

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2017) 第17巻:54-55.

平成27年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題13)流れ負荷装置を用いたメカニカルストレスが及ぼすヒト培養角膜上皮細胞への影響の解明

宇都宮 嗣了

13) 流れ負荷装置を用いたメカニカルストレスが及ぼすヒト培養角膜上皮細胞への影響の解明

Transforming Growth Factor- β Signaling Cascade Induced by Mechanical Stimulation of Fluid Shear Stress in Cultured Corneal Epithelial Cells

研究代表者 宇都宮嗣了

【目的】

角膜上皮は瞬目時に上眼瞼の摩擦によるメカニカルストレスを受けている。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ある。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メカニカルストレスを再現し、その応答を見た。

【方法】

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 ($12, 1.2 \text{ dyne/cm}^2$) 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、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 蛋白濃度を検討した。

【結 果】

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 TGF β 1 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 TGF β 1 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。TGF β 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。TGF β receptor inhibitor である SB 431542 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 察】

瞬目の摩擦による機械的刺激は角膜上皮細胞の TGF β 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。

これらの研究成果は *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 誌に受理され掲載予定となっている。

【文 献】

- 1) Cher I. Blink related microtrauma: when the ocular surface harms itself. *Clin Exp Ophthalmol*. 31, 183-190 (2003).
- 2) Ishibazawa A, Nagaoka T, Takahashi T, et al. 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, 8496-8504 (2011).
- 3) Carracedo G, Guzman-Aranguez A, Loma P, Pintor J. Diadenosine polyphosphates release by human corneal epithelium. *Exp Eye Res*. 113, 156-161 (2013).