

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20791275

研究課題名（和文）角膜内皮不全が角膜上皮幹細胞疲弊症を来すメカニズムの解明

研究課題名（英文）Search for the mechanism of corneal epithelium stem cell deficiency by bullous keratopathy

研究代表者

内野 裕一（UCHINO YUICHI）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80365337

研究成果の概要（和文）：ウサギの角膜内皮を切除することにより、人工的な水疱性角膜症を発生させ、ウサギ水疱性角膜症モデルを作成した。水疱性角膜症により、角膜上皮のターンオーバーが亢進していることが示唆された。長期間の水疱性角膜症では角膜上皮幹細胞が枯渇し、輪部機能不全を起こしている可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：We could create a rabbit model of bullous keratopathy, by removal of the rabbit corneal endothelium, causing a artificial bullous keratopathy. Our result suggested that the bullous keratopathy increased turnover of the corneal epithelium. The long-term bullous keratopathy may produce the corneal epithelial stem cell depletion and limbal dysfunction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：水疱性角膜症、角膜上皮幹細胞、角膜輪部機能不全、幹細胞疲弊

1. 研究開始当初の背景

日本国内では角膜移植待機患者が 5000 人以上いると言われ、深刻な角膜ドナー不足が長年指摘されてきた。待機患者の移植適応疾患の中でも角膜内皮細胞が機能低下して生じる水疱性角膜症は全移植患者の約 20%を占める主要疾患である。この水疱性角膜症は bulla と呼ばれる角膜上皮への水分貯留から角膜上皮欠損を定期的に繰り返し、患者は

痛みに耐える生活を強いられている。罹病期間が長期に及んでいる水疱性角膜症では結膜上皮が周辺角膜へ侵入することを我々が初めて報告した。（Uchino Y, et al. *Ophthalmology* 2006）この報告のなかで、我々は長期罹患水疱性角膜症で角膜上皮幹細胞機能の低下が起きていることを示唆した。しかし状況証拠のみで、病態経路まで切り込んだ観察はできていなかった。

2. 研究の目的

本研究目標は水疱性角膜症という角膜上皮損傷を繰り返す疾患を長期罹患することによる角膜上皮の turn over 亢進が原因となり、輪部の角膜上皮幹細胞が疲弊して機能不全に陥るのかという病態経路を解析・証明する。

3. 研究の方法

角膜輪部での細胞分裂状況を評価するため、まず家兎の角膜輪部細胞を Brd-U (5-bromo-2-deoxy-uridine) という色素でラベルする。これは細胞分裂時に核内に取り込まれるもので、その後細胞分裂を繰り返すとその色素濃度が薄くなっていくという特徴を持つ。したがって幹細胞のように基本的には quiescent な細胞は色素ラベルを一度取り込んだまま核が染色され続けるという特性がある。このような細胞は “label-retaining cells (LRCs)” と言われている (Bickenbach et al. J. Dent. Res. 1981)。我々が角膜上皮欠損を繰り返す水疱性角膜症家兎モデルを作製すると、モデル家兎の角膜輪部にある角膜上皮幹細胞は上皮欠損を埋めるため quiescent ではいられなくなり、分裂を繰り返すことで LRCs の個数減少あるいは色素蛍光発色の低下が認められるのではないかと仮説を立てた。この仮説を証明するために、以下の実験方法を施行した。

(1) 水疱性角膜症家兎モデルの作製

白色家兎 (Shiraishi Experimental Animal Breeding Farm, Tokyo) に対して、全身麻酔下にて前房側よりアプローチし、シンスキーフックにて角膜内皮面に円状に切開線を入れ、デスメ膜ごと層状に一塊として剥離する。この際、家兎は角膜内皮細胞がヒトと異なり増殖可能であることから、広範囲の除去を必要とする。内皮細胞が存在しなくなるにより水疱性角膜症が発症するが、周囲角膜内に表在性血管侵入を確認するまでは定期観察して水疱性角膜症状態を継続させた。

(2) Brd-U ラベリング方法および Brd-U 陽性細胞の評価方法

Brd-U を耳静脈より 10 日間投与 (30mg/kg/日) し、輪部上皮をラベルする。この Brd-U は細胞分裂時に取り込まれる性質を利用し、その後分裂するたびに希釈されることで上皮増殖能を見積もることができる。

Brd-U にてラベルされた細胞は核が蛍光染色されるため、染色されない他の細胞核と容易に区別できる。それを利用してある面積あたりの全ての細胞核の個数と、Brd-U ラベルされた細胞核の個数を比で表し “labeling index (%)” とする。この Labeling index を正常家兎と水疱性角膜症モデル家兎で比較し、角膜上皮幹細胞の turn over 亢進の指標とする。我々の研究での水疱性角膜症家兎の方が、

正常家兎に比較して少ないのではないかと予想して施行している。

(3) マーカーを用いた細胞特性の解明

我々の研究でも上記 2 群それぞれに Label retaining cells の存在が判明すると思われるが、それらの細胞特性を評価するため、発現マーカーを調べた。細胞増殖のマーカーとして Ki67 を用い、differential cell markers (分化細胞マーカー) として結膜上皮に特異的なマーカーである K4、K12 を用いる。上皮再生のため上皮幹細胞が quiescent でいられないのであれば、細胞増殖マーカーの発現が増加し、輪部におけるバリア機能が低下し結膜上皮の侵入が起こっていれば、結膜上皮分化細胞マーカー (K4、K12) の発現が増える可能性が高い。

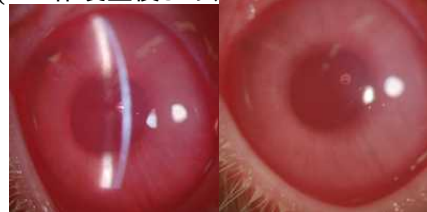
4. 研究成果

(1) 水疱性角膜症家兎モデルの作製

まず水疱性角膜症家兎の作製および正常家兎と水疱性角膜症家兎の周辺角膜を比較検討した。一般的に家兎の角膜内皮細胞はヒト角膜内皮細胞と異なり分裂増殖可能であるため、角膜内皮への損傷程度が弱い場合には水疱性角膜症の発生期間が短くなり、今回の実験目的である「長期間の水疱性角膜症」となるモデルは成立できない。我々は角膜内皮への損傷を最小限としてかつ長期間におよぶ水疱性角膜症が発症する手技をまず確立した。

図1 モデル作製後の経過(0W, 1W, 2W, 6W)
(左がスリット写真、右が徹照写真)

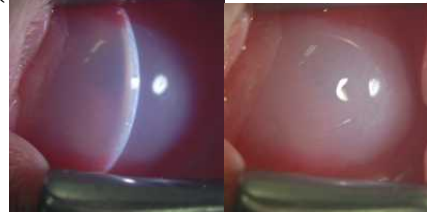
(0W:作製直後より角膜浮腫をきたす)



(1W:角膜浮腫が増強している)



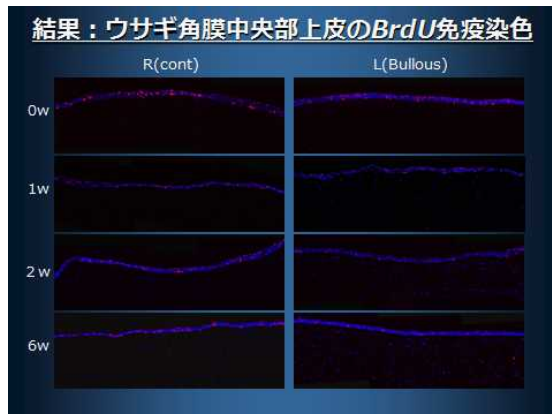
(2W:角膜周辺から血管侵入を認める)



(6W:角膜中央付近まで血管侵入を認める)

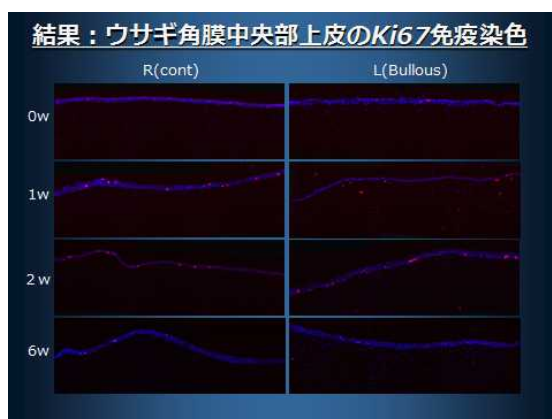


(2)ウサギ角膜中央部上皮の Brd-U 免疫染色
(R:右眼,正常角膜) (L:左眼,水疱性角膜症)



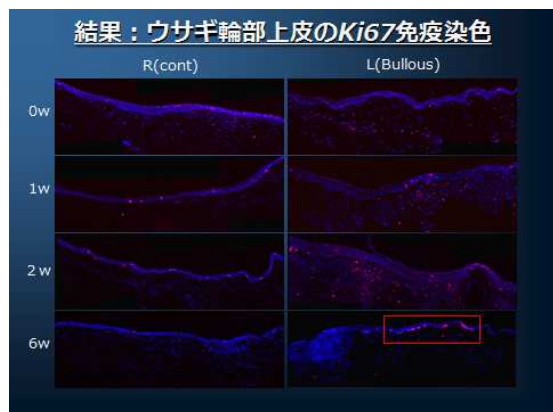
ウサギ角膜中央部上皮における BrdU の免疫染色ですが、正常眼(R:cont)では予め取り込まれた Brd-U 陽性細胞は6週間後においてもそれほど変わりにくく検出されたのに対し、水疱性角膜症の角膜中央部上皮(L:Bullous)では時間が経つにつれて徐々に Brd-U 陽性細胞が減少しているのがわかる。

(3) マーカーを用いた細胞特性の解明
「ウサギ角膜中央部上皮の Ki67 免疫染色



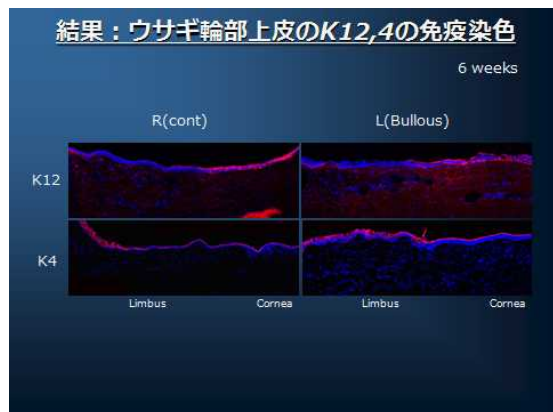
一方、Ki67 の免疫染色では 正常眼のどの時期においても比較的安定して Ki67 陽性細胞を検出したのに対し、水疱性角膜症の方では多かったり少なかったりと安定していないことがわかった。

ウサギ輪部上皮の Ki67 免疫染色
(R:右眼,正常角膜) (L:左眼,水疱性角膜症)



輪部上皮における Ki67 の免疫染色を行ったところ、角膜中央部上皮における染色とは異なり水疱性角膜症の6週間後において上皮の基底細胞で、このように強く染まっているところが観察されました。

ウサギ輪部上皮の K12,K4 の免疫染色
(水疱性角膜症作製後、6 週後)
(R:右眼,正常角膜) (L:左眼,水疱性角膜症)



輪部上皮の発現系を観察するため6週間後における K12, 4 の免疫染色を行いました。K12, 4 とともに水疱性角膜症でも正常眼と同じように発現が観察されたことから、角膜上の結膜上皮化が進んでいるような像は観察されませんでした。

(4) 結果まとめおよび考察
・角膜内皮剥離直後から角膜実質の浮腫が観察され、1週間後には control の5倍以上の

厚さの水疱性角膜症を作製できた。

・水疱性角膜症の角膜上皮では BrdU 陽性率が減少し、Ki67 陽性率が 2 週後で増加していた。また、6 週後の輪部上皮基底細胞では強い Ki67 陽性像を観察した。

・2 週以降、角膜周囲から血管侵入も認められるようになったが、6 週間後でも結膜上皮の角膜への侵入は認められなかった。

水疱性角膜症で BrdU が減少した原因として一つは細胞増殖速度が増加することで BrdU 陽性細胞が分裂し希釈され陽性率が減少したと考えられた。もう一つは上皮が増殖することで脱落が亢進して BrdU 陽性細胞も脱落して陽性率が減少したと考えられた。

(5)結論

水疱性角膜症では角膜上皮の turn over が亢進している可能性が示唆された。またこのような turn over の亢進が長期にわたって起こることにより、長期間の水疱性角膜症では角膜上皮幹細胞が枯渇し、輪部機能不全を起こしている可能性が考えられた。

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 1 件)

比嘉 一成、榛村 重人、内野 裕一、島崎 潤、坪田 一男 「水疱性角膜症の角膜上皮への影響」

第 34 回角膜カンファランス (2010.2.11. ~ 13. 仙台)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

内野 裕一 (UCHINO YUICHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80365337

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし