

## 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 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591943

研究課題名（和文） FGF7 signalへの性ホルモンの作用とドライアイへの応用

研究課題名（英文） Sex Hormone Effect on FGF7 Signaling and Application for Dry Eye.

研究代表者

林 康人 (Hayashi Yasuhito)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70314953

研究成果の概要（和文）：ドライアイは眼部の不快感を伴い、視機能の質のみでなく、生活の質を損なう。ドライアイが女性に多い理由についての分子メカニズムは不明であったが、本研究により、マイボーム腺の分化増殖に重要な役割を果たすと考えられる線維芽細胞増殖因子7がマイボーム腺及び皮膚上皮細胞の増殖を起こすさいの性ホルモンの影響を遺伝子組換えマウスと培養細胞を用いた研究により明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Dry eye disease, a major cause of ocular surface irritation, is not only greatly enhance their vision, but also their quality of life. To elucidate molecular mechanism of the reason why women are more likely to develop dry eyes, in this study, we found the effect on cell proliferation of Meibomian gland tissues by Fibroblast growth factor 7.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：マイボーム腺、線維芽細胞増殖因子7、性ホルモン、ドライアイ、遺伝子組換えマウス

## 1. 研究開始当初の背景

ドライアイは眼部の不快感をとめない、その有病率は高いものでは30%を超えている。これらの報告で共通しているのは高齢の女性に多いことであり、性ホルモンの関与が考えられてきたが、分子メカニズムは詳細不明

であった。我々が所有する *Kera3tTA3/tet-0-FGF7* (*Kera3tTA3* マウス：眼瞼組織で過剰発現している線維芽細胞増殖因子7 (Fibroblast growth factor 7, FGF7) をドキシサイクリンを腹腔内投与で停止できる) では 2014 Teklad Global 14%

Protein Rodent Maintenance Diet (Harlan Laboratories, Inc. 米国より輸入) を使用すると、マイボーム腺と眼瞼上皮の過剰増殖は雄では 100%おきるのに対して雌では発育異常を伴う極 1 部にのみマイボーム腺と眼瞼上皮の過剰増殖をおこす。性別により phenotype が異なる遺伝子組換えマウスはドライアイが女性に多いことと合致し、大変興味深いものである。従来報告では生理活性が強いとされる、女性ホルモン  $17\beta$ -estradiol がマイボーム腺の発育を抑制する、または、男性ホルモン  $4,5\alpha$ -Dihydrotestosterone がマイボーム腺の発育を亢進させるなどの、形態学的な研究に留まっており、分子メカニズムは不明であった。一方、FGF7 の過剰発現では、角膜実質に腺組織ができるモデルマウスや、上皮の過剰増殖をおこすモデルマウスの報告があり、腺組織の構築分化や上皮細胞の増殖と密接な関係があり、性ホルモンとの関係が明らかになれば、ドライアイの性差を決定づける分子メカニズムの解明に近づくものと期待できる。

## 2. 研究の目的

マイボーム腺と眼瞼上皮の増殖過程における FGF7 と FGF7 シグナルパスウェイと性ホルモンの関連の分子メカニズムを明らかにし、細胞増殖と性ホルモン、ドライアイの性差の分子機序についての検討をする。

## 3. 研究の方法

ヒト皮膚培養上皮細胞とマウスマイボーム腺培養細胞 (プライマリーカルチャー) を使用し、FGF7 シグナルパスウェイの性ホルモンの影響をウェスタンブロットを使用し確認し、細胞増殖分化との関わりを、cell counter で確認、さらに double FUCCI mouse (B6. Cg-Tg (Fucci) 504Bsi (RBRC02706) [Fucci-S/G2/M-Green: mAG-hGeminin (1/110)] と B6. Cg-Tg (Fucci) 596Bsi

(RBRC02707) [Fucci-G1-Red: mK02-hCdt1 (30/120)] を用いて細胞増殖周期に対する影響を確認する。

## 4. 研究成果

ヒト皮膚培養上皮細胞において、FGF7 の下流で増殖に関わっているとされる、活性型 ERK である p-ERK (p42, p44) の発現量は FGF7 刺激により 15 分後より亢進が見られるものの、生理活性が強いとされる  $17\beta$ -estradiol や  $4,5\alpha$ -Dihydrotestosterone の前処理による、変化は観察できなかった。細胞増殖の検討では、 $17\beta$ -estradiol、Progesterone、 $4,5\alpha$ -Dihydrotestosterone の 3 つの組みあわせで検討を行った結果、 $17\beta$ -estradiol と  $4,5\alpha$ -Dihydrotestosterone 前処理で FGF7 刺激による細胞増殖の亢進がみられたのに対して、Progesterone では FGF7 刺激による細胞増殖を抑制している結果が得られた。double FUCCI mouse ( B6. Cg-Tg (Fucci) 504Bsi (RBRC02706) [Fucci-S/G2/M-Green: mAG-hGeminin (1/110)] と B6. Cg-Tg (Fucci) 596Bsi (RBRC02707) [Fucci-G1-Red: mK02-hCdt1 (30/120)] の生直後の皮膚を表皮層のみ dispase II で剥離し、keratinocyte のみ取り出して、CnT-07 medium (CellnTec, Bern, Switzerland) を collagen type1 coat 6 well plate (IWAKI, ABW-4810-010) で培養後、30% confluent の状態で supplement を除去して 12 時間の starvation かけた状況下、Progesterone 投与 2 時間後の、human FGF7 (hFGF7 : R&D 251KG/CF) の作用と、Progesterone と hFGF7 を作成して、G0-G1 期の細胞と S-G2-M 期の細胞の比率を検討した結果、細胞増殖が Progesterone で抑制できる結果を得たが、B6. Cg-Tg (Fucci) 504Bsi (RBRC02706) [Fucci-S/G2/M-Green: mAG-hGeminin

(1/110) の蛍光発現量が少なく、  
B6. Cg-Tg(Fucci)596Bsi (RBRC02707)  
Fucci-G1-Red: mK02-hCdt1 (30/120) の蛍光  
蛋白発現が強すぎるため、蛍光の漏れの影響  
が否定できず、明確な結果を得ることは難し  
かった。一方、マイボーム腺は P7 の double  
FUCCI mouse より単離を試みている。  
trypsin-EDTA 処理後、CnT-07 medium にコレ  
ラトキシンと hFGF7 を加えた培養液を使用し、  
球形の脂肪を蓄えた細胞を得たが、増殖性が  
悪く、実験をするのは困難であった。  
B6. Cg-Tg(Fucci)596Bsi (RBRC02707)  
Fucci-G1-Red: mK02-hCdt1 (30/120) はホモ  
の状態では、マウスが発育させることができ  
ず、蛍光蛋白自体の毒性が強いことが原因で  
はないかと考えている。

#### 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) (査読有り)

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Bone marrow mesenchymal stem cells can differentiate and assume corneal keratocyte phenotype. . Liu, H., Zhang, J., Liu, C. Y., Hayashi, Y., Kao, W. W. *J Cell Mol Med*, **16**, **1114-1124**.2012 (査読有り)
2. Important role of epiregulin in inflammatory responses during corneal epithelial wound healing. Zhang, Y., Kobayashi, T., Hayashi, Y., Yoshioka, R., Shiraishi, A., Shirasawa, S., Higashiyama, S., Ohashi, Y. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **53**, **2414-2423**. 2012 (査読有り)
3. Involvement of stem cell factor and c-kit in corneal wound healing in mice. Miyamoto, K., Kobayashi, T., Hayashi, Y., Zhang, Y., Hara, Y., Higashine, M., Shiraishi, A., Ohashi, Y. *Mol Vis*, **18**, **1505-1515**.2012 (査読有り)

4. Confocal microscopic observations of stromal keratocytes in soft and rigid contact lens wearers. Ohta, K., Shimamura, I., Shiraishi, A., Ohashi, Y. *Cornea*, **31**, **66-73**. 2012 (査読有り)
5. Assessment of real-time polymerase chain reaction detection of Acanthamoeba and prognosis determinants of Acanthamoeba keratitis. Ikeda, Y., Miyazaki, D., Yakura, K., Kawaguchi, A., Ishikura, R., Inoue, Y., Mito, T., Shiraishi, A., Ohashi, Y., Higaki, S., Itahashi, M., Fukuda, M., Shimomura, Y., Yagita, K. *Ophthalmology*, **119**, **1111-1119**. 2012 (査読有り)
6. Crosstalk between TGF-beta and MAPK signaling during corneal wound healing. Terai, K., Call, M. K., Liu, H., Saika, S., Liu, C. Y., Hayashi, Y., Chikama, T., Zhang, J., Terai, N., Kao, C. W., Kao, W. W. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **52**, **8208-8215**. 2011 (査読有り)
7. Automatic evaluation of corneal nerve tortuosity in images from in vivo confocal microscopy. Scarpa, F., Zheng, X., Ohashi, Y., Ruggeri, A. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **52**, **6404-6408**. 2011 (査読有り)
8. Autologous fascia lata grafts for scleral repair in eyes with infectious necrotizing scleritis. Zheng, X., Kodama, T., Goto, T., Ohashi, Y. *Arch Ophthalmol*, **129**, **1225-1227**. 2011 (査読有り)
9. Anterior segment optical coherence tomography analysis of clinically unilateral pseudoexfoliation syndrome: evidence of bilateral involvement and morphologic factors related to asymmetry. Zheng, X., Sakai, H., Goto, T., Namiguchi, K., Mizoue, S., Shiraishi, A., Sawaguchi, S., Ohashi, Y. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **52**, **5679-5684**. 2011 (査読有り)
10. In vivo confocal microscopic evidence of

keratopathy in patients with pseudoexfoliation syndrome. Zheng, X., Shiraishi, A., Okuma, S., Mizoue, S., Goto, T., Kawasaki, S., Uno, T., Miyoshi, T., Ruggeri, A., Ohashi, Y. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **52**, 1755-1761.2011 (査読有り)

11. Lumican is required for neutrophil extravasation following corneal injury and wound healing. Hayashi Y., Call MK, Chikama T, Liu H, Carlson EC, Sun Y, Pearlman E, Funderburgh JL, Babcock G, Liu CY, Ohashi Y., Kao W. *Journal of Cell Science* **123**:2987-2995. 2010 (査読有り)

12. Monoallelic Expression of Krt12 Gene during Corneal-type Epithelium Differentiation of Limbal Stem Cells. Hayashi Y., Call M, Liu CY, Hayashi M, Babcock G, Ohashi Y., Kao WW. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **55**:4562-4568.2010. (査読有り)

13. Corneal Epithelial Wound Healing Impaired in Keratinocyte-Specific HB-EGF Deficient Mice In Vivo and In Vitro. Yoshioka R, Shiraishi A, Kobayashi T., Morita S, Hayashi Y., Higashiyama S, and Ohashi Y. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **June 16**, 2010 (査読有り)

14. In vivo and in vitro laser confocal microscopy to diagnose acanthamoeba keratitis. Shiraishi A, Uno T, Oka N, Hara Y, Yamaguchi M, Ohashi Y. *Cornea*. **2010 29(8)**:861-5. (査読無し)

15. Cosmetic Product Migration Onto the Ocular Surface: Exacerbation of Migration After Eyedrop Instillation. Goto T, Zheng X, Gibbon L, Ohashi Y. *Cornea*. **2010 Feb 17**. (査読有り)

16. Effect of anterior chamber depth on shear stress exerted on corneal endothelial cells by altered aqueous flow after laser iridotomy. Yamamoto Y, Uno T, Joko T, Shiraishi A,

Ohashi Y. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **2010**.

**51:1956-64.** (査読有り)

17. Effectiveness of In Vivo Confocal Microscopy in Detecting Filamentous Fungi During Clinical Course of Fungal Keratitis. Takezawa Y, Shiraishi A, Noda E, Hara Y, Yamaguchi M, Uno T, Ohashi Y. *Cornea*. **2010 Sep 15** (査読有り)

[学会発表] (計 21 件)

1. 角膜カンファレンス 2013

2/14-16, 2012.(和歌山)

林 康人, 小林 剛, 白石 敦, 大橋 裕一

角膜中央の上皮基底細胞層には胎生期由来の上皮幹細胞が残存する可能性がある

2. 角膜カンファレンス 2013

2/14-16, 2012.(和歌山)

友岡真美, 井上智之, 鈴木 崇, 小林 剛, 原 祐子, 鄭 暁東, 林 康人, 山口昌彦, 白石 敦, 大橋裕一

非典型的な角膜上皮病変を呈した水痘帯状疱疹ウイルス性角膜炎の 3 例

3. 第 66 回日本臨床眼科学会

10/25-28, 2012.(京都)

鎌尾知行, 白石 敦, 立松良之, 大橋 裕一

涙道閉塞症治療後のドライアイ

4. 第 66 回日本臨床眼科学会

10/25-28, 2012.(京都)

鄭 暁東, 鎌尾知行, 坂根由梨, 山口昌彦, 白石 敦, 島村一郎, 大橋裕一  
前眼部 OCT を用いた涙液クリアランス試験 : 加齢および眼位変化の検討

5. 第 66 回日本臨床眼科学会

10/25-28, 2012.(京都)

原 祐子, 鳥山浩二, 坂根由梨, 鈴木 崇, 鄭 暁東, 宇野敏彦, 白石 敦,

大橋裕一

高張食塩水を用いたポートルス・ドレナージ DSAEK の術後成績

6.第 66 回日本臨床眼科学会

10/25-28, 2012.(京都)

有田玲子, 白川理香, 前田修司, 前田耕志, 山口昌彦, 大橋裕一, 天野史郎  
マイボーム腺機能不全患者の眼瞼結膜温度低下とマイボーム腺消失は関連する

7.第 66 回日本臨床眼科学会

10/25-28, 2012.(京都)

村上 晶, 大橋裕一, 小玉裕司, 糸井素純, 梶田雅義  
インストラクションコース: ハードコンタクトレンズを見直そう

8.第 66 回日本臨床眼科学会

10/25-28, 2012.(京都)

