

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791687

研究課題名(和文) 角膜潰瘍の形成機序及びその新規治療薬の開発

研究課題名(英文) The analysis of mechanism for corneal ulceration and the development of new drugs

研究代表者

木村 和博 (KIMURA KAZUHIRO)

山口大学・医学部付属病院・講師

研究者番号：60335255

研究成果の概要(和文)：角膜潰瘍は、角膜実質を構成するコラーゲンの過剰分解がその本態であると考えられる。組織学的に角膜潰瘍周辺では、角膜実質細胞、活性化した角膜線維芽細胞、浸潤してきた好中球などの炎症細胞が認められる。中でも角膜線維芽細胞がその中心的役割を果たしており、病原体由来のLPS, Poly:IC, Zymosanなどに反応し、種々のサイトカイン、ケモカインおよびコラーゲン分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼの発現、分泌を亢進させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Corneal ulceration results from the destruction of collagen fibrils in the stroma. Histological observations have revealed that corneal keratocytes, fibroblasts and infiltrated leukocytes are present at corneal tissue affected by ulceration. Corneal fibroblasts have an important role in the formation of corneal ulceration. In responses to lipopolysaccharide (LPS), polyinosinic-polycytidylic acid [poly(I:C)], and zymosan as surrogates for bacteria, viruses, and fungi, the cells produce various cytokines, chemokines and matrix metalloproteinases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
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：角膜潰瘍、コラーゲン分解、病原微生物

1. 研究開始当初の背景

無色透明な臓器である角膜は、感染や外傷、手術などによる外的要因により角膜実質に障害が及ぶと、その障害が治癒した後しばしば永続的な混濁をきたし著しい視力障害をきたす。中でも、感染性角膜潰瘍は、臨床の場において非常に頻度が多く悪化すれば失明の危険性もある。さらにたとえ角膜潰瘍が治癒し

たととしても、角膜潰瘍治癒後もしばしば角膜実質に永続的な混濁をきたし、時には著しい視力障害をきたす。薬剤、外傷や手術などによる角膜実質障害後の角膜実質の混濁形成も同様な機序を経て形成されていると考えられる。

角膜潰瘍は、その原因から感染と非感染性に区別される。原因はともあれ角膜潰瘍は、角

膜実質をしめるコラーゲンの融解がその病気の本態であると考えられている。種々の原因により、角膜実質に障害が及ぶと固有細胞である角膜実質細胞、炎症細胞などの浸潤細胞およびそれらを取り巻く細胞外基質が互いに影響しあう。その結果、種々のサイトカイン、プロテアーゼなどがこれらの細胞から発現、分泌され、パラクラインあるいはオートクライン的に各々の細胞に作用し、最終的に角膜実質のコラーゲンが融解することで生じると潰瘍が生じると考えられる。これまでの研究で、浸潤してくる好中球なども重要な働きをするが、中でも活性化した角膜実質細胞（角膜線維芽細胞）がその中心的役割をはたすことが明らかになってきた。

感染性角膜潰瘍は、感染初期なら抗菌薬の点眼にて治癒することが多い。つまり感染初期なら、抗菌薬による病原微生物の死滅のみにて感染性角膜潰瘍は改善し治療が容易である。しかしながら、ある程度進行した感染性角膜潰瘍では、抗菌薬の点眼は重要であるので点眼は行うが治癒にいたらず、角膜潰瘍形成がさらに進行することをしばしば臨床の場でみかける。このことは、感染性角膜潰瘍において、抗菌薬点眼による病原微生物の死滅のみでは、角膜潰瘍形成は十分に阻害できないことを意味する。このことは、未だ感染性角膜潰瘍の特異的な薬剤が存在しないことを示唆している。

2. 研究の目的

本研究は感染性角膜潰瘍の病態解明を行い、特異的な角膜潰瘍の治療法ならびに角膜混濁形成阻害の治療法を模索検討し、新規治療薬の開発、臨床応用を究極の目的とする。

Resident cell として角膜実質に存在する角膜線維芽細胞、感染および炎症によって角膜実質に浸潤してくる好中球をはじめとした炎症細胞と角膜実質を構成する細胞外マトリックスのそれぞれの相互作用による角膜潰瘍への関与およびそのメカニズムを詳細に解析する。まずは、角膜線維芽細胞を起点としてのサイトカイン、ケモカイン、接着分子、マトリックスメタロプロテアーゼの発現、分泌およびコラーゲン分解促進に関与する作用、制御因子並びにそれを制御するシグナル伝達経路の同定を行うことを主たる目的とする。

3. 研究の方法

角膜実質細胞をヒト角膜より分離培養し、血清存在下で継代し、角膜線維芽細胞を単離する。これらの細胞を播種し、3日間血清存在下で培養し細胞密度をコンフルエントの状態にする。さらに、細胞培養液を

血清を含まない無血清培地にかえて、24時間さらに培養を行う。つづいて、この角膜線維芽細胞に対して、感染性外来因子としてグラム陰性桿菌のリポポリサッカライド (LPS)、真菌の細胞壁の主要成分である Zymosan、ウイルスのアナログである Poly (I:C) を無血清下で添加して、さらに 24 時間培養を継続する。その後、角膜線維芽細胞の細胞上清を回収する。これら回収した培養上清中のサイトカイン、ケモカインおよび成長因子の分泌、発現を ELISA 及び multiplex にて検討する。検討する因子としては、IL-1beta, IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, Basic FGF, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN-gamma, IP-10, MCP-1, MIP-1alpha, MIP-1beta, PDGF-BB, RANTES, TNF-alpha, VEGF をターゲットとした。また、白血球など血球成分との接着に関与している炎症性接着因子である ICAM-1 および VCAM-1 などの角膜線維芽細胞の細胞表面での発現を検討するため、LPS, Poly (I:C), Zymosan で刺激した角膜線維芽細胞より細胞抽出液をえて、これを電気泳動にかけ、各々の抗体を用いてウエスタンブロット法を行いそのタンパク質発現を確認する。また、LPS, Poly (I:C), Zymosan で刺激した角膜線維芽細胞におけるタンパク質分解酵素特にマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の分泌、発現も、LPS, Poly (I:C), Zymosan により刺激した角膜線維芽細胞の培養上清を回収し、同様にそれぞれの特異抗体を用いてウエスタンブロット法にて検討する。

4. 研究成果

LPS, Poly (I:C), Zymosan にてヒト角膜線維芽細胞を刺激すると、濃度及び時間依存性に種々のサイトカイン、ケモカインの発現、分泌が亢進した。中でも IL-6, IL-8 及び MCP-1 の三つが、LPS, Poly (I:C), Zymosan で共通に分泌発現が亢進した。さらに、LPS および Poly (I:C) は、RANTES, IP-10, eotaxin の発現分泌をともに亢進させた。さらに LPS は、IL-12 および VEGF の分泌発現を亢進させ、Poly (I:C) はまた MIP-1 β , IFN- γ の発現、分泌亢進をきたした。また、IL-1beta, IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17, Basic FGF, G-CSF, GM-CSF, MIP-1alpha, PDGF-BB, TNF-alpha の培養上清中の分泌、発現亢進は認められなかった。続いて、炎症に関与する接着因子の ICAM-1, VCAM-1 の発現への LPS, Poly (I:C), Zymosan

の影響を検討ところ、LPS 及び Poly:IC は ICAM-1、VCAM-1 の発現を亢進させた。一方で Zymosan はそれら分子の発現に影響をおよぼさなかった。また、LPS、Poly (I:C)、Zymosan のタンパク質分解酵素の一つであるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の分泌、発現に対する作用を検討した。結果、LPS、及び Poly (I:C) は、角膜線維芽細胞より MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9 の発現分泌を亢進させた。一方で Zymosan は、MMP の分泌、発現にはほとんど影響を及ぼさなかった。

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 10 件)

- ① Orita T, Kimura K, Zhou H, Nishida T. Poly(I:C)-Induced Adhesion Molecule Expression Mediated by NF- κ B and Phosphoinositide 3-Kinase-Akt Signaling Pathways in Human Corneal Fibroblasts. Invest Ophthalmol Vis Sci. 51:5556-60. 2010. 査読有
- ② Kimura K, Orita T, Zhou H, Kondo Y, Nishida T. Up-regulation of matrix metalloproteinase expression by poly(I:C) in corneal fibroblasts: role of NF- κ B and interleukin- β . Invest Ophthalmol Vis Sci. 51:5012-8. 2010. 査読有
- ③ Kimura K, Kawano S, Mori T, Inoue J, Hadachi H, Saito T, Nishida T. Quantitative analysis of the effects of extracellular matrix proteins on membrane dynamics associated with corneal epithelial cell motility. Invest Ophthalmol Vis Sci. 51:4492-9. 2010. 査読有
- ④ Chikamoto N, Fujitsu Y, Kimura K, Nishida T, Araki T. Device for cataract analysis: development and relevance to cataract surgery. J Cataract Refract Surg 36:58-65. 2010. 査読有
- ⑤ Nomi N, Kimura K, Nishida T. Release of Interleukins 6 and 8 Induced by Zymosan and Mediated by MAP Kinase and NF- κ B Signaling Pathways in Human Corneal Fibroblasts. Invest Ophthalmol Vis Sci. 51:2955-9. 2010. 査読有
- ⑥ Kimura K, Teranishi S, Kawamoto K, Nishida T. Protection of human corneal epithelial cells from hypoxia-induced disruption of barrier function by hepatocyte growth factor. **Experimental Eye Research** 90:337-43. 2010. 査読有
- ⑦ Kimura K, Nishida T. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in

downregulation of the gap-junction protein Connexin43 by TNF- α in human corneal fibroblasts. Invest Ophthalmol Vis Sci. 51:1943-7. 2010. 査読有

- ⑧ Kimura K, Teranishi S, Nishida T: Establishment of human corneal epithelial cells stably expressing human connexin43. **Experimental Eye Research** 90:4-9. 2009. 査読有
- ⑨ Teranishi S, Kimura K, Nishida T: Role of Formation of an ERK-FAK-Paxillin Complex in Migration of Human Corneal Epithelial Cells During Wound Closure in Vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci 50:5646-52, 2009. 査読有
- ⑩ Kimura K, Teranishi S, Nishida T: Interleukin- β -Induced Disruption of Barrier Function in Cultured Human Corneal Epithelial Cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 50: 597-603, 2009. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 折田朋子, 木村和博, 西田輝夫: 角膜線維芽細胞における poly(I:C) による接着因子の発現制御に関する伝達経路. 第 114 回日本眼科学会総会, 愛知県, 名古屋国際会議場, 2010/4/15
- ② 木村和博, 川野純廣, 斉藤 俊, 西田輝夫: 細胞外マトリックスによる角膜上皮の細胞運動に伴う細胞膜形態変化の定量的解析. 第 34 回角膜カンファレンス・第 26 回日本角膜移植学会, 宮城県, 仙台国際センター, 2010/2/11
- ③ 木村和博, 寺西慎一郎, 西田輝夫: 角膜上皮細胞における TNF- α による Occludin, β -catenin のチロシンリン酸化作用. 第 43 回日本眼炎症学会, 大阪府, グランキューブ大阪, 2009/7/10
- ④ 木村和博, 折田朋子, 近藤由樹子, 西田輝夫: 角膜線維芽細胞での Poly (I : C) による MMP 発現及びその分子機序. 第 46 回日本眼感染症学会, 大阪府, グランキューブ大阪, 2009/7/10
- ⑤ 折田朋子, 木村和博, 西田輝夫: Poly (I : C) によるサイトカイン, 接着因子発現に関するシグナル伝達経路. 第 46 回日本眼感染症学会, 大阪府, グランキューブ大阪, 2009/7/10

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 和博 (KIMURA KAZUHIRO)
山口大学・医学部・講師
研究者番号：60335255

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし