とも呼ばれ、TNF receptor-1、2 (TNFR1, TNFR2)、IL-6 receptor、L-selectin など複数のタンパク質をシェディングすることが報告されており、TACE がシェディングにおいて中心的な役割を果たすと考えられている。

炎症性サイトカインである IL-6 は、細胞表面上の IL-6 receptor (IL-6R) と結合するが、体液中や細胞外基質には可溶性の IL-6R が存在し、IL-6 と複合体を形成する。この複合体

は細胞表面上のレセプターである gp130 と結合して IL-6 の信号を細胞内に伝達する。このような伝達様式は IL-6 トランスシグナリングと呼ばれている。gp130 はほぼ全ての細胞に発現するため、IL-6 は、IL-6R を発現していない細胞でも可溶性 IL-6R と結合することで、gp130 を介してシグナルを伝達することができる。その特徴を反映して IL-6/IL-6R の作用は免疫炎症反応など多彩なものとなっている。

TNF- α は、炎症の誘発や細胞傷害といった機能を持つ炎症性サイトカインであり、TNF- α の標的細胞において膜型 TNF receptor (TNFR) がシェディングされると、この標的細胞に対する TNF- α 作用が减弱し、さらに、シェディングされて細胞外へ遊離した可溶性 TNFR は、可溶性 TNF- α /膜型 TNF- α のいずれにも対する生理的な中和物質として機能するとも考えられている。

2. 研究の目的

本研究では角膜においてシェディングという事象がどのように発現・制御されているのかを明らかにすることを目的とし、以下の研究を行った。

- ① 角膜上皮創傷治癒におけるシェディングについて
- ② 角膜潰瘍におけるシェディングとして、上皮-実質相互作用の面から、上皮における IL-6R のシェディングについて
- ③ 角膜潰瘍におけるシェディングとして、浸潤細胞-実質細胞の面から、実質細胞における TNFR のシェディングについて

3. 研究の方法

- ① 研究 1 では、培養角膜上皮細胞において TACE 依存性に TNFR1 や EGFR ligand のシェディングがみられるか検討し、角膜上皮創傷治癒において TNFR1 や EGFR ligand のシェディングが適切な創傷治癒のコントロールに必要なかどうか検討する。
- ② 研究 2 では、角膜上皮によって産生された可溶性 IL-6R を介した IL-6/IL-6R/gp130 のトランスシグナリングによって、角膜実質細胞（線維芽細胞）が刺激され炎症反応を起こし、角膜潰瘍の病態に関与するか検討する。
- ③ 研究 3 では角膜潰瘍において、角膜実質に浸潤してきたマクロファージなどの浸潤細胞（effector 細胞）から TNF- α が、実質中の resident 細胞（標的細胞）である線維芽細胞から TNFR1 がシェディングされている

か検討する

4. 研究成果

① 角膜上皮におけるシェディングについては、SV40 導入不死化培養角膜上皮細胞または培養結膜上皮細胞において、TACE 刺激剤 (phorbol myristate acetate {PMA}、peptidoglycan {PGN}) や TACE 阻害剤 (TIMP-3、TAPI-1) を用いて TNFR1 の TACE 依存性シェディングを証明し海外雑誌に発表掲載した (Sakimoto T et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2009)。

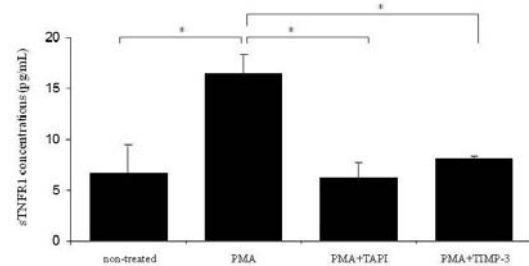


図 1 培養角膜上皮細胞における可溶性 TNFR1 産生 (PMA 刺激)

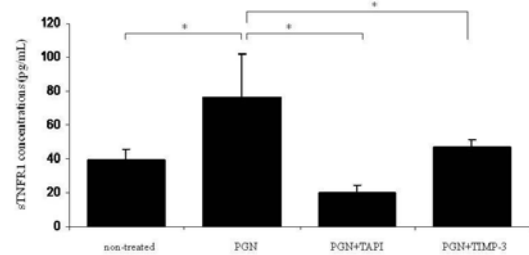


図 2 培養角膜上皮細胞における可溶性 TNFR1 産生 (PGN 刺激)

また、TACE 特異的な siRNA (RNA 干渉) によって TNFR1 の細胞外への放出が減少することを証明し、TNFR1 の細胞外ドメインシェディングが TACE 依存性であることを確認した。

- ② 角膜潰瘍におけるシェディングとして、上皮-実質相互作用の面から、上皮における IL-6R のシェディングについては、培養角膜上皮細胞における TACE 依存性の IL-6 レセプター (IL-6R) シェディングを確認した。また、リコンビナントの IL-6/IL-6R を培養線維芽細胞に投与し、IL-6 トランスシグナリングを検討した。IL-6+IL-6R 双方を投与すると IL-6/IL-6R トランスシグナリングによる細胞内シグナル伝達物質である STAT-3 のリ

