

機関番号：32650

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：平成20年～平成21年度

課題番号：20791283

研究課題名 (和文)

リング移植を用いた角膜上皮創傷治癒モデル

研究課題名 (英文)

Wound healing model of corneal epithelium using stainless-ring.

研究代表者

榛村真智子 (Shimmura Machiko)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80385244

研究成果の概要 (和文) : 家兎角膜に金属リングを縫着することで、角膜上皮の創傷治癒モデルが作成可能か検討した。角膜輪部から隔離されたリング内の上皮はリング移植6ヶ月後においても存在した。さらに、リング内に上皮欠損を作成したところ、上皮化は上皮欠損の面積が増えるに伴って上皮化回数が減少する傾向が観察された。リング内の上皮のコロニー形成能については、5週間後でも約8%のCFEを維持していた。また、金属リングを移植した角膜の知覚は正常角膜の約1/9である6ミリにまで減少しており、リング内においてはほとんどβIII-チューブリンの陽性像を観察することが出来なかった。以上のことからリングを使うことで創傷治癒モデルとして有用であり、神経栄養性角膜上皮欠損モデルとしても有用であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : To characterize corneal epithelial cells separated from limbus *in vivo* by the transplantation of stainless steel ring with or without creating defect inside the ring. When re-epithelization was achieved, central epithelial defect was continuously created until cells exhaust within the ring. The number of creating defect was also analyzed. Ring-transplanted corneal stroma showed little inflammation signs, and when epithelium is removed inside of the ring totally, complete epithelial defect was persistent at least for a month. Corneal sensation was significantly decreased in cornea with the ring. ( $p<0.05$ ). Immunostaining demonstrated similar expression pattern of p63, Ki67, and Cytokeratin3 as normal control. When those rings were transplanted in intact cornea, inside epithelia prevent epithelial defect *in vivo* for up to 6 months. Trans-amplifying cells might be maintained homeostasis for more than 1 month when separated from their limbus *in vivo*, and this model will be useful for future stem cell research or wound healing model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成21年度	550,000	390,000	940,000
平成22年度	750,000	0	750,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：遷延性角膜上皮欠損、前駆細胞、角膜上皮、神経栄養欠乏性角膜上皮欠損、創傷治癒

## 1. 研究開始当初の背景

### 角膜の XYZ 理論と角膜基底細胞の寿命

角膜は恒常性と透明性を維持するために常にターンオーバーしている。角膜上皮は 5～6 層の重層扁平上皮からなり、最上層の細胞が剥離し、それより深層の細胞が増殖・分化することにより補われるというターンオーバーをしているが、それは以下のような XYZ 理論にて説明される。すなわち、最表層の角膜上皮が剥離する (Z) と、それよりも深部にある基底細胞 transient amplifying cell (TA 細胞) が分裂し、翼細胞が作り出され、最終的に翼細胞が表層細胞に分化するという一連の動きによって上皮のホメオスタシスが維持される (X)。さらに TA 細胞が分裂できる回数は限られているために、新たな基底細胞が輪部に存在する角膜上皮の幹細胞より供給される (Y)。すなわち、角膜上皮における細胞分裂は TA 細胞だけで生じるが、その TA 細胞の供給源は輪部の基底部位に存在する幹細胞にある。このターンオーバーに障害が生じると、角膜上皮障害が生じ、角膜上皮障害が発生したときには幹細胞が何らかの形で刺激され、この理論に基づいて角膜上皮の創傷治癒機転が起こる。

### 角膜知覚神経の創傷治癒における役割

角膜には密に三叉神経が分布し、知覚伝導を担う。この三叉神経が逆行性にサブスタンス P を介して角膜上皮細胞に作用することにより、角膜上皮や実質細胞から分泌される IGF-1 とともに創傷治癒が促進される (Nishida T 1996, Chikama T 1998)。また、サブスタンス P と IGF-1 あるいはこれらの分子の断片を投与すると糖尿病に伴う角膜上皮創傷治癒の遅延や神経麻痺性角膜潰瘍の治療に役立つことが明らかになった。

### 角膜リングモデルと再現性の高い遷延性上

### 皮欠損モデル

ここまで述べたように角膜上皮の創傷治癒に関しては研究が進んでいるが、まだ明らかでない点も多い。例えば TA 細胞の分裂回数には限りがあることが分かっているが、実際の寿命は不明である。遷延性上皮欠損に対する薬物治療の研究は進んできているが、遷延性角膜上皮欠損の動物モデルが今まで存在していないために、理論的な解明には限界がある。薬剤を用いた、あるいは輪部を機械的に破壊することによる輪部疲弊モデルは存在するが、その場合は結膜侵入、炎症などの他因子も角膜上皮の創傷治癒に関与してくる。このため、純粋に角膜上皮細胞の創傷治癒機転を観察することは難しく、個体差も大きいと考える。

そこで、TA 細胞の動向や角膜上皮創傷治癒のさらなる究明を目的とした TA 細胞疲弊モデルを作成する研究に着眼した。直径 8mm、厚さ 350 $\mu$ m の角膜リングを移植することでリング内は輪部との上皮細胞の交通が遮断され、周辺部から中心部に上皮細胞が移動できなくなる。またリングを移植しても、炎症反応はきわめて少なく、ウサギの開眼状態に影響はなく、充血、血管侵入もほとんどないことを確認している (図 1 参照)。この角膜上皮創傷治癒モデルが完成すれば、将来的には様々な薬剤の評価に用いることも可能であると考えている。

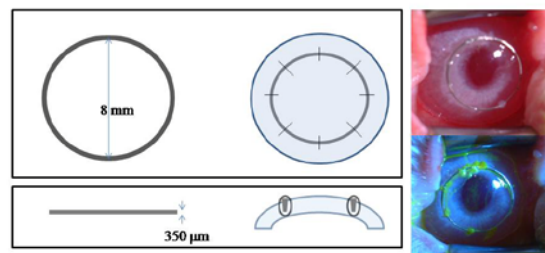


図 1 角膜リングと移植後のウサギ角膜

## 2. 研究の目的

### 正常なオキュラーサーフェスを維持した再現性の高い遷延性角膜上皮欠損モデルの作成

現在までに、角膜リングを移植するとリング内へリング外から角膜上皮が侵入してくることは少なくとも1カ月はない。またリング内の角膜上皮を擦過すると1ヶ月ほど経過をみても周辺部上皮の侵入はなかった。すなわち、このリング移植モデルでは角膜上皮幹細胞と TA 細胞を分離できることが示唆された。組織切片、免疫染色を用い上皮の状態、炎症反応が本当に起こっていないかを確認する。

### TA 細胞の上皮化予備能力とそれを既定している因子の解析

今後はまず、リング内の角膜上皮擦過の大きさを変化させて各々の角膜上皮の形態維持を観察することで、TA 細胞の予備能を検討する。また、角膜上皮擦過を行わないモデルでリングを長期的に移植するとどれくらいでリング内の角膜上皮が形態を維持できなくなるかを観察し、リング内の TA 細胞の寿命を調べる予定である。さらに、リング移植後の角膜実質内の神経がほとんど切断されているかを観察し、神経栄養欠乏性角膜上皮欠損のモデルとなりうるかを検証する。

## 3. 研究の方法

### 角膜リングの移植（8ミリ）

直径8ミリ径の角膜リングを真空トレパンで250マイクロ切開後に10-0ナイロンで8針、端端縫合をすることにより固定する。輪部との上皮細胞の交通が遮断され、周辺部から中心部に上皮細胞が移動できなくなることは数羽の家兎による予備実験でわかっている（図2）ので、Nを増やして再現性を検証する。家兎の開瞼状態、充血、角

膜血管侵入などの炎症反応も観察することにより、こういったモデルになりうるのかを検証する。

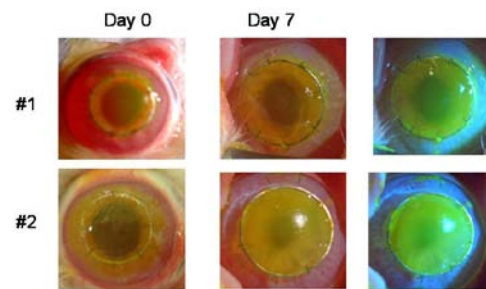


図2 リング移植後のウサギ角膜

### リング内上皮欠損モデル（4、5、6ミリ）の経時的評価

リング内の上皮欠損の再現性が得られれば、リング内の上皮の動向を観察することにより、今まで不明であった角膜基底細胞（TA 細胞）の動向を観察することができると考えている。その移植リング内に4、5、6ミリの上皮欠損を作成し、上皮化が得られたら、その時点でまた同部位の上皮欠損を作成することにより、上皮 TA 細胞疲弊がどの段階で起こるのか、またどのような因子がそれに関係するのかを観察する。TAC の動向をみるモデルとして、また in vivo での創傷治癒過程を観察するモデルとして、活用する。

## 4. 研究成果

家兎角膜に金属リングを縫着することで、角膜上皮の創傷治癒モデルが作成可能か検討した。まずリング移植3週間後において眼球組織を回収し組織の解析を行った。免疫組織により、ケラチン3、Ki67、p63の発現を観察したところ、リング移植周辺の上皮は増殖亢進等が懸念されたが、正常上皮とほとんど変わりなく、輪部上皮から隔離出来ている事がわかった（図3）。また、組織回収直前の眼表面の観察や組織のヘマトキシリン・エオジ

ン染色において、顕著な血管侵入等は観察されなかった(図4)。

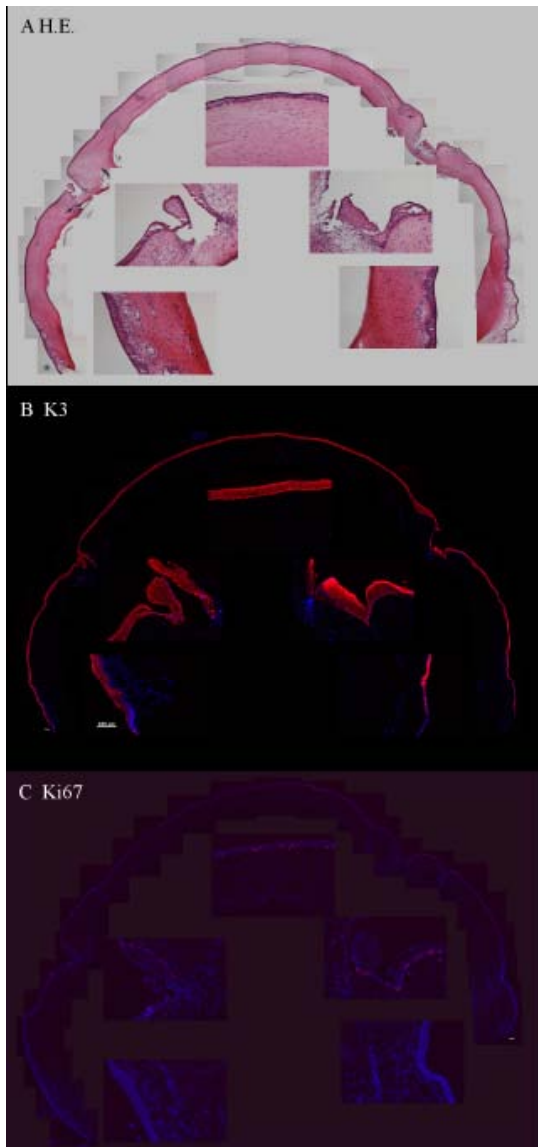


図3 リング移植3週間後の免疫染色

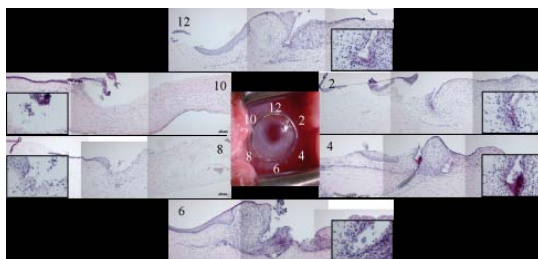


図4 リング移植後の組織

角膜上皮の幹細胞が存在する輪部から隔離されたリング内の上皮はリング移植6ヶ月後

においても存在していた。これにより、角膜上にも増殖能の高い未分化な細胞(前駆細胞もしくはTA細胞)が存在し、半年以上かけて、ターンオーバーしている事が考えられた。さらに、角膜上皮基底細胞(TA細胞)の動向を観察するため、作成した角膜上皮創傷治癒モデルのリング内に4、5、6mmの上皮欠損を作成し、その上皮化能力を観察した。上皮化は4mmで平均4回、5mmで平均0.75回、6mmで平均0.33回であり、上皮欠損の面積が増えるに伴って上皮化回数が減少する傾向が観察された。この傾向は4mmから5mmで優位に減少していたが5mmから6mmでは優位さは認められなかった(図5)。これによって、今まで不明であったTA細胞の動向を解析することが可能になったと考えられる。

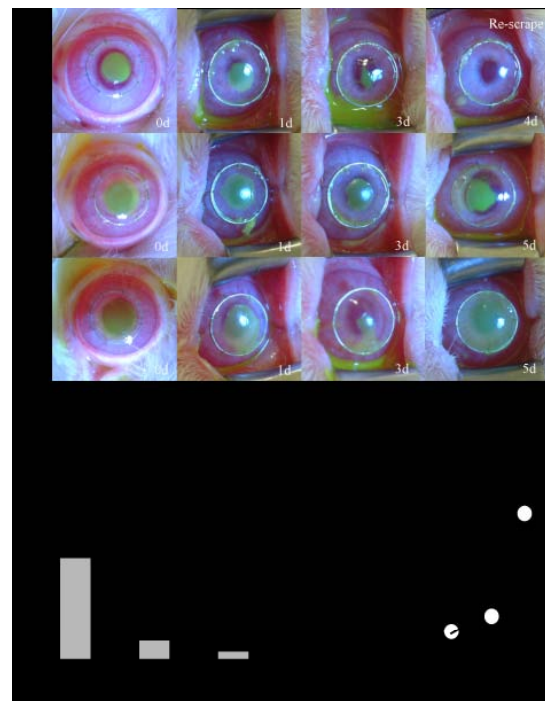


図5 角膜上皮創傷治癒モデル

次にTA細胞の予備能を検討するため、移植したリング内の上皮のコロニー形成能(CFE)について移植直後、1週間後、5週間後と経時的に観察した。また、リングを移植すること

による神経への影響を観察するため、移植後の角膜知覚を測定した。さらに、リング内における神経の分布を観察するため、 $\beta$ III-チューブリンの免疫染色を行った。移植直後においてリング内の角膜上皮は約25%のCFEを示したのに対し、1週間後においては約8%にまで減少したが、その後5週間後においても約8%のCFEを維持していた(図6)。

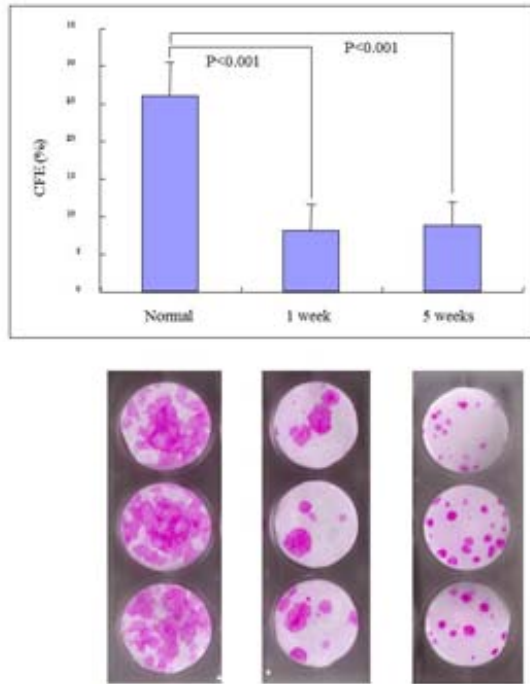


図6 リング内上皮のCFE

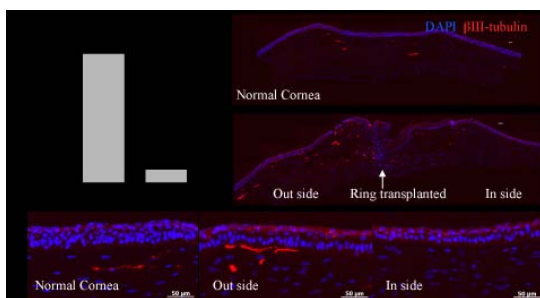
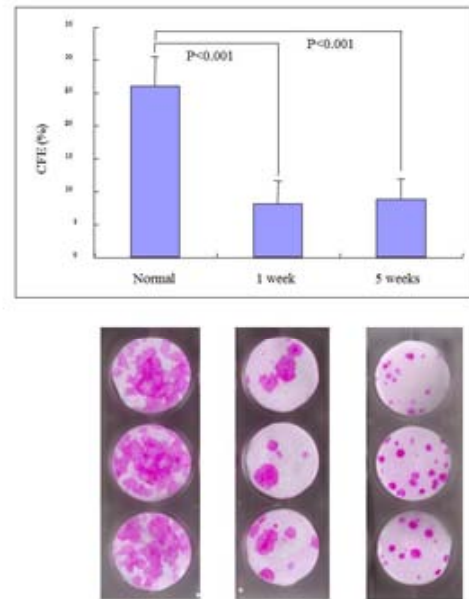


図7 リング移植後の知覚と $\beta$ III-チューブリンの免疫染色

一方、金属リングを移植した角膜の知覚は正常角膜の約1/9である0.6cmにまで減少していた。また、 $\beta$ III-チューブリンにおける免疫染色では角膜輪部から金属リング移植部分

までは正常の角膜と同様に陽性像が観察されたが、リング内においてはほとんど陽性像を



[学会発表] (計1件)

Kawakita T, Shimmura M, Higa K, Shimazaki J, Tsubota K. The fate of trans-amplifying cells analyzed by in vivo rabbit model with stainless ring transplantation. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), 2008, Fort Lauderdale, Florida, USA.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

榛村 真智子 (東京歯科大学・歯学部・助教)  
研究者番号: 8035244

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

川北 哲也 (慶応義塾大学・医学部・講師)  
研究者番号: 50408308  
比嘉 一成 (慶応義塾大学・医学部・共同研究員)  
研究者番号: 60398782