

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20287

研究課題名（和文）角膜感染症が角膜神経と角膜血管新生に及ぼす影響

研究課題名（英文）Influence of corneal infection to corneal nerves and angiogenesis

研究代表者

片平 晴己（Katahira, Haruki）

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：50617579

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000 円

研究成果の概要（和文）：マウスの角膜に代表的な緑膿菌株を用いて角膜炎を安定的に生じさせることにより、緑膿菌角膜炎モデルを作成し、角膜神経との関連性について研究を行った。本モデルでは安定的に角膜炎を生じさせることができたので、経時的なマクロでの観察、免疫染色、クリニカルスコア、病理像が得られた。本モデルにおいては角膜炎発症後から24時間以内に角膜神経が完全に消失することが判明し、また角膜上皮厚も減少していることが確認された。また、角膜における血管新生は数日後から発生しており、角膜神経消失と比較して遅れて生じることが判明した。

研究成果の概要（英文）：We developed a stable model of *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in mice using a representative *P. aeruginosa* strain and studied the relationship with the corneal nerve. In this model, since it was able to stably developed keratitis, observation of macro over time, immunostaining, clinical score and pathological image were obtained. In this model, it was found that the corneal nerve completely disappeared with in 24 hours after the onset of keratitis, and it was confirmed that the corneal epithelium thickness also decreased. In addition, angiogenesis in the cornea occurred several days later, and it turned out to be delayed compared to the corneal nerve disappearance.

研究分野：眼科学

キーワード：角膜神経 角膜血管新生 緑膿菌感染

1. 研究開始当初の背景

角膜は体内で最も神経が密に存在する組織で、知覚も非常に鋭敏な組織である。その鋭敏な知覚は角膜を透明に保つために外来の異物等から角膜を保護する非常に重要な働きをもつ。角膜の神経の由来としては脳神経である三叉神経の第一枝である眼神経が眼窩内を通過し、角膜神経となり、角膜輪部より侵入した神経枝は角膜浅層に分布し、神経終末が多数上皮で分布することで角膜の知覚を司っている。

近年、この角膜神経が単純な角膜知覚のみならず角膜上皮の恒常性維持に重要な関与をしていることが示唆されているものの、角膜上皮細胞と角膜神経の詳細な相互作用についてはまだ未解明である。

一方で角膜感染症は角膜混濁を引き起こし、感染が制圧されても視覚障害を生じる疾患である。角膜感染症では上皮剥離は実質の浮腫など、角膜の恒常性を大きく乱す疾患であるが、角膜神経の角膜感染症に対する影響についてはいままで報告がない。

また、角膜感染症においては角膜に血管新生が生じるが、今まで血管新生と角膜神経についての関連性についての報告はない。角膜血管新生は角膜上皮細胞によって制御されているが、角膜上皮細胞は同じく角膜神経の影響を受けているため、両者には相互に与える影響があると想像される。

そのため、血管新生時における角膜神経の状態や、また逆の状況、更には角膜神経が消失した際の角膜血管新生など神経と血管新生については非常に興味深い知見が得られる可能性がある。

2. 研究の目的

角膜神経は角膜を透明に保つために、その鋭敏な知覚によって角膜を様々な傷害から保護していることに加え、近年では詳細は不明なものの角膜上皮細胞の恒常性に寄与していることが示唆されている。

そこで今回、角膜上皮細胞に対して強い傷害を生じる感染性角膜炎のマウスモデルを用いて、角膜感染症における生体反応を明らかにすると共に、角膜感染症における角膜神経の役割やその与える影響を解明することを研究目的とした。我々の研究室では代表的な緑膿菌株である PAO-1 を保有しており、この菌株を用いて角膜感染症モデルの作成を行った。

また、角膜感染症においては角膜血管新生が強く生じることがわかっているが、角膜血管新生も角膜神経と同様に角膜上皮細胞に影響を受けていることがわかっている。特に角膜上皮細胞からの soluble VEGF receptor は角膜血管新生を強く抑制することがわかっている。一方で角膜神経と角膜血管新生の関係性については詳細な検討はなされていない。

そこで角膜感染症における角膜神経と角

膜神経が角膜血管新生に及ぼす影響について解析することで、角膜感染症の新規治療法の糸口を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

マウスの角膜上皮を以下の図のように 3 本スクラッチを行い、そこに代表的な緑膿菌株である PAO-1 を滴下することで、角膜炎モデルを作成した。

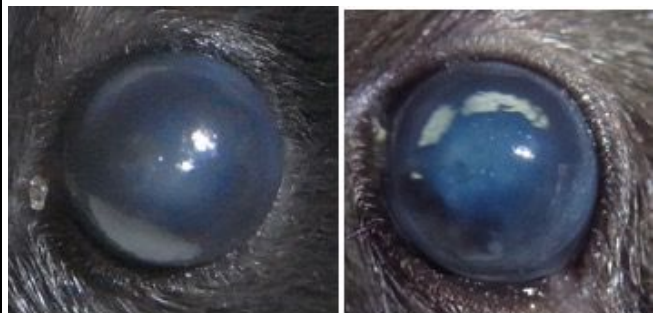


この角膜炎モデルに対し、マクロでの眼表面観察、免疫染色(α -tubulin, CD31, F4/80, CD11b)、クリニカルスコア、病理像などの解析を用いて感染とその影響を観察した。

マウス角膜に上記の方法にて緑膿菌を感染させた後、緑膿菌角膜炎モデルの評価を臨床的に行った。更に、感染から何日後に角膜神経が消失するのか経時的に α -tubulin にて免疫染色を行い観察した。また、免疫系細胞(好中球マーカー Gr-1、マクロファージマーカーである CD11b, F4/80) にて免疫染色を行い、角膜神経に対する影響の有無を調べた。

4. 研究成果

マウスの角膜に代表的な緑膿菌株である PAO-1 を用いて角膜炎を安定的に生じさせることができた。緑膿菌角膜炎モデルを作成し、角膜神経との関連性について研究を行った。下図の通り、マウスにおける緑膿菌角膜炎の Day2 においてはヒトの緑膿菌角膜炎でもみられる前房蓄膿を伴う角膜浮腫、混濁を認めた。また、Day7 においては角膜の浮腫、混濁がみられた。



Day 2

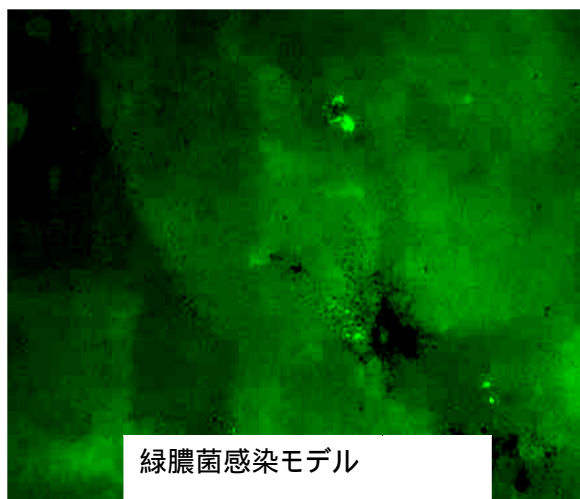
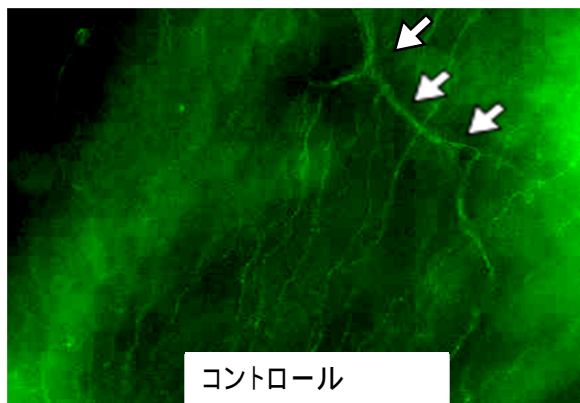
Day 7

本モデル作成においては、安定的に角膜炎を生じさせることを確立し、それにより経時的なマクロでの観察、免疫染色、クリニカルスコア、病理像が得られた。

本モデルにおいては角膜炎発症後から非常に早期に(24時間以内に)角膜神経が完全に消失することが判明し、また角膜上皮厚も減少していることが確認された。

角膜神経は α -tubulin によって良好に染色されている。

緑膿菌感染による角膜神経の消失



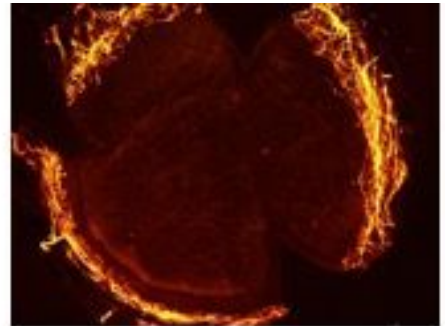
この結果より角膜における感染症は非常に鋭敏に角膜神経に影響し、メカニズムは不明であるが早期に角膜神経を消失させることが判明した。

また、角膜における血管新生は数日後から発生しており、角膜神経消失と比較して遅れて生じることが判明した。

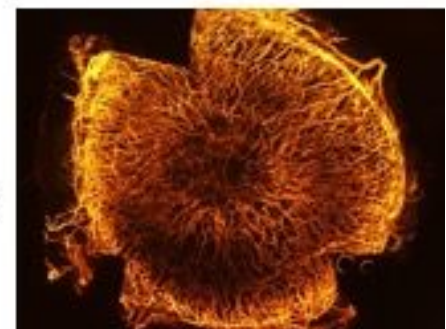
感染から2週間が経過すると角膜血管新生はピークとなり、角膜全体に CD31 陽性細胞が観察される程に血管新生が確認された。

緑膿菌感染による血管新生

control



PA
infection



<引用文献>

Ambati BK, Nozaki M, Singh N et al.
Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1.
Nature 443(26); 993-997. 2006.

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 1 件)

柴田元子、服部貴明、森秀樹、嶺崎輝海、片平晴己、熊倉重人、後藤浩
涙点プラグの付着物からの細菌の検出
新しい眼科, 33(10); 1493-1496. 2016.査読有り

[学会発表](計 2 件)

成松明知、服部貴明、小池直人、田島一樹、中川迅、片平晴己、嶺崎輝海、熊倉重人、松本哲哉、後藤浩
緑膿菌感染における角膜リンパ管とマクロファージ動態の解析
日本角膜学会総会 2017.2.16 アクロス福岡

片平晴己、服部貴明、嶺崎輝海、熊倉重人、後藤浩
带状角膜変性に生じた細菌性角膜潰瘍の2例
日本角膜学会総会 2015.2.11 高知市文化

プラザかるぽーと

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

片平 晴己 (KATAHIRA Haruki)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号：50617579

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

服部 貴明 (HATTORI Takaaki)
田島 一樹 (TAJIMA Kazuki)