

## 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 5 月 17 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23792015

研究課題名（和文） 角膜輪部における角膜幹細胞と角膜神経の関与  
 —ニューロトロフィンに着目して—

研究課題名（英文） Dependence of corneal stem/progenitor cells on ocular surface innervation.

研究代表者

上野 宏樹（UENO HIROKI）

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：30529897

研究成果の概要（和文）：電流凝固により三叉神経を障害し、臨床での神経麻痺性角膜炎を反映した病状を作成することができた。更に角膜三叉神経障害後、角膜 stem/progenitor 細胞は著しく減少していた。これらの結果より角膜 stem/progenitor 細胞また角膜幹細胞をとりまく環境 (niche) を維持するために角膜三叉神経は重要な役割を担っていると考察された。

研究成果の概要（英文）：Trigeminal stereotactic electrolysis (TSE) was able to induce a disease state that reflected clinical neurotrophic keratitis. Moreover, corneolimbic stem/progenitor cells are significantly reduced after depletion of sensory nerves. The data suggest a critical role of innervation in maintaining stem cells and/or the stem cell niche.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：角膜、三叉神経、角膜 stem/progenitor 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

神経麻痺性角膜炎は角膜の知覚低下および遷延性角膜上皮欠損を認め、強いては角膜実質の菲薄化、眼球穿孔に至ることさえある難治性疾患である。しかしながら、病態学的に現在においても詳細には解明されておらず、治療に苦慮するケースが多い。特に神経麻痺性角膜炎における角膜幹細胞に対する影響については報告が少ないため研究を開始した。

## 2. 研究の目的

神経麻痺性角膜炎のモデルマウスを作製し、モデルを用いて感覚神経である角膜三叉神経と角膜幹細胞との関連性を調査することである。

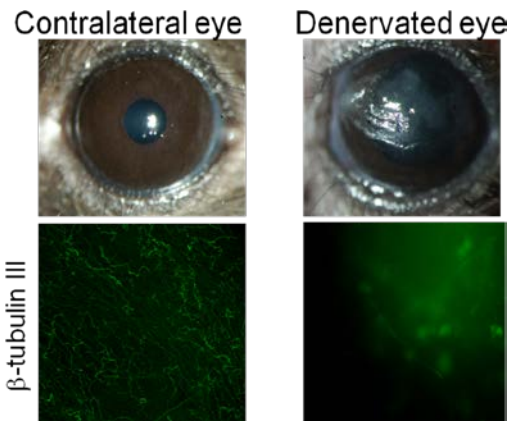
## 3. 研究の方法

三叉神経障害モデルマウス作成の方法として、まず障害したい側のみマウス頭頂部骨壁に小さな孔を作り、電極針を垂直に刺して三叉神経の分枝である眼神経部位に固定し

ます。その後直流電流をある一定時間放流する。障害側のみ凝固斑がみられ、術後は障害側のみ瞬目が全く見られず、Luxol fast blue 染色にて障害された三叉神経は髄鞘が脱落し、白っぽい領域が多くなっているが、対側は正常三叉神経と同様に髄鞘は脱落せず空洞様の所見は認められなかった。以上より神経麻痺性角膜症様の所見を呈したマウスを作ることに我々は成功した。このモデルマウスを用いて、角膜 stem/progenitor 細胞のマーカに対する mRNA の発現は real time PCR、蛋白発現、定量は免疫染色、フローサイトメトリーにて正常マウス角膜と比較した。また更に 2 型糖尿病モデルマウスである C57BLKS/J 1/1 Lepr Db (db/db) を用いて正常マウスと比較した場合、特にニューロトロフィンの受容体で代表的な低親和性受容体 (p75) と高親和性受容体 (trk) に特に着目して、これらの受容体の変化と角膜幹細胞量・幹細胞機能面とが相関性があるかを調査した。変化量に関しては real time PCR, 免疫染色を施行した。

#### 4. 研究成果

健側眼では神経マーカーである beta-III tubulin を用いて免疫染色を行ったところ、角膜上皮基底層での角膜神経叢、実質の神経幹は正常眼と同様の所見をとり変化を認めなかった。一方、三叉神経障害後 24 時間では上皮基底層での角膜神経は特有の枝状パターンは失われ、更に実質の神経幹は脆弱しており、途絶や分裂した所見を呈していた。48 時間後では、上皮基底層と角膜実質共に神経は検出されなかった。



障害 7 日後、現段階で角膜 stem/progenitor 細胞のマーカとして考えられている ATP-binding cassette subfamily G member 2 (ABCG2), p63, hairy enhancer of split 1 (Hes1) 蛋白を免疫染色にて評価したところ発現が低下していた。また real-time PCR 法において、いずれの mRNA 量も低下を示した。幹細胞の低下を具体的に定量するために、幹細胞の代替として用いられる side population を用いてフローサイトメトリーで検出したところ、正常マウス角膜と比べて神経麻痺性角膜症のモデルマウスの side population は約 75% の低下を示した。以上より角膜神経障害後、角膜 stem/progenitor 細胞は著しく減少していることから、角膜幹細胞をとりまく環境を維持するために角膜三叉神経は重要な役割を担っていると示唆された。

また 2 型糖尿病モデルマウスである C57BLKS/J 1/1 Lepr Db (db/db) においても角膜三叉神経は正常マウスに比較して著しく減少し、real time PCR, 免疫染色で確認したところ角膜 stem/progenitor 細胞も減少傾向であった。

#### 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 7 件)

- (1) Takaaki Hattori, Daniel R Saban, Emami-Naeini P, Sunil K. Chauhan, Toshinari Funaki, Hiroki Ueno, Reza Dana. Donor-derived, tolerogenic dendritic cells suppress immune rejection in the indirect allosensitization-dominant setting of corneal transplantation. *J Leukoc Biol.* 2012 ;91:621-627. doi: 10.1189/jlb.1011500. 査読有
- (2) Hiroki Ueno, Akiko Matsuzawa, Yuta Kumagai, Hitoshi Takagi, Satoki Ueno. Imaging of a severe case of acute hydrops in a patient with keratoconus using anterior segment optical coherence tomography. *Case Report in Ophthalmology.* 2012;3 : 304-310. doi: 10.1159/000337483. 査読有
- (3) Hiroki Ueno, Ferrari Giulio Ferrari, Takaaki Hattori, Daniel R Saban, Katikireddy KR, Sunil K. Chauhan, Reza Dana. Dependence of corneal stem/progenitor cells on ocular surface innervation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:867-872. doi: 10.1167/iovs.11-8438. 査読有
- (4) Takaaki Hattori, Suni K. Chauhan, Hyunsoo Lee, Hiroki Ueno, Reza Dana, Kaplan DH, Daniel R Saban. Characterization of Langerin-expressing dendritic cell subsets in the normal cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:4598-4604. doi: 10.1167/iovs.10-6741. 査読有
- (5) Giulio Ferrari, Sunil K. Chauhan, Hiroki Ueno, Nambi Nallasamy, Stefano Gandolfi, Lawrence Borges, Reza Dana. A Novel Mouse Model for Neurotrophic Keratopathy: Trigeminal Nerve Stereotactic Electrolysis through the Brain. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:2532-2539. doi: 10.1167/iovs.10-5688. 査読有
- (6) Yuta Kumagai, Manae S. Kurokawa, Hiroki Ueno, Maki Kayama, Kazuo Tsubota, Norio Nakatsuji, Shinji Nito, Satoki Ueno, Noboru Suzuki. Induction of Corneal Epithelium-Like Cells From Cynomolgus Monkey Embryonic Stem Cells and Their Experimental Transplantation to Damaged Cornea. *Cornea.* 2010;29:432-438. doi: 10.1097/ICO.0b013e3181b9ffcc. 査読有
- (7) Maki Kayama, Manae S. Kurokawa, Yuji Ueda, Hiroki Ueno, Yuta Kumagai, Shunmei Chiba, Erika Takada, Satoki Ueno, Mamoru Tadokoro and Noboru Suzuki. Transfection with pax6 gene of mouse embryonic stem cells and subsequent cell cloning induced retinal neuron progenitors, including retinal ganglion cell-like cells, in vitro. *Ophthalmic Res.* 2010;43(2):79-91. doi: 10.1159/000247592. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 上野宏樹. 角膜 stem/progenitor cell と角膜神経との相互作用について, 角膜カンファレンス 2013 シンポジウム, 2013

年2月15日, 白浜.

- ② 上野宏樹、松澤亜紀子、熊谷悠太、高木均、上野聰樹. 3者併用療法に希釈ポピドニョード液を治療に用いたアcantアメラバ角膜炎の3症例, 第66回日本臨床眼科学会, 2012年10月27日, 京都.
- ③ Ueno H, Hattori T, Kumagai Y, Takada E, Suzuki N, Ueno S. Evaluation of Corneal Progenitor Cells in Mice with Type II Diabetes Mellitus, The Association for Research in vision and Ophthalmology, 2012年5月8日, Fort Lauderdale, USA.
- ④ 上野宏樹. 角膜stem/progenitor cellと角膜神経との相互作用について, 第16回眼科分子生物学会, 2012年2月11日, 山鹿.
- ⑤ 上野宏樹、松澤亜紀子、熊谷悠太、高木均、上野聰樹. 重症円錐角膜急性水腫後前眼部OCTにて長期経過を観察した1例, 角膜カンファランス2012, 2012年2月23日, 東京.
- ⑥ 上野宏樹、熊谷悠太、阿藤 晃一、相原正記、高木均、上野聰樹. 高眼圧により視神経変化を伴ったIgG4関連ミクリツ病の1例, 第65回日本臨床眼科学, 2011年10月7日, 東京.
- ⑦ Ueno H, Ferrari G, Hattori T, Ueno S, Chauhan S, Dana R. Evaluation of Corneal Progenitor Cells in a Murine Model of Neurotrophic Keratopathy. The Association for Research in vision and Ophthalmology, 2011年5月4日, Fort Lauderdale, USA.
- ⑧ Ueno H, Ferrari G, Hattori T, Funaki T, Saban D, Chauhan S, Dana R. Nerve Regeneration Associate With Stem Cell Environment, The Association for Research in vision and Ophthalmology,

2010年5月3日. Fort Lauderdale, USA.

- ⑨ Ueno H, Ferrari G, Hattori T, Funaki T, Saban D, Chauhan S, Dana R. Nerve Regeneration Depends on Stem Cell Environment, The World Cornea Congress VII (WCC VII) 2010年4月8日. Boston, USA.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者 上野 宏樹

(UENO HIROKI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号: 30529897