

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861658

研究課題名(和文) 翼状片発症機構の解明と予防薬の開発に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of the onset mechanism of pterygium and the development of its preventive medicine

研究代表者

柴田 奈央子 (SHIBATA, Naoko)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：20534647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：翼状片は結膜が角膜に侵入し視力低下をきたす疾患であり、紫外線(UV)のような慢性的刺激が原因とされている。本研究では、翼状片に発現している遺伝子をマイクロアレイ法で網羅的に解析し、原因因子を探索した。その結果、Keratin24 (KRT24), matrix metalloproteinase (MMP9)の発現亢進をわれわれは確認した。さらにヒト角膜上皮と結膜線維芽培養細胞にUV-Bを照射すると、KRT24とMMP9の発現がみられており、これらの遺伝子は紫外線に誘導され翼状片伸展に関与していることが示唆された。これら遺伝子を制御できる薬剤の開発により翼状片の発症予防につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Pterygium is a wing shaped fibrovascular growth on the ocular surface causing visual loss and effective medication has not been found yet. Pterygium formation is induced by various chronic inflammatory conditions, such as ultraviolet radiation (UV) exposure. In this study, we found that Keratin 24 (KRT24) and matrix metalloproteinase 9 (MMP9) were highly upregulated in pterygium tissues using DNA microarray analysis. UV-B treatment induced the upregulation of the expression of KRT24 and MMP9 in human corneal epithelial cells (HCEC) and human conjunctival fibroblast (HCF). In conclusion, UV radiation may promote the modulation of these pterygium related genes such as KRT24 and MMP9, and may induce the initiation and progression of human pterygium. Suppression of these genes may protect the development of pterygium.

研究分野：眼科学、角結膜疾患

キーワード：翼状片 DNAマイクロアレイ MMP9 KRT24

1. 研究開始当初の背景

翼状片は、結膜組織が線維性血管組織を伴って角膜側にゆっくりと侵入していく疾患である。角膜乱視、美容上の問題、大きくなり瞳孔縁にかかるとう高度の視力低下をきたす。原因としては、紫外線、結膜への刺激、炎症反応によるものと言われており、眼部紫外線予防が一番の翼状片予防法であるといえる。しかし、サッカーなど屋外スポーツ選手、審判員は、試合中にサングラス、帽子の着用は禁じられている。つまり、眼の紫外線予防対策は、したくてもできない現状にある。翼状片治療は現時点では手術しか方法はなく、再発もある疾患であるため、有効な治療薬や進行予防薬の開発が必要とされる。

2. 研究の目的

(1)翼状片発症機序については諸説あり、様々な誘発因子や組織学的研究が行われてきたがその発症機序は明らかではない。本研究ではヒト切除翼状片組織を用いて、まずは遺伝子発現を DNA マイクロアレイ法で網羅的に解析し、酸化ストレスや上皮間葉系移行 (EMT) に注目して翼状片発症との関連について検討するのが目的である。

(2)次に、DNA マイクロアレイで発現が亢進していた遺伝子に関してリアルタイム PCR、プロテインブロットを用いて測定し、実験的に紫外線と翼状片組織発症との関係を検討するが目的である。

3. 研究の方法

(1)検体採取

翼状片手術予定患者とコントロールとして結膜弛緩手術予定患者の同意を得て切除された検体を採取。翼状片は角膜輪部から角膜側を頭部、それ以降の結膜と結膜下組織を体部として分けて採取し半切した。

(2)DNA マイクロアレイ及び遺伝子オントロジー解析

検体の数例で DNA マイクロアレイ解析及び遺伝子オントロジー解析を行い、代表的な変化の見られた遺伝子をウエスタンブロット法、リアルタイム PCR 法でこれらの遺伝子発現を検討した。また、上皮間葉系移行マーカーである平滑筋アクチン (SMA) についても測定した。

(3) ヒト角膜上皮細胞とヒト結膜線維芽細胞への紫外線照射実験

初代ヒト培養角膜上皮細胞 (HCEC) と初代培養結膜線維芽細胞 (HCF) を 35c m<sup>2</sup> に播種し CO<sub>2</sub> インキュベーター 37 で単層静置培養した。

コスモバイオ社製の BIO-LINK® を使用し 312nm の紫外線 UV-B 波を照射強度を変えて連日照射し (0mj, 50mj, 100mj, 200mj/cm<sup>2</sup>)、Day4 で MMP9, KRT24 をリアルタイム PCR 法で測定した。

4. 研究成果

(1)検体採取

2012 年から 2015 年の期間に翼状片組織 32 サンプル (平均年齢 74.51 ± 8.1 歳) コントロール正常結膜組織 9 サンプル (平均年齢 76.6 ± 7.3 歳) を採取した。手術は全て同一術者が行った。

(2)DNA マイクロアレイ及び遺伝子オントロジー解析

翼状片組織 3 サンプルと正常結膜組織 1 サンプルを使用し、DNA マイクロアレイ解析及び遺伝子オントロジー解析を行った。正常結膜組織よりも 2 倍以上に発現している遺伝子を検討した結果、特にケラチン 24 (KRT24) とマトリックスメタロプロテアーゼ 9 (MMP9) が多く発現していた (表 1: 上位 10 遺伝子)

Gene Symbol	Genbank Accession	GeneName	Ave(n=3)	SD
KRT24	NM_019016	keratin 24	49.446	59.618
MMP9	NM_004994	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	24.214	22.393
PTN	NM_002825	pleiotrophin	12.844	7.892
GSTA5	NM_153699	glutathione S-transferase alpha 5	12.809	11.397
SMR3B	NM_006685	submaxillary gland androgen regulated protein 3B	12.722	15.471
CXCL9	NM_002416	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	12.220	7.955
GSTA2	NM_000846	glutathione S-transferase alpha 2	11.350	5.891
COL8A1	NM_001850	collagen, type VIII, alpha 1	10.628	2.661
CES1	NM_001025195	carboxylesterase 1	10.570	3.885
COL10A1	NM_000493	collagen, type X, alpha 1	10.316	8.039

表 1: DNA マイクロアレイ解析結果  
コントロールに比べて発現が5倍以上だった遺伝子

また、遺伝子オントロジー解析でコントロールに比べて 2 倍以上発現していた遺伝子は、細胞外基質に関わる遺伝子組成及び血管伸長に關する遺伝子組成がみられた。コントロールに比べて 2 分の 1 以下の発現量であった遺伝子としては、ウイルス防御に対する反応低下や自然免疫に対する反応低下、アポトーシスを含めた蛋白質分解能の低下がみられた (表 2)。

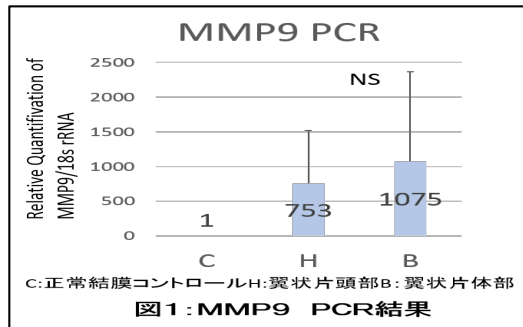
GO ACCESSION	GO Term(遺伝子産物の機能)	
GO:0031012	extracellular matrix	※1
GO:0044421	extracellular region part	
GO:0005576	extracellular region	
GO:0005578	proteinaceous extracellular matrix	
GO:0030198	extracellular matrix organization	
GO:0043062	extracellular structure organization	
GO:0022617	extracellular matrix disassembly	
GO:0005615	extracellular space	※2
GO:0001944	vasculature development	
GO:0001568	blood vessel development	

※1 細胞外基質に関わる遺伝子組成  
※2 血管の伸長に關する遺伝子組成

表 2: 遺伝子オントロジー解析  
コントロールに比べて2倍以上発現していた遺伝子

### リアルタイム PCR

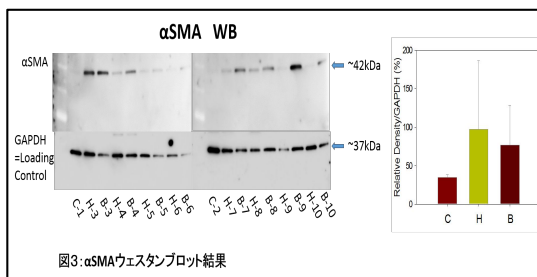
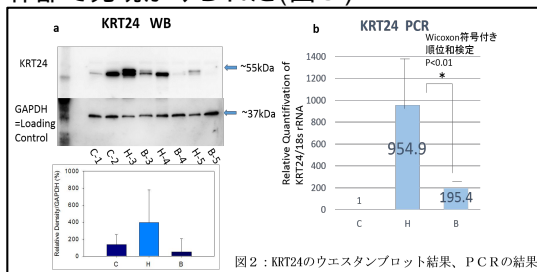
DNA マイクロアレイ法において翼状片 3 サンプル中 2 サンプルで発現が 4 倍以上になっていた遺伝子 MMP9 と KRT24 についてリアルタイム PCR で発現確認を行った。細胞外マトリックスの分解や創傷治癒に関わっている MMP9 はコントロールを 1 とした場合、翼状片頭部で 753、翼状片体部で 1075 と多くの MMP9 の発現を認めた。翼状片頭部と体部では有意差はなかった(図 1)  
KRT24 はコントロールを 1 とした場合、翼状片頭部で 954.9、翼状片体部で 195.4 と頭部で有意に発現していた。(P<0.01)(図 2 - b)



### ウェスタンブロット法

翼状片頭部と体部における KRT24 の発現量はウェスタンブロットの結果、頭部で多く発現がみられた(図 2 - a)

SMA の発現量についてはウェスタンブロットでは全体的に発現量は低かったが、コントロールでほとんどみられず翼状片頭部及び体部で発現がみられた(図 3)



### (3) ヒト角膜上皮細胞とヒト結膜線維芽細胞への紫外線照射実験

#### MMP 9

ヒト培養角膜上皮細胞(HCEC)に強度の異なる紫外線を照射した結果、MMP 9 の発現量は照射強度が上がるほど亢進していた(図 4-a)

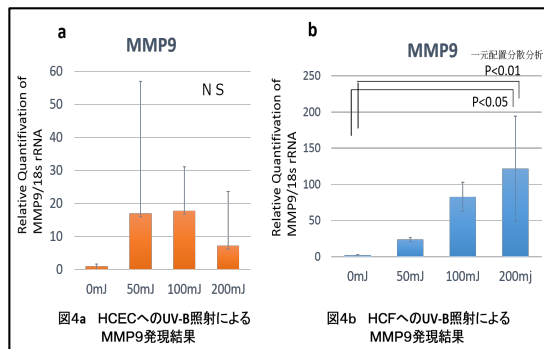
ヒト培養結膜線維芽細胞(HCF)では紫外線強

度を強くするほど MMP9 発現亢進がみられた(P<0.05) (図 4 -b)

紫外線の影響をより多く受けているであろうグレードの高い翼状片で、MMPs 発現量が正比例する報告 1)もあり本研究の結果に矛盾しない。

翼状片組織では、角膜創傷治癒過程でみられる炎症や細胞外基質リモデリング、過形成、細胞遊走がみられており、創傷治癒や炎症、癌の進行でみられる MMPs はこの過程に関与していると考えられる。

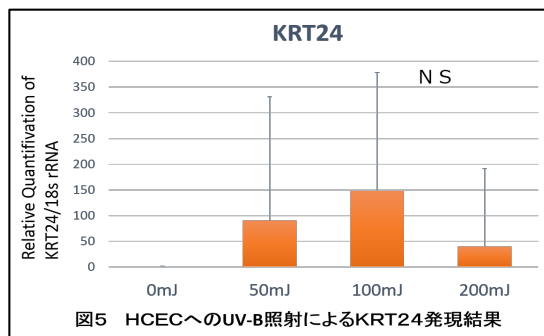
加藤らは翼状片上皮が上皮間葉系移行(EMT)により、線維芽細胞に分裂していることを報告しており 2)、この線維芽細胞による MMP 分泌が病態の進展に関与していることが示唆された。



#### KRT24

ヒト培養角膜上皮細胞(HCEC)に強度の異なる紫外線を照射した結果、KRT24 の発現量は照射強度が上がるほど亢進していた。200mJ で低下しているのはおそらく紫外線照射による細胞死によるものと思われた(図 5)

また、ヒト培養結膜線維芽細胞(HCF)では KRT24 の発現はみられなかった。



KRT24(Keratin)と翼状片に関する報告は今までにない。角膜上皮のマーカーである KRT3 や KRT12 は翼状片にもみられた報告 3)があるが、今回 KRT24 が角膜上皮細胞や翼状片には見られて、正常結膜上皮細胞には発現がなかった結果は、KRT24 が角膜上皮細胞の病態のマーカーになる可能性があるかと推測された。KRT24 は比較的高分化な腫瘍でみられるとの報告 4)があり、本研究で紫外線により発現量が増加したことより、翼状片頭部で紫外線の影響を受けて角膜上皮が腫瘍性に伸展していることが推測される。

本研究結果より、翼状片の発症機序において、

紫外線による MMP9 や KRT24 の発現上昇が、翼状片の発症や進展に関与している可能性が示唆された。

<引用文献>

- 1)S.F.Yang IOVS October2009,Vol.50,No10
- 2)N.Kato et.al Invest Ophthalmol Vis Sci.2007;48:1511-1517
- 3)C.J.Jaworski et.al Molecular Vision 2009;15:2421-2434
- 4)Yi Hong et.al Clin Cancer Res 2007;13(14))

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

柴田 奈央子

「培養角膜上皮細胞と培養結膜線維芽細胞の紫外線照射における翼状片関連遺伝子の発現変化」

第 120 回日本眼科学会総会

2016 年 4 月 7 日～10 日

仙台国際センター 宮城県・仙台市

柴田 奈央子

「翼状片組織における遺伝子発現変化の解析と翼状片発症機構の解明」

第 199 回日本眼科学会総会

2015 年 4 月 16 日～4 月 19 日

ロイトン札幌 北海道・札幌市

6．研究組織

(1)研究代表者

柴田 奈央子 (SHIBATA,Naoko)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：20534647