

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18390

研究課題名（和文）角膜実質創傷治癒での細胞外基質蛋白質ルミカンの機能解析に基づいた新規治療戦略

研究課題名（英文）Therapeutic strategies based on functional analysis of lumican in wound healing of corneal stroma.

研究代表者

鈴木 映美（Suzuki, Eimi）

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60794394

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）：ルミカン遺伝子欠失マウスで角膜全層切開モデルを作成し、ルミカン遺伝子欠失マウスでは角膜実質創傷治癒が遅れること、筋線維芽細胞のマーカーである SMA の発現が抑制されていること、また、眼培養線維芽細胞を用いた研究でルミカン遺伝子欠失マウスの培養細胞において、TGF 添加時の SMA 発現が抑制されること、収縮を評価できるゲルのキットを用いた研究でゲルの収縮性が有意に低下することを報告した。（Suzuki, E et al, Ocular Surface. 2023）

研究成果の学術的意義や社会的意義

創傷治癒の遅延は感染リスクの増加、血管新生、最終的な治癒時の線維瘢痕化によって視力障害の大きな原因となる。従って角膜上皮や実質の創傷は炎症を制御しつつも速やかに治癒することが求められる。今回の研究にて、lumican は角膜実質創傷治癒に促進的に関与することを解明した。

速やかな角膜実質の創傷治癒を実現する新たな治療戦略の樹立は治癒不全の遷延化の防止や過剰な瘢痕形成の抑制などの面で極めて意義深い。他組織の創傷治癒過程でも同様の機序の存在が想定できるので、ルミカン C 末端ペプチドを用いた皮膚での褥瘡治療などルミカンペプチドの角膜実質での作用に基づいた新規治療戦略を提唱できる可能性を想定している。

研究成果の概要（英文）：A whole cornea incision model was created in mice lacking the lumican gene. It was found that (1) corneal parenchymal wound healing is delayed in mice lacking the lumican gene, (2) expression of SMA, a marker of myofibroblasts, is suppressed, and in cultured cells of mice lacking the lumican gene in a study using ocular cultured fibroblasts, (3) We reported that SMA expression is suppressed when TGF is added, and (4) that gel contractility is significantly reduced in a study using a kit for gels that can evaluate contractility. (Suzuki, E et al., Ocular Surface. 2023)

研究分野：角膜創傷治癒

キーワード：ルミカン 角膜実質 創傷治癒

## 1. 研究開始当初の背景

角膜は眼球の最表面に位置するため外傷を受けやすい。創傷治癒の遅延は細菌感染、線維・癒着化や角膜輪部からの血管新生の原因となり、重度の場合は角膜透明度の低下や形状の乱れにより視機能障害をきたす。透明性と形状維持のための角膜実質の細胞外マトリックスの規則正しい配列にはコラーゲン線維間距離を制御している細胞外マトリックスの役割が大きい。この役割を担う細胞外マトリックスには、コラーゲン V 型以外にルミカン、デコリンなどをコア蛋白質にもつプロテオグリカンが含まれる。ルミカンはケラタン硫酸プロテオグリカンとして角膜に存在する。ルミカンは角膜に存在するケラタン硫酸プロテオグリカン (KSPG) のコア蛋白質の一種で、ルミカンをコアとする KSPG は角膜の透明性維持に関与している。またルミカンは糖鎖に乏しいグリコプロテインの形で角膜上皮の創傷治癒に関与することが遺伝子欠失マウスを用いた研究で判明している。

角膜実質では受傷後、角膜実質細胞が活性化され筋線維芽細胞に分化し、一次治癒のための細胞外マトリックスを分泌すると同時に組織収縮によって創を物理的にも閉鎖治癒する。代表研究者の所属の雑賀司珠也教授を中心とした研究で、この過程でマクロファージや角膜固有細胞が発現するトランスフォーミング成長因子 (TGF) が重要な役割を演じることが当時、世界に先駆け報告された (Saika, S et al. Am J Pathol, 2005; Saika, S et al. Prog Retina Eye Res 2008、総説)。創傷治癒の遅延は感染リスクの増加、血管新生、最終的な治癒時の線維癒着化によって視力障害の大きな原因となる。従って角膜上皮や実質の創傷治癒は速やかに治癒することが求められる。

所属の雑賀司珠也教授はかつて米国シンシナチ大学医学部眼科に留学時にルミカン欠損マウス (Saika S, et al. J Biol Chem. 2000) の作出に従事し、同マウスでは角膜実質のコラーゲン線維配列の不均一性によって実質が混濁する以外に角膜上皮の創傷治癒が遅延することを示した。創傷治癒過程にある角膜上皮が一過性にルミカンを発現するが、そのルミカンは糖鎖構造乏しいグリコプロテインの形で機能すると考えられる。しかし角膜実質の創傷治癒でのルミカンの役割に関する報告は無い。

## 2. 研究の目的

ルミカン欠損マウスでの角膜実質の創傷治癒の異常の細胞生物学的な機序の解明とルミカン欠損マウス由来の培養細胞におけるルミカンと TGF- $\beta$ /Smad シグナルのクロストークの解明が本研究の目的である。

ルミカンは角膜に存在するケラタン硫酸プロテオグリカンのコア蛋白質の一種で角膜の透明性維持に関与している。所属の雑賀司珠也教授はかつてルミカン欠損マウスの作出に従事し、同マウスでは角膜のコラーゲン線維配列の不均一性が生じることと角膜上皮の創傷治癒が遅延することを示した (Saika S, et al. J Biol Chem. 2000)。角膜実質の創傷治癒過程でマクロファージや角膜固有細胞が発現するトランスフォーミング成長因子 (TGF) が重要な役割を演じることが当時、世界に先駆け報告された (Saika, S et al. Am J Pathol, 2005; Saika, S et al. Prog Retina Eye Res 2008)。しかし実質の創傷治癒過程でのその役割は研究されていない。本研究計画では、ルミカン遺伝子欠失マウスを用いて角膜実質創傷治癒 (角膜全層切開モデル) を用いて、角膜実質創傷治癒過程におけるルミカンの役割やその際のシグナル伝達の変化について解明する。またマウスの生後 1 日の眼球由来から outgrowth で得た培養角膜実質細胞を用いてその背景メカニズムについて検討する。癒着や血管新生抑制とのバランスのとれた速やかな角膜実質の治癒の実現が最終目標である。臨床的展望を踏まえて本研究ではルミカン C 末端ペプチドの局所投与による新たな治療戦略を確立する。速やかな角膜創傷治癒のための新規治療戦略の提唱を目指す。

## 3. 研究の方法

1) 生後 8 週齢のルミカン欠損マウス (繁殖中) と野生型 (C57BL/6J) マウスで全身麻酔およびオキシプロカイン塩酸塩点眼麻酔下で、マイクロサージカルナイフを用いて右眼で約 1.8mm (瞼裂方向に切開) の角膜全層切開の角膜創傷治癒モデルを作成する。細菌感染防止の目的でオフロキサシン眼軟膏を塗布するが、治癒過程観察のため鎮痛薬の投与は避けるものとする。手技の詳細は所属の報告 (Nidegawa-Saitoh Y, et al. Cell Tissue Res, 2018) に準じる。創作成 5 日後、10 日後で屠殺後に眼球を摘出し、パラフィン切片での HE 染色にて角膜実質間距離を計測して統計処理することで創の閉鎖速度を比較検討する。また免疫染色法にて SMA (筋線維芽細胞)、F4/80 (マクロファージ)、各種炎症性サイトカイン、フィブロネクチンなどの発現を検討する。上記の因子の mRNA の発現レベルは角膜のみを摘出し RNA を抽出 (Sigma 社キット)、TaqMan real-time RT-PCR (所属の Applied Biosystem 社) で検討する。内因性 GAPDH mRNA 発現をもとに Ct 法ソフトウエアで解析し、Mann-Whitney U test テストで統計処理を行う。角膜の RNA 量が少ないので、2 角膜からの RNA で

1 サンプルとする。

2) 背景メカニズムの解明の為の *in vitro* 研究

所属の既報(Okada Y, et al. Am J Pathol, 2011)に従ってルミカン欠損および野生型マウスの生後 1 日の眼球を刻んで得た培養角膜実質細胞を用いる。60mm シャーレでコンフルエントになるまで培養後、TGF 1(1 ng/ml)添加時の線維化関連遺伝子発現と SMA 発現を real-time RT-PCR と免疫組織化学で評価する。また、コラーゲンゲルのキットを用いて、TGF 1 添加によるゲルの収縮を評価した。得られた眼線維芽細胞を、 $3 \times 10^6$  個/ml に調整し、Collagen-Based Cell Contraction Assay Kit に混合した。TGF 1 の添加の有無による経過を 12 時間おきに合計 96 時間観察し、面積率 (%) = [(ゲルの初期表面積-ゲルの最終表面積) / ゲルの初期表面積] × 100 を求めることでゲル収縮の程度を経時的に解析した。

#### 4. 研究成果

ルミカン遺伝子欠失マウスと野生型マウスに対して角膜全層切開モデルを作成し、デスメ膜間の距離を測定した。切開 5 日目では、デスメ膜間の距離は、ルミカン遺伝子欠失マウスでは野生型マウスに比べて有意に大きかった。SMA の免疫染色とリアルタイム RT-PCR の結果から、筋線維芽細胞の分布は KO 角膜で抑制されていた。フィブロネクチンの発現を免疫染色を用いて比較したところ差はみられなかった。創作成 1 日後、3 日後の KO 角膜で筋線維芽細胞の発現は低下していた。よって創部における筋線維芽細胞の出現は、ルミカン遺伝子欠失マウスの角膜では抑制されていた。筋線維芽細胞の出現が低下することによりルミカン遺伝子欠損マウスでは角膜実質の創傷治癒が遅延したと考え、ルミカンは角膜実質切開創の治癒に促進的に関与している可能性を想定したためその機序解明を目的として培養研究での検討を行った。

*In vitro* の実験では、生後 1 日のマウス眼球を刻んで得た培養眼線維芽細胞に TGF 1 を添加して時間経過における変化を観察したところ、TGF 1 添加後 48 時間と 72 時間後でルミカン遺伝子欠失マウスの培養細胞では -平滑筋アクチンとコラーゲン 1a1 発現がダウンレギュレートされることが示された。傷害を受けた間質では PCNA 染色をもちいて測定した細胞増殖率が上昇していたが、このことはアラマーブルー染色での *in vitro* のデータからも裏付けられた。また、コラーゲンゲルのキットを用いて、TGF 1 添加によるゲルの収縮を評価した。リアルタイム RT-PCR の評価では、TGF 1 添加群で SMA の mRNA 発現が WT 細胞と比較し KO 細胞では有意に抑制された。一方、MCP1、VEGF-A、IL-6 では TGF 1 添加群で mRNA の発現が WT 細胞と比較し KO 細胞で有意に促進された。生後 1 日のマウスの眼球から得た眼線維芽細胞を一定濃度に調整し、コラーゲンゲルに混合した。その後、12 時間おきに計 96 時間ゲルの収縮を観察し、その面積率を求めてゲルの収縮の程度を評価した。TGF-1 添加から 24 時間以降では、ゲルの収縮はルミカン遺伝子欠損マウスの培養細胞を添加したゲルにおいて有意に抑制されていた。これらのことより、ルミカンは間葉系細胞での TGF 1 経路を介した SMA 発現に関与しており、ノックアウトマウスの角膜実質創傷治癒の遅延の機序にこれが含まれる可能性があることを発見した。これらのことを論文にまとめ、2023 年 10 月の The Ocular Surface 誌に掲載された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Suzuki Eimi, Sumioka Takayoshi, Saika Shizuya, Miyajima Masayasu, Yasuda Shingo, Iwanishi Hiroki, Takada Yukihisa, Ichikawa Kana, Venkatakrishnan Jhuwala, Liu Chia-Yang, Whei-Yang Kao Winston, Okada Yuka	4. 巻 30
2. 論文標題 Impaired healing in an incision wound in corneal stroma in a lumican-null mouse	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Ocular Surface	6. 最初と最後の頁 286 ~ 294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtos.2023.11.002	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 鈴木映美
2. 発表標題 Corneal parenchyma sectioning and ocular fibroblast culture in Lumican null mice reduces SMA mRNA expression.
3. 学会等名 the International Society of Eye Research (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木映美
2. 発表標題 Lumican欠失の眼線維芽細胞培養では筋線維芽細胞発現とゲル収縮性が低下する
3. 学会等名 角膜カンファランス2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木映美
2. 発表標題 Lumican is involved in expression of fibrogenic genes in eyeshell fibroblasts
3. 学会等名 The Association for Research in Vision and Ophthalmology (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------