

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	宇都宮 嗣了
学位論文題目			
<p>Transforming Growth Factor-β Signaling Cascade Induced by Mechanical Stimulation of Fluid Shear Stress in Cultured Corneal Epithelial Cells. 培養角膜上皮細胞における流体機械的刺激による Transforming Growth Factor-β のシグナル誘導に関する研究</p> <p style="text-align: center;">共著者名 石羽澤明弘, 長岡泰司, 花田一臣, 横田陽匡, 石居信人, 吉田晃敏 <i>Investigative Ophthalmology & Visual Science</i> 57(14):6382-6388 2016</p> <p style="text-align: center;">研究目的</p> <p>瞬目は眼表面の涙液分布に極めて重要な役割を果たしているが、眼表面の状況によってはその上皮細胞に対して機械的摩擦刺激となり得る。近年blink-related traumaという概念が提示され、眼表面の摩擦に関連する疾患とその病態が注目されている。瞬目による機械的刺激は物理的に角膜上皮を障害するだけでなく、何らかのシグナル伝達に関与している可能性が考えられる。眼瞼結膜上皮と角膜上皮の間には涙液が存在することから、我々は瞬目による摩擦を流体力学的にシェアストレスとして捉え、水流を用いて角膜上皮細胞にシェアストレスを負荷することにより、瞬目時の摩擦による機械的刺激を再現し、その細胞応答を評価した。</p> <p style="text-align: center;">材料・方法</p> <p>ヒト角膜上皮細胞をスライドガラス上に培養、ピペットチップで一部を剥離して平行平板型流れ負荷装置に設置、ペリスタポンプを用いて水流を生じさせ、定常的な層流によるシェアストレス (12, 1.2 dyne/cm²) を 24 時間細胞に負荷した。剥離部の撮影をした後、負荷後の細胞、培地上清を採取した。Wound healing assayにて創傷治癒を、BrdU assayにて細胞増殖を評価した。また、real time PCRにて増殖因子の mRNA 発現を、ELISAにて培地上清中の TGF β 1 蛋白濃度を、ウエスタンブロッティングにて SMAD2 のリン酸化を検討した。</p>			

(1)

成 績

静置した細胞と比較し、創傷治癒は12dyne/cm²負荷後の細胞で有意に遅延し、細胞増殖も有意に低下した。増殖因子のうちTGFβ1が最も著明な変化を示し、mRNA発現は12dyne/cm²負荷後の細胞で2.38±0.11倍、1.2dyne/cm²で1.42±0.06倍に増加した。培地上清中TGFβ1濃度は使用前培地中濃度と比較して、静置したもので+212±38pg/ml、12dyne/cm²で-73±36pg/ml、1.2dyne/cm²で+5±39pg/mlであった。TGFβの下流であるSMAD2のリン酸化は12dyne/cm²負荷後の細胞で2.20±0.60倍、1.2dyne/cm²で1.54±0.34倍に有意に増加した。TGFβ receptor inhibitorであるSB431542を用いて同様の実験を行ったところ、12dyne/cm²負荷後の細胞でもSMAD2のリン酸化は認めず、創傷治癒遅延や細胞増殖低下も見られなかった。

考 案

涙液を眼表面全体に行き渡らせるために瞬目は必須であるが、瞬目時に角膜上皮と眼瞼結膜上皮の間には摩擦が生じてしまう。角膜上皮と眼瞼結膜上皮の間には涙液が存在することから、瞬目による摩擦を流体力学的にシヤーストレスとして考察することが可能である。粘性流体を挟んだ移動物体によって引き起こされるシヤーストレスは液体の粘性×速度勾配で求められることから、瞬目時に角膜上皮にかかるシヤーストレスは涙液の粘性×瞬目速度/涙液厚で求められる。本研究は流れ負荷装置を用いて角膜上皮細胞に定量的にシヤーストレスを負荷することにより、シヤーストレスが角膜上皮細胞のTGFβシグナルに関与することを見出した。TGFβは多機能なサイトカインであり、眼表面では角膜上皮、結膜上皮、涙腺から分泌されて涙液中に認められ、角膜上皮、結膜上皮にはそのreceptorも発現している。TGFβはepidermal growth factorに誘導された角膜上皮細胞の増殖や遊走を阻害することが報告されており、本研究のシヤーストレスによる角膜上皮細胞の創傷治癒遅延や細胞増殖の減少はTGFβ receptor inhibitorを用いて認めなくなったことから、これらの変化はTGFβのシグナル伝達を介していると考えられた。TGFβの多くはLatency-associated peptide(LAP)と結合した潜在型で存在している。LAPの解離によって活性型となることでTGFβ receptorへの結合が可能となることから、潜在型TGFβの活性化機序はTGFβ経路のシグナル調節に重要であるとされている。本研究ではシヤーストレスを負荷するとTGFβの下流であるSMAD2のリン酸化が増加したが、培地上清中TGFβ1濃度は使用前培地中濃度と比較して低下していた。本研究は角膜上皮細胞のみが存在する閉鎖回路にて培地を循環させていることから、潜在型TGFβが活性化してreceptorに結合した結果、培地中のTGFβ濃度が低下した可能性が考えられる。潜在型TGFβの活性化機序が角膜上皮細胞においてシヤーストレスによるTGFβシグナル伝達に重要である可能性があり、さらなる研究が必要である。

結 論

培養ヒト角膜上皮細胞においてシヤーストレスはTGFβのシグナル伝達を引き起こした。瞬目の摩擦による機械的刺激は角膜上皮細胞のTGFβ経路を介したシグナル伝達を通じて創傷治癒や細胞増殖に関与している可能性が考えられた。

(最終項)

引 用 文 献

1. Ishibazawa A, Nagaoka T, Takahashi T, Yamamoto K, Kamiya A, Ando J, Yoshida A.
Effects of shear stress on the gene expressions of endothelial nitric oxide synthase, endothelin-1, and thrombomodulin in human retinal microvascular endothelial cells.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 52(11):8496-8504, 2011.
2. Ishibazawa A, Nagaoka T, Yokota H, Ono S, Yoshida A.
Low shear stress up-regulation of proinflammatory gene expression in human retinal microvascular endothelial cells.
Exp Eye Res. 116:308-311, 2013.

参 考 論 文

参考論文 1

1. Imaging of the Corneal Sub-Basal Whorl-Like Nerve Plexus: More Accurate Depiction of the Extent of Corneal Nerve Damage in Patients with Diabetes.
糖尿病患者における角膜上皮下神経叢渦状構造の神経密度解析に関する研究
長岡泰司ほか6名と共著
2. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56(9):5417-5423
平成27年

参考論文 2

1. The wound healing process after corneal stromal thinning observed with anterior segment optical coherence tomography.
前眼部OCTを用いて観察した角膜菲薄化後の創傷治癒過程に関する研究
花田一臣ほか4名と共著
2. *Cornea* 33(10):1056-1060
平成26年