ン酸化が濃度依存性に認められた。

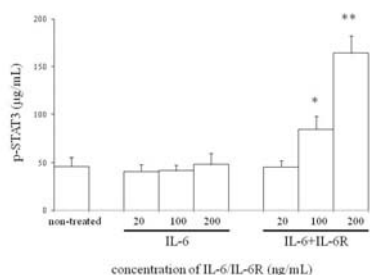


図3 培養線維芽細胞におけるリン酸化STAT3の変化

このことにより角膜上皮から産生された可溶性のIL-6RがIL-6とともに角膜実質へ作用し、IL-6の炎症性シグナルを伝達している可能性が考えられた。また、培養角膜線維芽(実質)細胞においては、IL-6レセプター(IL-6R)の細胞外ドメインシェディングは起こらないことを確認した。これらのことから角膜実質では、角膜上皮から産生された可溶性のIL-6RとIL-6の複合体(IL-6トランスシグナリング)の標的となり、IL-6トランスシグナリングの炎症性シグナルを伝達している可能性が考えられた。(Sugaya S, Sakimoto T et al. Jpn J Ophthalmol 2011)

③ 角膜潰瘍におけるシェディングとして、浸潤細胞-実質細胞の面から、実質細胞におけるTNFR1のシェディングについては、マウス角膜アルカリ外傷を免疫組織化学的に検討し、アルカリ外傷早期以降に角膜実質中にTACEとTNFR1が発現し、それらを発現しているのが実質中に存在する線維芽細胞と実質に浸潤してくるマクロファージであること、培養線維芽細胞/マクロファージからTACE依存性にTNFR1がシェディングされることをin vitroで証明した(Sakimoto T et al. Jpn J Ophthalmol 2008)。

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)

① Sugaya S, Sakimoto T, Shoji J, Sawa M.

Regulation of soluble interleukin-6 (IL-6) receptor release from corneal epithelial cells and its role in the ocular surface. Jpn J Ophthalmol 2011 Apr 27. [Epub ahead of print] 査読有

② Sakimoto T, Yamada A, Sawa M: Release of soluble tumor necrosis factor receptor 1 from corneal epithelium by TNF-alpha converting enzyme dependent ectodomain shedding. Invest Ophthalmol Vis Sci 50: 4618-21, 2009. 査読有

③ Sakimoto T, Yamada A, Kanno H, Sawa M: Upregulation of TNF receptor 1 and TNF-alpha converting enzyme during corneal wound healing. Jpn J Ophthalmol 52:393-398, 2008. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

① 崎元 暢: 角膜内皮障害の診断と手術適応. 第34回日本眼科手術学会総会 シンポジウム 角膜内皮疾患に対する外科的アプローチ. 京都. 2011.1.29.

② Sakimoto T, Sugaya S, Ohnishi T, Shoji J, Sawa M: Regulation of soluble IL-6 receptor release from corneal epithelial cell by ectodomain shedding and mRNA splicing. 2nd Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting, Kyoto, 2010.12.2.

③ 崎元 暢, 澤 充: 角膜上皮-実質相互作用におけるIL-6トランスシグナリングの役割. 第15回眼創傷治癒研究会. 和歌山. 2010.8.21.

④ 菅谷哲史, 崎元 暢, 庄司 純, 澤 充: 角膜上皮細胞と涙液における可溶性IL-6R発現の検討. 第114回日本眼科学会総会. 名古屋. 2010.4.16.

⑤ 菅谷哲史, 大西貴子, 崎元 暢, 澤 充: 蛍光マイクロビーズアレイシステムを用いた涙液中サイトカイン受容体の発現解析. 第63回日本臨床眼科学会, 福岡, 2009.10.11.

⑥ 崎元 暢, 佐々木淳, 加島陽二, 澤 充: シェーグレン症候群症例における涙液中の可溶性TNFレセプター-1発現の検討. 第33回角膜カンファレンス・第25回日本角膜移植学会. 大阪. 2009.2.20.

⑦ 菅谷哲史, 崎元 暢, 澤 充: 円錐角膜におけるADAMファミリーを介する蛋白発現の検討. 第33回角膜カンファレンス・第25回日本角膜移植学会. 大阪. 2009.2.19.

⑧ Sakimoto T, Yamada A, Shoji J, Sawa M: TACE (ADAM17) dependent shedding of soluble TNF receptor in conjunctival

epithelium. ARVO, Fort Lauderdale, FL, 2008. 4. 28.

- ⑨ 崎元 暢、山田 愛、庄司 純、澤 充：
結膜上皮における細胞外ドメインシエ
ディングを介した可溶性TNF レセプタ
ー産生. 第112回日本眼科学会総会，横
浜. 2008. 4. 18.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nihon-u.ac.jp/department/eye/school/project.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

崎元 暢 (SAKIMOTO TOHRU)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：20465272