

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659766

研究課題名(和文)生体4Dイメージングを用いた角膜創傷治癒過程における炎症制御機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of the Cellular Dynamics of Immune Cells in a Corneal Wound Mouse Model using Intravital Imaging

研究代表者

水野 連太郎(MIZUNO, RENTARO)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10516008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：近年、生物の内部で起こっている事象を“生きたまま”で観察できる手法として生体4Dイメージングが注目されている。生体4Dイメージングでは、多光子励起顕微鏡を用いることにより、従来の固定・薄切した組織による静的な解析では十分検討が困難であった、生命現象の本質である細胞の動きを時間軸を加えて解析することが可能となった。本研究では、免疫細胞蛍光標識マウスならびに眼表面の生体4Dイメージングの手法を用いて、角膜創傷治癒過程における炎症細胞の動態解析を行った。その結果、角膜アルカリ外傷、ならびに、角膜縫合による角膜内炎症細胞の動態を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Corneal suture is a surgical procedure used to treat corneal trauma or for cases of corneal transplantation. However, suture-related inflammatory cell infiltration (dynamics) in the cornea has yet to be analyzed in detail. In this study, we used immune cells labeled mice, which are gene-targeted mice expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP), and intravital imaging, which is a technique used to analyze cellular and molecular dynamics stereoscopically and time-dependently in an in vivo animal model. LysM strongly positive cells (neutrophils) are present in the stroma of only limbus at normal condition, but they move to the entire stroma of the cornea after alkali injury. We also found that neutrophils migrated from limbal capillary loop and infiltrated to the corneal suture. Using Intravital Imaging, we could find the dynamic features underlying various physiological and pathological conditions in cornea.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：眼免疫学

1. 研究開始当初の背景

従来、組織や細胞の解析には、組織や臓器を“固定”して観察していた。このように“生体”を“死体”にして観察していたので、細胞の動きに関する情報を得ることはできなかった。近年、低侵襲で深部組織の観察に適した“多光子励起顕微鏡”の登場により生体を“生きたまま”観察することができるようになった。多光子励起顕微鏡を用いた生体4Dイメージングでも、“intravital imaging”とよばれる、実験動物を麻酔下で生かしたまま、観察したい臓器を露出して観察する方法を用いる。動物を生かしているため、循環血流が保たれるという非常に大きなメリットがあり、血流があることにより、観察している組織を完全に生理的な環境に保つことができる。血管と組織間での細胞の流入もとられることができる。共同研究者である石井優教授は、生きた骨の組織を観察し、血液中にある脂質の一種のスフィンゴシン1リン酸(S1P)が骨組織内での破骨細胞の動態を制御していることを明らかにした。生体4Dイメージングでは、呼吸し心拍している生きた動物を観察するため、目的とする臓器をきれいに観察できるようになることは容易ではない。研究分担者である上田は、2010年4月より石井優研究室において、眼表面の生体4Dイメージングの実験系を立ち上げはじめ半年以上かけて完成させた。多光子励起顕微鏡を用いた生体4Dイメージングを眼表面の解析に応用したという報告は今まで皆無であり、それを実践できるのは、研究代表者の研究グループだけである。

研究代表者ならびに研究分担者は、角膜外傷後やアルカリ外傷後の角膜創傷治癒過程における炎症制御に興味を持ち臨床診療を行ってきた。本研究では、角膜縫合マウスモデルならびに角膜アルカリ外傷マウスモデルと、多光子励起顕微鏡を用いた生体4Dイメージングを用いて、これらの角膜創傷治癒過程における炎症制御機構を、炎症細胞動態に焦点をあて解析を行う。

2. 研究の目的

近年、生物の内部で起こっている事象を“生きたまま”で観察できる手法として生体4Dイメージングが注目されている。生体4Dイメージングでは、多光子励起顕微鏡を用いることにより、従来の固定・薄切した組織による静的な解析では十分検討が困難

であった、生命現象の本質である細胞の動きを時間軸を加えて解析することが可能となった。研究代表者ならびに研究分担者は、世界に先駆けてマウスを用いた眼表面の生体4Dイメージングの手法を確立している。本研究では、眼表面の生体4Dイメージング手法ならびに免疫細胞(好中球、単球、樹状細胞等)蛍光標識マウスを用いて角膜創傷治癒過程における炎症細胞の動態解析を行うとともに、各種遺伝子改変マウスを用いてその制御機構を解明する。

本研究により角膜創傷治癒過程における炎症制御機構が明らかとなれば、現在臨床で用いられている治療法の炎症細胞に対する作用効果ならびに時間的適切性を評価することが可能となり、さらに新しい治療戦略の確立へとつながることが期待できる。

