

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18360

研究課題名(和文) 内的酸化ストレスに惹起される角膜内皮細胞減少の分子機構解明と予防

研究課題名(英文) Molecular Mechanism of Decreasing Corneal Endothelial Cells Induced by Internal Oxidative Stress

研究代表者

尾内 宏美 (Onouchi, Hiromi)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：00580135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：内的酸化ストレスを負荷したTet-mev-1マウスの角膜内皮細胞が通常マウスと比べて早期に細胞内脂肪滴を蓄積していることを確認した。さらに若齢のmev-1マウスの角膜内皮細胞では通常マウスと比べてオートファジーが亢進していた。老齢の通常マウスでも脂肪滴が蓄積しmev-1マウスと同等にまでオートファジーが誘導されていた。一方、老齢のTet-mev-1マウスの角膜内皮細胞は膨潤化し、多くのオートファゴソームを蓄積し内部は空胞化していた。このことから、内的酸化ストレスにより蓄積する脂肪滴をオートファジーによって除去することで細胞損傷等を回避し、角膜内皮細胞の減少を抑止していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、酸化ストレスがより自然に近い状態で加わるTet-mev-1マウスを用いることによって、角膜内皮細胞減少の早期変化の詳細な分子メカニズムを細胞レベルから生体レベルにおいて解析できた。

本研究はこれまでに報告のないリポファジーの誘導と角膜内皮細胞の減少を関連している分子機構を解明するものであり、脂肪酸代謝の制御が角膜内皮細胞の減少に対する新たな治療戦略になることを創造させる成果が期待できる。すなわち、加齢・前房内侵襲・炎症等に伴う水疱性角膜症の治療、およびFuchs角膜内皮ジストロフィーの早期診断マーカーおよび治療法の開発の端緒を得ることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Corneal endothelial cells from Tet-mev-1 mice subjected to internal oxidative stress accumulated intracellular fat droplets earlier than in normal mice. In addition, autophagy was enhanced in corneal endothelial cells of young mev-1 mice compared to normal mice. Older normal mice also accumulated fat droplets and autophagy was induced to the same extent as in mev-1 mice. On the other hand, corneal endothelial cells of old Tet-mev-1 mice were swollen and accumulated many autophagosomes, and their interior was vacuolated. This suggests that autophagy avoids cellular damage by removing fat droplets accumulated by internal oxidative stress, thereby preventing the decrease in corneal endothelial cells.

研究分野：角膜内皮細胞

キーワード：内的酸化ストレス 角膜内皮細胞減少 オートファジー リポファジー

1. 研究開始当初の背景

内的酸化ストレスの大部分は、ミトコンドリア電子伝達系から発生するスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$)に起因する。細胞から発生する $O_2^{\cdot-}$ は、免疫応答機構や細胞増殖・分化などのホメオスタシス維持の役割を担うが、エネルギー代謝の副産物として発生した $O_2^{\cdot-}$ は過剰量となるとより強い毒性をもつ活性酸素種 (ROS) に代謝され、悪性腫瘍・神経変性疾患や生活習慣病の発症原因となることが最近の研究で明らかになりつつある。

眼球は角膜から網膜に至るまで紫外線曝露を受けるため、外的酸化ストレスの影響が現れやすい臓器の一つといえる。近年、緑内障、糖尿病網膜症、加齢黄斑変性症など失明にか



図1 水疱性角膜症

かわる疾患において、酸化ストレスの関与が報告され注目されている。さらに眼球の中でも角結膜は眼表面にあ

り、外界の影響を受けやすい。長期にわたり外界からの紫外線や酸素に曝露されることで、他の組織よりも外的酸化ストレスを受けやすい環

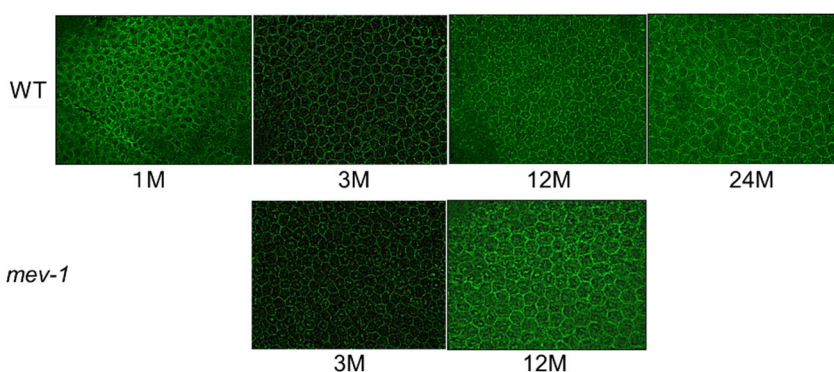


図2 カテニンによる角膜内皮細胞の免疫組織染色

Tet-mev-1 マウスの12か月の細胞数が野生型の24月に相当する

境にある。酸化ストレスに伴い、ドライアイや翼

状片が発症することは多く報告されているが、角膜内皮細胞の減少に関しては酸化ストレスとの関係や詳細な分子メカニズムについて未だ不明瞭な点が多い。

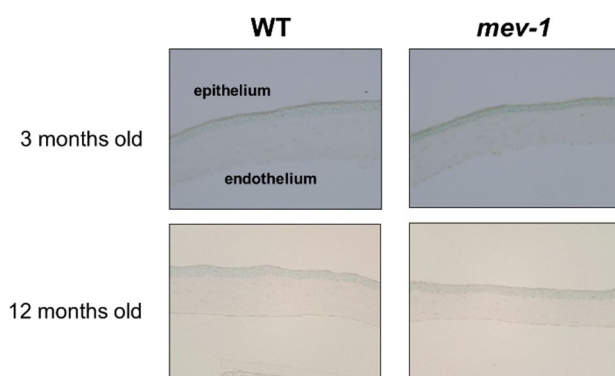


図3 TUNEL染色においてアポトーシスは検出されなかった

角膜内皮細胞は一度障害されると再生せず、障害された部分は周りの内皮細胞が面積を拡大して補う。角膜内皮細胞は角膜の透明度を維持するためにはならない存在であり、内皮細胞の密度がある限度を超えて少なくなると角膜浮腫が発生し角膜の透明性が維持できなくなる水疱性角膜症となる(図1)。

これまでに申請者は、ミトコンドリア電子伝達系から $O_2^{\cdot-}$ を過剰発生させるモデル動物(*Tet-mev-1* マウス)をもちいて、

内的酸化ストレスに伴う角膜内皮細胞の減少(図2)ドライアイ発症を明らかにしている(文献1:Onouchi et al.、文献2:Uchino et al.)。しかし、内的酸化ストレスに伴う角膜内皮細胞の減少を確認したものの、TUNEL染色を指標にしたアポトーシスは全く認められず(図3)その分子機序は不明のままである。そこで本研究では、内的酸化ストレスに伴う角膜内皮細胞の減少の分子機序を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

現在、水疱性角膜症に対する治療は外科的治療である角膜移植(角膜全層移植、角膜内皮移植)しかない。

内的酸化ストレスに伴う角膜内皮細胞減少の分子メカニズムを明らかにすることにより、角膜内皮細胞減少の予防、あるいは Fuchs 角膜内皮ジストロフィーの早期診断マーカーの開発、さらには加齢および前房内侵襲、炎症等に伴う内皮細胞減少による水疱性角膜症の予防および治療開発の端緒となることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス角膜内皮細胞培養の確立

組織培養から、細胞培養を行う独自の方法でマウス角膜内皮細胞培養の確立を行った。

その際に長期培養で内的酸化ストレスが付加されている *Tet-mev-1* マウスでは通常マウスと比し脂肪滴の蓄積が認められ、オートファジー(リポファジー)の関与が示唆されたため、さらに以下の実験を行った。

(2) 免疫細胞染色による脂肪滴の確認

Lipi Green による免疫細胞染色により、細胞培養で認められた脂肪滴様の変化が脂肪的であることを確認した。

(3) 免疫細胞染色と Western blot 解析によるオートファジー(リポファジー)の確認

DAP Green および LC-3 による解析でオートファジー(リポファジー)の亢進の確認を行った。

4. 研究成果

(1) 組織培養から独自の方法でマウス角膜内皮細胞培養の確立を行い、角膜内皮細胞であることを確認した(図4)。

(2) 内的酸化ストレスを負荷した *Tet-mev-1* マウスの角膜内皮細胞は、通常マウスの角膜内皮細胞に比べて早期に細胞内脂肪滴を蓄積し(図5)、その後培養を長期継続すると細胞外に脂質顆粒を放出することを確認した(図6)。このことから、細胞内で処理きれない過酸化状態の脂質成分が老廃物となってエキソサイトーシスなどによって細胞外に放出された、あるいは細胞死を起こした生体膜脂質顆粒が細胞外老廃物となっていると示唆された。生体においては、細胞外に放出された角膜内皮細胞の老廃物等はシュレム管-房水静脈連関を介して、排除されている。

