

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K09463

研究課題名（和文）糖尿病誘引の慢性炎症による角膜幹細胞と神経への影響-マクロファージの動態に着目-

研究課題名（英文）Effects of chronic inflammation with diabetes on corneal stem cells and corneal nerves

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：近年の研究により、肥満に伴うインスリン抵抗性や2型糖尿病の発症には、慢性的な炎症や免疫系の活性化が関与していることが徐々に明らかになってきた。本研究の目的は2型糖尿病による慢性炎症の観点から角膜幹細胞と角膜三叉神経への影響を評価することである。糖尿病モデルマウスにマクロファージ枯渇薬の結膜下注射を施行した群は神経のマーカーである β -tubulin の発現が正常マウス群と似た角膜上皮下神経叢の所見を示した。以上のことから重症2型糖尿病に対して糖尿病角膜障害をきたした際、マクロファージ枯渇薬を用いることで三叉神経支配である角膜上皮下神経叢障害保護の可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性炎症状況下に置かれている角膜神経・角膜幹細胞に対する影響の解明は、重度糖尿病角膜症や混濁を伴う角膜ヘルペス等の角膜三叉神経関与疾患の治療を行う際に今後極めて有用である。幹細胞培養臓器移植は今後更に臨床応用されていく可能性を秘めているが、長期予後考えた際幹細胞を維持し機能させる環境因子の補充だけでなく、炎症等の阻害因子の除外も重要である。本研究は特に慢性炎症という環境因子に注目し角膜三叉神経・角膜幹細胞を含んだニッチの機能維持を阻害する炎症メカニズムが解明できれば、幹細胞疲弊症の治療や自己幹細胞移植後の治療に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Recent studies have gradually made it clear that a chronic inflammation and an activation of the immune system are involved in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and type 2 diabetes. The purpose of this study is to evaluate the effects of corneal stem cells and corneal trigeminal nerve in terms of chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes. The group of diabetic mice treated with subconjunctival injection of liposomal clodronate showed sub-epithelial corneal plexus similar to that of normal mice in terms of expression of β -tubulin, a marker of nerves. These results suggest that macrophage-depleting drugs may protect against corneal sub-epithelial nerve plexus damage in severe type 2 diabetes when diabetic corneal damage occurs.

研究分野：眼科

キーワード：糖尿病 角膜三叉神経 慢性炎症 角膜幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メタボリック症候群の発症基盤である内臓脂肪の肥満に關与する糖尿病合併症は、癌や自己免疫疾患等にも共通する慢性炎症性変化の一種として近年捉える事ができるとされる。糖尿病による高血糖が誘引で各臓器の実質細胞にストレスがかかり、内因性の炎症反応を惹起するシグナルが増加して寄与するマクロファージや血管内皮等の反応性が亢進状態になると組織の恒常性維持のバランスを崩す。その結果実質臓器内での炎症反応が慢性的に持続し、最終的には不可逆的な組織障害へと移行する可能性がある。また肥満からインスリン抵抗性更に糖尿病が惹起されるが、肥満の脂肪組織では TNF- α や IL-6 等の炎症性アディポサイトカインの産生が亢進し、アディポネクチンのような抗炎症性アディポサイトカインの産生は減少していることが解明されてきた。

一方眼科領域特に角膜分野に焦点を当ててみると、高血糖状態は角膜の樹状細胞侵入につながり、肥満はこの免疫反応を更に悪化させると Leppin K らは報告した (IOVS:2014)。樹状細胞と角膜三叉神経の間の直接的な関わりは、糖尿病の角膜の多発神経障害への寄与している要因であるとされ、神経繊維の損傷のトリガーとなる事が想定できると結んでいるが詳細なメカニズムは依然解明できていない。以上を踏まえて我々は特に糖尿病による慢性炎症性変化に注目し、角膜輪部環境 (ニッチ) における詳細なメカニズム解析を追及する。生体内で炎症が遷延化された際、特にマクロファージの動態に着目しながらサイトカインを介した角膜三叉神経と角膜幹細胞の相互間の影響を明確にすることを旨とした。

2. 研究の目的

本研究の目的は糖尿病もしくはメタボリック症候群の状況により誘引された慢性炎症は角膜三叉神経と角膜幹細胞に対して阻害因子であるという仮説のもとに、糖尿病モデルマウスを用いて重症糖尿病を仮想し、慢性炎症反応誘導時のケモカイン、炎症性サイトカイン、抗炎症性サイトカインの経時的評価、更に角膜幹細胞、角膜三叉神経に対する影響を検討することである。

3. 研究の方法

はじめに糖尿病マウスに高脂肪含有飼料で飼育したところ、血糖値が正常マウス群は 136.5 ± 13.2 mg/dL に対して、糖尿病モデルマウス群は 565.0 ± 39.5 mg/dL であった。また過去 1 から 2 か月の平均的血糖状態を反映する HbA1c 値においても正常マウス群は 4.1 ± 0.3 mg/dL に対して、糖尿病モデルマウス群は 9.8 ± 0.6 mg/dL であり高血糖状態の安定した重症化モデル作成に成功した。

続いて慢性炎症の主因となるマクロファージを枯渇するために糖尿病モデルマウスに liposomal clodronate 結膜下注射を施行後、角膜三叉神経のマーカである tubulin 蛋白に対して免疫組織染色により経時的に共焦点レーザー顕微鏡で解析した。更に好中球の遊走における動向も免疫組織染色により、糖尿病モデルマウス群と糖尿病モデルマウスに liposomal clodronate 結膜下注射施行した群で比較確認をした。また Real-time PCR 法により対照群と比較し (a) ケモカイン (MCP-1)、炎症性サイトカイン (Tumor Necrosis Factor : TNF- α , Interferon : IFN- γ)、抗炎症性サイトカイン (Transforming growth factors : TGF- β , アディポネクチン) (b) 神経マーカー (tubulin) の差異を比較した。

4. 研究成果

糖尿病モデルマウス群と比較して糖尿病モデルマウスに liposomal clodronate 結膜下注射を

施行した群は tubulin の発現が正常マウス群と似た角膜上皮神経叢の所見を示した。更に骨髄細胞分化抗原として知られる Gr-1 は主に好中球に発現するが、蛍光免疫染色にて陽性細胞の有無を確認したところ正常群よりは減少しているが、糖尿病モデルマウス群と糖尿病モデルマウスに liposomal clodronate 結膜下注射を施行したマウス群間に有意差は認められなかった。一方糖尿病マウスに liposomal clodronate 結膜下注射を施行した群の炎症性サイトカインの mRNA 定量を Real-Time PCR にて測定したが、炎症性サイトカインである TNF- α や IFN- γ には糖尿病マウスと比較して変化を及ぼしていなかった。

以上のことから重症 2 型糖尿病に対して糖尿病角膜障害をきたした際、マクロファージ枯渇薬を用いることで三叉神経支配である角膜上皮神経叢障害保護の可能性を示唆した。これは liposomal clodronate がマクロファージ枯渇作用で慢性炎症プロセスを抑制するのみでなく、細胞内で ATP 類似体として ATP 代謝を阻害する事を踏まえると、ATP 経路を介した慢性疼痛発症メカニズムにも関与していると考察できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Narimatsu Akitomo, Hattori Takaaki, Usui Yoshihiko, Ueno Hiroki, Funaki Toshinari, Komatsu Hiroyuki, Nakagawa Hayate, Akiba Hisaya, Goto Hiroshi.	4. 巻 199
2. 論文標題 Blockade of costimulatory CD27/CD70 pathway promotes corneal allograft survival	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental eye research	6. 最初と最後の頁 108190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exer.2020.108190. Epub 2020 Aug 14.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu Jun, Suzuki Tomoko, Hirotsu Chieko, Ueno Hiroki, Takada Erika, Arimitsu Nagisa, Ueda Yuji, Wakisaka Sueshige, Suzuki Noboru.	4. 巻 63(4)
2. 論文標題 Interaction between SDF1 and CXCR4 Promotes Photoreceptor Differentiation via Upregulation of NF B Pathway Signaling Activity in Pax6 Gene-Transfected Photoreceptor Precursors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ophthalmic Res.	6. 最初と最後の頁 392-403
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000503929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Narimatsu Akitomo, Hattori Takaaki, Koike Naohito, Tajima Kazuki, Nakagawa Hayate, Yamakawa Naoyuki, Usui Yoshihiko, Kumakura Shigeto, Matsumoto Tetsuya, Goto Hiroshi.	4. 巻 9
2. 論文標題 Corneal lymphangiogenesis ameliorates corneal inflammation and edema in late stage of bacterial keratitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2984
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-39876-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu Jun, Kubota Takao, Takada Erika, Takai Kenji, Fujiwara Naruyoshi, Arimitsu Nagisa, Ueda Yuji, Wakisaka Sueshige, Suzuki Tomoko, Suzuki Noboru.	4. 巻 38
2. 論文標題 Relative abundance of Megamonas hypermegale and Butyrivibrio species decreased in the intestine and its possible association with the T cell aberration by metabolite alteration in patients with Behcet's disease (210 characters).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1437-1445
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10067-018-04419-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Jun, Yamano Yoshihisa, Kawahata Kimito, Suzuki Noboru.	4. 巻 97(42)
2. 論文標題 Relapsing polychondritis patients were divided into three subgroups: patients with respiratory involvement (R subgroup), patients with auricular involvement (A subgroup), and overlapping patients with both involvements (O subgroup), and each group had distinctive clinical characteristics.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore)	6. 最初と最後の頁 e12837
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000012837.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 村山正承 上野宏樹	4. 発行年 2022年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 3
3. 書名 アレルギーの臨床	

〔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	上野 聡樹 (Ueno Satoki) (20109010)	聖マリアンナ医科大学・医学部・名誉教授 (32713)	
研究分担者	服部 貴明 (Hattori Takaaki) (20408173)	東京医科大学・医学部・兼任講師 (32645)	
研究分担者	鈴木 登 (Suzuki Noboru) (40235982)	聖マリアンナ医科大学・医学部・教授 (32713)	

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
---------	---------