

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861657

研究課題名(和文) 炎症惹起時の角膜幹細胞への影響 神経栄養因子を介し、炎症から防御する可能性

研究課題名(英文) Effect of the corneal stem/progenitor cells during the corneal inflammatory cell infiltration

研究代表者

上野 宏樹 (Ueno, Hiroki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：30529897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：炎症細胞浸潤を誘導するためにまずマウス角膜に11-0ナイロン縫合糸を2針設置した。角膜stem/progenitor細胞と角膜三叉神経を経時的に定性・定量解析したところ著しく減少していた。それゆえにニッチェ(niche)を構成している角膜stem/progenitor細胞また角膜三叉神経が維持されるためには炎症因子が重要な役割を担っていると考察された。

研究成果の概要(英文)：Two corneal sutures were placed with 11-0 nylon between the mouse corneal center and the limbus to induce the inflammatory cell infiltration. As a result of determining the chronological change qualitatively and quantitatively, both corneal nerves and corneolimbic stem/progenitor cells are significantly reduced after infiltration of inflammatory cell. Therefore, the data suggest a critical role of inflammation in maintaining corneal stem/progenitor cells that formed the corneal stem cell niche and/or the corneal nerve.

研究分野：眼科

キーワード：角膜stem/progenitor細胞 角膜三叉神経 角膜Side population 炎症細胞 IL-1 TNF-

### 1. 研究開始当初の背景

本研究では角膜幹細胞が生体内で生存、機能していくにあたり、炎症は重要な阻害因子であるという仮説の下、マウス角膜炎症モデルを用いてそのメカニズムを詳細に解明していくことが研究目標であった。

### 2. 研究の目的

マウス角膜炎症モデルを用いた幹細胞の機能解析として、角膜にナイロン糸を縫合し炎症を惹起させ、術後経時的に角膜を採取し、幹細胞の定量・機能解析を試みることで、炎症を介しての角膜三叉神経と角膜幹細胞への影響・関連性を調査することである。

### 3. 研究の方法

研究手法としてはC57BL/6マウス角膜に11-0ナイロン糸を2針通糸し角膜内に炎症を惹起させ、術後7、14日目に角膜を採取した。コントロールには通糸をしない正常角膜を用いた。さらに角膜内の炎症が沈静化した後の幹細胞の変化を検討するために11-0ナイロン糸を通糸し、7日後に抜糸を施行し、抜糸後7日目の角膜の幹細胞の変化も合わせて調査した。これらの採取した角膜を用いて幹細胞の蛋白定量のために、フローサイトメトリーによるSide populationの測定を行った。またReal-time PCRにてmRNAの定量を、免疫組織染色等の手法を用いて蛋白定性も同様に行った。

### 4. 研究成果

mRNAにおいて角膜炎症モデルマウスのATP-binding cassette subfamily G member 2 (ABCG2), hairy enhancer of split 1 (Hes1), Keartin15は正常眼と比較し、有意差のある著しい減少は見られなかった。しかし蛋白発現における定性的な結果として、角膜炎症モデルマウスにおける角膜三叉神経に対してIII-tubulinで免疫染色を行ったところ、

正常眼と比較して特に角膜 sub-basal nerve 層の神経密度が減少し、また形状においても屈曲・途絶の著しい減少が観察された。更に角膜 stem/progenitor 細胞のマーカーとして考えられている ABCG2, Hes1, Keartin19 においても角膜縫合糸を置いて炎症を惹起させた群は発現部位が低下もしくは減弱していた。また角膜幹細胞定量測定の方法として、各群の角膜 (各 n=6) をコラゲナーゼ処理し、角膜細胞を単一化させ、その細胞を Hoechst33342 で染色後 Side population をフローサイトメーターにて解析した。一部の角膜は角膜上皮と実質を EDTA にて分離し角膜上皮細胞のみを染色し同様の手法でも比較を試みた。また炎症細胞を除いて測定するために CD45 を同時染色し、CD45(-) 細胞の Side population の割合も検討して評価した。その結果、術後7日目、14日目とも正常角膜 Side population に比べ約80%と著しく減少していることが認められた。

### 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 6 件)

1) Hiroki Ueno, Takaaki Hattori, Yuta Kumagai, Noboru Suzuki, Satoki Ueno, Hitoshi Takagi. Alterations in the corneal nerve and stem/progenitor cells in diabetes: preventive effects of insulin-like growth factor-1 treatment. Int J Endocrinol. 2014;2014:312401. 査読有

2) 松村綾子, 松澤亜紀子, 上野宏樹, 宮本純輔, 高木 均. 前眼部 OCT を用いた角膜潰瘍の観察. 臨床眼科 2014; 68: 983-987. 査読有

3) Giulio Ferrari, AR Hajrasouliha, ZP Sadrai, Hiroki Ueno, Sunil K. Chauhan SK, Reza Dana. Nerves and Neovessels Inhibit Each Other in the Cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013;54:813-820. 査読有

4) 松澤 亜紀子, 工藤 昌之, 針谷 明美, 上野 宏樹, 上野 聰樹. 光干渉断層計を用いたソフトコンタクトレンズの観察. 日本コンタクトレンズ学会誌 2013;55:79-85. 査読有

5) Akira Shiono, Jiro Kogo, Klose G, Hiroyuki Takeda, Hiroki Ueno, Naoto Tokuda, Jun Inoue, Akiko Matsuzawa, Naoyuki Kayama, Satoki Ueno, Hitoshi Takagi. Photoreceptor Outer Segment Length: A Prognostic Factor for Idiopathic Epiretinal Membrane Surgery. Ophthalmology. 2013;120 : 788-794. 査読有

6) Giulio Ferrari, Hiroki Ueno, Fabio Bignami, Paolo Rama, Reza Dana. Trigeminal stereotactic electrolysis induces dry eye in mice. Acta Ophthalmologica. 2013;91:e162-3. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

1) 服部貴明、上野宏樹、舟木俊成、後藤浩、Reza Dana. 角膜実質細胞により骨髄細胞から誘導された樹状細胞の機能解析, 第120回日本眼科学会, 2016年4月8日. 仙台国際センター(宮城県仙台市)

2) 服部貴明、上野宏樹、舟木俊成、後藤浩、Reza Dana. 角膜実質細胞には骨髄細胞から樹状細胞を誘導する機能がある, 角膜カンファランス 2016, 2016年2月19日. 軽井沢プリンスホテルウエスト(長野県北佐久郡)

3) Ueno Hiroki, Hattori Takaaki, Kumagai Yuta, Suzuki Noboru, Ueno Satoki, Takagi Hitoshi. Alterations in the corneal nerve in type 2 diabetes: preventive effects of insulin-like growth factor-1 treatment. The Association for Research in vision and Ophthalmology, 2014年5月4日. Orlando (USA)

4) Akiko Matsuzawa, Hiroki Ueno, Chizuko Sasaki, Akemi Harigaya, Hitoshi Takagi. Scanning Electron Microscope Observation of Colored Cosmetic Contact Lenses Using Ionic Liquid. WOC2014, 2014年4月2日. 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

5) 上野宏樹、服部貴明、熊谷悠太、上野聰樹、高木均. 重症糖尿病角膜症での幹細胞障害, 角膜カンファランス 2014, 2014年1月30日. 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

6) 松村綾子, 上野宏樹, 宮本純輔, 松澤亜紀子, 高木 均. 前眼部光干渉断層計を用いた角膜潰瘍の観察. 第67回日本臨床眼科学会, 2013年11月2日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

7) Ueno Hiroki, Hattori Takaaki, Kumagai Yuta, Suzuki Noboru, Ueno Satoki. Evaluation of Corneal Stem/Progenitor Cells in leptin deficient mice. The Association for Research in vision and Ophthalmology, 2013年5月5日. Seattle (USA)

8) 松村綾子, 上野宏樹, 宮本純輔, 松澤亜紀子, 高木 均. 前眼部光干渉断層計を用いた角膜潰瘍の観察, 第5回神奈川眼科学会, 2013年5月25日. ホテル横浜キャメロットジャパン

(神奈川県横浜市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

上野宏樹 (UENO, HIROKI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：30529897