

平成 22 年 6 月 13 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791293

研究課題名 (和文) 角膜内皮におけるポンプ機能の活性制御に関する研究

研究課題名 (英文) Activation and regulation of the pump function of corneal endothelium.

研究代表者

羽藤 晋 (HATOU SHIN)

独立行政法人国立病院機構東京医療センター (臨床研究センター) 視覚研究部

研究者番号：70327542

研究成果の概要 (和文)：角膜内皮 Na, K-ATPase 酵素活性の測定と Ussing chamber を用いたポンプ機能の測定を行い、デキサメサゾンおよびインスリンが角膜内皮細胞の Na, K-ATPase 活性を上昇させることが確認された。デキサメサゾンは Na, K-ATPase 発現量増加により、またインスリンは、PKC 活性化経路を介し、Na, K-ATPase の脱リン酸化により Na, K-ATPase を活性化していることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：We measured Na, K-ATPase enzyme activity and pump function of the corneal endothelial cells with the use of an Ussing chamber. Our results suggest that dexamethasone and insulin stimulates Na, K-ATPase activity. The effect of dexamethasone activation in these cells is mediated by Na, K-ATPase synthesis and insulin activation is mediated by dephosphorylation of Na, K-ATPase via PKC activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	17,000,000	510,000	2,210,000
21 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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・組織, 生理学, 薬剤反応性, 薬理学, 移植・再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

角膜内皮は角膜の最後面に位置する一層の細胞層であり、ポンプ機能とバリア機能により角膜実質の含水率を制御し、角膜の透明性の維持に寄与している。角膜内皮細胞はヒトでは生後は再生能力がなく、その細胞数は加齢と共に低下し、コンタクトレンズの長期装用や眼手術によっても低下することが知ら

れている。細胞数の減少がある段階に達すると内皮機能不全となり、角膜浮腫、水疱性角膜症により視力低下を来す。現在のところ内皮機能不全の治療は角膜移植による他はなく、角膜移植の最も主要な適応疾患となっているが、本邦の角膜移植の待機患者が約 6,000 名であるのに対し、提供眼球数は年間 1,500 眼程度であり、手術までの長い待機期

間があるのが現状である。

内皮細胞のポンプ機能は主として Na-K ATPase により発揮されるが、内皮機能不全の初期では内皮細胞の細胞膜に存在する Na-K ATPase はむしろ増加し、逆に末期では著明に減少することが報告されている。初期の Na-K ATPase の増加は細胞数の減少に対する代償機転と考えられるが、その機序は明らかではない。三叉神経麻痺や交感神経麻痺患者では角膜浮腫が誘発されやすいことも報告されており、内皮機能は何らかの神経性因子により調節されていることが示唆されるが、その機序も不明である。他の臓器、たとえば腎の尿細管や骨格筋などの Na-K ATPase は、ステロイドや甲状腺ホルモン、バソプレッシンなどのホルモン類や神経ペプチド、蛋白分解酵素、蛋白リン酸化酵素、プロスタグランジンなどの脂質メディエーターなど様々な因子によりその活性の調節を受けていることが報告されている。角膜内皮の Na-K ATPase もこれに類似した調節機構が作用している可能性があるが、その詳細には不明の点が多い。蛋白発現レベルでの調節、リン酸化による活性調節、細胞膜への動員や細胞膜での相互作用による活性の調節などの機序を利用することにより角膜内皮の Na-K ATPase 活性を上昇させることができれば、角膜内皮機能不全を角膜移植によらずに治療できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究は角膜内皮機能を活性化する候補薬剤のスクリーニングと機序の解析を行い、機序の異なる薬剤の組み合わせによる相加作用、相乗作用を検討し、薬物療法による角膜内皮機能不全の治療法の基礎となることを目的とする。

実験にはマウス由来の培養角膜内皮細胞を用い、Na-K ATPase 活性を *in vitro* で薬理学的に測定する。さらに培養角膜内皮細胞シートをウッシングチャンバーに組み込み、微小循環電流を計測することにより角膜内皮の Na-K ATPase ポンプ機能を測定する。これに候補薬剤を様々な濃度で添加することによりポンプ機能活性の変化を検討する。

## 3. 研究の方法

実験には、マウス由来の角膜内皮細胞を培養し、継代培養したものを用いた。培養した角膜内皮細胞の培養液中に、ステロイドであるデキサメサゾン、インスリンおよび Phorbol dibutyrate といった Na-K ATPase の発現や活性に影響を与える可能性がある薬剤を添加した。また、indomethacin、Resorufin、okadaic acidなどを組み合わせて、protein kinase C の下流にあるシクロオキシゲナーゼ、チトクローム P450、protein phosphatase

を介する経路を制御することでの Na-K ATPase 活性への影響を検討した。

Na-K ATPase の活性測定は、培養液中にアデノシン 3 リン酸 (ATP) を加えて、ATPase により生成される無機リン酸量をリンモリブデン反応による呈色反応を用いることで行い、Na-K ATPase の特異的阻害剤であるウアバインを添加した場合と添加しない場合の差を求めて Na-K ATPase 活性とした。

Na-K ATPase の活性に変化がみられる場合には、1) Na-K ATPase の発現量が増加する、2) Na-K ATPase の細胞内局在が変化する、3) Na-K ATPase の  $\alpha$ -subunit のセリンの部位に脱リン酸化が生じる、4) Na-K ATPase と細胞膜との相互作用が変化する、などの機序が考えられるが、Na-K ATPase の発現量については、培養細胞より mRNA を抽出し mRNA レベルでの変化を解析すると同時に、モノクローナル抗体を用いた Western blot により蛋白レベルでの解析を行う。また、cyclohexamide などの蛋白合成阻害剤の存在下で Na-K ATPase の活性変化を測定し、その影響を解析することで、Na-K ATPase の活性変化が新たな蛋白合成によるものかどうかを検討した。さらに、角膜内皮細胞内での Na-K ATPase の局在を調べるために Na-K ATPase に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織染色を行った。

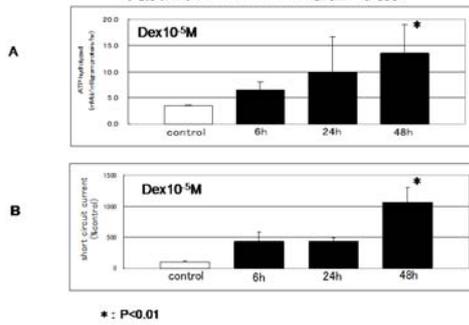
培養角膜内皮の Na-K ATPase ポンプ機能については、細胞間あるいは組織間の微小循環電流を計測できるウッシング・チャンバーを用いて測定することができる。上記に挙げた候補薬剤が Na-K ATPase のポンプ機能に及ぼす影響をウッシングチャンバーを用いて測定した。

## 4. 研究成果

1) デキサメサゾンによる Na-K ATPase 活性化  
デキサメサゾンの反応時間と Na-K ATPase 酵素活性の関係を図 1 A に示した。 $10^{-5}M$  のデキサメサゾンを投与後、6 時間、24 時間、48 時間での Na-K ATPase 活性を測定した。デキサメサゾンは時間が経過するにつれて活性が増加し、48 時間で最も活性が上昇した。デキサメサゾンの反応時間と Ussing chamber を用いた Na-K ATPase ポンプ機能増加率の関係を図 1 B に示した。酵素活性と同様にポンプ機能も時間が経過するにつれて活性が増加し、48 時間で最も活性が高くなった。

デキサメサゾン濃度が Na-K ATPase 酵素活性に及ぼす影響を図 2A に示した。 $10^{-6}M$  から  $10^{-5}M$  のデキサメサゾンを投与し 48 時間後の Na-K ATPase 活性を測定した。Na-K ATPase の活性がはっきり濃度依存的に増加するのがみられ、濃度が  $10^{-5}M$  のときにコントロールの約 3.9 倍に有意に増加していた。

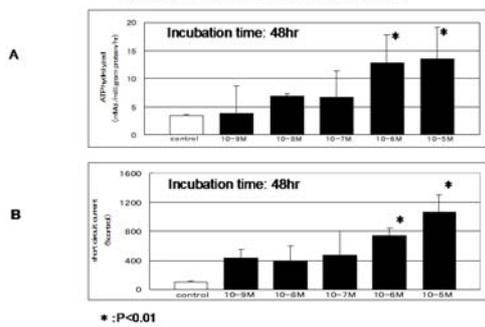
図1:デキサメサゾンの反応時間と角膜内皮Na-K ATPase活性の関係



デキサメサゾンの濃度とポンプ機能増加率の関係を図 2B に示した。酵素活性と同様にポンプ機能も濃度依存的に増加するのがみられ、濃度が  $10^{-5}M$  のときにコントロールの 10.6 倍となった。

Western blotting 法による、デキサメサゾン濃度と、Na-K ATPase  $\alpha$  subunit の発現量との関係を図 3 に示した。デキサメサゾンは Na-K ATPase  $\alpha$  subunit の発現量を濃度依存的に増加させることが示された。

図2:デキサメサゾンの濃度と角膜内皮Na-K ATPase活性の関係



さらに、タンパク合成阻害剤の cycloheximide を投与すると、デキサメサゾンによる Na-K ATPase 活性化は阻害されることも見出された (図 4)

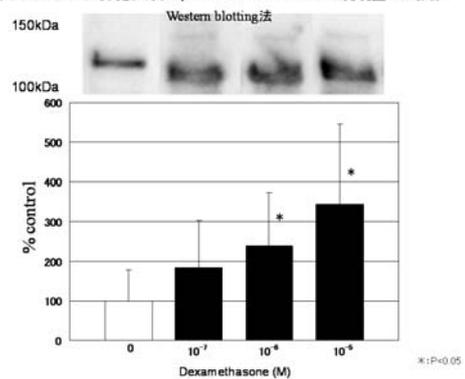
以上の結果から、デキサメサゾンは Na-K ATPase  $\alpha$  subunit の発現量を増加させることで Na-K ATPase を活性化させていることが示された。

2) インスリンによる Na-K ATPase 活性化  
 インスリンの反応時間と Na-K ATPase 酵素活性の関係を図 5A に示した。  $10^{-5}M$  のインスリンを投与後、6 時間、12 時間で最も Na-K ATPase 活性が高くなり、時間が経過するにつれ活性が減少していった。インスリンの反応

時間とポンプ機能増加率の関係を図 5B に示した。酵素活性と同様にポンプ機能もインスリン投与後 6 時間で最も Na-K ATPase 活性が高くなり、時間が経過するにつれ活性が減少していった。

インスリン濃度が Na-K ATPase 活性に及ぼす影響を図 6A に示した。  $10^{-9}M$  から  $10^{-5}M$  のインスリンを投与し 6 時間後の Na-K ATPase 活性を測定した。Na-K ATPase 活性は、インスリン濃度依存的に上昇し、  $10^{-7}M$  においてプラトーに達した。インスリンの濃度とポンプ機能増加率の関係を図 6B に示した。酵素活性と同様にポンプ機能も、インスリン濃度が  $10^{-7}M$  においてプラトーに達した。

図3 デキサメサゾンによる角膜内皮Na-K-ATPase  $\alpha$ 1 subunitの発現量への影響



3) インスリンによる Na-K ATPase 活性化機序と PKC 活性化経路

過去の報告によると、インスリンは PKC などの protein kinase 群を介して Na-K ATPase 活性へ影響を及ぼしていると考えられている。角膜内皮でもこの経路を介しているかどうかを検討した。ELISA 法を用いた、インスリン濃度と角膜内皮における PKC 活性との関係を図 7 に示した。インスリンによる Na-K ATPase 活性化の場合と同様、インスリン濃度  $10^{-7}M$  においてプラトーに達する用量反応曲線を示すことが明らかとなった。

図4 デキサメサゾンによる角膜内皮Na-K ATPase活性化とcycloheximideの影響

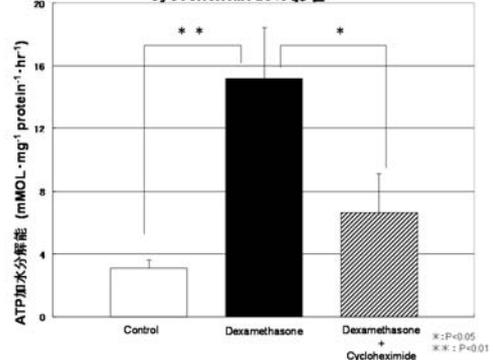
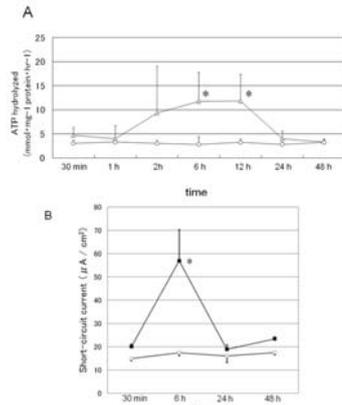


図5 インスリンの反応時間と角膜内皮Na-K ATPase活性の関係



Western blotting 法を用いて、角膜内皮 Na-K ATPase  $\alpha$ -subunit 発現量と、非活性化型であるリン酸化 Na-K ATPase  $\alpha$ -subunit を以下の条件下で測定した。①インスリンのみ ②PKC 阻害薬の Staurosporin 存在下でのインスリン投与③protein phosphatase 阻害薬である okadaic acid や GF109203X の存在下でのインスリン投与。リン酸化 Na-K ATPase  $\alpha$ -subunit 発現量の positive control として PDBu を用いた。その結果を図 8 に示す。角膜内皮では、インスリン投与により Na-K ATPase 総量の発現量の優位な変化は認めなかったが、非活性化型/活性化型の比率が減少する (すなわち活性化 Na-K ATPase が増加する) ことで Na-K ATPase 活性化が得られることが示された。またこの活性化は Staurosporin、

図6 インスリンの濃度と角膜内皮Na-K ATPase活性の関係

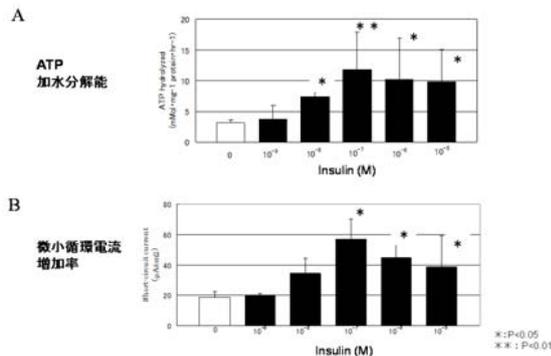
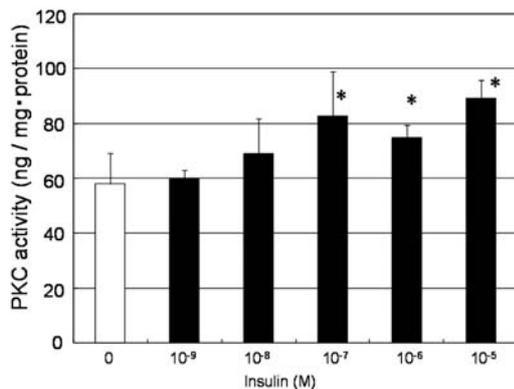
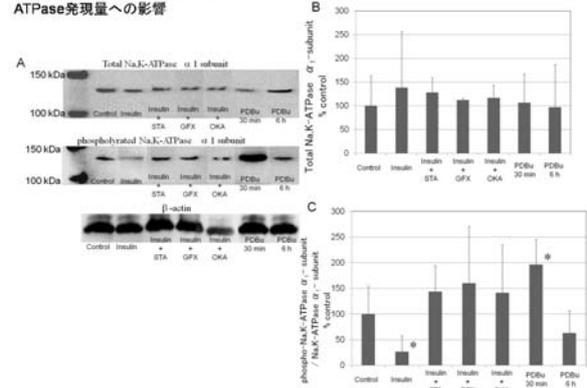


図7 インスリン濃度と角膜内皮PKC活性の関係



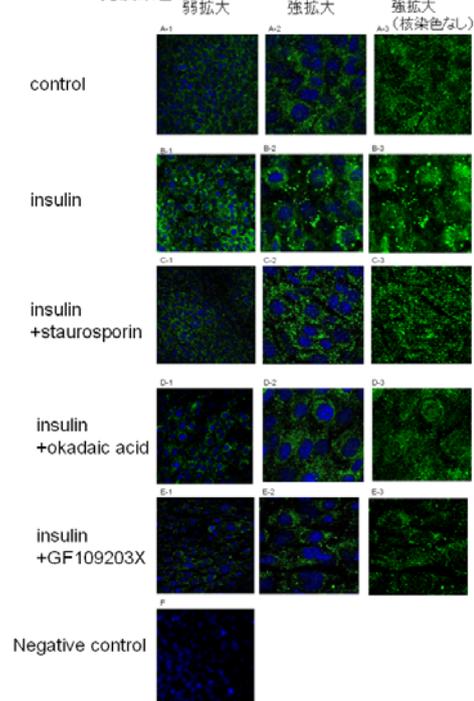
okadaic acid、GF109203X の存在下で block されることが示された。これまでの報告で PKC 活性化経路の下流に protein phosphatase による Na-K ATPase 脱リン酸化 (活性化) 経路があると考えられており、今回の結果は角膜内皮でもこの経路による Na-K ATPase 活性化の存在を裏付けることが示された。

図8 インスリンによる角膜内皮Na-K ATPase発現量への影響



$\alpha$ -subunit が脱リン酸化された活性化型 Na-K ATPase は細胞質内から細胞膜表面に移動し活性量を増加させることがいわれており、インスリンによる角膜内皮 Na-K ATPase 活性化がこの機序に従うことを裏付けるために、角膜内皮 Na-K ATPase  $\alpha$ -subunit の免疫組織染色を行った (図 9)。インスリン投与により角膜内皮細胞膜表面での Na-K ATPase 発現量増加がしめされ、かつこれらは Staurosporin、okadaic acid、GF109203X の存在下で block されることが示された。

