

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 7 月 3 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462673

研究課題名(和文) ビタミンDの前眼部上皮における働きに関する細胞生物学的研究

研究課題名(英文) Studies on the roles of vitamin D on the epithelial tissues of ocular surface

研究代表者

伊藤 正孝 (Ito, Masataka)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・再生発生学・准教授)

研究者番号：30534896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンDは近年、皮膚組織をはじめとする上皮組織にも様々な作用をしていることが明らかとなっている。そこで、われわれは、皮膚と同じ表皮外胚葉由来である角膜においても同様にビタミンDが作用している可能性があると考え、ビタミンDの前眼部上皮における働きの解明を目指した。

はじめに培養マウス角膜上皮細胞をより生体の角膜上皮に類似した重層上皮組織様にさせる培養法を開発した。次にこれに活性型ビタミンDを投与したところ、細胞増殖は抑制されたものの、部分剥離後の再被覆部で細胞間結合タンパクや、F-アクチンの発現が変化していたことから、細胞間接着や細胞運動がビタミンDにより変化していることが推測された。

研究成果の概要(英文)：Vitamin D plays a lot of roles not only on bones but also on many organs including several epithelial tissues. The main aim of this study was to evaluate the roles of vitamin D on the epithelial tissues on ocular surface.

First, we developed an method to culture mouse corneal epithelial cells to make stratified 3D tissue mimicking human corneal epithelium, which has microvilli and basement membrane. Then, we checked the effects of active form of vitamin D on it. Although, the active form of vitamin D suppressed cell proliferation, in the recovery from partial peeling by scratching, re-epithelializing cells showed different expression patterns in cell adhesion molecules and intracellular F-actin, suggesting that vitamin D modifies cell adhesions and movements of corneal epithelial cells.

研究分野：発生学

キーワード：ビタミンD 角膜上皮 細胞培養 細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

ビタミンDは脂溶性ビタミンの一種であり、植物由来のビタミンD₂と、動物由来のビタミンD₃に分けられる。これらは食物より摂取され、紫外線照射下の皮膚で活性型ビタミンDとなる。

活性型ビタミンDの主要な標的器官は骨や腸管等であるが、次いで重要な標的器官が皮膚である。皮膚において活性型ビタミンDは、角化上皮や毛根の増殖、分化の調節とともに、細胞接着分子や抗菌ペプチド等の発現調節をおこなって、皮膚のバリア機能、免疫機能等を調節しているものと考えられる。こうした働きから、活性型ビタミンDは角化性皮膚疾患の治療薬としても実用化されており、さらに、外傷や感染に対する効果についても臨床研究が進められている。

角結膜、涙腺、マイボーム腺などの前眼部上皮組織は、いずれも皮膚と同じ表皮外胚葉由来であることから、ビタミンDが同様に作用していることが期待される。現状では前眼部組織におけるビタミンDの作用に関する報告は極めて少ないが、角膜へのビタミンD投与でランゲルハンス細胞の遊走が抑制されたとする報告 (Suzuki ら, 2000)、上皮のバリア機能の増強が認められたとする報告 (Yin ら, 2011) や、角膜の緑膿菌感染に対しビタミンD投与で炎症性サイトカインの産生が抑制されたとする報告 (Xue ら, 2002) などがある。こうした報告から、眼球表面においてもビタミンDが何らかの機能を果たしていることが強く示唆される。また、眼組織ではないが、Lee ら (2012) はラット体表皮膚由来の培養脂腺細胞にビタミンDを投与することで抗菌ペプチドの一種である cathelicidin の産生が増加したことを報告している。このようなことが同様に皮脂腺の一種であるマイボーム腺においても起こるのであるならば、前眼部の細菌感染の制御にビタミンDが有用である可能性が高い。

上記のような背景から、今回、われわれは、このビタミンDの角膜上皮組織における作用を検討し、その健常眼表面における生理機能の解明に資することを目指す。

2. 研究の目的

本研究は、角膜上皮細胞に対するビタミンDの影響を検討することを目的とする。すなわち、ビタミンDが角膜上皮細胞の増殖活性や創傷治癒などに与える影響等を評価し、その角膜上皮組織に与える有用性の有無を検証するための基礎的知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス角膜上皮細胞の3次元培養による角膜上皮様構造(重層上皮)の構築

はじめに、培養角膜上皮細胞を生体の角膜上皮組織に模した重層上皮になるように、培養条件を調整した。(図1)

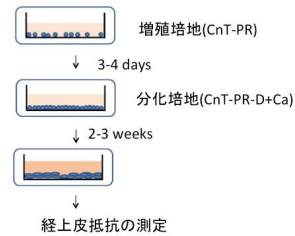


図1 マウス角膜上皮細胞の重層培養法

この培養系を用いて、実験群では活性型ビタミンDの一種である 22-oxacalcitriol を、濃度 $10^{-7}M$ となるように培地に添加し、経上皮電気抵抗の継続的測定と、電子顕微鏡による微細構造の観察を行ない、対照群と比較した。経上皮電気抵抗は膜上で培養した細胞の上下で抵抗値を測るもので、重層化や細胞接着の強化で値が増加する。

(2) ビタミンDが角膜再上皮化に与える影響

次に、ビタミンDの角膜創傷治癒に与える影響を調べるために、上記培養法でコンフルエントになった時点で、ピペットチップで培養面に掻き傷をつけ(図2)、その後の掻爬部位の面積の縮小を継続的に定量した。

前項と同様、実験群では活性型ビタミンDの一種である 22-oxacalcitriol を、濃度 $10^{-7}M$ となるように培地に添加した。

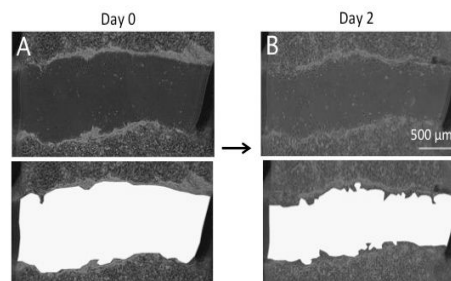


図2 角膜上皮細胞の培養面の掻爬と再上皮化 対照群のみを示している。A 掻爬直後。B 掻爬48時間後。下段は上段の上皮欠損部分を面積計測のため白に置換してある。

さらに、この際、再上皮化の様子を両群でさらに詳しく比較検討するため、上皮細胞内のアクチンフィラメントをファロイジンで、細胞接着因子の Zo-1 を免疫細胞化学的に染色した。

(3) 細胞接着因子とケラチン類の遺伝子発現に関する網羅的解析

ビタミンDの角膜上皮細胞に対する影響の検討として、関連遺伝子の発現変化の網羅的観察を目的として、ビタミンD投与の有無の2群でDNAマイクロアレイ解析を実施して、ビタミンDによって影響を受ける上皮機能関連因子の候補を絞った。

前述の培養方法と同様に、実験群では

22-oxacalcitriol を、濃度 $10^{-7}M$ となるように培地に添加したのち、1週間培養し、その後、両群の細胞から mRNA を抽出し、マイクロアレイ解析に供した。

4. 研究成果

(1) マウス角膜上皮細胞の3次元培養による角膜上皮様構造構築(重層上皮)の構築

TEM 像(図2A,B)では、対照群では3~4層に重層化し、ビタミンD添加群では増殖抑制により重層性はやや低下していたが、基底層の立方化が進み、より in vivo の角膜に近い形態を呈した。SEM 像(図2C,D)では、対照群では敷石状の上皮細胞表面に微絨毛が見られた。ビタミンD添加群では細胞間接着がやや悪く、細胞表面の微絨毛も乱れているように見えた。また、ビタミンD添加群では細胞表面に小粒状の分泌物が附着していた。

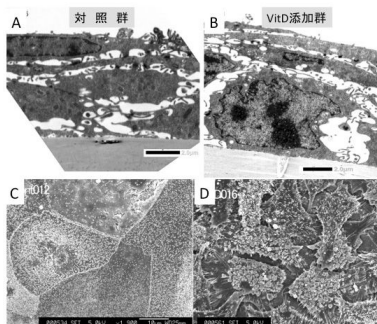


図2 A, B TEM 像、C, D SEM 像、A, C は対照群、B, D はビタミンD添加群

経上皮電気抵抗は、ビタミンD添加群では予想に反し増加が極めて緩徐であった。

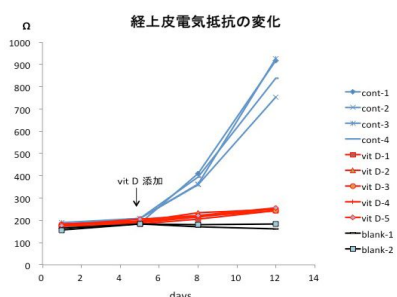


図3 ビタミンD添加の有無による経上皮電気抵抗(青線が対照群、赤線がビタミンD添加群、黒線は細胞なし)

(2) ビタミンDが角膜再上皮化に与える影響

上皮欠損部の面積計測から、ビタミンDの投与は、創傷治癒(再上皮化)を促進も遅延もさせていなかった。しかしながら、この際、上皮細胞内のActinフィラメントをファロイジンで、細胞接着因子のZo-1を免疫細胞化学的に染色したところ、両者の発現パターンにビタミンD投与の有無で変化が生じていることを発見した。すなわち、ファロイジンは、

対照群で見られた lamellipodia に加えてビタミンD投与群では filopodia が観察された(図4)。また、Zo-1は、対照群で観察された細胞境界における染色がビタミンD投与群では減少していた。これらより、ビタミンD投与によって創傷治癒(再上皮化)に質的变化が生じている可能性のあることが示唆された。

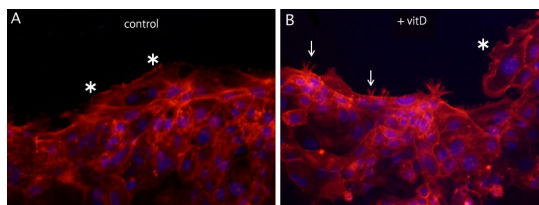


図4 ファロイジンによるF-アクチンの蛍光染色(赤)。ビタミンD添加群(B)では、lamellipodia (*) に加え filopodia () が観察された。

(3) 細胞接着因子とケラチン類の遺伝子発現に関する網羅的解析

マイクロアレイ解析の結果、ケラチン遺伝子群14種類のうち11種類で低下が見られた。そのほかにも複数の因子で変動が見られたため、これらの因子について改めて定量PCRを実施したところ、CK1とCK14の発現はビタミンD投与によって3割程度に、CK10が30分の一程度に抑制されていることがわかった。細胞接着因子のうち Claudin5と Claudin14の発現も35%程度に減少していた。一方、生体防御レクチンの一種であるフィコリンAはビタミンD投与によって発現が約5倍上昇した。

以上より、角膜上皮細胞に対してビタミンDは、ケラチン遺伝子群の発現抑制の意義はなお明らかではないが、異常角化を抑制している可能性がある。また、フィコリンAの発現増加を介して細菌感染の抑制に働いていることが示唆された。

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10件)

(1) Arita R, Suehiro J, Haraguchi T, Shirakawa R, Tokoro H, Amano S. Objective image analysis of the meibomian gland area. Br J Ophthalmol、査読有、2014. 98 巻、p746-755
DOI : 10.1136/bjophthalmol-2012-303014.

(2) Arita R, Morishige N, Koh S, Shirakawa R, Kawashima M, Sakimoto T, Suzuki T, Tsubota K. Increased Tear Fluid Production as a Compensatory Response to Meibomian Gland Loss: A Multicenter Cross-sectional

Study. Ophthalmology, 査読有、2015、122
巻、p925-933

DOI : 10.1016/j.ophtha.2014.12.018.

(3) Kojima T, Dogru M, Ibrahim OM, Wakamatsu TH, Ito M, Igarashi A, Inaba T, ほか. Effects of Oxidative Stress on the Conjunctiva in Cu, Zn-Superoxide Dismutase-1 (Sod1)-Knockout Mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読有、2015. 56 巻、p8382-8391

DOI : 10.1167/iovs.15-18295.

(4) Takeuchi M, Sato T, Tanaka A, Muraoka T, Taguchi M, Sakurai Y, Karasawa Y, Ito M. Elevated Levels of Cytokines Associated with Th2 and Th17 Cells in Vitreous Fluid of Proliferative Diabetic Retinopathy Patients. PLoS One. 査読有、2015. 10 巻、e0137358

DOI : 10.1371/journal.pone.0137358.

(5) Arita R, Mori N, Shirakawa R, Asai K, Imanaka T, Fukano Y, Nakamura M, Amano S. Meibum Color and Free Fatty Acid Composition in Patients With Meibomian Gland Dysfunction. Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読有、2015. 56 巻、p4403-4412

DOI : 10.1167/iovs.14-16254.

(6) Arita R, Morishige N, Shirakawa R, Sato Y, Amano S. Effects of Eyelid Warming Devices on Tear Film Parameters in Normal Subjects and Patients with Meibomian Gland Dysfunction. Ocul Surf. 査読有、2015. 13 巻、p321-330

DOI : 10.1016/j.jtos.2015.04.005.

(7) Yamamoto T, Osako Y, Ito M, Murakami M, Hayashi Y, ほか. Trophic Effects of Dental Pulp Stem Cells on Schwann Cells in Peripheral Nerve Regeneration. Cell Transplant. 査読有、2016. 25 巻、p 183-193

DOI : 10.3727/096368915X688074.

(8) Takeuchi M, Karasawa Y, Harimoto K, Tanaka A, Shibata M, Sato T, Caspi RR, Ito M. Analysis of Th Cell-related Cytokine Production in Behçet Disease Patients with Uveitis Before and After Infliximab Treatment. Ocul Immunol Inflamm. 査読有、2017. 25 巻、p52-61

DOI : 10.3109/09273948.2016.1158276.

(9) Takeuchi M, Taguchi M, Sato T, Karasawa K, Sakurai Y, Harimoto K, Ito M. Association of High-Mobility Group Box-1 With Th Cell-Related Cytokines in the Vitreous of Ocular Sarcoidosis Patients. Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読有、2017.58

巻、p528-537

DOI : 10.1167/iovs.16-20324.

(10) Takeuchi M, Sato T, Sakurai Y, Taguchi M, Harimoto K, Karasawa Y, Ito M. Association between aqueous humor and vitreous fluid levels of Th17 cell-related cytokines in patients with proliferative diabetic retinopathy. PLoS One. 査読有、2017.30 巻、e0178230.

DOI : 10.1371/journal.pone.0178230.

〔学会発表〕(計15件)

(1) 有田 玲子、高 静花、白川 理香、ほか. MGD 診療ストラテジー ~MGD の診断法と治療法、症例提示. 第 68 回日本臨床眼科学会. 神戸. 2014 年 11 月

(2) 有田 玲子、伊藤 耕三、川島 素子、伊藤 正孝、坪田 一男. 活性型ビタミン D3 外用製剤のマイボーム腺機能不全への安全性、有用性の検討. 第 68 回日本臨床眼科学会. 神戸. 2014 年 11 月

(3) 佐藤 智人、唐沢 容子、伊藤 正孝、竹内 大ほか. 加齢黄斑変性、網膜静脈閉塞症に伴う黄斑浮腫における前房水サイトカインの網羅的解析. 第 68 回日本臨床眼科学会. 神戸. 2014 年 11 月

(4) 白川 理香、有田 玲子、伊藤 正孝、澤村 裕正、天野 史郎. マイボーム腺開口部二重配列に関する機能的・組織学的検討. 第 119 回日本眼科学会. 札幌. 2015 年 4 月

(5) 伊藤 正孝、唐沢 容子、市来 やよい、竹内 大. 3次元培養角膜上皮の電子顕微鏡観察. 第 119 回日本眼科学会. 札幌. 2015 年 4 月

(6) ジン カイ、川島 素子、伊藤 正孝、伊藤 明子、サムエル コネル、佐野 こころ、坪田 一男. Effect of Vitamin D Receptor Knockout on Meibomian Gland. 第 119 回日本眼科学会. 札幌. 2015 年 4 月

(7) 唐沢 容子、伊藤 正孝、竹内 大. 角膜上皮株細胞を用いた創傷治癒モデルの作成と成長因子の作用に関する検討. 第 119 回日本眼科学会. 札幌. 2015 年 4 月

(8) 佐藤 智人、竹内 大、唐沢 容子、伊藤 正孝、榎 敏生. 加齢黄斑変性、網膜静脈閉塞症における前房水中 VEGF 値と各種サイトカインの相関. 第 119 回日本眼科学会. 札幌. 2015 年 4 月

(9) 白川 理香、有田 玲子、伊藤 正孝、澤村 裕正、天野 史郎. Clinical and Histological Investigation of the Double

Row of Meibomian Gland Orifices. The Association for Research in Vision and Ophthalmology.コロラド州デンバー. 2015年5月

(10) 伊藤 正孝、桜井 裕、竹内 大、今城 純子. PD-1 ノックアウトマウスにおける眼窩外涙腺の harderianization について. 第 121 回日本解剖学会. 郡山. 2016年3月

(11) 伊藤 正孝、稲田真、今城 純子. パラフィン包埋涙腺・唾液腺検体からの透過型電子顕微鏡観察. 第 122 回日本解剖学会. 長崎. 2017年3月

(12) 唐沢 容子、伊藤 正孝、竹内 大、培養系における角膜上皮組織構築と創傷治癒に対する活性型ビタミンDの影響、第 121 回日本眼科学会. 東京. 2017年4月

(13) 竹内 大、佐藤 智人、田口 万蔵、播本幸三、唐沢 容子、桜井 裕、伊藤 正孝、増殖糖尿病網膜症患者の前房水および硝子体液中の IL-17A 関連サイトカイン、第 121 回日本眼科学会. 東京. 2017年4月

(14) 田口 万蔵、稲田 真、村田 敏彦、播本幸三、唐沢 容子、伊藤 正孝、竹内 大、Keyhole Limpet Hemocyanin 免疫による Akita マウスの網膜変化、第 121 回日本眼科学会. 東京. 2017年4月

(15) 佐藤 智人、竹内 大、唐沢 容子、神田貴之、伊藤 正孝、榎 敏生、急性緑内障発作眼の前房水中サイトカインと罹病期間、白内障手術前後の眼圧との相関、第 121 回日本眼科学会. 東京. 2017年4月

〔図書〕(計1件)

(1) 伊藤正孝: マイボーム腺機能不全 (MGD)の診断と治療。(坪田一男編) 金原出版、東京、2016.

〔産業財産権〕(計1件)

出願状況(計1件)
名称: マイボーム腺機能不全の処置剤
発明者: Kazuo Tsubota, Reiko Arita, Masataka Ito
権利者: 同上
種類: 特許
番号: PCT/JP2014/067099
出願年月日: 2014年6月27日
国内外の別: 海外

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 正孝 (ITO MASATAKA)
防衛医科大学校・医学教育部再生発生学・准教授
研究者番号: 30534896

(2)研究分担者

有田 玲子 (ARITA REIKO)
慶応義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 00338120

竹内 大 (TAKEUCHI MASARU)
防衛医科大学校・医学教育部眼科学・教授
研究者番号: 40260939

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし