

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659812

研究課題名（和文） アカントアメーバの角膜への感染機序の解明

研究課題名（英文） Investigation of Acanthamoeba infection mechanism in cornea

研究代表者

坂根 由梨（ Sakane Yuri ）

愛媛大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：00601478

研究成果の概要（和文）：アカントアメーバ角膜炎の感染成立機序について Mannose-binding protein(MBP1)と接着する可能性のある蛋白質を解析するため無細胞蛋白合成により、MBP1のキメラ蛋白は作成し、その蛋白と接着した蛋白を SDS-PAGE で展開して、切り出したバンドを MALDI-TOF/MS を用いて解析した。アメーバのユビキチンプロモーターを人工合成し、アメーバを蛍光標識することに成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated receptor for Mannose-binding protein(MBP1) which thought to be need for establishment of acanthamoeba keratitis. We made MBP1 chimera protein by cell free system and analyzed binding protein with the MBP1 chimera protein by MALDI-TOF/MS. Also we made ubiquitin promoter fluorescent protein constructs, and then we made fluorescent protein labeled acanthamoeba.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：アカントアメーバ、角膜上皮、MBP1、蛍光標識、MALDI-TOF/MS

1. 研究開始当初の背景

近年、頻回交換型の使い捨てソフトコンタクトレンズ（FDSCL）とマルチパーパスソリューション（MPS）を使用しているユーザーに感染性角膜炎が急増している。その中でも、アカントアメーバ角膜炎は極めて難治であり、治療時期を逸すれば数ヶ月の入院治療が必要となり、最終的に治療的角膜移植を余儀なくされるケースもある。治癒後も視機能障

害を残すことは少なくなく、コンタクトレンズ使用者が主として若年層である点において大きな社会問題となっている。

アカントアメーバ角膜炎の治療が困難な原因の1つは特効薬の欠如にある。現在使用されている治療薬はすべて限定的な効果しか有していない。さらに、生存環境が悪化すると薬剤抵抗性のシストに変化する能力（ability to encyst）を有していることが治療をさらに困難としている。この点におい

て、特異的な治療薬の開発が大いに望まれるが、マーケット規模は細菌性角膜炎より小さいため、その重篤性にも関わらず、製薬メーカーによる開発研究はほとんど行われていない。現在、アカントアメーバ角膜炎に関する研究は欧米の一部研究機関において実施されてはいるが、病態の解明あるいは治療法の実現に直接結びつくものではない。一方、Niederhornらは、アカントアメーバ角膜炎の感染成立機序について Mannose-binding protein(MBP1)を介した仮説を提唱しているが、想定されたイベントがヒト生体内で起こっているのか、特に角膜実質内へ進展後の病態については不明である。

2. 研究の目的

MBP1 が接着するヒト角膜の糖蛋白を特定する。詳細な病態解析を行うために、赤色蛍光発現アカントアメーバを作成、さらに遺伝子組み換えなどの技術応用が可能な免疫細胞蛍光標識マウスでの感染モデルを開発し、アカントアメーバと宿主免疫細胞系との関係を明かにする。

3. 研究の方法

角膜上皮への接着糖蛋白と考えられているアカントアメーバの Mannose Binding Protein1(MBP1)が結合する角膜の糖蛋白を同定するため、ヒトの細胞膜蛋白分画をより細 SDS-PAGE で分離し、band を切り出して MALDI-TOF/MS で結合した蛋白の解析を行う。アカントアメーバのユビキチンのプロモーターと考えられる 1.7kb の領域を人工遺伝子合成してアカントアメーバの蛍光標識を行う。

4. 研究成果

角膜上皮への接着糖蛋白と考えられているアカントアメーバの Mannose Binding Protein1(MBP1)が結合する角膜の糖蛋白を同定するため、MBP1 細胞外 N-domain と

C-domain の GST 結合蛋白の精製無細胞蛋白合成のコンストラクト pEU-E01-MBPNC-TEV-GST (NC), pEU-E01-MBPN-TEV-GST (N) 及び pEU-E01-MBPC-TEV-GST (C) を作成した。SV40T antigen 不死化ヒト角膜上皮細胞から細胞膜分画抽出キットで細胞膜分画を分離し、3つのコンストラクトから得られた MBPNC-GST、MBPN-GST、MBPC-GST と反応させたのち SDS-PAGE で展開し、MBPNC-GST、MBPN-GST のみに存在するバンドを MALDI-TOF/MS で解析した。KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1、KRT9 Keratin, type I cytoskeletal 9、KRT10 Keratin, type I cytoskeletal 1、Keratin-8-like protein 1、ACTB 14 kDa protein ACTG1 cDNA FLJ57283, highly similar to Actin, cytoplasmic 2、HRNR Hornerin が MBP1 の N-domain と接着していることが解った。蛍光標識アカントアメーバの作成では、CAG, CMV, pgk などの真核生物で働くプロモーターは働かないことを確認した。そこでアカントアメーバのユビキチンのプロモーターと考えられる 1.7kb の領域を人工遺伝子合成して tdTomato の発色を検討したところ、数日間細胞質に蛍光を観察することができた。

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 15 件)

1. Important role of epi-regulin 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. Automatic evaluation of corneal nerve tortuosity in images from in vivo confocal microscopy. Scarpa, F., Zheng, X., Ohashi, Y., Ruggieri, A. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **52**, 6404-6408. 2011 (査読有り)
6. 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)
7. 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)
8. 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., Ruggieri, A., Ohashi, Y. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **52**, 1755-1761. 2011 (査読有り)
9. 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)
10. 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)
11. 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)
12. 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)
13. 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)

14. 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)

15. 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、角膜カンファランス 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、角膜カンファランス 2013 2/14-16, 2012. (和歌山)

池川和加子, 山口昌彦, 白石 敦, 原角膜カンファランス 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)

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

4、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

5、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

6、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

7、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

8、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アメラ角膜炎発症者数の全国調査

9、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

10、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

1 1, フォーサム 2012 横浜 7/14-16, 2012.
(京都)

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

1 2, フォーサム 2012 横浜 7/14-16, 2012.
(京都)

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

1 3, フォーサム 2012 横浜 7/14-16, 2012.
(京都)

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®)の抗アカントアメーバ消毒効果の検討

1 4, フォーサム 2012 横浜 7/14-16, 2012.
(京都)

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カントアメーバ角膜炎の 2 例

1 5, フォーサム 2012 横浜 7/14-16, 2012.
(京都)

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

1 6, フォーサム 2012 横浜 7/14-16, 2012.
(京都)

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

1 7, フォーサム 2012 横浜 7/14-16, 2012.
(京都)

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

1 8, フォーサム 2012 横浜 7/14-16, 2012.
(京都)

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

1 9, 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

2 0, 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における

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 曉東, 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

坂根 由梨 (Sakane Yuri)

愛媛大学・大学院医学系研究科・寄附講座
助教

研究者番号 : 00601478

(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