

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861456

研究課題名(和文)角膜神経障害に伴う有害事象の時間生物学的予防法の確立

研究課題名(英文)Basis for chronobiological approach in treatment of corneal nerve damage

研究代表者

楠瀬 直喜 (Kusunose, Naoki)

大分大学・医学部・特任助教

研究者番号：10725964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障や翼状片手術に併用されるマイトマイシンC (MMC)は、角膜神経障害の原因となる。一方、時計遺伝子の発現変化にともなうリズム障害が、薬物の副作用発現に寄与すると指摘されている。本研究では、MMCの時計遺伝子発現におよぼす影響を明らかにするとともに、体内時計の機能障害と角膜神経障害の関連を明らかにすることを目的に実験を行なった。実験には、神経保護因子を産生すると報告されている線維芽細胞を用いた。その結果、MMCはグルココルチコイド受容体の発現低下を介して線維芽細胞における体内時計機構を変化させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mitomycin C (MMC), which has been applied in surgery of glaucoma or pterygium to suppress growth of fibroblasts, could induce corneal nerve damage. Circadian rhythm of physiological function is regulated by particular gene cluster called as clock gene, which is component of molecular clock. In this study, we performed in vitro study to clarify the possibility of MMC induced dysfunction of circadian clock and relationship between circadian clock dysfunction and corneal nerve damage. The mouse fibroblast cell line NIH3T3 or primary fibroblasts from Per2::Luc knock in mice were used for experiments. MMC decreased expression of glucocorticoid receptor and modulated circadian oscillation of Per2::Luc bioluminescence. These results suggest that MMC could persistently modulate the circadian clock system in fibroblast of eyes.

研究分野：時間生物学

キーワード：体内時計 時計遺伝子 マイトマイシンC グルココルチコイド

## 1. 研究開始当初の背景

角膜神経の障害は、ドライアイや慢性疼痛といった難治性の後遺症を引き起こす。角膜にメスを入れるという性質上、レーシック手術や白内障手術は角膜神経を障害する危険性をはらんでいる。長時間のディスプレイ使用による視力障害や加齢に伴う白内障の増加といった現代社会の問題を考慮すると、今後は、レーシック手術や白内障手術のさらなる増加が予想される。それに伴い、角膜神経障害の後遺症罹患患者数も同様に増加すると考えられる。しかしながら、上述の後遺症に対する有効な治療薬は未だ開発されていないのが現状である。そのため、角膜神経障害に伴う後遺症の発症自体を回避する画期的な手段が必要とされている。

このような現状を打開する手段として、申請者は体内時計に焦点を当てた。体内時計は、様々な生理現象の約 24 時間周期の変動 (概日リズム) を制御している。近年、体内時計を利用した疾患の治療法や予防法の有用性が示されている。これまでの研究で、多くの薬物の効果 (副作用も含む) が服用する時刻の違いによって変化すること、すなわち、薬物ごとに最適な服用時刻が存在することが明らかになってきた (Kusunose et al., Molecular Pain, 2010)。さらに、体内時計の変調が、ガンや生活習慣病など様々な疾患の発症原因となることが指摘されている。このことから、体内時計を正常に保つことで疾患を予防するという新たな概念も育ちつつある。本研究では、体内時計を軸に、角膜神経障害に伴う後遺症の予防法を確立することを目的に実験を行う。

## 2. 研究の目的

緑内障や翼状片手術に併用されるマイトマイシン C (MMC) は、角膜神経障害の原因となる。一方、時計遺伝子の発現変化にともなうリズム障害が、薬物の副作用発現に寄与すると指摘されている。本研究では、MMC の時

計遺伝子発現におよぼす影響を明らかにすることを目的に実験を行なった。

## 3. 研究の方法

実験にはマウス線維芽細胞株 NIH3T3 を用い、mRNA の発現量をマイクロアレイまたは real-time PCR によって測定した。タンパク質の発現量は、Western Blotting 法によって測定した。培養細胞における時計遺伝子の発現リズムは、ルシフェラーゼ活性の長時間リアルタイム発光計測システムを用いて測定した。

## 4. 研究成果

NIH3T3 に対して、MMC (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を 24 時間処置し、時計遺伝子 (*Clock*, *Bmal1*, *Dbp*, *Ror*, *Per1*, *Per2*, *E4bp4*, *Rev-erb*) の mRNA の発現量を測定した。その結果、MMC 処置群において *Bmal1* mRNA の有意な発現低下が確認された。一方、*Per1*, *Dbp* および *Rev-erb* mRNA の発現量は MMC 処置群において有意に上昇した。MMC 処置後の時計遺伝子発現変化のタイムコースを追ったところ、*Bmal1* mRNA の発現量は、MMC 暴露後 1 時間目から有意に低下し、MMC 暴露後 6 時間目にはプラトーに達した。一方、*Per1*, *Dbp* および *Rev-erb* mRNA の発現量は、MMC 暴露後 6 時間目まで上昇しなかったが、MMC 暴露後 12 時間目から有意に上昇した。さらに検討を進めた結果、MMC の *Bmal1* mRNA 発現に対する影響は、可逆的であったのに対して、*Per1*, *Dbp* および *Rev-erb* mRNA 発現に対する影響は、不可逆的なものだった。

また、NIH3T3 における mRNA の発現変化をマイクロアレイによって網羅的に解析した結果、1,184 個の遺伝子の発現が MMC を 3 時間処置することで変化することが明らかになった。変化した 1,184 遺伝子には、時計遺伝子の発現量に影響をおよぼすことが報告されているグルココルチコイド受容体 (GR) が含まれていた。

NIH3T3 における核内 GR タンパク質の蓄積量を測定した結果、3 時間の MMC 処置によって顕著に低下した。また、NIH3T3 における *Per1* mRNA の発現は GR のリガンドであるデキサメタゾンによって誘導されるが、MMC の 3 時間処置によってその発現誘導は抑制された。さらに、*Per2::Luc* マウスの眼から調整した線維芽細胞に対して 3 時間 MMC を処置したところ、デキサメタゾン刺激による *Per2::Luc* の発現リズムは認められなかった。一方、マウス眼由来線維芽細胞をデキサメタゾンで刺激し *Per2::Luc* の発現リズムを引き起こした後、MMC を 3 時間処置したところ、*Per2::Luc* の発現リズムの周期延長が認められた。

以上の結果から、MMC はグルココルチコイド受容体の発現低下を介して線維芽細胞における体内時計機構を変化させる可能性が示唆された。過去の報告では、神経障害を察知した線維芽細胞が、BDNF 等の神経栄養因子放出することで神経保護作用を示すことが示されている。一方、BDNF の発現には概日リズムが認められ、その発現が体内時計によって制御されている可能性が示されている。すなわち、MMC による線維芽細胞におけるリズム障害が、神経保護因子の発現変容を介して神経障害を悪化させる可能性が考えられる。

#### 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 2 件)

Akamine T, Koyanagi S, Kusunose N, Hashimoto H, Taniguchi M, Matsunaga N, Ohdo S. Dosing time-dependent changes in the analgesic effect of pregabalin on diabetic neuropathy in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 354, 65-72, 2015. 査読有り

Kusunose N, Matsunaga N, Kimoto K, Akamine T, Hamamura K, Koyanagi S, Ohdo S, Kubota T. Mitomycin C modulates the circadian oscillation of clock gene period 2 expression through attenuating the

glucocorticoid signaling in mouse fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 467, 157-163, 2015. 査読有り

〔学会発表〕(計 8 件)

楠瀬直喜、中野聡子、木許賢一、久保田敏昭。ミューラー細胞における VEGF の時計遺伝子 DEC2 依存的発現制御機構の解明。第 119 回日本眼科学会。2015 年 4 月 16 日～19 日。ロイトン札幌/さっぽろ芸術文化の館/札幌市教育文化会館 (北海道, 札幌市)

楠瀬直喜。眼科疾患の新規治療法の開発にむけた時間生物学的研究。第 85 回九州眼科学会。2015 年 5 月 29 日～31 日。鹿児島県医師会館 (鹿児島県, 鹿児島市)

Naoki KUSUNOSE, Naoya MATSUNAGA, Satoru KOYANAGI, Satoko NAKANO, Shigehiro OHDO, Toshiaki KUBOTA. Effect of mitomycin C on molecular clock system in fibroblast. 6th World Glaucoma Congress. 2015 年 6 月 6 日～9 日 (香港, 中国)

Naoki KUSUNOSE, Naoya MATSUNAGA, Satoru KOYANAGI, Kenichi KIMOTO, Shigehiro OHDO, Toshiaki KUBOTA. EBRS/WCC Meeting 2015. 2015 年 8 月 2 日～6 日 (マンチェスター, イギリス)

楠瀬直喜、松永直哉、小柳悟、木許賢一、大戸茂弘、久保田敏昭。マイトマイシン C による線維芽細胞の時計遺伝子発現変容とそのメカニズムの解明。第 26 回日本緑内障学会。2015 年 9 月 11 日～13 日。ウインクあいち (愛知県, 名古屋市)

Naoki KUSUNOSE, Naoya MATSUNAGA, Satoru KOYANAGI, Kenichi KIMOTO, Shigehiro OHDO, and Toshiaki KUBOTA. Alteration of the circadian clock system by mitomycin C in fibroblast. The 8<sup>th</sup> Joint

Meeting of Korea-China-Japan  
Ophthalmologists. 2015年10月17日～18  
日。ヒルトン福岡シーホーク(福岡県, 福岡  
市)

楠瀬直喜、松永直哉、小柳悟、木許賢一、  
大戸茂弘、久保田敏昭。マイトマイシンCに  
よる線維芽細胞の時計遺伝子発現変容とそ  
のメカニズムの解明。第22回日本時間生物  
学会学術大会。2015年11月21日～22日。  
東京大学本郷キャンパス伊藤国際学術研究  
センター(東京都, 文京区)

楠瀬直喜。時間生物学的視点から迫る、  
糖尿病関連眼疾患の病態。第4回大分糖尿病  
眼合併症セミナー。2016年2月13日。レン  
ブランドホテル(大分県, 大分市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

楠瀬 直喜(KUSUNOSE Naoki)

大分大学 医学部 特任助教

研究者番号: 10725964

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号: