

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791270

研究課題名 (和文) 創傷治癒過程における角膜実質ネットワークと細胞動態の評価

研究課題名 (英文) Evaluation for the corneal stromal network and cellular kinetics in the wound healing process

研究代表者

森重 直行 (MORISHIGE NAUYUKI)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40346565

研究成果の概要：

我々は、当該研究期間において、ラット角膜実質細胞におけるギャップ結合タンパク Connexin43 の発現を、角膜組織構造を破壊せずに観察する方法を確立した。さらに、角膜実質創傷治癒過程において、創傷部位に進展する線維芽細胞にも早期から Cx43 が発現し、角膜実質細胞が積極的にそのネットワークを再構築しようと試みていることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 2,100,000 | 0       | 2,100,000 |
| 2008 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,300,000 | 360,000 | 3,660,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：角膜，実質細胞，ギャップ結合，Connexin43

## 1. 研究開始当初の背景

角膜は、眼表面に存在する透明な組織であり、その透明性維持は良好な視力のために必須である。角膜は上皮、Bowman 膜、実質、Descemet 膜、内皮の 5 層からなり、その 90% 以上は角膜実質で占められている。角膜実質は、主に I 型コラーゲンの線維が層状に規則正しく整列し、その間隙で角膜実質細胞がネ

ットワークを構成している。また、角膜実質には骨髄細胞由来の細胞成分や三叉神経第一枝の神経分布も見られる。これらの細胞成分と細胞外マトリックス成分の規則正しい相互関与、特にコラーゲンの規則正しい配列が角膜実質の透明性、ひいては角膜の透明性に大きく寄与しているものと考えられる。これまでわれわれは、第 2 次高調波発生を用い

て角膜実質中のコラーゲン線維を可視化し、実質内でのコラーゲン線維束 (Collagen Lamellae) の 3 次元的解析を行い、角膜実質内に折り合わされるように存在する Collagen Lamellae を示した。また、第 2 次高調波発生によって可視化される Collagen Lamellae が角膜実質細胞のネットワークの間隙を走行している、換言すると Collagen Lamellae を包み込むように角膜実質細胞のネットワークが構成されていることが明らかとなった (unpublished data)。このように、角膜実質コラーゲンは角膜実質細胞と非常に強い相互関与をしていると考えられ、種々の疾患や創傷治癒過程において角膜実質細胞のネットワークとその維持が角膜実質の透明性維持に非常に重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

角膜実質細胞は細胞間接着により隣接する実質細胞と接合し情報交換をしていると考えられる。角膜実質に外傷や感染などの侵襲が加わった場合、その部位の角膜実質細胞が細胞間のネットワークを介して反応を起こすと推測できる。角膜実質のネットワーク及びその細胞間結合を指標にして角膜実質に対するさまざまな侵襲に対する角膜実質細胞の反応を観察することで、種々の疾患や創傷治癒過程における角膜実質の反応を、実質細胞のネットワークの反応として解析することができると思われる。また、実質細胞のネットワークが破壊された後のネットワーク再構築の過程を観察することで、角膜実質という組織としてではなく、実質細胞ネットワークの創傷治癒を評価することが可能である。今回の研究では、種々の侵襲に対する角膜実質ネットワークの反応を検討することとした。

## 3. 研究の方法

### (1) 正常角膜における角膜実質ネットワークの描出の確立

Wister rat を屠殺後眼球を摘出、角膜を採取した後に、角膜ブロックを作成、免疫染色を行う。角膜実質のネットワークを描出するために、レーザー共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM 5 Pascal, 現有) を用いた既報の方法を用い、角膜実質ネットワークを3次元構築を行う。免疫染色は、細胞-細胞間接着の評価として Connexin43 (Cx43) および細胞骨格 (アクチン) の染色を行った。

### (2) 創傷治癒過程における角膜実質ネットワークの変化と再構築過程の観察

Wister rat 角膜中央部に、直径2mmの上皮剥離または150 $\mu$ mの切創を作成し、経時的に屠殺、眼球を摘出し、切創作成部位、切創近傍、角膜周辺部の角膜を採取し、Cx43の免疫染色を行った。レーザー共焦点顕微鏡およびSHG顕微鏡を用いてスキャンを行い、3次元的構築を行い、実質細胞ネットワークの破壊、続いて起こる実質細胞ネットワークの再構築および実質細胞表現形の変化を観察し、実質細胞ネットワークとの構築と実質細胞表現型を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) Whole mount法を用いた角膜実質細胞 Connexin43 (Cx43) の発現の解析

角膜実質細胞は角膜組織内では星状～樹状の形態を有しているが培養系におかれると紡錘状の形態に変化するため、角膜組織内での形態評価が必要になる。Whole mount法で角膜を組織として染色することにより、生体における角膜実質細胞の評価が可能となる。様々な条件設定の上で、正常ラット角膜実質細胞の細胞突起にCx43が発現していることを示すことに成功した。角膜実質細胞密度の高い実質浅層ではCx43の発現量が顕著であった。

### (2) 角膜実質の創傷治癒過程における角膜実質の生体反応の3次元的解析

Whole mount法で角膜実質細胞の形態およびCx43の発現を検出することが可能であることが示されたので、角膜実質に創傷を作成しその治癒過程での角膜実質細胞の動態および活性化、炎症性細胞の浸潤を検討した。創傷作成後、既報の通り角膜実質細胞はアポトーシスに至り、創傷周囲の細胞は消失した（無細胞領域）。創傷作成後1日目にはactin-richな線維芽細胞様の細胞が周辺部および創傷部位より無細胞領域に伸展している像が観察された。それらの細胞にもCx43が発現していた。また、創傷作成後3時間頃よりCD45陽性の球状細胞の集簇を認めた。また、創傷作成後5日頃より、 $\alpha$  SMA陽性細胞の出現が観察された。角膜実質の創傷治癒過程では、創傷治癒にあたる線維芽細胞/角膜実質細胞が、Gap junctionを維持しながら角膜実質の創傷治癒に関与していることが推測された。

(3) 上皮剥離による角膜実質細胞ネットワークの破壊と回復

上皮剥離直後に角膜実質浅層の角膜実質細胞は消失、無細胞領域を形成し、角膜実質細胞ネットワークは破綻した。上皮欠損作成後3日目より角膜実質細胞は創傷作成部位周囲より無細胞領域に進展したが、細胞間ネットワークの指標となるConnexin43の細胞接合部位での発現は見られなかった。創傷作成後7日では徐々にConnexin43の細胞結合部位での発現が観察されるようになり、創傷作成後14日では細胞間ネットワークが回復した。

(4) 角膜実質創傷治癒モデルにおける細胞間ネットワークの形成と角膜実質コラーゲン船側構造の関係の評価

実質創傷治癒モデルにおいて、実質切開部位では創傷作成後3時間で実質細胞は消失し無細胞領域を形成したが、6時間後頃より周囲からの実質細胞の進展を認めるようになり、Connexin43の細胞結合部位での発現も観察するようになった。同時期における創傷周囲の実質コラーゲン線維束構造は、線維束の断裂を認めるものの新たなコラーゲン線維の再構築は観察されなかった。筋線維芽細胞のマーカーである $\alpha$ 平滑筋アクチンの発現は、創傷作成後7日、14日に観察するのみであり、実質細胞ネットワークの消失・再構築には関与しなかった。

角膜実質細胞ネットワークは上皮剥離刺激により広範に障害されその再構築に時間がかか

ること、実質切開による実質細胞ネットワークの破壊はいち早く回復されることが明らかとなった。

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 13 件)

1. Chikama T, Takahashi N, Wakuta M, Morishige N, Nishida T: In vivo biopsy by laser confocal microscopy for evaluation of traumatic recurrent corneal erosion. *Molecular Vision* 14:2333-9, 2008, 査読有り
2. Nomi N, Morishige N, Yamada N, Chikama T, Nishida T: Two cases of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis after Epi-LASIK. *Japanese journal of Ophthalmology* 52(6): 440-443, 2008, 査読有り
3. Ko JA, Morishige N, Yanai R, Nishida T: Up-regulation of Semaphorin3A in human corneal fibroblasts by epidermal growth factor released from cocultured human corneal epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377(1): 104-108, 2008, 査読有り
4. Farid M, Morishige N, Wahlert A, Steinert RF, Jester JV: Detection of Corneal Fibrosis by imaging second harmonic-generated signals in rabbit corneas treated with mitomycin C after excimer laser surface ablation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 49(10): 4377-4383, 2008, 査読有り
5. Yamada N, Matsuda R, Morishige N, Yanai R, Chikama T, Nishida T, Ishimitsu T, Kamiya A: Open clinical study of eyedrops containing tetrapeptides derived from substance P and IGF-1 for treatment of persistent corneal epithelial defects associated with neurotrophic keratopathy. *British Journal of Ophthalmology* 92(7): 896-900, 2008, 査読有り
6. Morishige N, Kesler-Diaz A, Wahlert AJ, Kurtz RM, Juhasz T, Sarayba M, Jester JV: Corneal Response to Femtosecond Laser Photodisruption in the Rabbit. *Experimental Eye Research* 86(5): 835-843, 2008, 査読有り
7. Morishige N, Ko JA, Liu Y, Chikama T, Nishida T: Localization of Semaphorin 3A in the rat cornea. *Experimental Eye Research* 86(4): 669-674, 2008, 査読有り

8. Ko JA, Yanai R, Wu-Yong Quan, Morishige N, Nishida T: Up-regulation of HSP70 by the fibronectin-derived peptide PHSRN in human corneal epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 370(3): 424-428, 2008, 査読有り
9. Nishida T, Chikama T, Morishige N, Yanai R, Yamada N, Saito J: Persistent epithelial defects due to neurotrophic keratopathy treated with a substance P-derived peptide and insulin-like growth factor-1. *Japanese Journal of Ophthalmology* 51(6): 442-447, 2008, 査読有り
10. Mott KR, Osorio Y, Brown DJ, Morishige N, Wahlert A, Jester JV, Ghiasi H: The corneas of naive mice contain both CD4+ and CD8+ T cells. *Molecular Vision* 13(9): 1802-1812, 2008, 査読有り
11. Nesburn A, Bettahi I, Dasgupta G, Chentoufi AA, Zhang X, You S, Morishige N, Wahlert AJ, Brown DJ, Jester JV, Wechsler SL, BenMohamed L: Functional Foxp3+ CD4+ CD25(Bright+) "natural" regulatory T cells are abundant in rabbit conjunctiva and suppress virus-specific CD4+ and CD8+ effector T cells during ocular herpes infection. *Journal of Virology* 81(14): 7647-7661, 2008, 査読有り
12. Takahashi N, Wakuta M, Morishige N, Chikama T, Nishida T, Sumii Y: Development of an instrument for measurement of light scattering at the corneal epithelial basement membrane in diabetic patients. *Japanese Journal of Ophthalmology* 51(3): 185-190, 2008, 査読有り
13. Brown DJ, Morishige N, Neekhra A, Minckler DS, Jester JV: Application of second harmonic imaging microscopy to assess structural changes in optic nerve head structure ex vivo. *Journal of Biomedical Optics* 12(2): 024029-1 - 024029-5, 2008, 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

1. Morishige N, J-A. Ko, Chikama T, Nishida T: Localization of Semaphorin 3a in Adult Rat Cornea. ARVO2008 ANNUAL MEETING USA 2008/04/29
2. 森重直行, 高知愛, 西田輝夫: 正常角膜における神経ガイダンス蛋白 Semaphorin3A の発現. 第 112 回日本眼科学会総会, 神奈川県, 2008/04/17
3. 森重直行, 西田輝夫, James V. Jester. 第 2 次高調波発生を用いた円錐角膜カラーゲン線維束の観察. 第 32 回角膜カンファレンス・第 24 回日本角膜移植学会,

千葉県, 2008/3/1

4. Morishige N, A. J. Wahlert, M. C. Kenny, D. J. Brown, Kawamoto K, Chikama T, Nishida T, J. V. Jester: Second Harmonic Imaging Microscopy of Normal Human and Keratoconus Cornea. ARVO2007 Annual Meeting, USA, 2007/5/8

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森重 直行 (MORISHIGE NAOYUKI)  
山口大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 40346565

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし