

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09796

研究課題名（和文）角膜上皮治癒後の実質構造の再構築過程でのムチンの機能解析に基づいた新規治療戦略

研究課題名（英文）New strategy based on mucin function in corneal stromal reorganization following corneal epithelial wound healing

研究代表者

白井 久美（Shirai, Kumi）

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70326370

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：ムチン減少を病態とするドライアイでの角膜創傷治癒過程の異常の病態解明を目的として、（1）角膜実質創傷治癒での眼表面Muc16欠損の影響、（2）角膜上皮創傷治癒過程での角膜内知覚神経再生におけるドライアイやMuc16の影響（3）角膜上皮創傷治癒過程での角膜新生血管や角膜リンパ管新生におけるドライアイやMuc16の影響について検討した。（4）Stat3あるいはIL-6の阻害による、Muc16欠損マウスの実質癒痕化に伴う感覚神経再生遅延と実質血管・リンパ管新生異常に対する治療効果を評価した。角膜創傷治癒過程での知覚神経再生、角膜新生血管や角膜リンパ管新生とMuc16の関連は確認されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

角膜創傷治癒過程での知覚神経再生、角膜新生血管や角膜リンパ管新生とMuc16の有無の影響は確認されなかった。今後は別の観点から、ムチン減少を病態とするドライアイでの角膜創傷治癒過程の異常の病態機序解明、さらにはMuc16のドライアイ診療での役割評価を目指すことが必要である。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effect of dry eye or loss of Muc16 to corneal sensory nerve regeneration, neovascularization and lymphangiogenesis following corneal wound healing to elucidate the mechanism of impaired corneal wound healing in dry eye with mucin decrease. Muc16 is not related to corneal sensory nerve regeneration, neovascularization and lymphangiogenesis following corneal wound healing.

研究分野：眼細胞生物学

キーワード：ムチン

## 1. 研究開始当初の背景

眼表面ムチン（マウスでは Muc と略）の異常は水分保持機能や摩擦軽減効果の減弱から眼表面を障害しうる。代表研究者は、Muc16 遺伝子欠損マウスでは眼表面は一見正常に見えるが結膜に Stat3 シグナルを介する慢性炎症が恒常的に持続していることを証明した。その上で同マウスでは角膜上皮治癒が促進されるものの、眼表面で Stat3 シグナルによりインターロイキン 6 (IL-6) 発現が亢進し、上皮治癒後の角膜実質の筋線維芽細胞の過剰出現による癒痕混濁が増強されることを解明した。さらに Muc16 欠損マウスでは、点眼薬防腐剤の塩化ベンザルコニウム暴露により結膜下でのリン酸化 Stat3 と IL-6 発現が増強した。角膜創傷治癒過程での実質癒痕化は、上皮再生過程での感覚神経の再生抑制や血管・リンパ管新生に影響すると考える。そのため、Muc16 欠損の角膜恒常性維持への影響や、ムチン減少を病態とするドライアイでの角膜創傷治癒過程の異常の病態を解明し、それに対応したきめ細かい新規治療選択法を提唱することが必要と考えた。

そこで、(1) 角膜実質切開創の治癒、(2) 角膜上皮創傷治癒過程の実質癒痕増強での角膜知覚神経の再生、(3) 角膜血管・リンパ管新生の 3 点を Muc16 欠損マウス、野生型健常マウス、野生型の眼窩外涙腺摘出による涙液分泌減少マウス（すでに代表研究者で作成可能）の間で比較することを計画した。またそれを基礎に Stat3 阻害薬、デキサメサゾン、IL-6 抗体局所投与の Muc16 欠損マウスでの病態に対する治療効果を確認することを計画した。

## 2. 研究の目的

(1) 角膜実質創傷治癒での眼表面 Muc16 欠損の影響について検討する。眼窩外涙腺摘出による涙液分泌減少マウスモデルと比較する。(2) Muc16 欠損マウスの角膜上皮創傷治癒過程での実質癒痕増強が角膜知覚神経の再生に及ぼす影響について検討する。(3) 角膜血管・リンパ管新生が Muc16 欠損でどう影響されるかについて検討する。(4) Stat3 あるいは IL-6 の阻害による、Muc16 欠損マウスの実質癒痕化に伴う感覚神経再生遅延と実質血管・リンパ管新生異常に対する治療効果を評価する。眼窩外涙腺摘出ドライアイモデルマウスと比較する。ムチン減少を伴うドライアイ症例での結膜慢性炎症と IL-6 を標的とした角膜上皮損傷の対応でこれまで提唱されていなかった治療戦略を提唱する。

## 3. 研究の方法

### (1) 角膜全層切開後の角膜創傷閉鎖速度と角膜線維癒痕化に及ぼす Muc16 欠損の影響

マウスの涙腺には、眼窩外涙腺と眼窩内涙腺がある。マウスを全身麻酔下にて、外科的に眼窩外涙腺のみ摘出し、涙液分泌量が減少していることを確認した。この眼窩外涙腺の外科的摘出マウスをマウスドライアイモデルとした。①野生型マウス—未処置群、②野生型マウス—ドライアイモデル作成群、③Muc16 ノックアウトマウス—未処置群、④Muc16 ノックアウトマウス—ドライアイモデル作成群の 4 群を作成した。4 群とも右眼を対象とした。①～④の 4 群のマウスに、全身麻酔下で、散瞳剤点眼による散瞳後に、眼手術用のマイクロサージカルナイフを用いて幅約 1.8mm の角膜全層切開を行い、角膜実質癒痕モデルを作製した。角膜全層切開の 3 日、7 日、14 日後にマウスを屠殺、眼球摘出、パラフィン固定・包埋し、パラフィン切片を作成した。ヘマトキシリン・エオジン染色を行い角膜実質の癒合・癒痕化の程度を 4 群で比較した。

### (2) 角膜上皮創傷治癒過程での角膜内知覚神経再生におけるドライアイや Muc16 の影響

4 群とも右眼を対象とした。①～④の 4 群のマウスに、全身麻酔下で、右眼にトレパンで直径 2mm の円形を角膜上皮にマーキングし、スパーテルを用いてその部の角膜上皮を搔爬して、直径 2mm の円形の角膜上皮欠損を作成した。角膜上皮欠損作成の 12 時間後、24 時間後、36 時間後にマウスを屠殺、右眼の眼球を摘出した。角膜輪部よりやや後方で全周切開し、角膜片を採取した後、角膜周辺部から切開を入れて、角膜のフラットマウント標本を作成した。抗 TuJ1 抗体を用いて TuJ1 の局在を蛍光免疫組織学的手法で調べることにより、三叉神経の角膜内での再生について検討し、①～④の 4 群で比較した。

### (3) 角膜上皮創傷治癒過程での角膜新生血管や角膜リンパ管新生におけるドライアイや Muc16 の影響

4 群とも右眼を対象とした。①～④の 4 群のマウスに、全身麻酔下でパクレンを用いて右眼の角膜焼灼を行い、マウス角膜新生血管モデルを作成した。このマウス角膜新生血管モデルでは、角膜輪部から血管新生およびリンパ管新生が角膜焼灼処置後 7 日をピークとして増生する。角膜焼灼処置後、3 日、7 日、14 日に屠殺、右眼球摘出した。凍結切片およびホルマリン標本を作成し、血管新生およびリンパ管新生の伸展に差があるかを検討した。血管新生の評価には CD31

の免疫染色を行った。リンパ管新生の評価には LIVE1 の免疫染色を行った。

(4) (1) 角膜全層切開後の線維瘢痕化増強、(2) 角膜上皮創傷治癒過程での角膜内知覚神経の再生遅延、(3) 角膜新生血管や角膜リンパ管新生の促進、について、Stat3 阻害薬、デキサメサゾン、IL-6 抗体局所投与の Muc16 欠損マウスでの病態の治療効果を検討した。〈1〉 S31-201 (Stat3 阻害薬、0.004% DMSO, Sellek Chemicals) または 0.004% DMSO、〈2〉 デキサメサゾン (0.1%) または PBS の 2 セットを作成した。Muc16 欠損マウスで (1)、(2) または (3) の処置の 48 時間前から 6 時間ごとに各々を点眼して同様の評価を行い、Stat3 阻害薬、デキサメサゾンの治療効果の有無を検討した。Muc16 欠損マウスで、〈3〉抗 IL-6-rat IgG 中和抗体  $2\mu\text{g}/200\mu\text{L}$  (InvivoGen 社) の結膜下注射直後に (1)、(2) または (3) の処置を行い、その後 3 日毎に注射した。コントロールにはラット非特異的 IgG (R & D 社) を用いた。同様の評価で IL-6 中和抗体の治療効果の有無を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 角膜全層切開後の角膜創閉鎖速度と角膜線維瘢痕化に及ぼす Muc16 欠失の影響

4 群とも角膜切開創は、3 日後では閉鎖しておらず、7 日後には閉鎖していた。ヘマトキシリン・エオジン染色における、角膜切開後の創閉鎖、瘢痕部の癒合の状態に差はなかった。さらに  $\alpha$  平滑筋アクチンの局在を免疫組織学的手法で調べることにより、筋線維芽細胞の局在について検討した。4 群とも角膜切開創閉鎖の瘢痕部分における筋線維芽細胞の局在に差はなかった。

##### (2) 角膜上皮創傷治癒過程での角膜内知覚神経再生におけるドライアイや Muc16 の影響

4 群とも直径 2 mm の角膜上皮欠損は 24 時間で再被覆し角膜上皮の被覆時間に差はなかった。蛍光免疫組織学的手法による TuJ1 の局在の評価では、36 時間後に TuJ1 は角膜の中央まで伸展しており、4 群で差はなかった。Muc16 ノックアウトマウスドライアイモデルでやや密度が少ないが有意なレベルではなかった。

##### (3) 角膜上皮創傷治癒過程での角膜新生血管や角膜リンパ管新生におけるドライアイや Muc16 の影響

①野生型マウス未処置群、②野生型マウスドライアイモデル作成群の比較で血管新生およびリンパ管新生の伸展に差はなかった。③Muc16 ノックアウトマウス未処置群、④Muc16 ノックアウトマウスドライアイモデル作成群の比較では④で血管新生およびリンパ管新生の伸展がやや多くなっていたが、有意なレベルではなかった。②野生型マウスドライアイモデル作成群、④Muc16 ノックアウトマウスドライアイモデル作成群の比較では④で血管新生およびリンパ管新生の伸展がやや多くなっていたが、有意なレベルではなかった。

(4) 〈1〉、〈2〉とも (1) 角膜全層切開後の線維瘢痕化増強、(2) 角膜上皮創傷治癒過程での角膜内知覚神経の再生遅延、(3) 角膜新生血管や角膜リンパ管新生の促進) をやや抑制したが、有意なレベルではなかった。〈3〉は (1) 角膜全層切開後の線維瘢痕化増強、(2) 角膜上皮創傷治癒過程での角膜内知覚神経の再生遅延、(3) 角膜新生血管や角膜リンパ管新生の促進) をやや抑制したが、有意なレベルではなかった。

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
研究分担者	雑賀 司珠也  (Saika Shizuya)  (40254544)	和歌山県立医科大学・医学部・教授   (24701)	
研究分担者	岡田 由香  (Okada Yuka)  (50264891)	和歌山県立医科大学・医学部・教授   (24701)	

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