

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18902

研究課題名（和文）慢性移植片対宿主病マウスモデルを用いた角膜輪部機能不全と間葉上皮転換の関連の検討

研究課題名（英文）Investigation of the association between corneal limbal dysfunction and mesenchymal epithelial transition in a chronic graft-versus-host disease mouse model.

研究代表者

福井 正樹（Fukui, Masaki）

東京歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：30464978

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、角膜輪部機能不全の病態解明を目的とし、慢性移植片対宿主病およびアルカリ化学外傷のマウスモデルを用いて間葉上皮転換に関連するタンパク質Bone morphogenetic protein-7（BMP7）の発現を評価した。慢性移植片対宿主病モデルでは、BMP7の発現が有意に低下し、アルカリ化学外傷眼の角膜上皮化の遅延が確認された。また、アルカリ化学外傷モデルにおいても同様に上皮化遅延が見られ、BMP7の発現が低下した。この結果から、BMP7が角膜輪部機能不全・角膜上皮化の病態に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、角膜輪部機能不全の病態解明と治療法開発に一定の示唆を与えるものである

。学術的には、間葉上皮転換関連タンパク質BMP7が角膜輪部機能不全および角膜上皮化において変動することを明らかにし、新たな治療ターゲットとしての可能性を示した。社会的には、角膜輪部機能不全による失明リスクの軽減に寄与し、治療法の確立が進めば、角膜輪部機能不全患者の失明の防止や生活の質の向上に貢献することが期待される。具体的には、慢性移植片対宿主病や化学外傷などの角膜輪部機能不全疾患に対する一治療法の確立を目指すことができる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the pathophysiology of limbal stem cell deficiency by evaluating the expression of the mesenchymal-epithelial transition-related protein Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP7) using mouse models of chronic graft-versus-host disease (cGVHD) and alkali chemical injury. In the cGVHD model, a significant decrease in BMP7 expression and delayed corneal epithelialization in alkali-injured eyes were observed. Similarly, the alkali injury model also exhibited delayed epithelialization and decreased BMP7 expression. These results suggest that BMP7 plays a crucial role in the pathophysiology of limbal stem cell deficiency and corneal epithelialization.

研究分野：眼科学

キーワード：角膜輪部機能不全 間葉上皮転換 慢性移植片対宿主病 アルカリ化学外傷 BMP7

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

角膜疾患で失明の可能性があるが、病態が未解明のために治療法の確立が待たれる疾患の一つが角膜輪部機能不全である。本研究では角膜輪部機能不全に陥る疾患の一つである慢性移植片対宿主病のマウスモデルとアルカリ化学外傷のマウスモデルを用い、間葉上皮転換に関連するタンパク **Bone morphogenetic protein-7** の発現を検討することで、角膜輪部機能不全の病態の一因を考察する。

### 2. 研究の目的

角膜輪部機能不全に陥る疾患の一つである慢性移植片対宿主病のマウスモデルの解析を行う。慢性移植片対宿主病のマウスモデルを用いて間葉上皮転換に関するタンパク質 **Bone morphogenetic protein-7 (BMP7)**、**Octamer binding factor4 (Oct4)**、**SRY-Box Transcription Factor 2 (Sox2)**、**Kruppel-like factor 4 (Klf4)** の発現を免疫染色で評価する。

慢性移植片対宿主病のマウスモデルに角膜上皮擦過やアルカリ化学外傷を障害することにより、上皮化の遅延を確認する。また、**Bone morphogenetic protein-7** の発現を免疫染色で比較する。

角膜輪部機能不全のもう一つの疾患であるアルカリ化学外傷のマウスモデルの解析を行う。

アルカリ化学外傷マウスモデルを作成するにあたって野生マウスの週齢による角膜上皮細胞の **Bone morphogenetic protein-7** 発現を **real time PCR** により確認する。それに基づきアルカリ化学外傷のマウスモデルを用いて角膜の **Bone morphogenetic protein-7** の発現を角膜上皮細胞の **real time PCR** で評価する。

### 3. 研究の方法

放射線照射をした **BALB/c** マウスに同種異系である **B10.D2** マウスから採取した骨髄を移植することで慢性移植片対宿主病マウスモデルを作成した。対照群として同種同系 **BALB/c** マウスから採取した骨髄を移植することで比較対象とした。慢性移植片対宿主病マウスモデルおよび対照群の眼球を骨髄移植後 4 週で採取し、**BMP7**、**Oct4**、**Sox2**、**Klf4** の蛍光抗体で免疫染色を行い、観察する。

慢性移植片対宿主病マウスモデルおよび対照群マウスの片眼に 2mm の範囲でサージカルナイフで擦過するものと、1N の **NaOH** を浸漬させた 2mm のろ紙を 10 秒間接触させ、アルカリ外傷眼を作成する。その後の上皮化を観察し、上皮化の時間の差を確認する。また、摘出眼で **Bone morphogenetic protein-7** の免疫染色を行い、比較する。

野生マウスを生後週齢によって角膜上皮の **Bone morphogenetic protein-7** の発現が異なるかを、生後 5 週齢、8 週齢、11 週齢、50 週齢の野生 **BALB/c** マウスの上皮を採取し **real time PCR** により発現量を比較する。

**BALB/c** マウスに 同じ方法でアルカリ外傷モデルマウスを作成し、上皮化を得られた時点で眼を採取し、その上皮から **real time PCR** により **mRNA** 発現量を測定し、アルカリ外傷眼の僚眼と比較する。また、摘出した眼球を **Bone morphogenetic protein-7** の蛍光抗体で免疫染色を行い、観察する。

### 4. 研究成果

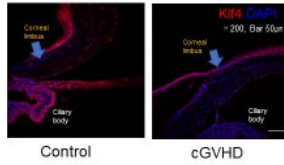
**Oct4**、**Sox2** は慢性移植片対宿主病マウスモデル、ともに蛍光免疫染色で染色を認めなかった。**Klf4** は免疫染色で角膜上皮細胞に発現を認めたが、慢性移植片対宿主病マウスモデルと対照群で差を認めなかった。一方、**BMP7** は免疫染色で角膜上皮細胞に発現を認め、骨髄移植後 3 週、5 週、8 週で対照群と角膜輪部における蛍光強度を画像解析ソフト **ImageJ** で比較したところ、3 週では有意差はなかったが、5 週、8 週では有意に慢性移植片対宿主病マウスモデル群で低下を認めた。このことから慢性移植片対宿主病マウスモデルにおいて角膜輪部機能不全の病態解明に **BMP7** を解析することが適していることが示唆された。

## Results

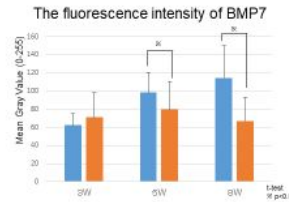
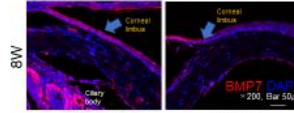
### Immunofluorescent staining for MET markers, BMP7

• Oct4, Sox2 ⇒ Not detected

• Klf4 ⇒ No difference between the control and the cGVHD

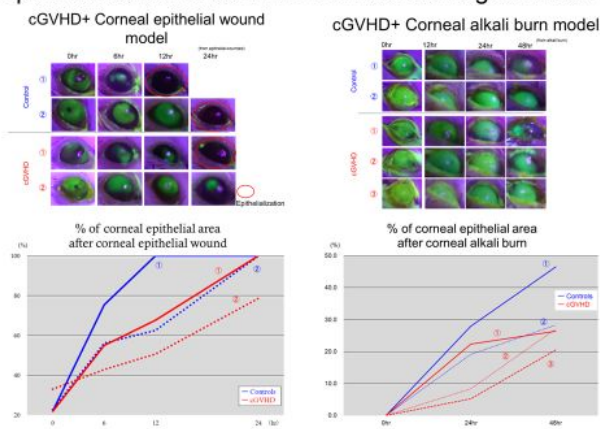


• BMP7



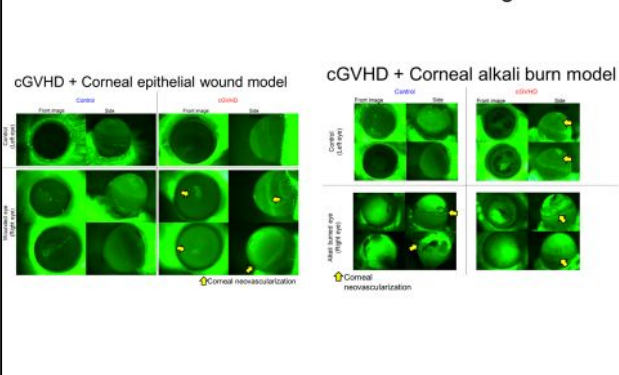
により **Bone morphogenetic protein-7** の評価を行うこととした。慢性移植片対宿主病モデルマウスでは角膜上皮障害が生じることが少ないため、擦過による上皮障害やアルカリ外傷による上皮障害を作成し、上皮障害を意図的に作成し、慢性移植片対宿主病マウスモデルに角膜上皮障害のマウスモデルとして病態解明に使用できるかを検討した。角膜擦過モデルでもアルカリ外傷モデルでも慢性移植片対宿主病マウスモデルの方が対象群より上皮化が遅延した。

### Epithelialization of cGVHD+corneal damaged model

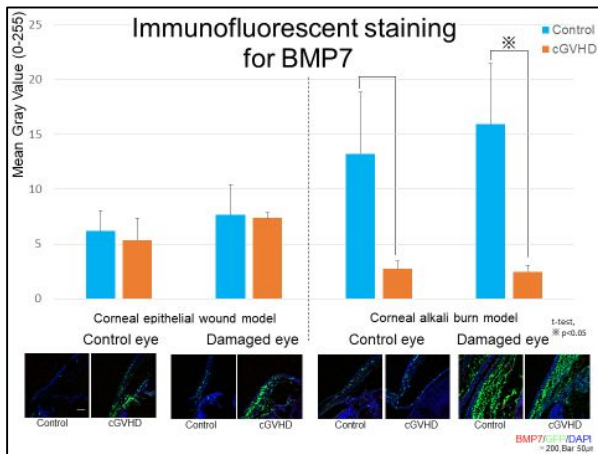


慢性移植片対宿主病マウスモデルの擦過眼、慢性移植片対宿主病マウスモデルおよび対照群のアルカリ外傷眼に角膜への血管侵入を認めたが、さらに興味深いことには慢性移植片対宿主病マウスモデルのアルカリ外傷モデルの僚眼にも角膜血管侵入を認めた。この現象の機序解明は今後の課題であるが、慢性移植片対宿主病マウスモデルではアルカリ外傷のような強い炎症が起こると全身への炎症の影響により僚眼にも影響が出る可能性が示された。

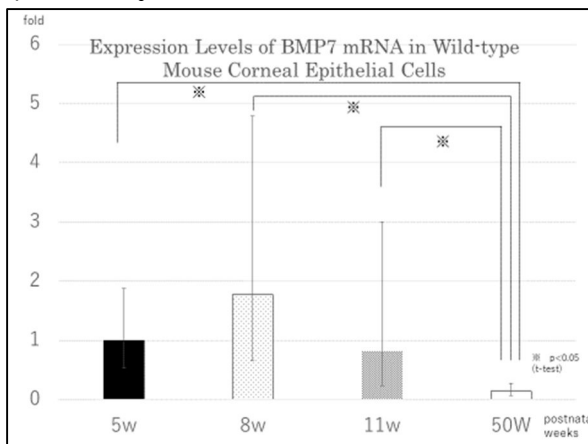
### Neovascularization of cGVHD+corneal damaged model



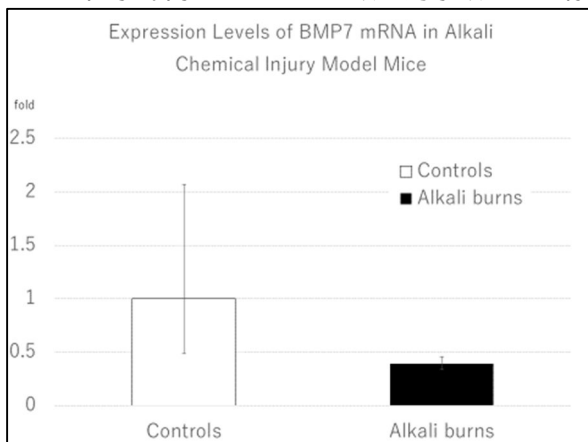
上皮化後に摘出したこれらの眼の **Bone morphogenetic protein-7** の蛍光免疫染色を行い、その蛍光強度を同様 **ImageJ** により解析をしたところ、慢性移植片対宿主病ならびに対照群で角膜輪部における **Bone morphogenetic protein-7** は擦過モデルでは蛍光強度の有意差はなく、アルカリ外傷では慢性移植片対宿主病で有意な蛍光強度の低下を認めた。このことから角膜上皮障害モデルとしてはアルカリ外傷を用いることが適しており、慢性移植片対宿主病の有無に限らず **Bone morphogenetic protein-7** の発現の変動に関係することが示唆された。



により角膜上皮障害と間葉上皮転換の関連性を解析するにはアルカリ外傷モデルが適していると考えられたが、解析を進めるにあたり、野生マウスにおける生後の週齢により角膜上皮細胞の **Bone morphogenetic protein-7** の発現が異なる可能性を考え、週齢と角膜上皮細胞の **Bone morphogenetic protein-7** の mRNA 発現を検討することにした。結果としては 5 週齢、8 週齢、11 週齢の間に発現量の有意な差はなく、50 週齢と 5,8,11 週齢の各群とは有意に 50 週齢マウスでの角膜上皮細胞の **Bone morphogenetic protein-7** の mRNA 発現の低下を認めた。これは 5~11 週齢での若いマウスにおいては角膜上皮細胞の **Bone morphogenetic protein-7** の mRNA 発現に差はないことが示唆された。また、今回どの程度の週齢になると低下するかは示せないが、老齢のマウスでは角膜上皮細胞の **Bone morphogenetic protein-7** の mRNA 発現が低下し、これは臨床でも高齢者が若年者よりも角膜上皮障害の回復に時間がかかることにも矛盾しない結果となった。



アルカリ化学外傷モデルマウスを作成し、72 時間後完全に上皮化した状態で上皮を擦過、回収し、**real time PCR** による **Bone morphogenetic protein-7** の mRNA 発現を解析したところアルカリ化学外傷モデルマウス眼は対象眼である僚眼に比べて有意に発現の低下を認めた。



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

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