

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16963

研究課題名（和文）三叉神経再生を視野に入れた神経麻痺性角膜症の新規治療戦略

研究課題名（英文）Treatment strategy for neuroparalytic keratopathy with a view to trigeminal nerve regeneration.

研究代表者

田中 才一（TANAKA, SAIICHI）

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60316106

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：マウスの円形角膜上皮欠損を作成し、創傷治癒及び細胞増殖の検討を行った。角膜上皮欠損創の残存部の面積はShh CE, Shhf/wtの両マウス間に統計的有意差はなかった。BrdU陽性細胞数は角膜上皮剥離6時間後のShh CEマウスの角膜上皮でShhf/wtマウスと比較し有意に抑制されていた。角膜上皮創傷治癒過程でのSox9の発現を免疫染色で検討したところ、角膜上皮剥離12時間後のShh CEマウスの遊走している角膜上皮でShhf/wtマウスと比べSox9の発現の増強が見られた。また、TUJ1抗体を用いた角膜のホールマウント免疫染色により、角膜の神経分布の抑制がみとめられて、知覚低下が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経麻痺性角膜症は視力障害や疼痛に関与する。ただ、その原因に関してはいまだ不明なために、動物実験モデルにてその機序を解明することで視力障害や疼痛の軽減につながる。今回の研究では角膜の創傷治癒や角膜神経の分布に関してソニックヘッジホッグ（Shh）が関与していることが示唆された。創傷治癒にはいろいろな作用機序が存在するが、その一つの関与がわかったことで、今後の創傷治癒における臨床的な治療薬の解明につながると思われる。

研究成果の概要（英文）：Circular corneal epithelial defects were created in mice, and wound healing and cell proliferation were examined. There was no statistically significant difference in the residual area of the corneal epithelial defect between Shh CE and Shhf/wt mice, and the number of BrdU-positive cells was significantly suppressed in the corneal epithelium of Shh CE mice 6 hours after corneal epithelial detachment compared to that of Shhf/wt mice. Immunostaining for Sox9 expression during corneal epithelial wound healing revealed enhanced expression of Sox9 in the migrating corneal epithelium of Shh CE mice at 12 hours after corneal epithelial detachment compared to Shhf/wt mice. Whole-mount immunostaining of the cornea with TUJ1 antibody showed suppression of corneal nerve distribution and hypersensitivity.

研究分野：眼科

キーワード：角膜 三叉神経 創傷治癒 ソニックヘッジホッグ

1. 研究開始当初の背景

角膜上皮創傷治癒では輪部幹細胞と上皮基底細胞の増殖と三叉神経の知覚が大きな役割を演じている。角膜上皮細胞増殖には上皮が発現するソニック・ヘッジホッグ(Shh)が関与する(Saika S et al. IOVS 2004)。研究代表者の予備的研究から角膜上皮特異的 Cre リコンビナーゼによる Shh 角膜上皮特異的ノックアウトでは角膜上皮の基底細胞の増殖活性が抑制された。一方、角膜上皮欠損は基底細胞下の三叉神経終末も障害する。その再生が上皮治癒に必須であるが、Shh が神経再生促進作用を有するので、角膜上皮 Shh 欠損が三叉神経終末の再生に関係するかどうかをも検討する。Dox 反応性 rtTA 角膜上皮特異的 K12 プロモータードライブの Cre を用いた角膜上皮の組織特異的、時間特異的 Shh 欠失マウスを交配し、角膜上皮創傷治癒過程とその時の三叉神経終末再生での Shh の役割を解明し、Shh 局所投与による三叉神経再生を視野に入れた神経麻痺性角膜症の新規治療戦略の確立を目指す。

2. 研究の目的

外傷(頭蓋内手術を含む)や単純ヘルペス感染による三叉神経第一枝の障害は角膜知覚障害を介して、角膜創傷治癒を障害したり、遷延性角膜上皮障害の原因となる(神経麻痺性角膜症)。糖尿病による末梢神経障害も糖尿病による基底膜構造の障害と合わせて角膜上皮の恒常性維持の障害と成る。神経麻痺性角膜症は極めて難治で、研究的には上皮再生を標的にしたサブスタンス P 由来ペプチドとインスリン様成長因子ペプチドの点眼治療の有効性が報告されたものの、臨床応用には至っていない。現状では対症療法に終始し、上皮細胞増殖にみならず三叉神経線維の再生促進を目的とした

3. 研究の方法

(1) K12 Cre/Shh(fl/fl) マウスでの胎生期からの角膜上皮 Shh 欠損の角膜三叉神経の分布と角膜上皮治癒(細胞遊走、細胞増殖など)に対する影響。

生後4週の K12 Cre/ Shh (fl/fl) マウスを用いる。角膜内の三叉神経線維の発育をホールマウント Tuj1 染色で EVOS 顕微鏡(所属に配置)で神経分布を観察する。円型トレパン(直径 2 mm、皮膚科生検用)でマークの上、角膜上皮欠損を眼科マイクロ手術用メスで作成する(Saika S, et al. JBC 2000)。24 時間後までの定期的なフルオレスセイン染色による残存上皮欠損の観察を行い、残存欠損面積の経過を統計解析する。通常、この上皮欠損は野生型マウスでは 24 時間で治癒する。同じ創傷を受けた両群マウスで、治癒経過で BrdU 腹腔内投与(Okada Y, et al. AJP XXXX)で増殖細胞をラベルし、パラフィン切片での BrdU 染色で評価する。また、同処置後の治癒中の角膜サンプルで RNA 抽出、real-time RT-PCR を用いて、各種創傷関連因子、神経ペプチドの mRNA 発現を所属の方法(TaqMan、Applied Bioctech 社)で評価する。

(2) rtTA K12 Cre/Shh(fl/fl) マウスで胎生期の角膜上皮と角膜内三叉神経が正常に発育したマウスでドキシサイクリン投与で Shh 発現を阻害した時期での角膜上皮創傷治癒(細胞遊走、細胞増殖など)とその後の角膜内三叉神経線維の再生過程の検討。

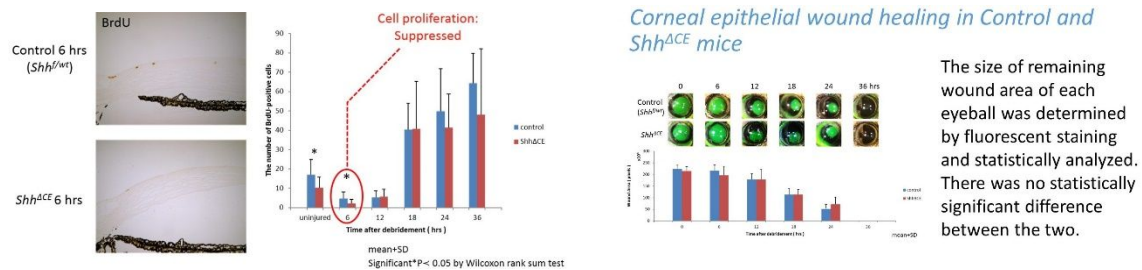
K12 は、胎生 14.5 日から角膜上皮に発現され始め、生後 8 週目には基底細胞についで発現される。予備的にドキシサイクリン添加飼料(0.2%、Research Diet 社)を生後 21 日目(離

乳日)から与えると、2ヶ月後から Cre の影響が出始め、3ヶ月後で効果が完全となることを把握している。この系で rtTA K12 Cre/Shh(fl/fl)マウス rtTA K12 と Cre/Shh(fl/+)マウスで(1)同様の検討を行う。追加として、上皮欠損で障害された角膜内の三叉神経線維の再生をホールマウント Tuj1 染色で EVOS 顕微鏡で神経分布を観察する。

(3)三叉神経の頭蓋内部分凝固による角膜創傷治癒不全マウスモデル(神経麻痺性角膜症モデルマウス:教室で作成手技確立済み)で Shh 局所投与の治療効果の評価と角膜内三叉神経再生に対する効果を判定する。

4. 研究成果

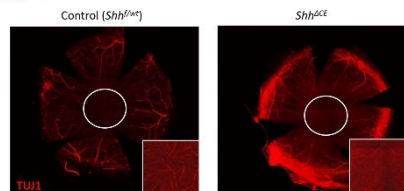
(1)Krt12-Cre 遺伝子をノックインしたマウス(シンシナチ大学眼科から供与)と Shhf/f マウスを交配し、Krt12Cre/wt/Shhf/f (Shh^{CE})マウスを作成した。皮膚科トレパンとマイクロサージカルナイフを用いて8週齢の Shh^{CE}及び Shhf/wt (Krt12wt/wt/Shhf/wt, コントロール)マウスの右眼角膜中央部に直径2mmの円形角膜上皮欠損を作成した。上皮剥離6,12,18,24,36時間後に創傷治癒及び細胞増殖の検討を行った。創傷治癒は角膜上皮欠損創の残存部面積を Imgae J ソフトウェアを用いて測定して評価した。細胞増殖については BrdU 陽性細胞数で評価をする。角膜上皮欠損創の残存部の面積は Shh^{CE}, Shhf/wt の両マウス間に統計的有意差はなかった。BrdU 陽性細胞数は角膜上皮剥離6時間後の Shh^{CE}マウスの角膜上皮で Shhf/wt マウスと比較し有意に抑制されていた。Sox9 は角膜輪部上皮の幹細胞/前駆細胞の増殖や分化の調節に関係しており、その発現を促進するシグナルのひとつに Shh シグナル伝達経路があるとされている。角膜上皮創傷治癒過程での Sox9 の発現を免疫染色で検討したところ、角膜上皮剥離12時間後の Shh^{CE}マウスの遊走している角膜上皮で Shhf/wt マウスと比べ Sox9 の発現の増強が見られた。



(2)TUJ1 抗体を用いた角膜のホールマウント免疫染色により非損傷下での角膜内の神経分布を観察すると同時に Cochet-Bonnet 角膜知覚計を用いて角膜知覚を検討し、角膜の神経分布の抑制がみとめられて、知覚低下がみとめられた。

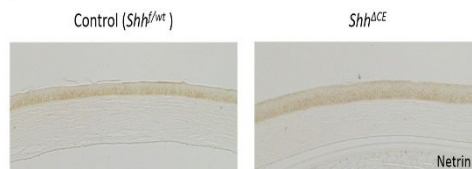
角膜の創傷治癒において内因性の Shh の関与が示唆され、角膜神経の再生においても Shh の関与が示唆された。

Corneal innervation was dramatically suppressed in Shh^{ACE}



In uninjured cornea, the sensory nerve distribution was dramatically suppressed in Shh^{ACE} compared with controls.

Expression pattern of netrin1 in corneal epithelial cells



Netrin1 expression was not suppressed in Shh^{ACE}.

これらの研究成果にて 日本眼科学会およびアメリカでのゴードンカンファレンスにて発表し、活発な議論を行い、ソニックヘッジホッグの重要性、それ以外の角膜の創傷治癒に関する因子の検討などについて知見を得て、さらなる角膜の創傷治癒の研究の必要性について考慮された。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka Sai-Ichi、Ichikawa Kana、Miyajima Masayasu、Okada Yuka、Saika Shizuya	4. 巻 10
2. 論文標題 Inhibition of Rho kinase suppresses capsular contraction following lens injury in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Taiwan Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 100 ~ 105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4103/tjo.tjo_80_19	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 市川佳奈
2. 発表標題 内因性ソニックヘッジホッグ(Shh)は角膜内の神経分布に関与する
3. 学会等名 日本眼科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市川佳奈
2. 発表標題 内因性ソニックヘッジホッグは角膜上皮治癒過程での細胞増殖に関与する
3. 学会等名 日本眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kana Ichikawa
2. 発表標題 Endogenous Sonic hedgehog is involved in the corneal innervation and epithelial cell proliferation
3. 学会等名 Gordon Research Conference USA（国際学会）
4. 発表年 2020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
研究協力者	市川 佳奈 (Ichikawa Kana)		

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
---------	---------