

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 1 月 25 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791705

研究課題名（和文）

遺伝子導入による TGFβシグナル阻害を戦略とした角膜内皮障害の予防法の探索

研究課題名（英文）

Search of the prophylaxis of the corneal endothelium disorder by the TGFβ signal inhibition using the gene introduction

研究代表者

住岡 孝吉 (TAKAYOSHI SUMIOKA)

和歌山県立医科大学・眼科・講師

研究者番号：40433362

研究成果の概要（和文）：健康な内皮は、角膜の透明度維持に不可欠であるが、角膜のアルカリ火傷では上皮実質だけでなく内皮までも障害をうけるため臨床的に深刻な状態である。アルカリ火傷の後、デスメ膜の下で内皮層の線維化様の構造が形成され、透明度を維持するための内皮の生理機能が弱まると思われる。Smad シグナルの阻害は、角膜内皮において創傷治癒反応を損なうことなく、内皮-間葉系移行や線維化反応を効果的に抑える。Smad を制御する戦略は、角膜内皮の線維化予防や治療に役立つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：A healthy endothelium is essential for the maintenance of transparency of the cornea. An alkali burn in the cornea is a clinically serious condition because it damages not only the epithelium and stroma but also the endothelium. During healing after an alkali burn, the fibrous structure is formed in the endothelial layer beneath Descemet's membrane. Formation of such fibrous structure impairs the physiologic function of the endothelium to maintain transparency. Blocking Smad signal effectively suppresses injury-induced endothelial-mesenchymal transition and fibrogenic reaction by corneal endothelium without impairing repair of wound defect. Strategies that block Smad may be useful for prevention and treatment of fibrogenic disorders in the corneal endothelium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 22 年度	600,000	180,000	780,000
平成 23 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：角膜内皮、角膜上皮、角膜実質、創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

| 角膜は視機能維持に必須の透明な組織であ

るが、角膜内皮障害が高度になるとヒトでは極めて分裂能が少ないため、内皮のポンプ作用の異常やバリア機能の破綻をきたし、角膜実質の浮腫や混濁を生じ、最終的に水泡性角膜症と呼ばれる不可逆性の状態となる。眼内ではトランスフォーミング成長因子ベータ (transforming growth factor- β :TGF β) が多く含有されているため、角膜内皮でも上皮-間葉系移行と同様のことが惹起されていると想定し、内皮-間葉系移行の障害で内皮の線維化抑制や透明性維持を期待できるのではと考えた。

2. 研究の目的

角膜透明治癒を得るには角膜全層において癒痕化の抑制や血管新生の抑制が非常に重要となる。

(1) 線維芽細胞様に変貌しうる治療困難な角膜疾患全般に応用すべく、ラットアルカリ外傷モデルにおいて Smad シグナル阻害での角膜内皮線維化抑制の効果を検討すること。

(2) 家兎角膜内皮細胞を使用した培養実験での各種サイトカイン添加による角膜内皮の遊走増殖を評価すること。

(3) 組織の再構築過程において重要な役割を担う分子であるテネイシンCを制御することで角膜血管新生の抑制を検討すること。

3. 研究の方法

(1) アルカリ眼外傷モデルでの抗 Smad 作用遺伝子の評価

CAG /Cre/LoxP システムを使用し、各種抗 Smad 作用を持つアデノウイルスベクター (Smad7 等) と Cre リコンビナーゼアデノを共感染させ投与する群と Cre リコンビナーゼアデノのみのコントロール群を比較する。Wistar ラットを使用。CAG プロモーターを用い、Cre/LoxP システムを使用しアデノウイルスベクターによる遺伝子導入を行った。その後ヒアルロン酸に Smad7 を混入したものと Cre-Ad のみのコントロール群とに分け、3 日後、1 規定の水酸化ナトリウム 10 μ l を点眼し感染対策としてオフロキサシン眼軟膏を塗布した。そして 3 日後、1 週間後、2 週間後と経時的に屠殺し免疫組織化学的に検討した。また走査電子顕微鏡を用いて直接内皮面の微細構造を観察した。上皮-間葉系移行のマーカーと細胞間接着分子の発現と角膜混濁発症の有無を組織病理学的、免疫組織化学的に検討し、抗 Smad 作用をもつ遺伝子の内皮-間葉系移行抑制における効果を比較検討した。

(2) 角膜内皮の創傷治癒における各種サイトカインの角膜内皮伸展の評価

家兎角膜を採取し、4 mm 四方の角膜ブロックを作製。角膜ブロックの内皮半分カバーガラスで機械的外傷を作製し内皮を除去する。創傷作製後の角膜ブロックを組織培養皿に入れ EGF、TGF β 1、TGF β 2、TGF β 中和抗体、MAP キナーゼ阻害剤、P38 阻害剤、JNK、ALK5 阻害剤、TRPV-1 アゴニスト (カプサイシン) とアンタゴニスト (SB366791、以下 SB) を添加し、37 $^{\circ}$ C で器官培養。規定時間後、0.25% トリパンプルー溶液、0.2% アリザリンレッド S 溶液で角膜ブロックを染色。光学顕微鏡で内皮細胞の伸展距離を測定し、統計学的処理で比較検討する。また内皮伸展が増殖、遊走のどちらが主体であるかを確認するため Proliferation Cell Nuclear Antigen (PCNA) などの試薬を用いて免疫組織化学的に検討した。

(3) 角膜創傷治癒におけるテネイシンCの役割

テネイシンC ノックアウトマウス群、野生種群の 2 群それぞれについて、パクレン[®]を用いて角膜を焼灼し、角膜創傷治癒モデルを作成した。創傷作成 3、7、14 日後に屠殺し、モデル眼を摘出して凍結切片を作成した。Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) を用いた免疫組織化学染色を行い、角膜内に伸展した新生血管の長さを測定した。また、同モデルの 3 日後 7 日後で real-time RT-PCR を施行し vascular endothelial growth factor (VEGF)、transforming growth factor β 1 (TGF β 1)、F4/80、myeloperoxidase (MPO) を比較検討した。

またテネイシンC ノックアウトマウスと野生種の眼線維芽細胞や腹腔内マクロファージを用いてシャーレで培養し、TGF β 1 添加の有無による各種シグナルの動向を real time RT-PCR を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) コントロール群では線維芽細胞様に変化した異常な増殖物が内皮下でみられ、リン酸化 Smad2 (Phospho Smad2)、 α 平滑筋アクチン (α SMA)、1 型コラーゲンは角膜実質や角膜内皮下にみられた。Smad7 群では角膜内皮下での Phospho Smad2、 α SMA、1 型コラーゲンの発現は抑制されていた。PCNA は 1 週間後のみ Smad7 群で角膜内皮での著明な核内での発現が観察された。角膜内皮は軽度の創傷では各サイトカインの働きにより遊走し治癒するが、重度の創傷では炎症が高度となり、上皮-間葉系移行と同様の内皮-間葉系移行が起こり癒痕治癒するため、遊走以外に組織線維化を予防することが求められる。Smad7 を前房内に注入した群では著明に内皮下の異常な増殖

物は抑制されており、免疫組織学的検討で内皮-間葉系移行が抑制されていることが判明した。TGFβ/Smadシグナルを阻害することが角膜内皮透明治癒において有効となることが示唆された。

(2) EGF 添加群で有意に内皮伸展をみとめ、MAP キナーゼ阻害剤、P38 阻害剤添加で内皮伸展が抑制された。またカプサイシン添加群では内皮の伸展距離に有意差はみられなかったが、SB 添加群でコントロール群やカプサイシン添加群と比較して有意に内皮の伸展が抑制されていた。内因性 TRPV-1 シグナルが家兎角膜内皮細胞の伸展の伸展に必要であると考えられた。内因性に TRPV-1 受容体を活性化させているリガンドを検索することで角膜内皮障害の新しい治療法の開発に繋がる可能性が示唆された。

(3) テネイシンC ノックアウトマウスでは角膜中央部への電熱焼灼後の角膜新生血管の伸展は WT と比較し、3日後7日後で有意に抑制されていた。また real time RT-PCR では同様のモデルにおいて VEGF、TGFβ1、F4/80 の抑制が3日後で確認された。KO の眼線維芽細胞では、TGFβ1 添加の有無にかかわらず real time RT-PCR で、野生種と比較し VEGF の抑制が確認され、また TGFβ1 添加により KO の眼線維芽細胞での TGFβ1 発現の抑制が確認された。また、腹腔内より採取したマクロファージでは VEGF、TGFβ1 とも TGFβ1 の添加の有無にかかわらず野生種とテネイシンC ノックアウトマウスで有意な差はみられなかった。内因性のテネイシンC は血管形成遺伝子発現に関係しており、血管新生を介して創傷治癒に関係していると考えられる。また、内因性のテネイシンC は角膜創傷時にマクロファージを誘導することが示唆された。透明角膜維持において角膜新生血管の抑制は重要と思われ、さらなるテネイシンC の役割の解明が期待される。

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4件)

① Sumioka T, Fujita N, Kitano A, Okada Y, Saika S. Impaired Angiogenic Response in the Cornea of Mice Lacking Tenascin C. Investigative Ophthalmology and Visual Science52. 2462-2467, 2011 査読:有
DOI: 10.1167/iovs.10-5750.

② Takeshi Miyamoto, Takayoshi Sumioka, Shizuya Saika. Endothelial Mesenchymal Transition:A Therapeutic Target in

Retrocorneal Membrane.
CORNEA29. 52-56, 2010 査読:有

③Tanaka S, Sumioka T, Fujita N, Kitano A, Okada Y, Yamanaka O, Flanders KC, Miyajima M, Saika S. Suppression of injury-induced epithelial-mesenchymal transition in a mouse lens epithelium lacking tenascin-C. Molecular Vision16. 1194-1205, 2010 査読:有
URL:http://www.molvis.org/molvis/v16/a133/

④Saika S, Yamanaka O, Sumioka T, Okada Y, Miyamoto T, Shirai K, Kitano A, Tanaka S. Transforming growth factor beta signal transduction: a potential target for maintenance/restoration of transparency of the cornea. Eye Contact Lens36. 286-289, 2010 査読:有
DOI: 10.1097/ICL.0b013e3181eef01c.

[学会発表] (計10件)

①住岡孝吉、田中オ一、泉谷愛、藤田識人、岡田由香、雑賀司珠也. テネイシンC 欠損マウスにおける角膜創傷治癒の障害 第一回テネイシンフォーラム 2011年11月5日三重

②Takayoshi Sumioka, Yuka Okada, Peter Reinach, Norihito Fujita, Masayasu Miyajima, Shizuya Saika. Roles of TRPV1 Signal in Migration of Corneal Epithelium. Corneal Cell Biology 2011年10月30日和歌山

③Takayoshi Sumioka, Yuka Okada, Peter Reinach, Norihito Fujita, Masayasu Miyajima, Shizuya Saika. Roles of TRPV1 Signal in Wound Healing of Corneal Epithelium. 韓日シヨイント角膜カンファレンス 2011年10月14日韓国ソウル

④Takayoshi Sumioka, Norihito Fujita, Ai Kitano, Yuka Okada, Shizuya Saika. Impaired Angiogenic Response and Wound Healing in the Cornea of Mice Lacking Tenascin C オステオポンチン研究会 2011年6月18日札幌

⑤Sumioka T, Ikeda K, Okada Y, Yamanaka O, Saika S : Effect of blocking TGF-beta/Smad signal suppresses epithelial-mesenchymal transition and fibrogenic reaction by corneal endothelium post-alkali-burn in rats. Keystone Symposia, 2011.1. Vancouver, Canada

⑥Sumioka T, Kitano A, Fujita N, Okada Y, Saika S : Impaired angiogenic response in cornea by lacking tenascin C in mice. ARVO, 2010.5 Florida, USA

⑦住岡孝吉、岡田由香、藤田識人、北野 愛、雑賀司珠也：角膜創傷治癒過程での角膜血管新生におけるテネイシンCの役割. 日本眼科学会総会, 2010.4. 名古屋

⑧Takayoshi Sumioka, Takayoshi Sumioka, Yuka Okada, Peter Reinach, Akihiro Inoue, Masayasu Miyajima, Shizuya Saika. :Roles of Trpv1 Signal in Migration of Corneal Endothelium Epithelium. Gordon Research Conference, 2010.3 Ventura, USA

⑨Takayoshi Sumioka, Takayoshi Sumioka, Yuka Okada, Peter Reinach, Akihiro Inoue, Masayasu Miyajima, Shizuya Saika. :Roles of Trpv1 Signal in Migration of Corneal Endothelium Epithelium. ARVO, 2009.5 Florida, USA

⑩住岡孝吉、岡田由香、雑賀司珠也：家兎角膜内皮創傷治癒過程における TRPV-1 受容体の役割. 第 113 回 日本眼科学会総会, 2009.4 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

住岡 孝吉 (TAKAYOSHI SUMIOKA)
和歌山県立医科大学・眼科・講師
研究者番号：40433362

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：