図9: Na-K ATPase免疫染色



#### 4) まとめ

角膜内皮 Na-K ATPase の酵素活性測定においても、Ussing chamber を用いた shoro circuit current による角膜内皮ポンプ機能測定においてもデキサメサゾンとインスリンは Na-K ATPase 活性を上昇させることが示されたが、デキサメサゾンとインスリンの Na-K ATPase への影響の仕方は異なることが示された。デキサメサゾンは Na-K ATPase  $\alpha$  subunit の発現量を増加させることで Na-K ATPase を活性化させている一方で、インスリンは Na-K ATPase  $\alpha$  subunit の発現量の総量は変化させないが、活性化型 Na-K ATPase  $\alpha$  subunit の比率を増やすことで Na-K ATPase を活性化させていることが示された。角膜内皮においては、インスリンの Na-K ATPase 活性化経路のひとつとして

PKC-protein phosphatase 経路が大きな役割を示していることが明らかになった。これまでの報告で、インスリンの Na-K ATPase 活性化経路には PKC のほかに SGK1 などいくつかの経路が提唱されており、今後はそういった PKC 以外の経路の影響も検証する必要がある。

本研究の成果は、角膜内皮機能におけるステロイドやインスリンシグナルの重要性を明らかにし、糖尿病や細胞老化による角膜内皮機能への影響を明らかにしたものである。さらに、デキサメサゾンとインスリンは異なる機序によって Na-K ATPase 活性を上昇させることが明らかとなった。これらの機序の異なる薬剤の組み合わせにより様々な段階で角膜内皮の Na-K ATPase 活性を制御できれば、糖尿病や細胞老化の影響を抑制して角膜内皮機能不全に至らないようにする予防治療の開発や、角膜内皮機能不全を角膜移植によらずに治療できる薬物治療の開発につながる可能性がある。

従来の角膜移植以外の内皮機能不全の治療法としては、角膜内皮部分移植や培養角膜内皮細胞移植、人工角膜移植などが研究されているが、いずれも手術による外科的治療であり、本研究のように薬物治療を考慮したものではない。薬物治療により、内皮機能不全のいくらかの症例が治療できるようになり、手術を回避できるとすればその医学的、社会的意義は大きいものと考えられる。眼球提供数が多く角膜移植を行うことが比較的容易である米国に比べ、本邦では提供眼が常に不足している状態であり、角膜移植手術によらない内皮機能不全の治療法の確立は特に本邦では意義が高いと考えられる。

#### 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 Hatou S, Yamada M, Mochizuki H, Nishida T, Role of protein kinase C in regulation of Na<sup>+</sup>-and K<sup>+</sup>-dependent ATPase activity and pump function in corneal endothelial cells.、Jpn J Ophthalmol、査読有り、53(3)、2009、235-242
- ② Hatou S, Yamada M, Mochizuki H, Shiraishi A, Joko T, Nishida T, The effects of dexamethasone on the Na, K-ATPase activity and pump function of corneal endothelial cells.、Curr Eye Res.、査読有り、34 (5)、2009、347-354
- ③ Hatou S, Yamada M, Akune Y, Mochizuki H, Shiraishi A, Joko T, Nishida T, Tsubota K.、Role of insulin in Regulation of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>-Dependent ATPase Activity and Pump Function in Corneal Endothelial Cells.、Invest Ophthalmol Vis Sci、査読有り、In press、2010

[学会発表] (計 1 件)

羽藤晋、村戸ドール、佐藤エンリケアダン、オサマイブラヒム、若松タイスヒトミ、松本幸裕、川北哲也、榛村重人、坪田一男、レーザー生体共焦点顕微鏡を用いた、Mooren 潰瘍の重症度の定量的評価、第 33 回角膜カンファランス、2009 年 2 月 20 日、大阪

[図書] (計 1 件)

羽藤晋、日本評論社。坪田一男編、気になる目の病期のすべて一さかさまつげ、ものもらい、はやり目 (流行性角結膜炎)。からだの科学、2009、3

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

羽藤 晋 (HATOU SHIN)

独立行政法人国立病院機構東京医療センター (臨床研究センター) 視覚研究部

研究者番号：70327542

##### (2) 研究分担者

該当なし ( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

該当なし ( )

研究者番号：