

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 5 月 31 日現在

機関番号：11501
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23791964
 研究課題名（和文） トロンボモジュリンの眼組織での作用研究とその臨床応用
 研究課題名（英文） Thrombomodulins' s effects in ocular tissue and their clinical administration.

研究代表者

難波 広幸 (NAMBA HIROYUKI)
 山形大学医学部・眼科学講座・助教
 研究者番号：20455900

研究成果の概要（和文）：トロンボモジュリンは角膜実質由来細胞株、強膜実質由来細胞株、角膜上皮細胞株においてインターロイキン(IL)-4、IL-8、IL-10 の産生に関して影響を与えなかった。またそれらの細胞の細胞増殖に対して有意な変化を与えなかった。トロンボモジュリン投与は細胞の遊走に対して影響を与えなかった。トロンボモジュリンヘテロ接合体欠損マウスの作成まで研究を進展させることができなかった。

研究成果の概要（英文）：Thrombomodulin did not affect the expression of interleukin (IL)-4, IL-8 and IL-10 in Both corneal and scleral stromal cell strains, or corneal epithelial cells. And thrombomodulin did not affected the proliferation, or the migration of these cells. Animal experimentation was not examined because of the presence of difficulty in the development of the cell biology.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

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：眼細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

トロンボモジュリンは5つの領域から成る膜結合蛋白であり、血管内皮細胞上に存在し

て抗凝固作用を担っている。具体的には上皮成長因子様繰り返し領域 (EGF-like repeats) の4~6番がトロンビンと結合し、トロンビン

によるプロテインC活性化の補因子となる。活性化プロテインCは凝固因子Va、VIIIaを抑制し、トロンビンの生成を阻害する。活性化プロテインCは抗炎症効果も持ち、単球やマクロファージのTNF- α 発現を抑制し、NF κ Bの活性化を抑制する。トロンボモジュリンそのもののN末端のレクチン様領域は好中球の接着阻害作用を有するなど、やはり炎症を沈静化させる。またトロンボモジュリンは創傷治癒時に発現が増加し、レクチン様領域が細胞接着に関わっていると言われている。

トロンボモジュリンは表皮ケラチノサイトや肺胞上皮などの細胞にも発現していて、眼では角膜上皮・内皮、円蓋部結膜、線維柱帯細胞、シュレム管、毛様体無色素上皮に存在することが示されているが、その眼組織における働きについてはほとんど検討されていない。

以前我々はトロンボモジュリンが炎症性サイトカインである血小板由来成長因子BBによって賦活され、またその発現変化が角膜実質細胞と強膜実質細胞とで差があることを示した。

2. 研究の目的

強膜実質細胞のトロンボモジュリンは抗炎症サイトカインである血小板由来成長因子BBの刺激によって発現が増強され、その発現強度には組織特異性が見られる。しかしその働きについてはほとんど明らかにされていない。

そこで本研究では、細胞試料を用いた細胞生理学的実験と動物実験を行い、眼組織

におけるトロンボモジュリンの作用を解明することを目標とする。

3. 研究の方法

角膜実質細胞由来細胞株・強膜実質由来細胞株・角膜上皮細胞株と細胞生理学的実験手法を用いて、トロンボモジュリンのそれぞれの炎症性サイトカイン産生に与える影響、細胞増殖に与える影響、細胞接着作用、またプロテオグリカンなど細胞外マトリックス成分の発現に与える影響を明らかにする。また動物実験でトロンボモジュリンの生体内での作用を検討する。

●細胞生理学的実験：

トロンボモジュリンの角膜実質由来細胞株、強膜実質由来細胞株、角膜上皮細胞株における細胞外マトリックスのリモデリングに関する因子の遺伝子および蛋白質発現に対する影響や、それぞれの細胞増殖に与える影響、細胞シート(コラーゲンシート)に障害部位を作成した場合の細胞接着に与える影響を検討する。

トロンボモジュリンの細胞外マトリックスへの影響を評価するため、角膜実質由来細胞株、強膜実質由来細胞株、角膜上皮細胞株の細胞に対して0.01、0.1、1、10 ng/mlの濃度でトロンボモジュリンを加え、ルミカンなどのプロテオグリカン、コラーゲン類のmRNA発現変化をPCRでコントロールと比較する。発現変化が認められたものはwestern blottingで蛋白発現変化を確認する。

トロンボモジュリンが各細胞の細胞増殖に

与える影響を評価するために 0.01、0.1、1、10 ng/ml の濃度でトロンボモジュリンを加え、CellTiter 96^(R) Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, U. S. A.) を使用して MTT assay を行う。

コラーゲン上に各細胞を培養し、細胞シートを作成し、コンフルエントの状態でマイクロピペットチップで引っ掻いて創傷モデルとする。トロンボモジュリンの細胞接着作用を検討するため、0.01、0.1、1、10 ng/ml の濃度でトロンボモジュリンを加え、細胞が再度コンフルエントになるまでの期間をコントロール群と比較する。

●動物実験：

トロンボモジュリンヘテロ接合体欠損マウスを wild type のマウスと比較する。トロンボモジュリンヘテロ接合体欠損マウスはマサチューセッツ工科大学に依頼して提供を受けるか、参考文献 1 を参考に作成する。3~4 月齢のトロンボモジュリンヘテロ接合体欠損マウス、またコントロールとして同月齢の C57BL/6 マウスを材料として実験を行う。それぞれ角膜上皮剥離モデルを作成し、上皮欠損の消失までの期間を比較する。また 1、3、5、7 日目に眼球を摘出、組織的に比較をし、プロテオグリカンやサイトカインの発現に関しては免疫染色を行う。角膜、強膜にそれぞれ裂創を作成した群も作成し、3、7、15、30 日目に眼球を摘出、同様に組織学的比較、免疫染色を行う。

トロンボモジュリンの角膜実質由来細胞株、強膜実質由来細胞株、角膜上皮細胞株におけ

る細胞外マトリックスのリモデリングに関与する因子の遺伝子および蛋白質発現に対する影響や、それぞれの細胞増殖に与える影響、細胞シートに障害部位を作成した場合の細胞接着・遊走に与える影響を検討する。

その後トロンボモジュリンヘテロ接合体欠損マウスを作成し、動物実験を行う。3~4 月齢の C57BL/6 マウスにて角膜上皮剥離モデルを作成し、0.01、0.1、1、10 ng/ml の濃度に PBS で希釈したトロンボモジュリン溶液を 1 日 4 回点眼で投与する。1、3、5、7 日目に眼球を摘出、組織的に比較をし、上皮接着・進展に対する影響や充血、角膜内血管侵入の有無を評価する。

4. 研究成果

トロンボモジュリンは角膜実質由来細胞株、強膜実質由来細胞株、角膜上皮細胞株において IL-4、IL-8、IL-10 の産生に関して影響を与えなかった。またそれらの細胞の細胞増殖に対して有意な変化を与えなかった。また創傷治癒のモデルとしてコラーゲン上に各細胞シートを作成、搔破を行ったが、トロンボモジュリン投与は細胞遊走に対して影響を与えなかった。それぞれの実験はトロンボモジュリン濃度、添加方法を複数試行した。トロンボモジュリンヘテロ接合体欠損マウスの作成までは研究を進展させることができなかった。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

難波 広幸 (NAMBA HIROYUKI)

山形大学医学部・眼科学講座・助教

研究者番号：20455900