(3) 細胞内脂肪滴を多く蓄積した若齢の *Tet-mev-1* マウスの角膜内皮細胞では、LC-IIが増加し、通常マウスの細胞と比べてオートファジーが亢進していることを明らかにした(図7)。また、興味深いことに、老齢になると通常マウスの細胞においても脂肪滴が蓄積し、内的酸化ストレスを負荷した *Tet-mev-1* マウスと同等にまでオートファジーが誘導されていることを確認した。一方、若齢から既にオートファジーを誘導していた老齢の *Tet-mev-1* マウ

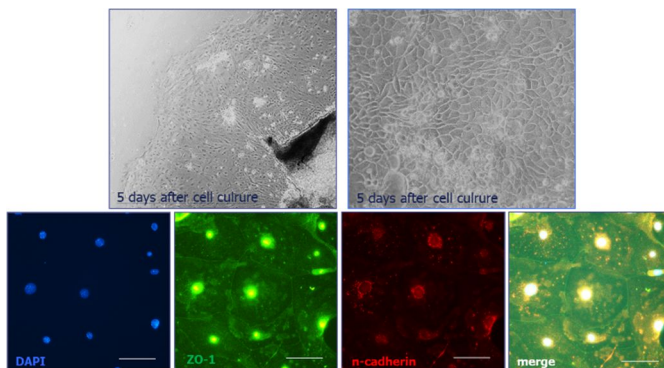


図4 組織からの角膜内皮細胞培養



図5 細胞培養8日目
脂肪滴様変化が確認された(矢印)

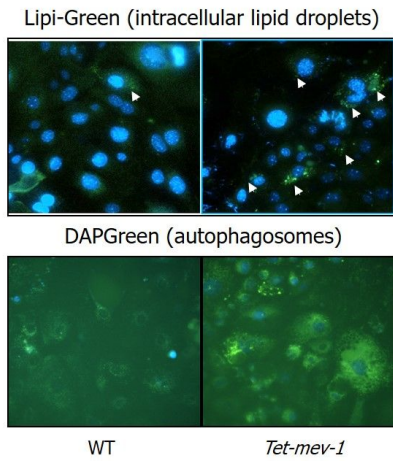


図6 Lipi-Green による脂肪滴の確認(上段)およびオートファゴソムの蓄積の確認(下)

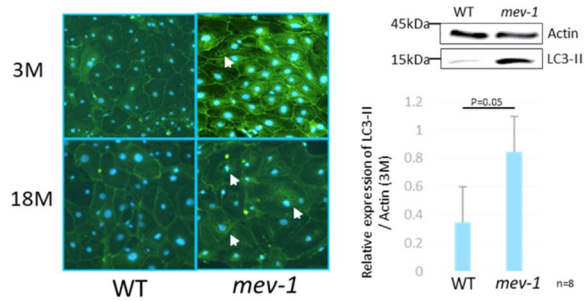


図7 LC-3 による Western-blot 解析と免疫細胞染色

スの角膜内皮細胞は膨潤化し、多くのオートファゴソームを蓄積し、内部は空砲化していた(図6)。このことから、内的酸化ストレスにより蓄積する脂肪滴をオートファジーによって除去することで、細胞損傷・細胞死を回避し、角膜内皮細胞の減少を抑止していることが示唆された。また、リソソームの絶対数がピークに達し、オートリソソーム

形成が不十分となると、増大する脂肪滴に含まれる脂質過酸化物などによって、フェロトーシス細胞死が角膜内皮細胞を減少させていると示唆された。

- 1) Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Aug 31;53(9):5780-7. Mitochondrial superoxide anion overproduction in Tet-mev-1 transgenic mice accelerates age-dependent corneal cell dysfunctions.
- 2) PLoS One. 2012;7(10):e45805. Oxidative stress induced inflammation initiates functional decline of tear production.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Onouchi Hiromi, Hayashi Takahiko, Shimizu Toshiaki, Matsuzawa Akiko, Suzuki Yasuyuki, Kato Naoko	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Anatomical Changes in the Anterior Chamber Volume After Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cornea	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/ico.0000000000002535	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiromi Onouchi
2. 発表標題 Molecular Mechanism of Decreasing Corneal Endothelial Cells Induced by Internal Oxidative Stress
3. 学会等名 The 45th Japan Society for Biomedical Gerontology
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------