

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月4日現在

機関番号： 15501

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2011~2012

課題番号： 23791989

研究課題名（和文） 角膜実質瘢痕の三次元解析と瘢痕形成の病態解明

研究課題名（英文） Three-dimensional analysis for corneal stromal scarring

研究代表者

森重 直行 (MORISHIGE NAOYUKI)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号： 40346565

研究成果の概要（和文）：

疾患ヒト角膜において、筋線維芽細胞とコラーゲン線維束構造異常の検出に成功した。Whole-mount 免疫染色法および第2次高調波発生顕微鏡を用い、角膜実質浮腫性疾患における角膜実質では、瘢痕性変化の指標となる筋線維芽細胞の発現やコラーゲン線維束構造異常が罹病期間依存性および原疾患依存性に出現することが明らかとなった。角膜実質浮腫性疾患における瘢痕形成は病理組織学的に進行性疾患であるという概念に至った。

研究成果の概要（英文）：

We successfully detected the expression of myofibroblasts and abnormality of collagen lamellae in the diseased corneas. Whole-mount immunostaining and second harmonic generation imaging microscopy revealed that the expression of myofibroblasts as the marker of corneal stromal scarring and abnormality of collagen lamellae were detectable in disease duration-dependent and causative disease-dependent manner. We propose that corneal stromal edematous disease may be the pathologically progressive disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学、眼科学

キーワード：水疱性角膜症、角膜実質、瘢痕、第二次高調波発生

1. 研究開始当初の背景

角膜は5層の比較的シンプルな構造を有する組織であるが、その生理的な構造維持が角膜の透明性維持に重要である。角膜に対する何らかの病的状況が生じると、様々な生体反応が起こり、角膜が混濁する。特に、角膜実質への侵襲が起こると、角膜実質細胞が反応し、炎症性細胞も浸潤し病的状態の回復を行う。この過程で、角膜実質のリモデリングが起こり、その結果不可逆的混濁である瘢痕が形成される。瘢痕に対しては、ステロイドの局所投与が試みられる場合もあるが、いったん形

成されてしまった角膜実質の混濁を完全に除去することはできず、著しい視機能障害の原因になる場合には角膜移植という治療法をとらざるをえない。瘢痕では細胞の異常に加え角膜実質の大部分を形成するコラーゲンを中心とした細胞外マトリックスの構造的異常が首座であると考えられる。角膜に対する障害の直後に瘢痕形成が完成するわけではないが、瘢痕の形成メカニズムが十分に解明されていないため、侵襲直後に瘢痕形成抑制を目的とした治療を行うことができない。我々は、この瘢痕に着目し、瘢痕形成の

病理組織学的な再検討を行い、その癒痕形成における細胞外マトリックスの構造変化と癒痕形成に関わる細胞成分の役割を解明したいと考えていた。

角膜実質の細胞外マトリックス構造の研究は、従来の光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いた検討に加え、最近では X 線散乱や第 2 次高調波発生 (SHG) を応用して、微細構造に加えて 3 次元構造の検討が積極的に行われている。SHG は、特定の条件を満たす分子構造に光子を照射する際に発生する現象であり、生体内で SHG 発生の条件を満たす分子はコラーゲンやミオシン、チューブリンなどと限られている。角膜に存在するコラーゲンはその他の SHG 発生分子と比較して極端に多量に存在するため、角膜組織から発生する SHG はコラーゲン由来と考えられる。この SHG の検出を、多光子顕微鏡で行うことにより、コラーゲンの構造と細胞の検出を同時に行うことが可能である。これまで我々は、角膜組織由来の SHG を検討することで、種々の角膜疾患の病態解明や正常角膜の構造解析を行ってきた。正常ヒト、正常家兎、正常マウスの角膜コラーゲン由来の SHG を検出しその種間の構造特性を検出し (Morishige N, et al. J Cataract Refract Surg. 2006: 1784-91), 特にヒトでは角膜実質浅層にコラーゲン線維束の interwoven structure があることを見いだした (Morishige N, et al. Cornea 2009: S46-S53)。さらに、ヒト検体を用いて、実質浅層の Bowman 層に接着するコラーゲン線維束 (sutural lamellae) の解剖学的特性を解明した (Morishige N, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011: 911-915)。また、角膜疾患眼の病態検討にも SHG を応用し、角膜の形状異常を来す疾患の代表である円錐角膜のコラーゲン線維束の構造を解析し、正常角膜と比較して sutural lamellae や角膜実質浅層のコラーゲン線維束構造が不均一であることを見いだした (Morishige N, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007: 1087-94)。さらに、水疱性角膜症に代表される角膜実質浮腫眼のコラーゲン線維束構造解析を行い、浮腫眼では実質浅層のコラーゲン線維束構造が維持される一方で、異常なコラーゲン線維構造を有する角膜上皮下線維性混濁が生じうることを、また角膜実質浮腫の罹病期間が 12 ヶ月を超えるころより発生することを見いだした (Morishige N, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009: 3145-50)。これ以外にも、フェムト秒レーザー照射の角膜コラーゲンの構造変化の評価 (Morishige N, et al. Exp Eye Res 2008: 835-843) やエキシマレーザー照射後の癒痕形成モデルのコラーゲン構造解析にも応用してきた (Farid M, Morishige N, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2008: 4377-4383)。このように、我々の有する検出系を用いることで、角膜実質の細胞観察と同

時に細胞外マトリックスの 3 次元構造解析を行うことが可能であり、癒痕を中心とした角膜混濁の評価、特に 3 次元構築による評価を行う準備が出来ていた。

角膜実質にける癒痕形成の主役は、角膜実質コラーゲンと角膜実質細胞であると考えられている。傷害およびその障害に対する創傷治癒による角膜実質コラーゲン線維の配列の乱れが生じ、また角膜実質細胞の分化転換により角膜実質に異常なコラーゲンが分泌・蓄積されるために角膜実質が混濁すると考えられている。これまでの研究は薄切切片による観察に基づいており、角膜の 3 次元構造を直接的に説明したものではないこと、また細胞と細胞外マトリックスを同時に観察したものではないため、癒痕組織内における角膜実質コラーゲンと角膜実質細胞の 3 次元的位置関係などは示されていない。

角膜実質浮腫眼における癒痕形成には、角膜実質細胞から筋線維芽細胞への分化転換が関与しているものと予想される。この分化転換は、実質浮腫期間に依存していることが予想される。また、角膜実質に形成された癒痕形成動物モデルでは、癒痕部位に角膜実質細胞由来の筋線維芽細胞が発現し、その部位のコラーゲン線維立体構造の乱れが SHG により描出されると予想される。今回の我々の研究が遂行されることにより、不可逆性と考えられている角膜の癒痕形成のメカニズムの解明に寄与することができ、いったん形成された癒痕を除去するためのステロイド投与や角膜移植に依存しない、癒痕の形成自体を抑制する癒痕治療法が開発できる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、角膜実質浮腫眼における角膜実質の混濁、特に癒痕形成の病態解明を最終的な目標とし、角膜実質浮腫眼における癒痕形成部分の角膜実質細胞の分化転換や、コラーゲン線維/線維束の 3 次元構造を観察・評価し、角膜における癒痕組織の病態解明を目指すこととした。

3. 研究の方法

- (1) whole-mount 免疫染色法を用いて、検体角膜の α 平滑筋アクチンを標識
- (2) レーザー共焦点顕微鏡 (LSM Pascal, Carl Zeiss Microimaging) を用いて α 平滑筋アクチンを観察
- (3) 第 2 次高調波発生顕微鏡 (LSM 710 meta, Carl Zeiss Microimaging) を用いてコラーゲン由来第 2 次高調波発生信号を検出
- (4) 診療録をもとに検体採取までの臨床経過を検討、 α 平滑筋アクチン陽性細胞およびコラーゲン線維束構造の異常がみられた対象の臨床経過の特徴を検討

4. 研究成果

【水疱性角膜症からの α -平滑筋アクチンの検出】これまでの検討で、水疱性角膜症角膜において癒痕性変化がみられることが明らかとなっていた (Morishige N, et al. IOVS 2009: 3145-3150) ことから、角膜実質において癒痕組織において発現する筋線維芽細胞を試みた。山口大学医学部附属病院で全層角膜移植を施行したBK角膜20例20眼 (男性11例女性9例, 45~89歳, 平均66.3 \pm 11.6歳) および正常前部角膜8眼 (59~75歳, 平均65.0 \pm 5.7歳) を対象とした。 α -平滑筋アクチンを標識したウエスタンブロッティングでは、正常角膜や水疱性角膜症の一部では α -平滑筋アクチンの発現が検出されなかったが、水疱性角膜症の検体の中では α -平滑筋アクチンの発現が見られたものも存在した。次いで、whole-mount免疫染色法を用いて、正常角膜および水疱性角膜症角膜すべてを抗 α -平滑筋アクチン抗体で標識し、その発現を検討した。正常角膜では α -平滑筋アクチン陽性細胞は見られなかったが、水疱性角膜症角膜では、 α -平滑筋アクチン陽性細胞がみられた。診療録をもとに、水疱性角膜症検体の疾患発症から手術までの期間 (角膜実質浮腫期間) を調査し、 α -平滑筋アクチン陽性細胞の発現と角膜実質浮腫期間とを比較した。 α -平滑筋アクチン陽性細胞は、実質浮腫期間が12か月を超える検体にみられることが明らかとなった。これらの検討により、水疱性角膜症では実質浮腫期間依存性に α -平滑筋アクチン陽性細胞発現を伴う癒痕形成をきたすことが明らかとなった。

【水疱性角膜症における癒痕形成の検討】前回の検討で、水疱性角膜症 (BK) の角膜実質において α -平滑筋アクチン陽性細胞すなわち筋線維芽細胞が発現することが明らかとなった。しかしながら、この検討は実質浅層に限局するものであり、実質全体が浮腫状となる水疱性角膜症では実質全体の癒痕形成評価が必要であると考えられた。そこで、実質深層の筋線維芽細胞の発現の有無およびコラーゲン線維束構造を観察し、その構造異常の検出と異常を来す要因について検討した。2008年9月から2011年8月までの期間に山口大学医学部附属病院で全層角膜移植を施行したBK角膜17例17眼 (男性6例女性11例, 44~85歳, 平均65.2歳) および正常角膜 (男性3例女性3例, 48~69歳, 平均63.7歳) を対象とした。中央部角膜から角膜ブロックを作成、第2次高調波発生顕微鏡およびレーザー共焦点顕微鏡を用いて角膜実質コラーゲンおよび筋線維芽細胞を可視化し、後部実質の構造を解析した。実質深層のコラーゲン線維束構造は、正常角膜および実質浮腫期間の短い群ではデスメ膜に対し均一な平行構造を有していた。実質浮腫期間の長い水疱性角膜症検体の実質深層ではコラーゲン線維束構造の乱れによる異常構

造を検出した。また、正常角膜及び実質浮腫期間の短い水疱性角膜症検体では実質深層の筋線維芽細胞の発現は見られなかったが、実質浮腫期間の長い水疱性角膜症検体から筋線維芽細胞への分化転換を示す α -平滑筋アクチンの発現が見られた。これらの異常構造は、角膜実質浮腫期間が長い検体に多く見られた。これらの検討から、水疱性角膜症における筋線維芽細胞の出現を伴う実質癒痕形成は実質全体に見られ、その発現は浮腫期間依存性であることが示された。これまでの臨床研究から、実質浮腫が長い症例に対する内皮移植を施行すると術後の視力回復が不十分であることが分かっており、これらの実質における癒痕形成が臨床的にも視力回復に影響していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Yamada N, Morishige N, Yanai R, Morita Y, Kimura K, Chikama T, Nomizu M, Sonoda KH, Nishida T: Open Clinical Study of Eye Drops Containing the Fibronectin-Derived Peptide PHSRN for Treatment of Persistent Corneal Epithelial Defects. *Cornea* 31(12):1408-1413, 2012.10 (査読有) DOI: 10.1097/ICO.0b013e31824afd6c
- ② 森重直行, 高橋典久: 共焦点顕微鏡. 臨床眼科 増刊号 66(11): 59-64, 2012.10 (査読無)
- ③ 森重直行, 守田裕希子: 水疱性角膜症の上皮下混濁. 臨床眼科 増刊号 66(11): 351-356, 2012.10 (査読無)
- ④ Morishige N, Yamada N, Zhang X, Morita Y, Yamada N, Kimura K, Takahara A, Sonoda KH. Abnormalities of Stromal Structure in the Bullous Keratopathy Cornea Identified by Second Harmonic Generation Imaging by Microscopy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53(8): 4998-5003, 2012.7 (査読有) DOI: 10.1167/iovs.12-10214
- ⑤ 森重直行: 写真セミナー「水疱性角膜症の上皮下線維性組織形成」. あたらしい眼科 29(5): 631-632, 2012.5 (査読無)
- ⑥ Morishige N, Chikama T, Yamada N, Takahashi N, Morita Y, Nishida T, Sonoda KH: Impact of the preoperative duration of stromal edema in bullous keratopathy on early visual acuity after endothelial keratoplasty. *J Cataract Refract Surg* 38(2): 303-308, 2012.2 (査読有) DOI: 10.1016/j.jcrs.2011.08.032
- ⑦ Morita Y, Chikama T, Yamada N, Morishige N, Sonoda KH, Nishida T: New mode of

treatment for lattice corneal dystrophy type I: corneal epithelial debridement and fibronectin eye drops. *Jpn J Ophthalmol* 56(1):26-30, 2012.1 (査読有) DOI: 10.1007/s10384-011-0104-5

- ⑧ Morishige N, Yamada N, Morita Y, Nakamura Y, Nishida T, Sonoda KH: Detection of ICP0 protein in tear fluid of individuals with active herpetic epithelial keratitis. *Jpn J Ophthalmol* 55(6): 591-4, 2011.11 (査読有) DOI: 10.1007/s10384-011-0091-6
- ⑨ 森重直行: 第二次高調波発生を用いた正常角膜と疾患角膜の構造解析. 日本眼科学会雑誌 115 (11): 1025-1035, 2011.11 (査読有)
- ⑩ Morishige N, Nomi N, Morita Y, Nishida T: Immunohistofluorescence Analysis of Myofibroblast Transdifferentiation in Human Corneas with Bullous Keratopathy. *Cornea* 30(10): 1129-34, 2011.10 (査読有) DOI: 10.1097/ICO.0b013e318213798d

[学会発表] (計 13 件)

- ① 森重直行, 守田裕希子, 山田直之, 園田康平: 角膜内皮移植術後眼における角膜実質浅層構造の変化. 角膜カンファレンス 2013, 2013/02/15, 白浜町立総合体育館, 和歌山県
- ② Naoyuki Morishige: Clinical and Laboratory Imaging for Bullous Keratopathy. The 18th Annual Meeting of the Kyoto Cornea Club, 2012/12/08, Westin Miyako Hotel, Kyoto
- ③ Naoyuki Morishige, Naoyuki Yamada, Yukiko Morita, Koh-Hei Sonoda: Impact of preoperative duration of stromal edema in bullous keratopathy on early visual acuity after endothelial keratoplasty. The 5th joint meeting of Japan-China-Korea Ophthalmologists, 2012/11/17, Hotel Nikko Fukuoka, Fukuoka
- ④ 森重直行, 山田直之, 守田裕希子, 寺西慎一郎, 園田康平: Corneal epithelial dysmaturation の臨床像と治療成績. 第 66 回日本臨床眼科学会, 2012/10/25, 国立京都国際会館, 京都府
- ⑤ 森重直行, 守田裕希子, 山田直之, 園田康平: フェムトセカントレーザーを用いた角膜移植. 第 54 回山口眼科手術懇話会, 2012/10/13, 山口大学, 山口県
- ⑥ 森重直行: 水疱性角膜症の瘢痕形成の検出と臨床的意義. 第 118 回山口大学医学会学術講演会 中村賞受賞者講演, 2012/08/26, 山口大学, 山口県
- ⑦ 森重直行: 角膜疾患とコラーゲン線維束

構造変化. 第 5 回研究推進体「ストレス」フォーラム, 2012/05/01, 山口大学, 山口県

- ⑧ Naoyuki Morishige, Tai-ichiro Chikama, Naoyuki Yamada, Norihisa Takahashi, Yukiko Morita, Teruo Nishida, Koh-Hei Sonoda: Impact of the Preoperative Duration of Stromal Edema in Bullous Keratopathy on Visual Acuity after Endothelial Keratoplasty. APAO/SOE 2012, 2012/04/13, Basin, South Korea
- ⑨ 森重直行: DSAEK 時代における水疱性角膜症の考え方. 第 3 回角膜 Eye の会, 2012/03/23, Shagri-La hotel Tokyo, 東京都
- ⑩ 森重直行, 山田典弘, 張旭, 守田裕希子, 山田直之, 園田康平: 水疱性角膜症における後部角膜実質コラーゲン線維束構造. 角膜カンファレンス 2012, 2012/02/23, ホテルニューオータニ, 東京都
- ⑪ 森重直行, 山田直之, 守田裕希子, 石田康仁, 鈴木克佳, 園田康平: 重症モーレン潰瘍に対する線維柱帯切除術併施強角膜移植. 第 49 回六大学合同眼科研究会, 2011/09/10, 九州大学医学部百年講堂大ホール, 福岡県
- ⑫ 森重直行: 第 2 次高調波発生を応用した浮腫状角膜の 3 次元構造解析と病変の検出. 第 115 回日本眼科学会総会, 2011/05/14, 東京国際フォーラム, 東京都
- ⑬ Naoyuki Morishige, Norimasa Nomi, Yukiko Morita, Teruo Nishida, Koh-Hei Sonoda: Immunohistofluorescence Analysis of Myofibroblast Transdifferentiation in Human Corneas with Bullous Keratopathy. 2011 ARVO Annual Meeting, 2011/05/02, Fort Lauderdale, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森重 直行 (MORISHIGE NAOYUKI)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 40346565