3. 研究の方法

A. 好中球蛍光標識マウス(LysM-EGFPマウス)を用いた細胞動態の解析

角膜アルカリ外傷における角膜内好中球の動態解析

1N-NaOHを染み込ませた直径2mmのろ紙をLysM-GFPマウスの角膜の中央に2秒間接触させ、角膜アルカリ外傷モデルを作成した。その後、経時的に角膜組織を採取し共焦点顕微鏡で観察した。

角膜縫合時における角膜内高級球の動態解析

LysM-eGFPマウスの角膜の中央全層に10-0ナイロン糸で約1mmの縫合を行った。角膜縫合後のLysM強陽性細胞の生体内での動態を、4D生体イメージングを用いて3日目まで経時的に観察した。

B. 単球蛍光標識マウス(CX3CR1-EGFPマウス)を用いた細胞動態の解析

角膜アルカリ外傷における角膜内単球の動態解析

1N-NaOHを染み込ませた直径2mmのろ紙をCX₃CR1-GFPマウスの角膜の中央に40秒間接触させ、角膜アルカリ外傷重症モデルを作成した。その後、経時的に角膜組織を採取し、共焦点顕微鏡で観察した。

C. 樹状細胞蛍光標識マウス(CD11c-YFPマウス)を用いた細胞動態の解析

菌体成分点眼時における角膜内樹状細胞の動態解析

ウイルス由来2本鎖RNAとしては、

polyI:C を用いた。骨髄系顆粒球を蛍光標識した LysM-eGFP マウスに LPS ならびに polyI:C を 1 回点眼し、点眼前、点眼 24, 48, 72 時間後の角膜内 LysM 強陽性細胞(好中球)の動態を蛍光顕微鏡で観察した。好中球の動態の比較を目的として、角膜アルカリ外傷ならびに角膜縫合による好中球の動態を経時的に解析した。

4. 研究成果

A. 好中球蛍光標識マウス(LysM-EGFP マウス)を用いた細胞動態の解析

角膜アルカリ外傷における角膜内好中球の動態解析

LysM-GFP マウスの正常角膜では LysM 強陽性細胞(好中球)は、角膜輪部の実質層に局限して存在していた。角膜アルカリ外傷 1 時間後は LysM 強陽性細胞に明らかな変化は認めなかった。角膜アルカリ外傷 1 日後は LysM 強陽性細胞の数が増え、角膜中央に向かって浸潤していた。角膜アルカリ外傷後 2 日目に角膜中央にまで LysM 強陽性細胞はさらに数が増え角膜実質全体に存在した。このことより、角膜輪部実質に存在した好中球は、角膜アルカリ外傷によって角膜実質全体に浸潤することが明らかとなった。

角膜縫合時における角膜内好中球の動態解析

正常角膜では、LysM 強陽性細胞は角膜輪部の実質層に局限して存在していた。角膜縫合 2 時間後に LysM 強陽性細胞が角膜輪部血管から角膜と結膜両方に遊走することが確認された。遊走してきた LysM 強陽性細胞は角膜縫合 6 時間後に角膜中央の縫合糸に到達した。その後も縫合糸への LysM 強陽性細胞の浸潤は継続し、角膜縫合 48 時間後に数がピークとなった。それ以降も、角膜輪部から縫合糸への遊走ならびに浸潤は継続するが、LysM 強陽性細胞の数は減少していった。このことから、角膜縫合により好中球が角膜輪部血管から縫合糸へ遊走し浸潤する事が明らかとなった。

B. 単球蛍光標識マウス(CX₃CR1-EGFP マウス)を用いた細胞動態の解析

角膜アルカリ外傷における角膜内単球の動態解析

CX₃CR1 細胞は、正常角膜では角膜の上皮層・実質層に存在したが、外傷直後、

外傷部では消失した。上皮層は、1 日後に非外傷部の角膜周辺部から外傷部へ若干の CX₃CR1 細胞の浸潤を認め、その後非外傷部・外傷部ともに経時的に CX₃CR1 細胞が増加した。実質層は、1 日後に外傷境界部で CX₃CR1 細胞の蓄積を認め、角膜中央部にも若干の浸潤を認めた。4 日後に外傷境界部の CX₃CR1 細胞の蓄積数が最大となり、角膜中央部への浸潤も著しく増加した。このことから、角膜上皮層・実質層に存在した CX₃CR1 細胞は、アルカリ外傷直後外傷部から消失し、その後非外傷周辺部から外傷部中央に向かって浸潤することが明らかになった。

C. 樹状細胞蛍光標識マウス(CD11c-YF)を用いた細胞動態の解析

菌体成分点眼時における角膜内樹状細胞の動態解析

無処置マウスでは角膜内の好中球は角膜輪部の実質層のみに局在していた。LPS 点眼群と polyI:C 点眼群では点眼後 24, 48, 72 時間いずれも、好中球は角膜輪部のみに局在し、大きな変化は認めなかった。一方、角膜アルカリ外傷ならびに角膜縫合では好中球は処置後 24 時間で角膜全体に浸潤していた。

このことより、角膜内の好中球は角膜アルカリ外傷、角膜縫合などの外的刺激に対しては大きく動き、角膜全体に浸潤するのにも関わらず、細菌あるいはウイルスの構成成分である LPS ならびに polyI:C による点眼刺激に対してはほとんど反応しないと考えられた。健常な眼表面には独自の自然免疫応答が存在すると考えられる。

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 0 件)

[学会発表](計 12 件)

国際学会

1. Koga A, Ueta M, Ishii M, Koizumi N, Kinoshita S: Kinetic analysis of neutrophils in a corneal-alkali-injury mouse model. The 28th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress held in conjunction with the 71th Annual

- Conference of All India Ophthalmological Society (APAO-AIOS 2013), Hyderabad, India. 2013.1.18.
2. Koga A, Ueta M, Ishii M, Koizumi N, Kinoshita S: Analysis of neutrophil dynamics in the cornea after alkali injury using lysm-gfp mice. 2012 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2012.5.8.
 3. Koga A, Ueta M, Ishii M, Minamiyama R, Koizumi N, Kinoshita S: Kinetic analysis of neutrophils in a corneal-alkali-injury mouse model. 2013 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Seattle, Washington, USA, 2013.5.6.
 4. Ueta M, Koga A, Ishii M, Kinoshita S: Analysis of the Cellular Dynamics of LysM-Positive Cells in a Corneal Suture Mouse Model using Intravital Imaging. 2014 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Imaging conference, Orlando, California, USA, 2014.5.3.

国内学会

5. 古賀彩加、上田真由美、井上亮太、石井 優、小泉範子、木下 茂: 角膜縫合ならびに抜糸による角膜好中球浸潤の動態変化の解析. 第38回日本角膜学会総会、角膜カンファランス 2014. 宜野湾市、沖縄、2014. 1. 30.
6. 井上亮太、上田真由美、古賀彩加、篠宮克彦、石井優、小泉範子、木下茂: LPS、polyI:C 点眼における角膜内の好中球動態解析, 第38回日本角膜学会総会、角膜カンファランス 2014. 宜野湾市、沖縄、2014. 1. 31.
7. 古賀彩加、上田真由美、井上亮太、石井 優、小泉範子、木下 茂: LysM-eGFP マウスを用いた角膜縫合による角結膜への影響についての解析第47回日本眼炎症学会、大阪市、大阪府、2013.7.12.
8. 南山竜輝、上田真由美、古賀彩加、石井優、小泉範子、木下茂: CX3CR1-GFP マウスを用いた角膜アルカリ外傷における炎症病態の解析. 角膜カンファランス 2013(第37回日本角膜学会総会・

第29回日本角膜移植学会), 和歌山, 2013.2.14.

9. 古賀彩加、上田真由美、南山竜輝、石井優、小泉範子、木下茂: LysM-GFP マウスを用いた角膜縫合モデルの生体4Dイメージ解析. 角膜カンファランス 2013(第37回日本角膜学会総会・第29回日本角膜移植学会), 和歌山, 2013.2.14.
10. Ayaka Koga, Mayumi Ueta, Masaru Ishii, Noriko Koizumi, Tadamitsu Kishimoto, Shigeru Kinoshita. Eye drops of IL-6 Ab suppress the infiltration of LysM-positive granulocytes after corneal alkali burn. 第41回日本免疫学会学術集会, 神戸, 2012.12.5.
11. 古賀彩加、上田真由美、石井優、小泉範子、木下茂: LysM-GFP マウスを用いた角膜化学外傷における好中球の動態解析. 第33回日本炎症・再生医学会, 福岡, 2012.7.6.
12. 古賀彩加、上田真由美、石井優、小泉範子、木下茂: LysM-GFP マウスを用いた角膜アルカリ外傷における炎症病態の解明. 角膜カンファランス 2012(第36回日本角膜学会総会・第28回日本角膜移植学会), 東京, 2012.2.23.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

該当無

取得状況(計0件)

該当無

〔その他〕

ホームページ等

該当無

6. 研究組織

(1)研究代表者

水野 連太郎(MIZUNO Rentaro)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号: 10516008

(2)研究分担者

上田 真由美(UETA Mayumi)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号: 60398386

(3)連携研究者

該当無