

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19592024
 研究課題名（和文） 創傷治癒過程における骨髄由来実質細胞とルミカンの役割
 - 美しい治癒をめざして
 研究課題名（英文） Role of Bone marrow derived cells and Lumican in cornea wound
 healing; For the beautiful healing.

研究代表者 大橋 裕一 (OHASHI YUICHI)
 愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：00116005

研究成果の概要：創傷治癒は生体防御において最も重要な過程であり、なかでも上皮のすみやかな修復は瘢痕を残さない美しい治癒を達成するために不可欠である。すみやかな上皮の修復には実質細胞とのクロストークが重要であることは最近の研究からも明らかとされつつあり、実質細胞の果たす役割を解明することが治療の質を向上させることにつながると考えられる。以前より、Lumican が角膜上皮の創傷治癒に重要な役割をはたしていることは報告されていたが、上皮の epidermal mesenchymal transition によるものか、実質が発現する Lumican による働きが重要であるかは不明であった。そこで我々は骨髄移植の方法を用いることにより、上皮と実質のキメラを作成し、それぞれの役割を明らかとするための研究を行った。その結果、Lumican wild type(Lum+/+) の骨髄移植を Lumican knockout (Lum-/-)に行うと、創傷治癒が促進されることがわかった。また Lum+/+ の C57BL/6-Tg(CAG-GFP) の好中球 (PMN: polymorphonuclear neutrophil leukocyte) を Lum-/- に移植した後、角膜実質に lysosome に捕食されると red fluorescein を発現する Staphylococcus aureus を注入した感染実験では、移植された PMN が細菌を貪食するのが Lum+/- の角膜実質比べて少ないことが確認された。角膜実質に存在する Lumican は PMN の浸潤を招き、角膜の透明治癒を妨げる結果となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：ルミカン、ケラトカン、創傷治癒、PMN、ノックアウト、骨髄移植、GFP、キメラ

1. 研究開始当初の背景

Lumican は、Keratocan ほぼ同じ構造を有するが、Keratocyte のみに発現する

Keratocan と異なり、角膜実質や強膜のほか、骨髄、胎盤、脳、肝臓、腎臓、脾臓、大動脈、軟骨、骨格筋などに豊富に存在する細胞外基

質成分である。Lumican の最も重要な役割は collagen fibril を束ねることで張力ストレスに対する抵抗性を作り出すことにあるが、最近では細胞間の情報伝達を行うマトリカインとして脚光を浴びており (Lumican は Keratocan を誘導することもわかっている)、生理的存在意義がさらに拡大している。この Lumican を knock-out したマウスでは角膜上皮の創傷治癒遅延が認められる。しかし従前の knock-out マウスによる遺伝子解析では角膜上皮、実質ともに目的の遺伝子を失うため、相互作用の解析には限界があった。骨髄移植により角膜上皮と実質骨髄由来細胞の chimera 動物 (角膜上皮あるいは実質骨髄由来細胞のみの knock-out マウス) を作成することで、実質内に出現、存在する細胞が角膜上皮および実質創傷治癒においてどのような役割を演じているのかについて明らかにできる。マウスの創傷治癒過程においては PMN、Macrophage、Keratocyte の役割 (実質細胞の遺伝子発現) が重要であると考えられる。遺伝子導入が容易な骨髄由来細胞の役割を明らかにすることは将来的には角膜実質の遺伝子治療を可能とするものである。Lumican は上皮の速やかな治癒に関わっている可能性があり、角膜透明治癒との関わりが注目されている。皮膚における創傷治癒の研究では出血を伴うため解析が困難であり、よりシンプルな系が求められる。その点、角膜は上皮の修復過程に出血を伴わず、上皮と実質のクロストークを解明するための生きた試験管となりうる。マウス角膜実質細胞の多くは骨髄由来であり、異なる個体からの骨髄移植によりキメラを作ることが可能である。角膜組織の大部分を占める角膜実質は、角膜上皮や内皮とは異なり、代謝的にも、機能的にもシンプルな組織と考えられがちである。しかしながら、角膜上皮欠損の治癒機転には

角膜実質細胞からの種々の増殖因子やサイトカインが関与するという報告もあり、また屈折矯正手術のひとつである PRK (Photorefractive keratectomy) では、照射面の創傷治癒の進行とともに線維芽細胞の活性化による上皮下混濁 (ヘイズ) が生じることが知られているが、これも上皮 実質間に相互作用が存在することを示唆する。また角膜上皮欠損にともなう細菌感染は角膜の透明治癒を妨げる最も大きな原因であるため、Lumican の細菌感染時の役割についても注目すべきである。

2. 研究の目的

近年、マウス角膜実質細胞のうち少なくとも 3 割以上は骨髄由来であることが報告された。また、上皮欠損作成後には、本来実質に存在した細胞は消退し、その後は骨髄由来の細胞が遊走し、実質内を占めるようになることが明らかとなってきた。しかも反応はすみやかで、マウスに上皮欠損作成後 5 分以内に、欠損上皮の最先端付近の実質最表層に PMN が出現することが判明している。このことより、実質に出現した細胞が上皮創傷治癒機転に何らかの役割を演じていることがうかがわれるが、詳細は不明であった。骨髄移植された細胞が Keratocyte になりうるかという疑問があり、現在角膜研究者の間では再生医療につながる研究として最もホットなトピックである。また、全層角膜移植後の graft-host 間の創傷治癒には実質細胞が重要な役割を果たしているが、角膜移植後も比較的容易に graft を host 角膜から乖離できるなど、その創傷治癒反応は上皮などにおけるほど活発なものではない。この

現象は実質細胞の活性の低い水疱性角膜症眼ではより顕著であり、角膜移植における課題のひとつとして残されている。角膜上皮と角膜実質で Lumican knockout(以後 Lum^{-/-}と略する)と Lumican wild type(以後 Lum^{+/+}と略する)のキメラをすることにより、上皮及び実質の Lumican が創傷治癒とどのように関わっているかを明かとする。また創傷治癒時に出現する PMN、Macrophage、Keratocyte の役割を検討する。

3 . 研究の方法

Lum^{-/-}-マウスを Jackson Lab より購入した TgN(GFP)5Nagy (chicken beta-actin promoter と CMV intermediate early enhancer により Green Fluorescent Protein(GFP)を発現するマウス) と交配した。しかし今回購入した TgN(GFP)5Nagy は GFP 発現が不十分であり、我々が購入した蛍光実体顕微鏡では、角膜実質細胞の識別が困難であったために、日本 SLC より購入した C57BL/6-Tg(CAG-EGFP) (以後 EGFP^{tg}と略する)に変更した。EGFP^{tg}を Lum^{-/-}と交配して、この時に得られた Lum^{-/-};EGFP^{tg}を骨髄と PMN の採取に、EGFP の入らなかったマウス(EGFP wt)を host として使用する。5 週齢の Host マウスに文献のとおり7Gy の X 線照射を行ったが、放射線障害が強く出てしまったため、4 Gy の照射に変更して実験を行った。4 日後に litter mate の Lum^{-/-};EGFP^{tg}もしくは Lum^{+/+};EGFP^{tg}マウスの骨髄細胞を大腿骨及び脛骨より採取し、尾静脈より注入した。骨髄細胞注入7日後に末梢血のスミアを作成し、白血球が graft 由来であることを確認して実験に使用した。

これらの骨髄移植後マウスに対して、直径 2mm の角膜上皮欠損を作成し、創傷治癒過程を検討した。また Lum^{-/-};EGFP^{tg}と Lum^{+/+};EGFP^{tg}の PMN を 2 %カゼイン注入後2時間の腹腔内より採取し、静脈内に投与し、角膜実質に貪食されると蛍光を発現する Staphylococcus aureus(S. aureus) である pHrodo S.aureus BioParticle®(Invitrogen) を Lum^{+/+}と Lum^{-/-}の角膜実質内に 1 μl 注入し感染実験を行った。

4 . 研究成果

Lum^{+/+};EGFP^{tg}の骨髄を Lum^{-/-} に移植すると、創傷治癒が促進される。逆に Lum^{-/-};EGFP^{tg}の骨髄移植を Lum^{+/+}に行っても、創傷治癒が遅延することはなかった。Western blot や immunohistochemistry では Lum^{+/+};EGFP^{tg}の骨髄を Lum^{-/-} に移植すると角膜実質に Lumican 蛋白の発現を認めており、Lum^{-/-};EGFP^{tg}の骨髄移植を Lum^{+/+}に行った場合にも同様の結果を得た。このことは角膜実質に発現する Lumican 蛋白が角膜上皮の創傷治癒にとって重要であることを示していると考えられる。Lum^{+/+}の GFP 陽性 PMN を Lum^{+/+}の尾静脈に注入した後に、角膜実質に pHrodo S.aureus BioParticle®を注入すると角膜実質は pHrodo S.aureus BioParticle®を貪食した PMN で満たされ、角膜の透明治癒を損なうことが解った。Lum^{+/+}の GFP 陽性 PMN を尾静脈に注入した Lum^{-/-}角膜実質に pHrodo S.aureus BioParticle®を注入した場合には PMN の浸潤はまばら(図 1)で代わりに Macrophage が pHrodo S.aureus BioParticle®を貪食し、角膜は透明治癒した。角膜実質の PMN 侵入には Lumican 蛋白が必要であると考えられる。(図 2)

図1

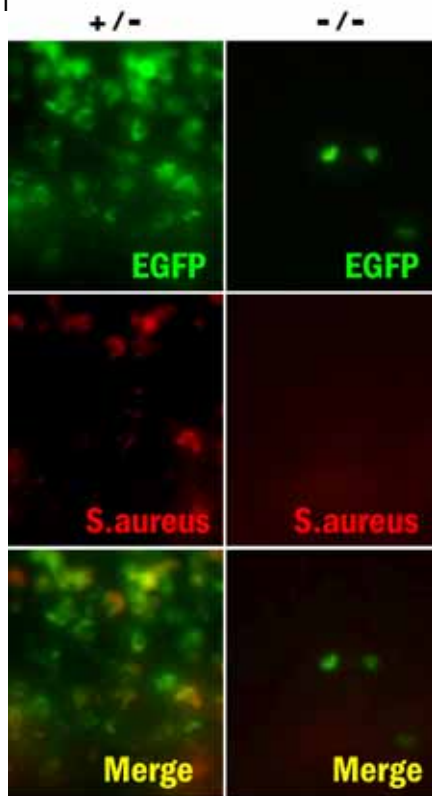
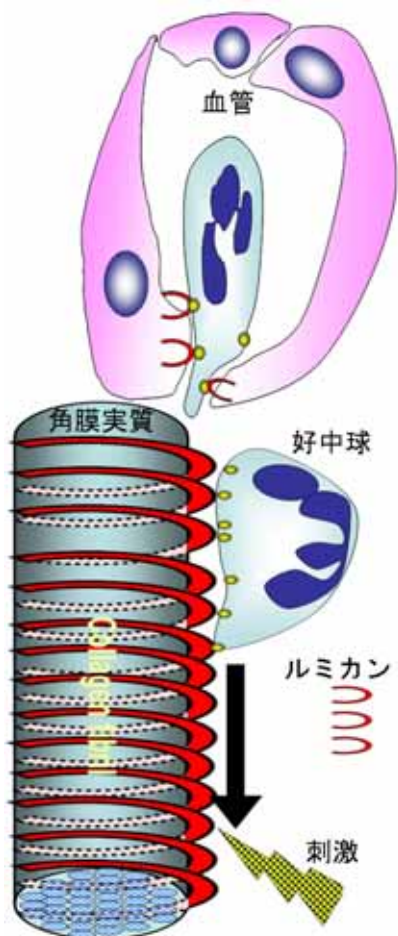


図2



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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大橋裕一(OHASHI YUICHI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00116005

(2)研究分担者

白石 敦(SHIRAISHI ATSUSHI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・

寄附講座准教授

研究者番号：90314963