

200828006A

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

角膜内皮機能不全に対する
新しい治療方法の開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田 昌和

平成21年（2009）4月

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

角膜内皮機能不全に対する
新しい治療方法の開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田 昌和

平成21年（2009）4月

目次

I. 総括研究報告書

角膜内皮機能不全に対する薬物治療のための基礎研究
山田 昌和

II. 分担研究報告書

1. 角膜疾患病態解析への応用に向けた自動化リピドミクス解析システムの開発
東城 博雅
2. ヒト角膜内皮細胞培養技術の確立
東 範行
3. 培養ヒト角膜内皮細胞に対するshear stressの影響の研究
大橋 裕一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究障害）
総括研究報告書

角膜内皮機能不全に対する新しい治療法の開発

主任研究者：山田昌和

独立行政法人国立病院機構東京医療センター・臨床研究センター・部長

研究要旨

角膜内皮機能不全は角膜疾患のなかで最も失明に至る頻度が高く、角膜移植を待機する患者の過半数を占める疾患である。本研究は角膜内皮機能不全に対する新しい治療法として、薬物療法と培養角膜内皮細胞移植による手術治療の開発を行うことを目的とした。

主任研究者の山田は、角膜内皮機能不全の薬物療法の開発を目的とした研究を行い、角膜内皮細胞のポンプ機能の担い手である Na-K ATPase の活性が、デキサメサゾン、インスリンによってどのように制御されているかを検討した。角膜内皮の Na-K ATPase はデキサメサゾンとインスリンにより活性化された。ステロイドによる Na-K ATPase 活性化は酵素蛋白合成による Na-K ATPase の発現量増加を介すると考えられた。これに対してインスリンによる角膜内皮の Na-K ATPase 活性化は PKC を介し、Na-K ATPase の α サブユニットの脱リン酸化によることが示された。インスリンの作用は cyclooxygenase 阻害剤の indomethacin を添加することにより増強された。以上より、Na-K ATPase の活性制御には異なる複数の経路が存在していると考えられ、これらの薬剤の組み合わせによって Na-K ATPase 活性を制御できれば、水疱性角膜症を薬物で治療できる可能性があると考えられた。

分担研究者の東はヒト角膜内皮細胞の培養技術の確立に関する研究を行った。網膜芽細胞腫の患児より得られたヒト角膜内皮細胞に、組換えレトロウィルスを用い、不死化遺伝子 HPV16 E6E7、hTERT、cdk4、cyclinD1 を単独あるいは種々の組み合わせで導入し、ヒト角膜内皮細胞株を作製した。分担研究者の東城は、角膜内皮細胞の機能や増殖の制御に関与する脂質バイオマーカーを網羅的に解析するための高速液体クロマトグラフィー/質量分析システムの開発を行い、角膜内皮機能やシグナル伝達機能を調節するガングリオシドの分析を行った。分担研究者の大橋は角膜内皮機能不全の主要原因の1つであるレーザー虹彩切開術に起因する水疱性角膜症の発症要因について培養角膜内皮細胞を用いた検討を行った。

分担研究者氏名・所属機関名及び
所属機関における役職名

東城 博雅	大阪大学大学院医学系 研究科 生化学分子生物学 生命機能研究科細胞 ネットワーク・生化学 准教授
東 範行	国立成育医療センター 眼科医長
大橋 裕一	愛媛大学大学院医学系研究 科 教授

A. 研究目的

角膜内皮機能不全は角膜疾患のなかで最も失明に至る頻度が高く、角膜移植を待機する患者の過半数を占める疾患である。本研究は角膜内皮機能不全に対する新しい治療法として、薬物療法と培養角膜内皮細胞移植による手術治療の開発を行うことを目的とした。角膜内皮機能不全症例のうち、軽症例は薬物療法による機能維持を目指し、重症例は自己または同種の培養角膜内皮細胞移植による手術によって治療することを企図したものである。

角膜内皮は角膜の最後面に位置する一層の細胞層であり、ポンプ機能とバリア機能により角膜実質の含水率を制御し、角膜の透明性の維持に寄与している。角膜内皮細胞はヒトでは生後は再生能力がなく、その細胞数は加齢と共に低下し、コンタクトレンズの長期装用や眼手術などの侵襲によって減少、低下することが知られている。細胞数の減少がある段階に達すると内皮機能不全となり、角膜浮腫から水疱性角膜症により失明状態に陥

る。内皮機能不全の治療法は現状では角膜移植しかなく、角膜移植の適応となる最大の疾患となっている。本邦では提供眼不足のために、6000人の患者が数年間角膜移植手術を待機している状態であり、角膜移植によらない本疾患の治療法の開発が急務と考えられる。

本研究では、主任研究者の山田は、角膜内皮機能不全の治療法として、従来ほとんど考慮されてこなかった薬物療法の開発を目的とした研究を行った。角膜内皮細胞のポンプ機能は主としてNa-K ATPaseにより発揮されるが、その詳細には不明の点が多い。本研究ではデキサメサゾン、インスリン及びインドメサシンによる角膜内皮細胞のNa-K ATPase活性制御とその機序、相互作用について検討した。

分担研究者の東はヒト角膜内皮細胞の培養技術の確立に関する研究を行った。網膜芽細胞腫の患児より得られたヒト角膜内皮細胞に、組換えレトロウィルスを用い、不死化遺伝子 HPV16 E6E7、hTERT、cdk4、cyclinD1を単独あるいは種々の組み合わせで導入し、ヒト角膜内皮細胞株を作製した。分担研究者の東城は、角膜内皮細胞の機能や増殖の制御に関与する脂質バイオマーカーを網羅的に解析するための高速液体クロマトグラフィー/質量分析システムの開発を行い、角膜内皮機能やシグナル伝達機能を調節するガングリオシドの分析を行った。分担研究者の大橋は角膜内皮機能不全の主要原因の1つであるレーザー虹彩切開術に起因する水疱性角膜症の発症要因について培養角膜内皮細胞を用いた検討を行った。これらの詳細については各々の分担研究報告書を参照されたい。

B. 方法

実験には、マウス由来の角膜内皮細胞株 (C3H由来) を培養し、継代培養したものを用いた。培養した角膜内皮細胞の培養液中に種々の濃度及び反応時間でデキサメサゾン、インスリン及びprotein kinase C (PKC) 活性化薬のphorbol dibutyrate (PDBu) を添加した。PDBuのC3H細胞内におけるPKC活性化の確認はenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で行った。また、protein phosphatase阻害剤のokadaic acid、cyclooxygenase阻害剤のindomethacin、cytochrome P₄₅₀阻害剤のresorufinの存在下で 10^{-6} Mから 10^{-5} MのPDBUを添加することで、細胞内伝達経路の検討を行った。

Na-K ATPase の酵素活性測定は、培養液中にアデノシン3リン酸 (ATP) を加えて、ATPaseにより生成される無機リン酸量をリンモリブデン反応による呈色反応を用いることで行い、Na-K ATPase の特異的阻害剤であるウアバインを添加した場合と添加しない場合の差を求めてNa-K ATPase 活性とした。Na-K ATPase のポンプ機能の測定は角膜内皮細胞シートをUssing chamberに組み込み、ポンプ機能により生じる角膜内皮細胞シートの表裏間のshort circuit currentを測定することで行った。また、デキサメサゾンによるNa-K ATPase α 1-subunit発現量への影響を、ウサギ抗Na-K ATPase α 1-subunit抗体を用いたWestern blotting法により測定した。

C. 研究結果

1. デキサメサゾンの角膜内皮 Na-K ATPase に及ぼす影響

デキサメサゾンの濃度とポンプ機能の関係を図1Aに示す。 10^{-6} Mから 10^{-5} Mのデキサメサゾンを投与後48時間での

Na-K ATPase ポンプ機能をUssing chamberを用いて測定した。角膜内皮Na-K ATPase ポンプ機能は濃度依存的に増加し、 10^{-6} Mのときにコントロールの10.6倍となった (*: $p < 0.05$, Student T-test)。図1Bは 10^{-6} Mから 10^{-5} Mのデキサメサゾンを投与後48時間でのNa-K ATPase 活性を測定した結果である。Na-K ATPase 活性は濃度依存的に増加し、濃度が 10^{-6} Mのときにコントロールの約3.9倍に増加した (*: $p < 0.05$, Student T-test)。酵素活性もポンプ機能も濃度依存的に増加するのがみられ、デキサメサゾンによるNa-K ATPase 酵素活性の亢進は、ポンプ機能という角膜内皮の機能面に反映されていることが示された。

蛋白合成阻害剤であるcycloheximideがデキサメサゾンによるNa-K ATPase 活性化に及ぼす影響を図2Aに示す。 10^{-6} M cycloheximideの存在下で、 10^{-6} Mデキサメサゾンを投与し48時間後のNa-K ATPase 活性を測定した。デキサメサゾン単独投与したときにみられたNa-K ATPase の活性化は 10^{-6} M cycloheximideの存在下では阻害された。デキサメサゾンによるNa-K ATPase 活性化は蛋白合成を介していることが示唆された (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, Student T-test)。

デキサメサゾンがNa-K ATPase α 1-subunit発現量に及ぼす影響を図2Bに示す。 10^{-6} Mから 10^{-5} Mのデキサメサゾンを投与し48時間後のNa-K ATPase α 1-subunit発現量をWestern blotting法により測定した。デキサメサゾンの濃度依存的にNa-K ATPase α 1-subunit発現量が増加するのがみられた。デキサメサゾンによるNa-K ATPase 活性化は、蛋白合成によるNa-K ATPase の発現量増加を介していることが示された。

2. インスリンの角膜内皮 Na-K ATPase に及ぼす影響

インスリン濃度が Na-K ATPase ポンプ機能に及ぼす影響を図 3A に示す。 10^{-9} M から 10^{-5} M のインスリンを投与し 6 時間後の Na-K ATPase ポンプ機能を測定した。ポンプ機能はインスリン濃度が 10^{-7} M において頂点となりコントロールの約 3.7 倍の増加がみられ、bell shape の用量反応曲線となった (*: $p < 0.05$, Student T-test)。Na-K ATPase 活性も、インスリン濃度が 10^{-7} M において頂点に達しコントロールの約 2.6 倍の活性増加がみられた (図 3B: *: $p < 0.05$, Student T-test)。

インスリンの作用は PKC と protein phosphatase を介するかどうかを検討した結果を図 4 に示す。図 4A はインスリンが培養角膜内皮細胞の PKC 活性に与える影響をみたもので、 10^{-7} M 以上の濃度でインスリンは PKC 活性を亢進することが示された。図 4B は PKC 阻害剤である Staurosporine のインスリンによる Na-K ATPase 酵素活性化への影響を検討した結果である。 10^{-7} M インスリンによる Na-K ATPase 酵素活性化は 10^{-6} M Staurosporine 存在下では阻害された。また、protein phosphatase 阻害剤である okadaic acid によってもインスリンによる Na-K ATPase 酵素活性化は阻害された。以上から、インスリンによる Na-K ATPase 酵素活性化は PKC と protein phosphatase が関与していることが示された。また、 10^{-6} M の indomethacin、 10^{-6} M の resorufin、 10^{-6} M の indomethacin + resorufin の存在下で 10^{-7} M インスリンが Na-K ATPase 酵素活性に及ぼす影響を検討した。その結果、インスリンによる Na-K ATPase 酵素活性化作用は indomethacin、resorufin の存在下で作用が増強され、

特に indomethacin + resorufin 存在下で最も活性が増加することが示された。インスリンの作用発現に重要な PKC 経路の下流には、protein phosphatase による亢進系と cyclo-oxygenase などの抑制系が同時に存在するためと考えられた。

インスリンが Na-K ATPase α 1-subunit とリン酸化 α 1-subunit の発現量に及ぼす影響を図 5 に示す。 10^{-7} M のインスリンを投与し 6 時間後の Na-K ATPase α 1-subunit、リン酸化 α 1-subunit 発現量を Western blotting 法により測定した。 α 1-subunit とリン酸化 α 1-subunit の比を取ると、インスリンによりリン酸化された α 1-subunit の比率が減少することが明らかとなった。Na-K ATPase α 1-subunit は脱リン酸化された状態が活性型であるので、インスリンによる Na-K ATPase 活性化は、 α 1-subunit の脱リン酸化による酵素活性増加を介していることが示された。

インスリンとデキサメサゾン、インドメサシンの相互作用を検討した結果を図 6 に示す。インスリン単独、デキサメサゾン単独の場合に比べ、Na-K ATPase 活性はインスリンとデキサメサゾンの併用により活性が増強され、これにインドメサシンを加えた場合に最も活性が亢進することが示された。

D. 考察

角膜内皮 Na-K ATPase の酵素活性測定においても、Ussing chamber を用いた short circuit current による角膜内皮ポンプ機能測定においてもデキサメサゾンとインスリンは Na-K ATPase 活性を上昇させることが示された。また、デキサメサゾンとインスリンの Na-K ATPase 活性の制御機序は異なることも示された。

デキサメサゾンによる Na-K ATPase 活

性的上昇は比較的長時間を要し、その作用は濃度依存的であった。デキサメサゾンによる Na-K ATPase 活性上昇は、蛋白合成阻害剤によって阻害されたこと、Western blotting 法により Na-K ATPase α 1-subunit 発現量の増加が確認されたことから、デキサメサゾンによる Na-K ATPase 活性化は新たな酵素蛋白合成による Na-K ATPase の発現量増加を介していると考えられた。

インスリンによる Na-K ATPase 活性の上昇は短時間でみられ、その作用は濃度依存的ではなく、 10^{-7} M で頂点となる bell-shape 型の反応曲線を示した。他の細胞種での報告から、インスリンは PKC などの protein kinase 群を介して Na-K ATPase 活性へ影響を及ぼすと考えられている。今回の結果でも、インスリン濃度と Na-K ATPase 活性の用量反応曲線は、PDBu 濃度と Na-K ATPase 活性の用量反応曲線と類似の bell-shape 型を示した。また、PKC 活性化の阻害薬である staurosporine 存在下ではインスリンによる Na-K ATPase の活性化は抑制された。以上から、インスリンは PKC の活性化を介して Na-K ATPase を活性化していると推測された。

PKC の下流では、protein phosphatase 群、特に protein phosphatase 1 および protein phosphatase 2A を介し Na-K ATPase の α -subunit を脱リン酸化して Na-K ATPase の活性を上昇させる経路が指摘されている。一方で PKC の下流では cyclooxygenase や、cytochrome P₄₅₀ を介して Na-K ATPase 活性を抑制する経路も指摘されている。今回の結果でも、protein phosphatase 1 および 2A の阻害剤である okadaic acid の存在下では、PKC を活性化することにより Na-K ATPase の活性はほぼ完全に抑制され、一

方で indomethacin の存在下では PKC を活性化することにより Na-K ATPase の活性が増強されることが示された。このように角膜内皮細胞においても PKC の下流には、protein phosphatase を介する Na-K ATPase 活性を亢進する経路と cyclooxygenase を介する Na-K ATPase 活性を抑制する経路が併存していることが示された。インスリンも同様に、indomethacin の存在下では Na-K ATPase の活性を増強することが示された。従って、インスリンによって Na-K ATPase を効率よく活性化するためには、抑制的に働く経路の阻害剤である indomethacin を同時に投与する必要があると考えられた。

以上の結果から、デキサメサゾンとインスリンでは、異なる機序で Na-K ATPase 活性を亢進させることが示された。また、インスリンの作用は indomethacin によって増強できることも明らかとなった。これらの薬剤の組み合わせによって角膜内皮細胞の Na-K ATPase 活性を制御できれば、水疱性角膜症に対する薬物治療となる可能性があると考えられた。

E. 結論

角膜内皮機能不全の薬物療法の開発を目的とした研究を行い、角膜内皮細胞のポンプ機能の担い手である Na-K ATPase の活性は、デキサメサゾン、インスリン及び protein kinase C (PKC) によって制御されていることを明らかにした。角膜内皮の Na-K ATPase はデキサメサゾンとインスリンにより活性化された。ステロイドによる Na-K ATPase 活性化は酵素蛋白合成による Na-K ATPase の発現量増加により、インスリンによる角膜内皮の Na-K ATPase 活性化は PKC を介し、Na-K ATPase の α サブユニットの脱リン酸化に

よることが示された。インスリンの作用は cyclooxygenase 阻害剤の indomethacin を添加することにより増強された。以上より、Na-K ATPase の活性制御には異なる複数の経路が存在していると考えられ、これらの薬剤の組み合わせによって Na-K ATPase 活性を制御できれば、水疱性角膜症を薬物で治療できる可能性があると考えられた。

分担研究者の東はヒト角膜内皮細胞の培養技術の確立に関する研究を行った。片眼性網膜芽細胞腫の患児より得られた摘出眼の角膜内皮由来の初代培養細胞に、組換えレトロウィルスを用い、不死化遺伝子 HPV16 E6E7、hTERT、cdk4、cyclin D1 を単独あるいは種々の組み合わせで導入し、ヒト角膜内皮細胞株を作製した。全10種類の遺伝子導入細胞をクローニングし、Western blot法で導入した各遺伝子の蛋白発現を解析した。初代培養細胞と全10種類の遺伝子導入細胞の形態的特徴を位相差顕微鏡で比較し、かつ遺伝子導入細胞の性状を、蛍光抗体免疫染色、RT-PCRを用い検討した。蛍光抗体免疫染色では Zo-1、Na⁺-k⁺ ATPase の発現を、RT-PCRでは Na⁺-k⁺ ATPase などの mRNA の発現を解析した。また、遺伝子導入細胞のポンプ機能を、Ussing chamber を用いて測定した。その結果として、このうちの少なくとも3種類の細胞は形態学的にも Zo-1、Na⁺-k⁺ ATPase の発現など免疫組織科学的にも、ポンプ機能など機能的にも角膜内皮細胞の性質を表現していることが明らかとなった。ヒト培養角膜内皮細胞株を樹立できたことは今後の基礎研究や臨床応用に重要な細胞源となると考えられた。

分担研究者の東城は、角膜内皮細胞の機能や増殖の制御に関与する脂質バイオマ-

カーを網羅的に解析するための高速液体クロマトグラフィー/質量分析システムの開発を行い、角膜内皮機能やシグナル伝達機能を調節するガングリオシドの分析を行った。分担研究者の大橋は角膜内皮機能不全の主要原因の1つであるレーザー虹彩切開術に起因する水疱性角膜症の発症要因について培養角膜内皮細胞を用いた検討を行った。

これらの研究によって、角膜内皮機能不全の新しい治療法として考えられる2つの方法、薬物療法と培養角膜内皮細胞移植による手術治療の基礎を作ることができた。臨床応用にはどちらもまだ数多くの問題点、検討すべき点が残されているが、今後も検討を続け、角膜内皮機能不全症例のうち、軽症例は薬物療法による機能維持を目指し、重症例は自己または同種の培養角膜内皮細胞移植による手術によって治療することを将来的に実現させたいと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

原著論文

1. Hatou S, Yamada M, Mochizuki H, Shiraishi A, Joko A, Nishida T. The effects of dexamethasone on the Na, K-ATPase activity and pump function of corneal endothelial cells. *Curr Eye Res.* (in press)

2. Hatou S, Yamada M, Mochizuki H, Nishida T. Role of protein kinase C in regulation of Na⁺- and K⁺-Dependent ATPase activity and pump function in corneal endothelial cells. *Jpn J Ophthalmol* (in press)
3. Mochizuki H, Yamada M, Hatou S, Tsubota K. Turnover rate of tear film lipid layer determined by Fluorophotometry. *Br J Ophthalmol* (in press)
4. Yamada M, Mizuno Y, Miyake Y, the Cataract Survey Group of National Hospital Organization in Japan. A multicenter study on health-related quality of life of cataract patients: baseline data. *Jpn J Ophthalmol* (in press)
5. Araki-Sasaki K, Osakabe Y, Miyata K, Amano S, Yamada M, Kitagawa K, Hirano K, Kinoshita S. What is this thing called amyloidosis? *Cornea* (in press)
6. Mochizuki H, Yamada M, Hatou S, Nishida T. Fluorophotometric Measurement of the Precorneal Residence Time of Topically Applied Hyaluronic Acid. *Br J Ophthalmol* 2008;92:108-111.
7. Yamada M, Hatou S, Yoshida J. In Vitro Susceptibilities of Bacterial Isolates from Conjunctival Flora to Gatifloxacin, Levofloxacin, Tosufloxacin, and Moxifloxacin. *Eye Contact Lens* 34:109-112, 2008
8. Yamada M, Yoshida J, Hatou S, Yoshida T, Minagawa Y. Mutations in the quinolone resistance determining region in *Staphylococcus epidermidis* recovered from conjunctiva and their association with susceptibility to various fluoroquinolones. *Br J Ophthalmol*. 2008;92:848-851.
9. Yamada M, Hatou S, Mochizuki H. Conjunctival Fixation Sutures for Refractory Superior Limbic Keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmol*.

2008 (online first)

10. 永井正子, 羽藤晋, 大野建治, 望月弘嗣, 山田昌和. 結膜弛緩症に対する結膜縫着術. あたらしい眼科 25:1557-1560, 2008

総説, 著書

1. 山田昌和. 加齢と眼表面疾患. 眼科 50:426-434, 2008
2. 山田昌和. 感染性結膜炎. こどもの感染症の診かた. 13:5-7, 2008
3. 山田昌和. 眼科領域の臨床疫学, 効用研究. 医療 62:695-700, 2008
4. 羽藤晋, 山田昌和. 角膜内皮機能不全の治療. 医療 62: 451-457, 2008
5. 山上聡, 新家眞, 天野史郎, 臼井智彦, 三村達哉, 横尾誠一, 青山佳世, 大沢稔也, 上羽悟史, 松島綱治, 林孝彦, 田中香純, 水木信久, 海老原伸行, 村上晶, 諸星計, 宮崎大, 井上幸次, HamrahP, LiuY, DanaMR, 中野英樹, 羽藤晋, 山田昌和, 羽室淳爾, 山田潤, 後藤晋, 小杉正明, 鈴木洋, 北川全. 拒絶反応のない理想的な角膜移植手術を目指して 全層角膜移植から内皮細胞移植へ. 日眼会誌 112: 266-278, 2008
6. 山田昌和. 先天性遺伝性角膜内皮ジストロフィ. あたらしい眼科 26:163-166, 2009
7. 山田昌和. 角膜・結膜・前眼部の加齢性変化. 眼科プラクティス 22, 抗加齢

眼科学. 坪田一男編, 23-27, 文光堂, 2008

8. 山田昌和. 薬剤障害. 看護のための最新医学講座第2版 20 巻眼科疾患, 中山書店, 水流忠彦編, 242-249, 2008
9. 山田昌和. 感染性角膜炎にステロイドは禁忌だろうか. 眼科診療のコツと落とし穴, 薬物療法. 樋田哲夫, 江口秀一郎編. 中山書店, 24-25, 2008
10. 山田昌和. ドライアイの診断には golden standard がない. 眼科診療のコツと落とし穴, 検査・診断. 樋田哲夫, 江口秀一郎編. 中山書店, 26-27, 2008
11. 山田昌和. ドライアイ (乾性角結膜炎・Sjogren 症候群). 眼科プラクティス 23, 眼科薬物療法 AtoZ. 根木昭編, 47-48, 文光堂, 2008
12. 山田昌和. びまん性表層角膜症・点状表層角膜症. 眼科プラクティス 23, 眼科薬物療法 AtoZ. 根木昭編, 73-75, 文光堂, 2008
13. 若倉雅登, 清澤源弘, 山田昌和, 編著. 続・解決, 目と視覚の不定愁訴・不明愁訴. 金原出版, 2008
14. 山田昌和. デルモイド. 眼科プラクティス 24, 見た目が大事, 眼腫瘍. 後藤浩編, 60-61, 文光堂, 2008
15. 山田昌和. デルモリポーマ. 眼科プラクティス 24, 見た目が大事, 眼腫瘍. 後藤浩編, 62-63, 文光堂, 2008
16. 山田昌和. こどもの目やに, 抗菌薬でいいの? 眼科インストラクションコー

ス 18. 眼科診療のスキルアップ、白内障・小児・ぶどう膜炎編、黒坂大次郎編、123-127、メジカルビュー、2009

17. 山田昌和. 保存角膜を利用した輪部デ
ルモイドの治療. 眼科プラクティス 24、
見た目が大事、眼腫瘍、後藤浩編、91、
文光堂、2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1 : デキサメサゾンの角膜内皮 Na-K ATPase 酵素活性、ポンプ機能に及ぼす影響

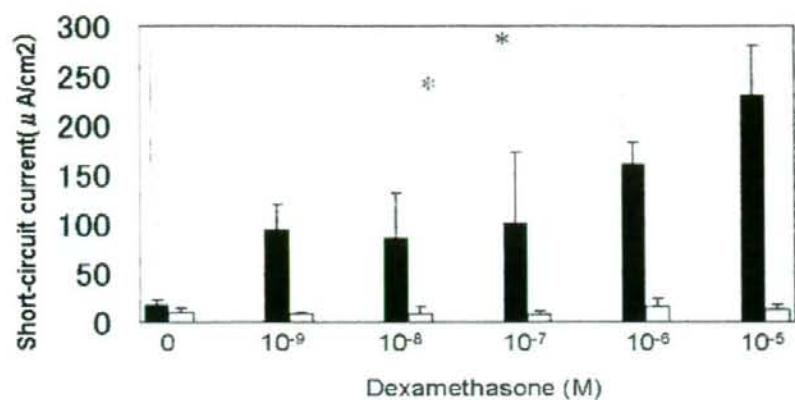


図1A

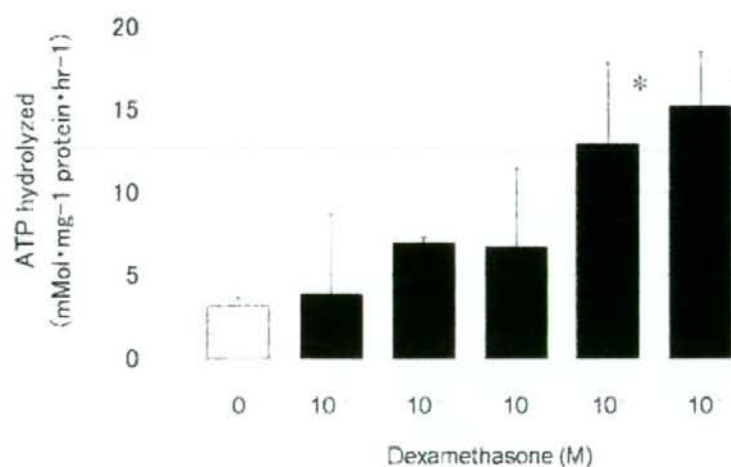


図1B

図2：デキサメサゾンの角膜内皮 Na-K ATPase 活性亢進作用の機序

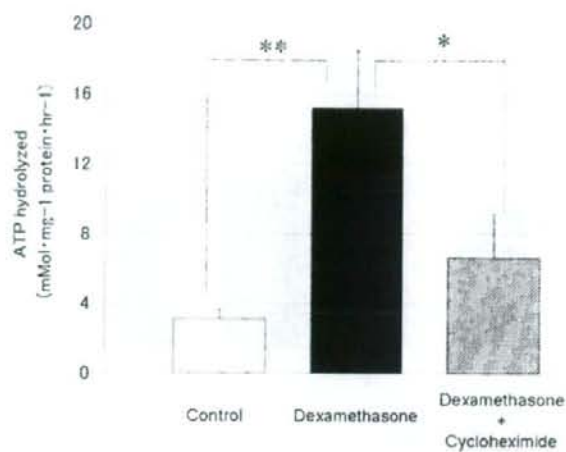


図2A

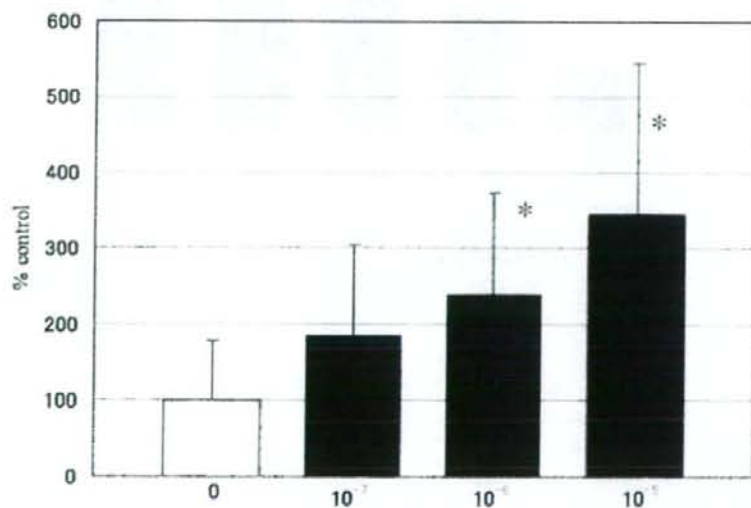
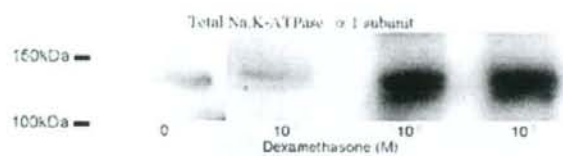


図2B

図 3 : インスリンの角膜内皮 Na-K ATPase 酵素活性、ポンプ機能に及ぼす影響

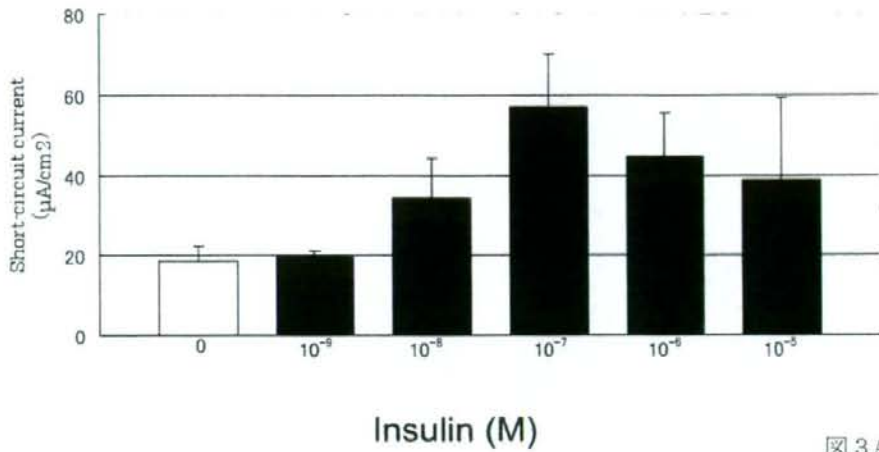


図 3 A

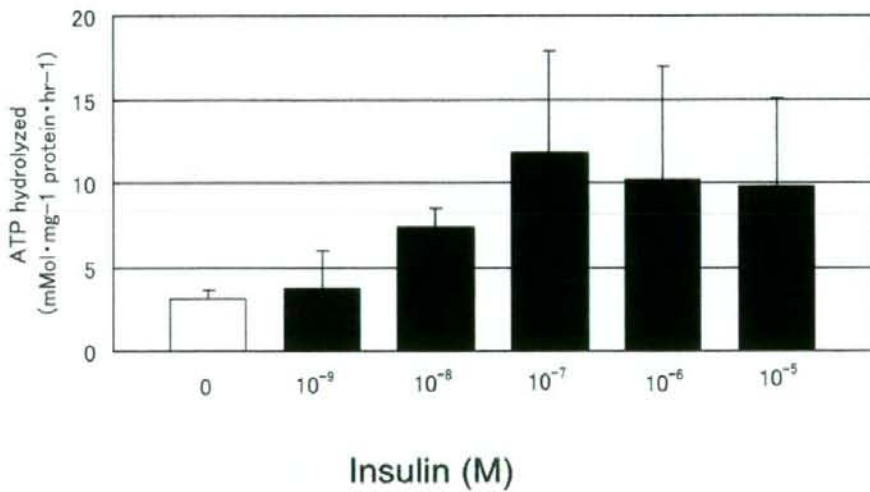


図 3 B

図4 : インスリンの作用はPKC と protein phosphatase を介する

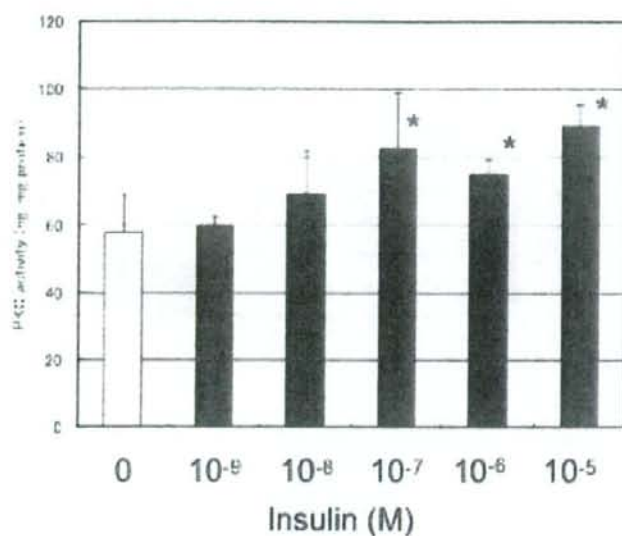


図4 A

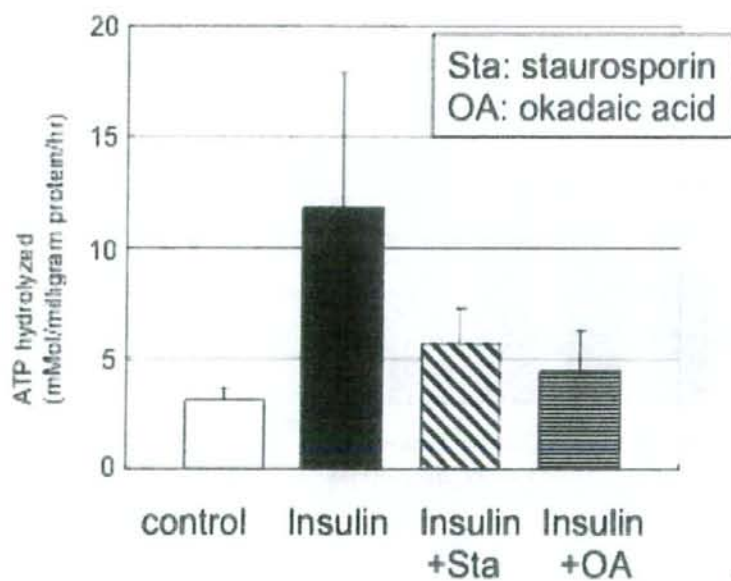


図4 B

図5：インスリンの角膜内皮Na-K ATPase 活性亢進作用の機序

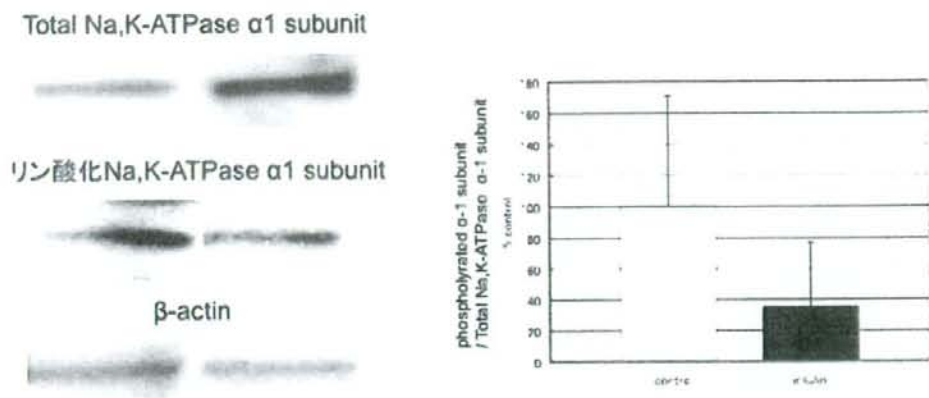
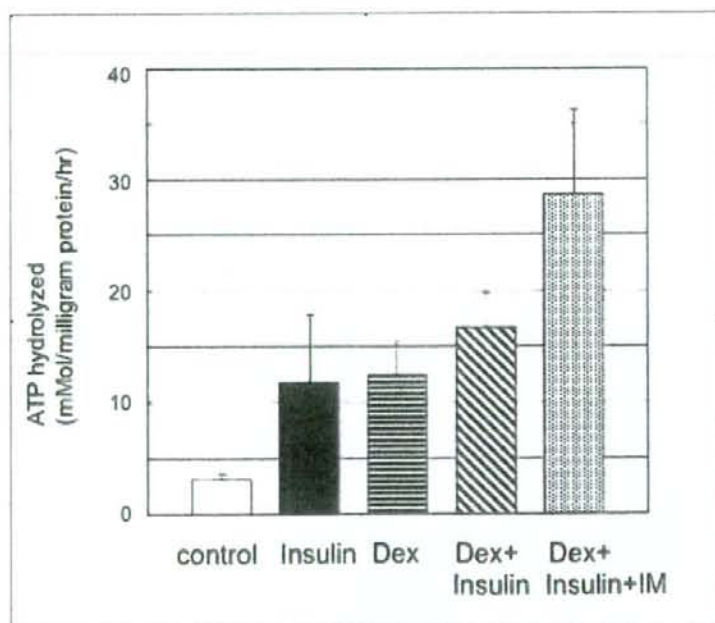


図6：インスリン、デキサメサゾン、インドメタシンの相互作用



II. 分担研究報告書

厚生労働省科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

角膜疾患病態解析への応用に向けた自動化リポドミクス解析システムの開発

分担研究者：東城 博雅

大阪大学大学院医学系研究科生化学分子生物学生命機能研究科
細胞ネットワーク・生化学・准教授

研究要旨

角膜内皮機能不全症を含む角膜疾患に関連する脂質性バイオマーカを検索する高速液体クロマトグラフィー/質量分析システムを開発する。前年度までの研究で、コレステロールエステルやワックスエステルに加え、カラムスイッチング法により涙液では微量成分であるリン脂質を含む生理活性脂質の自動化分析システムを構築した。