

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 6 月 13 日現在

機関番号：24303
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23659818
 研究課題名（和文） 涙液中アミノ酸発現が眼表面疾患の病態に及ぼす影響
 研究課題名（英文）
 The effects of the amino acid profile in tear fluid on ocular surface homeostasis and disease condition

 研究代表者
 外園 千恵 (CHIE SOTOZONO)
 京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師
 研究者番号：30216585

研究成果の概要（和文）：

アミノ酸が角膜上皮細胞の細胞増殖、創傷治癒および細胞接着に及ぼす影響を検討した。培養ヒト角膜上皮細胞はアミノ酸の種類により増殖性に差を生じ、in vitro 創傷治癒モデルでもアミノ酸の影響を認め、いずれも Arg 欠損培地での抑制が最大であった。アミノ酸含有が細胞間接着を高めていると推測され、Arg 欠損培地、Glu 欠損培地、Asn 欠損培地において電気抵抗値が低下した。

研究成果の概要（英文）：

We examined the change of cell growth, wound healing, and barrier function of cultivated human corneal epithelial cells using specific culture medium including or deleting 1-23 amino acids. The proliferation of cultivated human corneal epithelial cells was inhibited by deleting Arg, Glu, Asn or Ala from the culture medium containing 23 amino acids (FULL medium). Arg deficit from culture medium also inhibited wound healing at the vitro wound-healing model. Transepithelial electrical resistance (TER) was high in FULL medium, and low in ZERO medium, indicating amino acids increase cell-cell adhesion. In an Arg deficit culture medium, TER dramatically decreased. In the Glu deficit culture medium and the Asn deficit culture medium, it also decreased.

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	2,800,000	840,000	3,640,000

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：アミノ酸、角膜、上皮細胞、タイトジャンクション、涙液

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸は従来、蛋白質を構成する単なる原料、あるいは生体の栄養素として捉えられてきたが、近年の研究によりアミノ酸そのものが細胞機能の制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。

眼表面には涙液が存在し、その中に含まれる種々のアミノ酸が健常ホメオスタシス維持あるいは眼疾患の病態に関与することが推測される。しかし涙液は血液や体液と異なり一回に採取できる量が微量であり、これまでに涙液中のアミノ酸発現を詳細に検討した報告は知る限りない。我々は患者および正常ボランティアより採取した涙液を用いて23種のアミノ酸を網羅的に解析し、クラスター解析において炎症性眼表面疾患が非炎症性疾患と明瞭に区別されることを確認した。しかし、涙液中に含まれる種々のアミノ酸が眼表面細胞に及ぼす影響や病態との関連は明らかでない。

2. 研究の目的

アミノ酸が眼表面ホメオスタシスおよび眼表面疾患の病態に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、培養ヒト角膜上皮細胞を用いて、アミノ酸プロファイルが上皮細胞増殖、上皮層の透過性および上皮創傷治癒に及ぼす影響を検討する。また、健常および疾患眼における涙液中アミノ酸発現を網羅的に解析し、アミノ酸の役割を考察する。

3. 研究の方法

1) 上皮細胞増殖

SV40 不死化ヒト角膜上皮細胞を 96 well plate に播種 (5000、1 万および 2 万細胞/well)、2 日間培養した後に 20 種のアミノ酸を含む FULL 培地、アミノ酸を全て抜いた ZERO 培地、FULL 培地より特定のアミノ酸のみを欠損させた欠損培地、ZERO 培地に特定の

ミノ酸 (各 10mM) を添加した添加培地に交換し、細胞数、細胞形態の変化を検討した。

2) 創傷治癒

SV40 不死化ヒト角膜上皮細胞を 6 well plate に播種、confluent になるまで培養し、チップの先端で各 well に直線状創傷を作成した。20 種のアミノ酸を含む FULL 培地、アミノ酸を全て抜いた ZERO 培地、FULL 培地より特定のアミノ酸のみを欠損させた欠損培地、ZERO 培地に特定のアミノ酸 (各 10mM) を添加した添加培地に交換し、位相差顕微鏡を用いて創傷距離および細胞携帯の変化を検討した。

3) 細胞間接着

SV40 不死化ヒト培養角膜上皮細胞をコンフルエントになるまで培養し、20 種のアミノ酸を含む FULL 培地、アミノ酸を全て抜いた ZERO 培地、FULL 培地より特定のアミノ酸のみを欠損させた欠損培地、ZERO 培地に特定のアミノ酸 (各 10mM) を添加した添加培地に交換して、継時的に電気抵抗値 ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) を測定した。

4) 涙液中のアミノ酸発現

20 歳代ボランティアおよび 60 歳以上の白内障患者より非侵襲的に基礎分泌性涙液を採取、アミノ酸 23 種の濃度を HPLC/MS/MS 法を用いた超微量解析装置により網羅的に測定した。血漿中のアミノ酸濃度も測定し、涙液中アミノ酸プロファイルと比較、検討した。2) ドライアイ患者および VDT 負荷 20 歳代ボランティアより基礎分泌性涙液を採取し、正常涙液中アミノ酸プロファイルと比較検討した。

5) 人工涙液への添加

Arg/Gln 40mM、Ala/Asn/Gln 40mM を含有する人工涙液を用いて作成し、健常者およびドライアイ患者に用いて

自覚症状、他覚所見の変化を検討した。

4. 研究成果

1) 上皮細胞増殖性

FULL 培地では培養角膜上皮細胞が増殖し、ZERO 培地では細胞の脱落を認めた。欠損培地では、Arg 欠損培地、Glu 欠損培地、Asn 欠損培地、Ala 欠損培地の順に細胞の増殖が妨げられ、とくに Arg 欠損培地で増殖抑制が顕著であった。添加培地では、Asn 添加培地、Glu 添加培地において増殖促進効果を認めた。細胞形態には、培地の違いによる影響を認めなかった。

2) 創傷治癒

FULL 培地に比べて欠損培地で創傷治癒の遅延が顕著であり、Arg 欠損培地での創傷治癒抑制が明らかであった。添加培地では (Gln+Glu) 添加培地および (Ala+Asn) 添加培地においてほぼ同様の治癒促進効果を認めた。細胞形態には、培地の違いによる明らかな差を認めなかった。

3) 細胞間接着

完全培地は対照培地に比べて経時的に電気抵抗が高くなり、アミノ酸含有が細胞間接着を高めていると推測された。検討したアミノ酸 20 種のなかでは Arg 欠損培地において電気抵抗値の低下が著明であり、Glu 欠損培地、Asn 欠損培地においても電気抵抗値が低下した。添加培地では、Asn 添加培地、Glu 添加培地、Ala 添加培地、Arg 添加培地においてほぼ同等の電気抵抗値の促進効果を認めた。

4) 涙液中のアミノ酸発現

正常涙液のアミノ酸プロファイルは血漿と明らかに異なり、Tau、Glu、Asp が濃度値、構成比ともに高値であった。ドライアイ患者では正常に比べて涙液中の Gln、Arg、Asp が少なく、VDT 負荷後 2 時間では涙液中 Asn、Tau、Ala が有意に減少した。

5) 人工涙液への添加

いずれの配合も健常者への頻回点眼で異常所見を生じず、ドライアイ患者では自覚症状が改善もしくは不変、他覚所見は軽度改善もしくは不変であった。

これらの結果より、Arg、Glu、Asn、Ala がヒト角膜上皮の健常性維持に関与する可能性が高い。正常者の涙液中アミノ酸プロファイルは何らかの機序で一定に保たれており、様々な病態でアミノ酸プロファイルが変動していると推測された。アミノ酸配合が新たな人工涙液となりうる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Sotozono C, Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Yokoi N, Ueta M, Matsuyama K, Miyakoda K, Kaneda H, Fukushima M, Kinoshita S. Visual Improvement after Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation. *Ophthalmol*, 120(1):193-200, 2013. 査読有
DOI : 10.1016/j.optha.2012.07.053
- ② Okumura N, Kay EP, Nakahara M, Hamuro J, Kinoshita S, Koizumi N: Inhibition of TGF- β signaling enables human corneal endothelial cell expansion in vitro for use in regenerative medicine. *PLoS ONE* 8(2):e58000, 2013. 査読有
DOI : 10.1371/journal.pone.0058000
- ③ Okumura N, Koizumi N, Kay EP, Ueno M, Sakamoto Y, Nakamura S, Hamuro J, Kinoshita S: The ROCK Inhibitor Eye Drop Accelerates Corneal Endothelium Wound Healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 54(4):2493-2502, 2013 査読有
DOI : 10.1167/iovs.12-11320
- ④ Ueta M, Sotozono C, Yamada K, Yokoi N, Inatomi T, Kinoshita S: Expression of prostaglandin E receptor subtype EP4 in conjunctival epithelium of patients with ocular surface disorders: case-control study.

- BMJ Open. 2012 Oct 11; 2(5). 査読有
DOI : 10.1136/bmjopen-2012-001330
- ⑤ Ueta M, Matsuoka T, Sotozono C, Kinoshita S: Prostaglandin E2 Suppresses Poly I: C-Stimulated Cytokine Production Via EP2 and EP3 in Immortalized Human Corneal Epithelial Cells. *Cornea*. 2012; 31(11): 1294-1298. 査読有
DOI : 10.1097/ICO.0b013e318242fd7c
- ⑥ Ueta M, Tamiya G, Tokunaga K, Sotozono C, Ueki M, Sawai H, Inatomi T, Matsuoka T, Akira S, Narumiya S, Tashiro K, Kinoshita S: Epistatic interaction between Toll-like receptor 3 (TLR3) and prostaglandin E receptor 3 (PTGER3) genes. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 129(5): 1413-1416.e11. 査読有
DOI : 10.1016/j.jaci.2012.01.069
- ⑦ Ueta M, Sotozono C, Yokoi N, Kinoshita S: Downregulation of monocyte chemoattractant protein 1 expression by prostaglandin e2 in human ocular surface epithelium. *Arch Ophthalmol*. 2012; 130(2): 249-251. 査読有
DOI: 10.1001/archophthalmol.2011.1472
- ⑧ Kaido M, Yamada M, Sotozono C, Kinoshita S, 他 5 名. The relation between visual performance and clinical ocular manifestations in stevens-johnson syndrome. *Am J Ophthalmol*. 154(3):499-511,2012. DOI : 10.1016/j.ajo.2012.03.044 査読有
- ⑨ Koizumi N, Okumura N, Kinoshita S: Development of new therapeutic modalities for corneal endothelial disease focused on the proliferation of corneal endothelial cells using animal models. *Exp Eye Res*. 95(1): 60-67, 2012. 査読有
DOI : 10.1016/j.exer.2011.10.014
- ⑩ Yamamoto M, Quantock AJ, Young RD, Okumura N, Ueno M, Sakamoto Y, Kinoshita S, Koizumi N: A selective inhibitor of the Rho kinase pathway, Y-27632, and its influence on wound healing in the corneal stroma. *Mol Vis*. 18:1727-1739, 2012. 査読有
- ⑪ Okumura N, Koizumi N, Ueno M, et al.: A ROCK inhibitor converts corneal endothelial cells into a phenotype capable of regenerating in vivo endothelial tissue, *Am J Pathol*. 181(7): 268-277, 2012. 査読有
DOI : 10.1016/j.ajpath.2012.03.033
- ⑫ Nakatsukasa M, Sotozono C, Shimbo K, Ono N, Miyano H, Okano A, Hamuro J, Kinoshita S: Amino Acid profiles in human tear fluids analyzed by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Am J Ophthalmol*. 2011; 151:799-808. 査読有
DOI : 10.1016/j.ajo.2010.11.003
- [学会発表] (計 3 件)
- ① Sotozono C, Ueta M, Kinoshita S, Kitami A, Iijima M, Aihara M, Ikezawa Z, Kano Y, Shiohara T, Shirakata Y, Sakabayashi S, Matsubara Y, Hashimoto K. Etiologic Features of Stevens-Johnson syndrome (SJS) and Toxic Epidermal Necrolysis (TEN) with Ocular Involvement. Annual Meeting of the American Academy of Ophthalmology, Chicago, USA, 2012.11.11.
- ② 外園千恵. Stevens-Johnson 症候群の病態と治療. 第 117 回京都眼科学会. 京都, 2011.7.1.
- ③ 外園千恵. Stevens-Johnson 症候群、中毒性表皮壊死症 (TEN) 型薬疹と眼障害. 第 115 回日本眼科学会総会. 東京, 2011.5.13.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
外園 千恵 (CHIE SOTOZONO)
京都府立医科大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・講師
研究者番号 : 30216585
- (2) 研究分担者
奥村 直毅 (NAOKI OKUMURA)
同志社大学・生命医学部・助教
研究者番号 : 10581499