

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791292

研究課題名（和文） マウス角膜移植モデルを用いた末梢神経再生機序の解明

研究課題名（英文） The mechanism of peripheral nerve regeneration following corneal transplantation on mice.

研究代表者

大本 雅弘（OMOTO MASAHIRO）

慶應義塾大学・医学部・研究員（非常勤）

研究者番号：50385241

研究成果の概要：マウス全層角膜移植モデルを神経再生の評価系として確立した。移植片内への神経再生は非常に緩徐で、移植片内ではわずかに神経線維が認められるに過ぎないことが明らかになったが、Sema3A 阻害薬の投与により神経断端からの活発な神経再生が観察できた。また神経再生の程度を統計的に比較するため、再生神経の総延長を数値化する方法を確立した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

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：眼科学、三叉神経

1. 研究開始当初の背景

角膜は視覚を構成する光学系の入り口にあたり、高い透明性を持ち、またそのバリアー機能により化学物質や病原体などの外的刺激から眼球内部を保護している組織である。この眼球を保護する機構の中では、角膜の知覚とそれに続く瞬目が重要である。角膜の知覚は三叉神経第1枝である眼神経に支配されているが、知覚が傷害されると瞬目の機構が乱れ、外的刺激からの防御能力が低下する。また角膜の三叉神経末端から分泌される substance P が、角膜上皮や角膜実質細胞から分泌される IGF-1 とともに角膜上皮細胞に作用することで、上皮の修復を促進することも知られているが(Chikama et al, *Lancet*,

351, 1783-4, 1998) この神経の障害により角膜の創傷治癒が遅延し、角膜潰瘍を生ずる場合がある。これは神経障害性角膜潰瘍として眼科的に非常に重要な疾患であり、角膜ヘルペスや糖尿病では角膜の知覚低下とともに角膜上皮障害が遷延しやすい。また角膜移植眼においては全周で三叉神経が切断され、角膜知覚の低下は数年にも及ぶため、術後経過中に神経障害性角膜潰瘍が高い頻度で見られる。現在まで健全な生体における角膜内の三叉神経の走行はほぼ明らかにされているが、角膜が傷害され三叉神経が断裂した場合の三叉神経の再生に関しては未知である。角膜内での三叉神経の再生を解明することは、角膜移植眼の術後管理や神経障害性角膜

潰瘍の治療に役立つばかりでなく、角膜の上皮・実質細胞の創傷治癒機構や、さらには正常な角膜組織の恒常性をより深く理解するために有用であると考えられる。また神経再生のタイミングや特徴が明らかになれば、神経成長因子や神経再生に働く薬剤等が、実際の神経の再生に与える影響をスクリーニングすることができる。

2. 研究の目的

本研究は、神経の再生モデルとして P0-Cre/EGFP マウスを用い、透明な角膜を観察することで神経の走行が容易に観察できるということにおいて、大変画期的である。このモデルは、観察する組織が透明な角膜であることから、神経や細胞の再生を観察する上で非常に優れていると考えられるが、現在までにこうした試みはなされておらず、非常に独創的なアイデアであると言える。この実験系では、マウスの角膜移植を正確に行い、移植片を確実に生着させる技術が不可欠であるが、現在まで野生型マウスを用いた予備実験を行い、安定した術後生着率と透明治癒率を得ており、目的とする三叉神経の観察が十分にできると考えている。また P0-Cre/EGFP マウスは神経堤細胞に由来する細胞のみが GFP を発現しているため、摘出角膜において角膜実質細胞、角膜上皮細胞および角膜内の神経が GFP 陽性として観察される。通常の GFP マウスでは角膜上皮も GFP 陽性であることより、角膜実質内を走行する三叉神経を観察するためには、摘出角膜をトリプシン処理し上皮を除去しなくてはならない。しかし P0-Cre/EGFP マウスを用いることで酵素処理する必要はなく、より生体に近い状態で角膜を観察することができる。さらに移植手術後早期には多数の血球細胞が host-graft 接合部や移植片内に浸潤してくることを認めており、GFP マウスを用いた場合は GFP 陽性の血球系細胞が神経の観察の妨げになるが、P0-Cre/EGFP マウスを用いることで、血球系細胞の浸潤による影響を除外できると期待され、効率的に再生神経の観察ができると思われる。

ヒト角膜移植眼では術後数ヶ月でレシピエントの上皮が再生し、グラフトは完全に接着する。しかし術後数年を経ても角膜の知覚が低下しており(Rao et al, *Ophthalmology*, 92, 1408-11, 1985)、三叉神経の再生は非常に遅いと思われる。このことが移植角膜に起こる上皮障害の原因の一つであると考えられるが、マウスにおいては術後数週で上皮の再生が起こりグラフトの接着が得られるため、数ヶ月の経過観察により、神経の再生が観察できると予想できる。神経の再生は角膜の創傷治癒機構の中で重要な役割を担っている

と考えられ、神経の再生過程を明らかにすることで、角膜の創傷治癒や恒常性維持についてもいっそう理解を深めることができると思われる。さらにこのモデルは、神経成長因子や神経の再生を促進する薬剤の効果を判定するためには、非常に適したモデルであると考えられる。今後さらに新しい薬剤が開発されるであろうが、このモデルを用いることで、効率よく薬剤のスクリーニングを行うことができると期待される。

3. 研究の方法

本研究では角膜内の三叉神経再生モデルとして、マウスにおける全層角膜移植モデルを用いる。マウスにおける角膜移植モデルは現在までに確立済みである。三叉神経は神経堤細胞由来であるが、神経堤細胞に特異的に発現する P0(Protein zero)遺伝子のプロモーターに EGFP を発現させた P0-Cre/EGFP マウスでは、角膜内の三叉神経の走行が GFP の蛍光により容易に観察できる。このマウスをレシピエントとして、また同系の野生型マウスをドナーとして全層角膜移植を行い、一定期間後に角膜を摘出し移植片内に再生される GFP 陽性三叉神経の経時的变化を蛍光顕微鏡で観察する。これにより角膜移植後、神経がいつ再生するのか、グラフト全体に再生するのか、または限定的であるのか、などが視覚的にとらえられる。

続いて神経成長因子、神経栄養因子および神経再生薬の投与実験を行う。これは点眼、注射、神経内への注入等によって投与された因子や薬剤が、実際に神経の再生にどのような影響を与えるのかを、非投与群と比較して観察するものである。さらに正常な三叉神経が分泌している substance P や calcitonin gene-related peptide (CGRP) 等に関して、免疫染色によってその発現を正常な神経と比較することで、再生した神経の特徴を明らかにするものである。

(1) マウス全層角膜移植

マウスに対して行う全層角膜移植術は、ヒトで行うものと基本的に同様である。マウスの角膜移植モデルには2種類のマウスを用いる。ドナーは C57BL/6J、レシピエントは同系の P0-Cre/EGFP トランスジェニックマウスである。ドナーマウスを安楽死させ、角膜中央部を直径 2 mm のトレパンと小剪刀を用いて切除する。レシピエントには全身麻酔を施し、ドナーと同様に直径 2 mm のトレパンと小剪刀にて角膜を切除する。レシピエントにドナー角膜を乗せ、11-0 ナイロン糸にて 8 針から 10 針端々縫合し角膜を固定する。術後、眼球を保護するため、瞼板縫合を加えて閉瞼固定する。術後 1 週間で眼瞼および角

膜の縫合糸を抜糸する。

(2) 蛍光顕微鏡によるグラフトの観察

移植術後透明治癒した角膜を週に1眼摘出する。角膜に5から6カ所放射状に割を加えて、スライドグラス上にフラットマウントし、ドナー角膜内の GFP 陽性神経線維を蛍光顕微鏡で観察する。術後経過はおよそ3ヶ月観察する予定であるが、神経の再生の状態によってはさらに数ヶ月の観察を要する可能性がある。神経再生の程度を定量化するために、再生神経線維の数、ドナー角膜内への進展距離などを指標にして半定量的なスコアを作成する。スコア化は、薬剤効果判定、遺伝子改変マウス間の差を統計的に比較する際などに必要となる。

4. 研究成果

マウス全層角膜移植モデルを神経再生の評価系として確立した。マウス角膜移植モデルにおいて、GFP 陽性の神経線維と keratocyte 様の樹枝状細胞が移植片内に進入する様子が観察され、移植片内に出現した keratocyte 様の樹枝状細胞の多くは神経線維に伴っており、三叉神経が実質幹細胞の niche に関与しているという仮説が具体性を持ったように思われた。最終的に術後9週までの観察を行ったが、この段階で移植片中央部まで神経線維は進展し、やはり神経線維に沿って樹枝状細胞が認められた。しかし生理的な神経線維の走行や keratocyte の分布に比べ、未だ粗で単純であるため、この後さらに長期間経過を観察する必要があると思われた。

続いて、神経再生を促進させ得ると考えられる Sema3A 阻害薬を用いた予備実験を行った。全層角膜移植を行ったマウスに対し、Sema3A 阻害薬を定期的に結膜下注射で投与することにより、術後3週という早期に神経断端からの活発な神経再生を観察する事ができた。またコントロールと統計的に比較するため再生神経の程度を定量化する必要があるが、フラットマウントしたグラフト内の神経線維を蛍光顕微鏡で撮影し、撮影した写真で神経線維の蛍光をトレースすることによって、再生神経の総延長を数値化する方法を確立した。さらに、再生神経の機能を評価する方法として、角膜知覚を測定した。臨床で用いられる角膜知覚計によって、マウスにおいても知覚測定が可能であることを確認した。

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0件)

[学会発表](計3件)

発表者：大本雅弘・宮下英之・比嘉一成・坪田一男・榛村重人
発表標題：ヒト骨髄間葉系幹細胞のフィーダー細胞としての有用性
学会：第8回日本再生医療学会総会
発表年月日：平成21年3月6日
場所：東京

発表者：M. Omoto, H. Miyashita, K. Higa, K. Tsubota, S. Shimmura
発表標題：The Use of Human Mesenchymal Stem Cells as Feeder Cells in Cultivated Corneal Epithelial Sheets
学会：The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2008 annual meeting
発表年月日：平成20年5月1日
場所：アメリカ、フォートローダーデール

発表者：M. Omoto, S. Shimmura, S. Yoshida, H. Miyashita, K. Tsubota
発表標題：Corneal Wound Healing Following Penetrating Keratoplasty on Mice.
学会：The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2007 annual meeting
発表年月日：平成19年5月8日
場所：アメリカ、フォートローダーデール

[図書](計1件)

著者名：大本雅弘、他
出版社名：文光堂
署名：眼科プラクティス 角膜外科のエッセンス
発行年：2007年
27 - 30 ページ

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大本 雅弘 (OMOTO MASAHIRO)
慶應義塾大学・医学部・研究員 (非常勤)
研究者番号 : 50385241

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

榛村 重人 (SHIMMURA SHIGETO)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号 : 00235780

坪田 一男 (TSUBOTA KAZUO)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号 : 40163878

岡野 栄之 (OKANO HIDEYUKI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号 : 60160694