

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09791

研究課題名(和文) レックリングハウゼン病遺伝子Nf1を応用した角膜実質透明治療に向けた治療戦略確立

研究課題名(英文) Establishment of therapeutic strategy for corneal stromal scarring treatment by applying the NF1 (von Recklinghausen disease) gene.

研究代表者

白石 敦 (Shiraishi, Atsushi)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90314963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：角膜実質混濁は高度の視機能低下を招き、QOLを低下させる。内眼手術後や、角膜外傷後に起きる角膜実質混濁の機序は炎症反応の遷延、実質細胞の不規則な増生と形態異常など様々である。一方、神経線維腫症I型は頻度の高い遺伝疾患である。我々は神経線維腫症 型の上皮剥離後に上皮欠損の遷延と実質の混濁を来した症例を経験した。原因遺伝子のNf1を実質細胞でノックアウト後に角膜上皮を欠損させるとヒト角膜と同様の所見を呈する動物モデルを作製しバイオイメージングによる病態解析を行った結果、強い混濁を起こす群と、コントロールと差がない群が存在することが解った。Nf1以外の別の因子の影響も考慮する必要が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

角膜実質混濁は高度の視機能低下を招き、生活の質を低下させ、就業の選択範囲を狭める。実質混濁の機序は炎症反応の遷延、実質細胞(ケラトサイト)の不規則な増生と形態異常など様々である。角膜感染や角膜外傷後、角膜を透明で滑らかなドーム状の形状を取り戻すための治療は視力回復のためには不可欠であるが、現時点では、強い混濁を残した癒痕治療をする患者が一定数存在する。神経線維腫症I型患者の角膜では上皮欠損が遷延すると、実質の強い混濁が起きることを経験しており、適切な治療のためには、病態の解明が必要である。今回、そのモデルマウスが作製できたことは、今後の治療法解明に1歩前進したと考えている。

研究成果の概要(英文)：Corneal opacities, impar visual acuity and quality of life, were caused by prolonged inflammation and irregular proliferation of cornea stromal cells after epithelial defect due to intraocular surgery or corneal injuries. On the other hand, neurofibromatosis type I (NF-1), or von Recklinghausen syndrome, is a complex multi-system human disorder caused by the mutation of neurofibromin. Tissue specific neurofibromin knockout mice were made for studying the molecular mechanism of corneal clarity maintenance. Severe cornea stromal opacities were observed after epithelial defect in some of keratocyte inducible neurofibromin knockout. In the stromal opacity, ex-vivo confocal microscopy observation revealed that neutrophil leukocyte migration and transformation of keratocytes to myofibroblasts. Others of keratocyte inducible neurofibromin knockout corneas showed same clarity as non-induced control corneas. Unknown factors should be considered in this mouse models.

研究分野：角膜

キーワード：角膜実質 ケラトサイト レックリングハウゼン病 バイオイメージング 透明治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

角膜実質は角膜厚の約 90% を占め、透明で強靱なドーム形状を保持するための重要な組織である。角膜実質の混濁は感染、外傷、免疫異常など、原因は様々であるが、高度になると、社会的失明の危機に陥る。角膜実質の混濁の治療法は、現在のところ角膜移植しかない。角膜移植は確立された方法ではあるが、拒絶反応、感染のリスクが付きまとうため、混濁を残さない治癒を目指す必要がある(学術的背景)。一方、神経線維腫症 I 型(レックリングハウゼン病)は神経線維腫(シュワン細胞腫瘍)とカフェオレスポットを特徴とする常染色体優性遺伝の疾患である。

その原因遺伝子 neurofibromin1(Nf1 : 283kb, 58exon)は、Ras 蛋白の機能を制御して細胞増殖 Ras/MAPK 経路の活性化と PI3K/AKT 経路の活性化による細胞増殖を抑制すると考えられているが、そのメカニズムは不明な点が多い。Nf1 ノックアウトマウス(Nf1^{-/-})は大動脈管遺残により、胎児死亡する。シュワン細胞のみのノックアウト(Krox20Cre/Nf1^{flox/flox})では神経線維腫は発生せず、片方の allele を全身で Nf1 をノックアウト(Krox20Cre/Nf1^{flox/-})すると肥満細胞が浸潤して神経線維腫が生じることからも、Nf1 の働きが単純な細胞増殖抑制ではなく、炎症刺激に対する応答異常など、未知の機能に加えて、全身組織との相互作用を解析する必要がある。

我々は神経線維腫症 型の上皮剥離後に上皮欠損の遷延と実質の混濁を来した症例を経験した。Nf1 を loxP element で挟んだ、Nf1^{flox} は米国 Jackson Lab で購入可能であり、上皮特異的 Cre 発現マウス(K5Cre)、角膜実質細胞(ケラトサイト)特異的 Cre 発現マウス、タモキシフェン注射でケラトサイトに Cre を発現できるマウス、Cre を発現した細胞群に Enhanced green fluorescent protein (EGFP) をそれ以外の細胞には tdTomato を発現するマウスを組み合わせることで、Nf1 欠損組織における細胞の形態を観察し、Nf1 の角膜透明治癒の役割を解明できると考えた。

2. 研究の目的

Nf1 の角膜透明治癒の役割を明らかにするためには、培養系などで単純化した実験系では病態解明に繋がる可能性は低く、全身組織との相互作用を実験系に組み入れたバイオイメージングの応用が必要である。近年開発された、細胞増殖をイメージングするプロンプトと組織特異的 Cre により、色分けされた細胞膜を持つ個体で、細胞増殖イメージングと細胞の由来と形態変化を同時に観察することで、Nf1 による角膜透明治癒の役割を明らかにすることで、瘢痕を残さない治療法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

遺伝子組換え研究については、遺伝子組換え生物等の実験計画及び、遺伝子組換え生物の第二種使用に係る拡散防止措置を、愛媛大学大学院医学系研究科等遺伝子組換え実験安全管理規定に基づく安全委員会より承認を得た。(承認番号: 医動 28-19、医 27-6、医 27-18、医 25-21)

実験動物の扱いについても、愛媛大学動物実験規則に基づく愛媛大学動物実験委員会からの承認が得られており(承認番号: 05-HA-75、05-HA-76)、The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) の Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research を遵守し、3R(Replacement, Refinement, Reduction)の原則を遵守して遂行した。

Nf1(*loxP-pgkNeo-exon41-exon42-loxP*) (Strain #: 017639RRID: IMSR_JAX:017639) (Nf1^{flox}) マウスは Jackson Lab より購入、K5Cre (Tg(KRT5-cre)1Tak) は大阪大学より譲渡された。Keratocan-*IRES2-nlsCre* (KINC)、Keratocan-*IRES2-CreERT2* (KICE) および ROSA26 (CAG-*loxP-pgkNeo-loxP-mVenus-hGem(1/110)-IRES2-mCherry-hCdt1(30/120)*) (ROSA26^{FUCCI2}) マウスは以前の科研費(基盤 C 17K11452)をもとに作製したものをを使用した。

Nf1^{flox} マウスを ROSA26^{FUCCI2} マウスと交配し、GeneAmp® 9700 PCR システムを用いて

genotyping を行い、Nf1^{flox/flox} /ROSA26^{FUCCI2 / FUCCI2} のマウスコロニーを確立した。K5Cre マウス、KINC マウス、および KICE マウスを Nf1^{flox/flox}/ROSA26^{mTmG / mTmG} および Nf1^{flox/flox} /ROSA26^{FUCCI2 / FUCCI2} と交配し、6 種類のマウス (n=6) K5Cre/ Nf1^{flox/flox} /ROSA26^{mTmG / wild}、KINC/Nf1^{flox/flox} / ROSA26^{mTmG / wild}、KICE /Nf1^{flox/flox} /ROSA26^{mTmG / wild}、K5Cre/ Nf1^{flox/flox} /ROSA26^{FUCCI2 / wild}、KINC/Nf1^{flox/flox} / ROSA26^{FUCCI2 / wild} および KICE /Nf1^{flox/flox} / ROSA26^{FUCCI2 / wild} とそのコントロール (Nf1^{flox/wild}) を作製した。KICE に対しては、2 週齢において tamoxifen (0.25mg/g・body weight (in corn oil)) を腹腔投与した (ケラトサイトのみ loxP で挟まれた遺伝子を摘みとる)。これらのマウスを生後 12 週齢まで、愛媛大学学術支援センター動物部門の specific-pathogen-free room で管理し、全身麻酔下 (塩酸メドミジン 0.3mg/kg+ミダゾラム 4mg/kg+酒石酸ブトルファノール 5mg/kg を腹腔内注射) 手術用顕微鏡 (Leica, M715) で観察しながら右角膜中央直径 2 mm の上皮剥離を作製した。実体顕微鏡 (Zeiss Lumar.V12 Stereoscope) で角膜上皮欠損面積の計測と実質混濁状態を 7 日目まで記録した。共焦点顕微鏡 (Nikon A1R confocal microscope) で 1 日後から 7 日後までケラトサイト、上皮、炎症細胞、神経の形態とケラトサイト及び角膜上皮細胞の増殖をコントロールと比較検討した。

4. 研究成果

KICE /Nf1^{flox/flox} /ROSA26^{mTmG / wild}Nf1 tamoxifen 投与群で上皮治癒の遷延と強い実質混濁を伴う癒痕化を確認した。これに対する 2 つのコントロール KICE /Nf1^{flox/flox} /ROSA26^{mTmG / wild} corn oil 投与群と KICE /Nf1^{flox/wild} /ROSA26^{mTmG / wild} tamoxifen 投与群では、上皮治癒の遷延と強い実質混濁ともに認めなかった。K5Cre/ Nf1^{flox/flox} /ROSA26^{mTmG / wild} 群、KINC/Nf1^{flox/flox} / ROSA26^{mTmG / wild} 群はそのコントロールである K5Cre/ Nf1^{flox/wild} /ROSA26^{mTmG / wild} 群、KINC/Nf1^{flox/wild} /ROSA26^{mTmG / wild} 群との間に差を認めず、上皮は 36 時間以内に被覆し、軽度の実質混濁を残して治癒した。

共焦点顕微鏡による観察では KICE /Nf1^{flox/flox} /ROSA26^{mTmG / wild}Nf1 tamoxifen 投与群 (n=6) のうち 3 個体で、好中球が浸潤し、過剰な炎症反応が遷延して、線維芽細胞様に形態変化した EGFP 発現細胞が増殖し、上皮欠損 7 日後には増生した EGFP 発現細胞で実質が混濁することを観察した。残る 3 個体では、コントロールである KICE /Nf1^{flox/flox} /ROSA26^{mTmG / wild} corn oil 投与群と KICE /Nf1^{flox/wild} /ROSA26^{mTmG / wild} tamoxifen 投与群との間に差を認めなかった。

tamoxifen で誘導された KICE /Nf1^{flox/flox} と KINC/Nf1^{flox/flox} の違いは、後者が周辺部の実質細胞まで遺伝子が摘み取られていることにあり、周辺部の実質細胞の役割については不明である。上皮擦過前の tamoxifen 投与では KICE /ROSA26^{mTmG} の緑細胞がケラトサイト由来であることを示し、上皮擦過後のタイミングでの tamoxifen 投与では KICE /ROSA26^{mTmG} の緑細胞が Keratocan 発現 (ケラトサイト分化した) 細胞であることを示す。線維芽細胞様に形態変化したケラトサイトの増殖は、形質転換により、混濁を生じていることを示しておりさらなる研究が必要である。KICE /Nf1^{flox/flox} /ROSA26^{mTmG / wild}Nf1 tamoxifen 投与群でも半数で混濁を生じなかったことは、上皮欠損の遷延と深く関わっていると考えられる。上皮欠損が 36 時間以内に消失しない場合、ケラトサイト由来と考えられる EGFP 発現細胞が増殖し、実質が癒痕治癒することが解った。臨床による経験例でも、硝子体手術後 1 週間以上、上皮欠損が残存していたことも KICE /Nf1^{flox/flox} /ROSA26^{mTmG / wild}Nf1 tamoxifen 投与群の結果と合致する。神経線維腫症 I 型では、手術時に角膜上皮欠損を作らないよう手術の方法を考慮し、術後の角膜上皮欠損は可能な限り、早く修復させるため、ソフトコンタクトレンズの装用や、防腐剤フリーの点眼を使用するなど工夫が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	林 康人 (Hayashi Yasuhiro) (70314953)	愛媛大学・医学部・研究員 (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関