

## 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 6月 1日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591953

研究課題名（和文）細胞外マトリックスの視点からの血液眼関門の構造的・機能的評価

研究課題名（英文）Structural and Functional Evaluation of Blood-Ocular-Barrier

研究代表者

雑喉 正泰（ZAKO MASAHIRO）

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：80298596

研究成果の概要（和文）：毛様体無色素上皮細胞で腫瘍壊死因子（以下 TNF- $\alpha$ ）にて発現増加したマトリックスメタロプロテアーゼ（以下 MMP）の MMP-1、MMP-3、MMP-9 は、インフリキシマブ投与により、mRNA および蛋白レベルで抑制される。また MMP-1、MMP-3、MMP-9 は、血液房水関門の主要構成分子である毛様体無色素上皮細胞の claudin-1 および occludin を分解する事も免疫染色法により確認された。

研究成果の概要（英文）：Induction of matrix metalloproteinases (MMPs) in non-pigmented ciliary epithelium (HNPCECs) by tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) was counteracted by infliximab. Immunostaining showed that the MMPs degraded claudin-1 and occludin, major components of the tight junctions in the blood-aqueous barrier, in HNPCECs and in non-pigmented ciliary epithelial cells of the swine ciliary body.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：血液房水関門・ぶどう膜炎・腫瘍壊死因子・抗腫瘍壊死因子抗体・マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ベーチェット病ぶどう膜炎の発症は、血液あるいは眼内の腫瘍壊死因子（以下、TNF- $\alpha$ ）の増加が原因となる。実際、抗ヒト TNF- $\alpha$  モノクローナル抗体である infliximab はベーチェット病ぶどう膜炎に有効である。

(2) 血液眼関門は、血液網膜関門と血液房水関門から構成される。これらの関門の破綻がぶどう膜炎である。

(3) 我々は以前の研究で、血液網膜関門を構成する細胞は、TNF- $\alpha$  投与により、マトリックスメタロプロテアーゼ（以下 MMP）が増加し、さらに、その抑制因子である Tissue Inhibitor of Metalloproteinase（以下、TIMP）が減少することを示した。

## 2. 研究の目的

血液房水関門を構成するヒト毛様体無色素上皮細胞を用いて、前部ぶどう膜炎の発症な

らびに治癒機序を調べる。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞培養 ヒト毛様体無色素上皮細胞 (以下、HNPCECs) は ScienCell® Research Laboratories (Carlsbad, CA, USA) から購入した。

(2) 細胞処理 TNF- $\alpha$  およびインフリキシマブを各種濃度で細胞に暴露した。

(3) RNA の抽出ならびに cDNA の合成 RNA は SV Total RNA Isolation System® (Promega, Madison, WI, USA) を用いて抽出し、cDNA は Super Script VILO cDNA Synthesis Kit® (Invitrogen-Gibco, Grand Island, NY, USA) を用いて合成した。

(4) 定量的 PCR MMP-1、-2、-3、-9 ならびに TIMP-1、-2 の定量を実施した。

(5) ELISA 該当する MMP の蛋白定量を実施した。

(6) Gelatin zymography 該当する MMP の酵素活性を各種キット (Amicon® Ultra-0.5, Ultracel-10 Membrane 10 kDa (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)、Novex®10% Zymogram Gelatin Gels and a Novex® Colloidal Blue Staining Kit (Life Technologies, Catalog Number LC6025, Carlsbad, CA, USA)) を用いて実施し、Image J software (US National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いて定量した。

(7) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 各種蛋白を電気泳動し、解析に用いた。

(8) Western blotting 蛋白をメンブレンに転写し、解析に持ちいた。解析には、一次抗体として rat anti-human claudin-1 antibody (1:1000; R&D Systems, Inc.)、mouse anti-human occludin antibody (1:1000; R&D Systems, Inc.)、rabbit anti-human cytokeratin-18 polyclonal antibody (1:1000; LifeSpan BioSciences, Inc., Seattle, WA, USA)、rat anti-human vimentin antibody (1:1000; R&D Systems, Inc.) を用い、それぞれ適切な二次抗体を用いた。

(9) Immunohistochemical analysis 免疫組織染色には、swine ciliary body を用いた。解析には、anti-human claudin-1 rat monoclonal antibody (1:50; R&D Systems, Inc.) and anti-human occludin mouse monoclonal antibody (1:20; R&D Systems, Inc.) を用い、それぞれ適切な二次抗体を用いた。

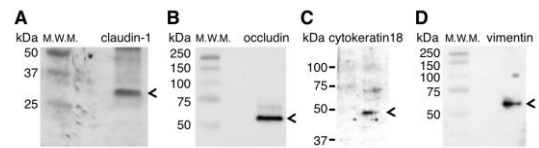
(10) Cell-based permeability assay 2 層チャンバーを用いて HNPCECs を培養し、bovine serum albumin (BSA) conjugated to

Alexa Fluor® 488 (Life Technologies) の透過性を計測した。

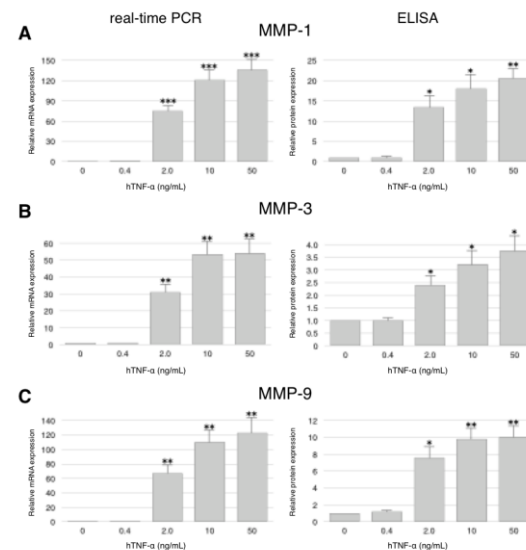
(11) 統計解析 各実験を 4 回行い、an analysis of variance (ANOVA) につき GraphPad Prism® ver. 4.0c (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) で解析した。

### 4. 研究成果

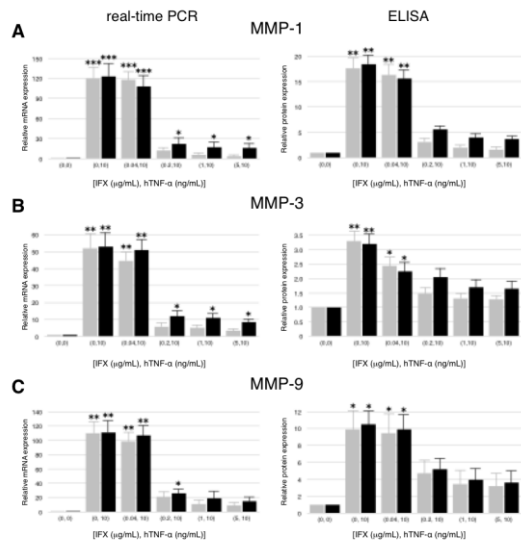
(1) HNPCECs の細胞特性 毛様体無色素上皮細胞が発現する分子、claudin-1、occludin、cytokeratin-18、vimentin を HNPCECs で以下のように確認した。実験で使用する細胞は毛様体無色素上皮細胞と同様の特性を示す。



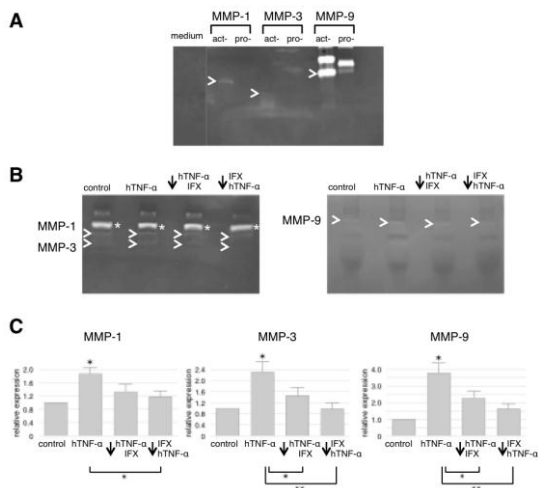
(2) HNPCECs における MMP-1、MMP-3、MMP-9 の発現は TNF- $\alpha$  によって増加する。以下のように mRNA ならびに蛋白レベルで確認された。



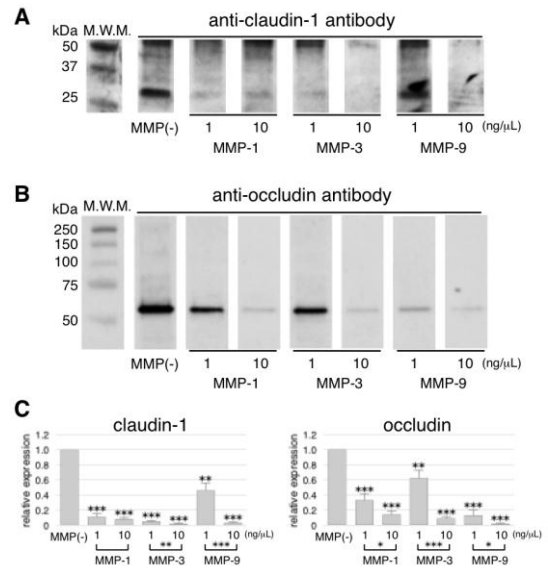
(3) TNF- $\alpha$  によって発現が増加した MMP-1、MMP-3、MMP-9 はインフリキシマブの投与により抑制される。グレイバーは先にインフリキシマブを投与し、後で TNF- $\alpha$  を投与した。ブラックバーは先に TNF- $\alpha$  を投与し、後でインフリキシマブを投与した。先にインフリキシマブを投与した方が、MMP 発現抑制作用が強い傾向がみられた。



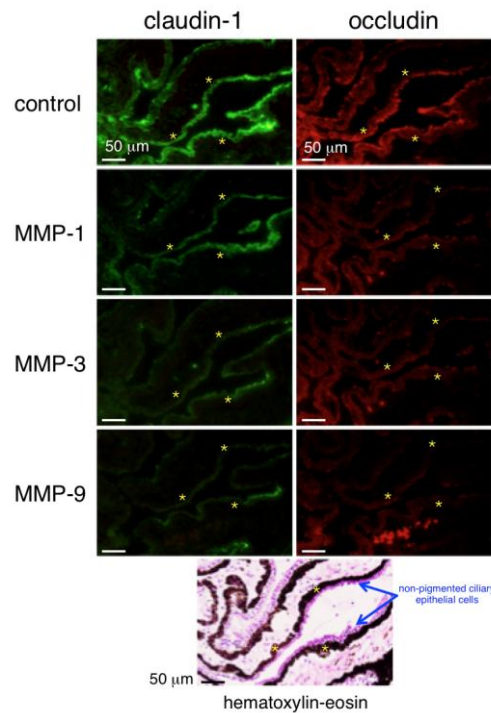
(4) TNF- $\alpha$  ならびにインフリキシマブによる MMP-1、MMP-3、MMP-9 の酵素活性を gelatin zymography により確認した。先の実験と同様、先にインフリキシマブを投与した方が、MMP 発現抑制作用が強い傾向がみられた。



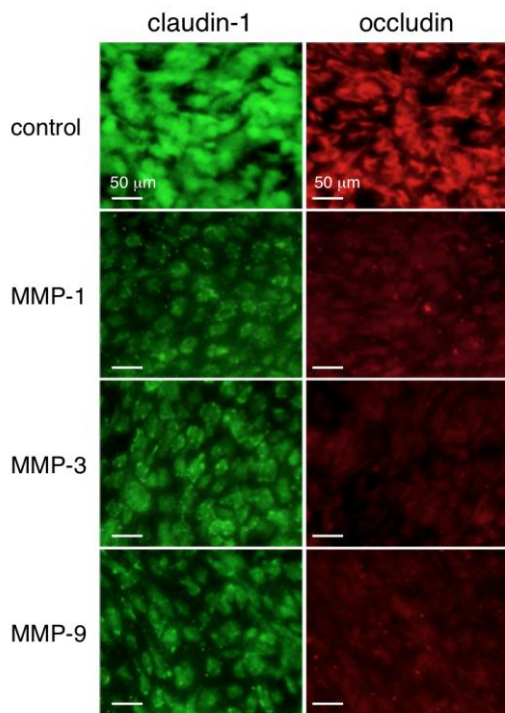
(5) MMP-1、MMP-3、MMP-9 の処理により claudin-1 と occludin のシグナルは減衰する。最初にウェスタンブロットによるバンドで確認した。



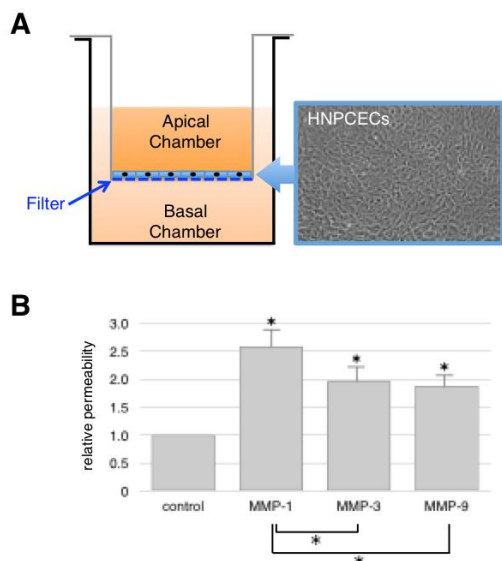
次に、ブタ毛様体無色素上皮細胞の染色で確認した。



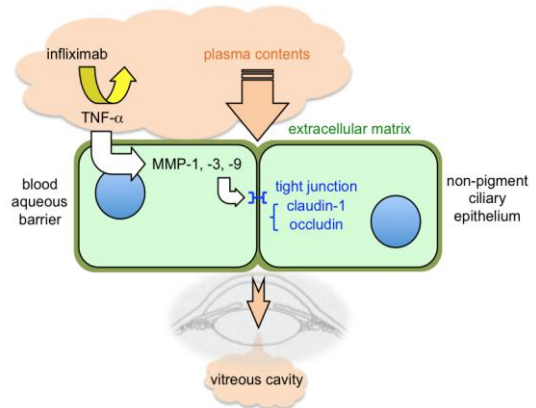
最後に、HNPCECs の免疫染色にてシグナルの減衰で確認した。



(6) MMP-1、MMP-3、MMP-9 の処理により HNPCECs の透過性は亢進する。以下のように、最も透過性を亢進させたのは MMP-1 処理であった。



すなわち TNF- $\alpha$  は血液房水関門を構成する細胞で MMP 発現を増加させ、増加した MMP は血液房水関門のタイトジャンクション構成分子を分解し、細胞透過性を増加させた。Infliximab は血液房水関門を構成する細胞での TNF- $\alpha$  による MMP 発現の増加を抑制することで、ぶどう膜炎抑制効果を発揮するのかもしれない (以下の図)。



### 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 1 件)

① Yamada H, Yoneda M, Inaguma S, Watanabe D, Banno S, Yoshikawa K, Mizutani K, Iwaki M, Zako M. Infliximab counteracts tumor necrosis factor- $\alpha$ -enhanced induction of matrix metalloproteinases that degrade claudin and occludin in non-pigmented ciliary epithelium. *Biochem Pharmacol*. In press. doi:pii: S0006-2952(13)00230-X.

[学会発表] (計 1 件)

① Yamada H, Yoneda M, Inaguma S, Watanabe D, Banno S, Yoshikawa K, Mizutani K, Iwaki M, Zako M. Infliximab attenuates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced alterations in non-pigmented ciliary epithelium. ARVO 2013. May 05. Seattle.

[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

雑喉 正泰 (ZAKO MASAHIRO)  
愛知医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80298596

### (2) 研究分担者

米田 雅彦 (YONEDA MASAHIKO)  
愛知県立看護大学・看護学部・教授  
研究者番号：80201086

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：