生理活性脂質にはリン脂質よりはさらに高極性な脂質であるスフィンゴ糖脂質がある。このうちシアル酸を含むガングリオシドは、主に細胞膜ミクロドメインに局在し細胞外からのシグナル伝達調節や角膜内皮機能を調節する Na^+ , K^+ -ATPase の活性化などに関与している。開発中の分析システムを、ガングリオシドを含む高極性脂質のリポドミクス解析に適応できる分析システムに拡張することに成功した。

A. 研究目的

脂質は細胞膜骨格、角膜を覆う涙液フィルムの成分、生理活性メディエータ、炎症メディエータとして眼科領域においても重要な生体分子である。本年度研究では、前年度までに開発した角膜内皮機能不全症を含む角膜疾患に関連する脂質性バイオマーカあるいは標的マーカを検索できる自動化システムを、世界的に見ても開発の遅れているガングリオシドを含む高極性脂質の分析を可能にするシステムに拡張する。

B. 研究方法

分担研究代表者が開発している3溶媒グラジエント高速液体クロマトグラフィー(HPLC)/イオントラップ質量分析(MS)シス

テムをガングリオシドなどの高極性脂質分析システム構築に拡張した。ポンプや制御自動化部分はそのまま利用した。順相シリカゲル HPLC では、ヘキサン・イソプロパノール・水を主体にした溶出溶媒中の水の濃度を増加させることにより脂質を極性の順に溶出させる。グラジエント溶出に用いる3種類の溶媒(A, B, C)のうち、C溶媒を高極性脂質溶出に用いた。このためにはC溶媒が二層分離しないように水含量を増加させなければならないが、Kundu と Scottにより報告されている組成をもとに微調整することにより、すべての主要ガングリオシドを効率よくBとC溶媒を用いたグ