井上智之, 鈴木 崇, 大橋裕一  
グラフト拒絶反応治療抵抗例におけるヘルペス性角膜内皮炎

9.第 66 回日本臨床眼科学会

10/25-28, 2012.(京都)

鳥山浩二, 鈴木 崇, 鄭 暁東, 原祐子, 白石 敦, 宇野敏彦, 大橋裕一  
最近 5 年間のアcantアメラバ角膜炎発症者数の全国調査

10.第 66 回日本臨床眼科学会

10/25-28, 2012.(京都)

山口昌彦, 坂根由梨, 鎌尾知行, 山本康明, 白石 敦, 大橋裕一  
上輪部角結膜炎に対するジクアホソルナトリウム点眼液の効果

11.フォーサム 2012 横浜

7/14-16, 2012.(横浜)

第 49 回日本眼感染症学会  
石川恵里, 鈴木 崇, 山口智史, 原祐子, 山口昌彦, 鄭 暁東, 白石 敦,

宇野敏彦, 大橋裕一

患者背景因子から見た緑膿菌角膜炎臨床像の検討

12.フォーサム 2012 横浜

7/14-16, 2012.(横浜)

第 49 回日本眼感染症学会  
山口智史, 鈴木 崇, 石川恵里, 原祐子, 山口昌彦, 鄭 暁東, 白石 敦, 宇野敏彦, 大橋裕一  
角膜炎由来緑膿菌株の病原因子の解析

13.フォーサム 2012 横浜

7/14-16, 2012.(横浜)

第 49 回日本眼感染症学会  
小林 剛, 渡部成美, 白石 敦, 宇野敏彦, 大橋裕一  
ソフトコンタクトレンズ用洗浄液(ミラフロー®)の抗アcantアメラバ消毒効果の検討

14.フォーサム 2012 横浜

7/14-16, 2012.(横浜)

第 49 回日本眼感染症学会  
鳥山浩二, 鈴木 崇, 鄭 暁東, 原祐子, 山口昌彦, 白石 敦, 宇野敏彦, 大橋裕一  
初診時に角膜内皮炎と診断されたアcantアメラバ角膜炎の 2 例

15.フォーサム 2012 横浜

7/14-16, 2012.(横浜)

第 49 回日本眼感染症学会  
井上智之, 鈴木 崇, 大橋裕一  
リアルタイム PCR が診断に有用であったアシクロビル耐性角膜ヘルペスの 1 例

16.フォーサム 2012 横浜 7

/14-16, 2012.(横浜)

第 49 回日本眼感染症学会  
鈴木 崇, 鳥山浩二, 岡本茂樹, 田中寛, 卜部公章, 橋田正継, 新開陽一郎,

大橋裕一

レボフロキサシン点眼液 1.5%の眼科  
周術期滅菌化療法の検討

17.フォーサム 2012 横浜

7/14-16, 2012. (横浜)

第1回日本涙道・涙液学会

大橋裕一

涙液排出を可視化する-Krehbiel flow  
が面白い

18.フォーサム 2012 横浜

7/14-16, 2012. (横浜)

第1回日本涙道・涙液学会

山口昌彦, 坂根由梨, 鄭 暁東, 太田  
清彦, 山本康明, 鎌尾知行, 白石 敦,

大橋裕一

PMMA 微粒子-フルオレセイン混合液  
(PMMA-F)による Krehbiel flow 可視  
化の試み

19.第 116 回日本眼科学会総会 4/5-8,  
2012. (東京)

鄭 暁東, 白石 敦, 鈴木 崇, 坂根  
由梨, 原 祐子, 山口昌彦, 宇野敏彦, 大  
橋裕一

生体共焦点顕微鏡による角膜後面沈  
着物の観察: 感染性及び非感染性疾患鑑別  
の試み

20.第 116 回日本眼科学会総会 4/5-8,  
2012. (東京)

山口昌彦, 島崎 潤, 高村悦子, 横井  
則彦, 渡辺 仁, 大橋裕一

ジクアホソル前向き観察研究のおけ  
るドライアイ治療効果と安全性

21.第 116 回日本眼科学会総会 4/5-8,  
2012. (東京)

清水 愛, 布施昇男, 高野良真, 石  
棟, 鄭 暁東, 白石 敦, 大橋裕一, 中澤  
徹

日本人における落屑症候群と

CNTNAP2 遺伝子多型の関連について

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 康人 (Hayashi Yasuhito)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 70314953

(2) 研究分担者

大橋 裕一 (Ohashi Yuichi)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 00116005

(3) 連携研究者

小林 剛 (Kobayashi Takeshi)

愛媛大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号: 70380285