

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18892

研究課題名(和文)細菌性角膜炎における角膜リンパ管新生誘導による新規治療法の開発

研究課題名(英文)The development of new therapies using corneal lymphangiogenesis against bacterial keratitis.

研究代表者

成松 明知(Narimatsu, Akitomo)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：20617625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：(1)既報のモデルを応用し、血管新生を伴わず、かつ角膜混濁を起こさないリンパ管増生モデルの作成方法を確立した。
(2)確立したリンパ管増生モデルを用いて、細菌性角膜炎によるリンパ管の役割を検討した。その結果、角膜リンパ管が細菌性角膜炎の炎症を軽減させている可能性が示唆された。今後は、角膜炎における浮腫、菌数がリンパ管増生モデルにおいて、どのような影響を受けるかを検討していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、我々は血管新生を伴わず、かつ角膜混濁を起こさないリンパ管増生モデルの作成方法を確立した。このモデルは今後、リンパ管新生の機能を解明するうえで汎用性があり、学術的に意義のあるものといえる。また、角膜リンパ管が細菌性角膜炎の炎症を軽減させている可能性が示唆されたことから、今後、細菌性角膜炎後に残存する癒痕性角膜混濁を軽減、さらには予防する治療法の開発につながる可能性があり、社会的意義も大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：(1)we established the mouse model of corneal lymphangiogenesis without angiogenesis and corneal opacity.

(2)Using the corneal lymphangiogenesis model, we demonstrated the role of corneal lymphatic vessels in bacterial keratitis. As a result, corneal lymphatic vessels probably reduced corneal inflammation in bacterial keratitis.

研究分野：眼科学

キーワード：角膜 リンパ管新生 血管新生 感染 緑膿菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細菌性角膜炎の臨床

コンタクトレンズ装用者は日本全国で約 1500 万人といわれ、装用者による眼障害の約 13% が感染性角膜炎であるといわれている(高橋ら、日本の眼科 2012)。緑膿菌に代表されるグラム陰性菌は、コンタクトレンズ装用者に起こる感染性角膜炎の代表的な原因菌であり、これらの細菌に対して有効な抗菌薬の局所投与(点眼)と全身投与にて治療を行うが、治療により感染が消退しても、角膜混濁を残して癒痕治癒し、重度の視力障害を来すこともある。角膜混濁の治療には、角膜移植が選択されるが、新たな感染、拒絶反応、移植後の不正乱視による視力不良など問題も多く、混濁を未然に防ぐ治療や起きてしまった混濁を軽減する新しい治療が望まれる。

(2) 細菌感染における角膜の免疫応答

角膜は眼球の最表面に位置し、光学体として眼の機能を維持するために生体内で最も透明な組織であることと同時に、他の体表面組織と同様に病原体が体内へ侵入することを防いでいる。正常角膜には血管やリンパ管などの脈管系組織は存在せず、わずかな数の免疫担当細胞しか存在しない。その理由として、脈管系組織から流出する物質や免疫担当細胞から放出される炎症性産物は角膜を混濁させ、角膜の透明性が維持できなくなってしまうためと考えられている。しかし、ひとたび角膜内に病原体が侵入すれば、マクロファージなどの抗原提示細胞が活性化されることによって病原体への攻撃が開始され、角膜内への炎症性細胞浸潤、血管、リンパ管新生が引き起こされる。

(3) 角膜リンパ管の機能および役割

リンパ管は免疫機構の一端を担っていることが近年の研究で明らかにされ、その働きに注目が集まっている(Alitalo K. Nat Med. 2011.)。眼科領域でも、角膜移植拒絶反応、ドライアイ、アレルギー、ヘルペス角膜炎などの病態にリンパ管が重要である可能性が報告されている(Patel et al. Semin Ophthalmol. 2009.)が、その役割については様々な報告があり、疾患や病原体微生物によってリンパ管の働きが異なっている可能性がある。さらに、細菌感染とリンパ管新生の関係については、詳細な報告もない。私たちは、緑膿菌による角膜炎のリンパ管を抑制すると角膜炎が悪化することを明らかにした(Narimatsu et al. Sci. Rep. 2019.)。その結果を踏まえて、本研究では、角膜リンパ管新生を誘導することで、細菌性角膜炎による角膜混濁を軽減する新しい治療法について検討を行っていく。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細菌性角膜炎におけるリンパ管の誘導による新規治療法の開発である。本研究では、マウスモデルにおけるリンパ管新生の治療効果および免疫動態を解明し、さらにリンパ管を誘導する最適な方法についても検討していく予定である。

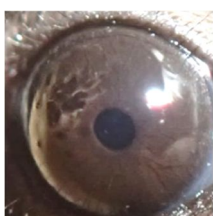
3. 研究の方法

(1) マウスリンパ管増生モデルの確立

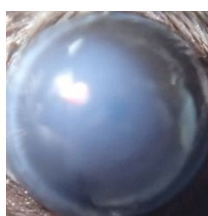
C57BL/6 マウスの角膜実質に PBS (PBS 群) もしくは生理食塩水(生食群)を注射することで浮腫を作成し、注射 1 週間後の混濁スコアを無処置の群(対照群)と併せて比較検討した。次に、生理食塩水を注射した群を注射群とし、抗 LYVE-1 抗体(リンパ管)と抗 CD31 抗体(血管)による免疫染色を行い、注射 1 週間後の血管、リンパ管新生を対照群と比較した。さらに、生理食塩水を注射した群(単回注射群)と、1 週間後に再度注射した群(2 回注射群)の注射後 2 週間後の混濁スコアおよび血管、リンパ管を比較検討した。

(2) 細菌性角膜炎におけるリンパ管の役割の検討

マウスに 27 ゲージ注射針で 3 本擦過創を作成し、一般的な緑膿菌株としてよく用いられる PAO-1 株を 2.5×10^5 CFU/2.5ul 滴下し接種させ、ソフトコンタクトレンズを装着することで角膜炎モデルを作成した。さらに上述のリンパ管増生モデル作成の後に、角膜炎を成立させた群と角膜炎のみの群との菌接種から 1 週間後の混濁スコアを比較検討した。



正常角膜



浮腫作成時



感染 1 週間後

4. 研究成果

(1)注射から 1 週間後は、対照群と比較して PBS 群では有意に混濁を生じていたが、生食群では混濁はみられなかった。また、注射群と対照群の 1 週間後の比較では、血管とリンパ管に有意差はなかった。一方、単回注射群と 2 回注射群の 2 週間後の比較では、角膜混濁と血管に差はみられなかったが、リンパ管は 2 回注射群で有意に進展していた。これらの結果から、血管新生を伴わず、かつ角膜混濁を起こさないリンパ管増生モデルの作成方法を確立した。

(2)リンパ管増生モデルに角膜炎を加えた群では角膜炎のみの群と比較し、混濁スコア有意に低かった。この結果から、角膜リンパ管が細菌性角膜炎の炎症を軽減させている可能性が示唆された。今後は、角膜炎における浮腫、菌数がリンパ管増生下でどのような影響を受けるかを検討していく予定である。

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 0件）

1. 著者名 Narimatsu Akitomo, Hattori Takaaki, Usui Yoshihiko, Ueno Hiroki, Funaki Toshinari, Komatsu Hiroyuki, Nakagawa Hayate, Akiba Hisaya, Goto Hiroshi	4. 巻 199
2. 論文標題 Blockade of costimulatory CD27/CD70 pathway promotes corneal allograft survival	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 108190 ~ 108190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exer.2020.108190	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 成松明知、服部貴明、山川直之、脇田遼、小池直人、熊倉重人、松本哲哉、後藤 浩
2. 発表標題 細菌性角膜炎における血管、リンパ管および神経の経時的変化の解析
3. 学会等名 フォーサム2019 2019年7月
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 成松明知、服部貴明、田島一樹、熊倉重人、後藤 浩
2. 発表標題 角膜上皮搔爬後の角膜神経におけるマクロファージの役割の検討
3. 学会等名 角膜カンファランス2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成松明知、服部貴明、田島一樹、熊倉重人、後藤 浩
2. 発表標題 角膜上皮搔爬後の角膜神経におけるP2Y2受容体とマクロファージの関与
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成松明知、服部貴明、田島一樹、熊倉重人、後藤 浩
2. 発表標題 角膜上皮搔爬後の角膜神経におけるP2Y2受容体とマクロファージの関与
3. 学会等名 第74回日本臨床眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成松明知、服部貴明、小松紘之、熊倉重人、後藤 浩
2. 発表標題 血管新生および角膜混濁を起こさないマウスリンパ管増生モデルの構築
3. 学会等名 角膜カンファランス2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akitomo Narimatsu, Takaaki Hattori, Yoshihiko Usui, Hiroki Ueno, Toshinari Funaki, Hiroyuki Komatsu, Hayate Nakagawa, Hisaya Akiba, Hiroshi Goto
2. 発表標題 Blockade of costimulatory CD27/CD70 pathway promotes corneal allograft survival
3. 学会等名 the 7th Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akitomo Narimatsu, Takaaki Hattori, Kazuki Tajima, Hayate Nakagawa, Naoyuki Yamakawa, Hiroyuki Komatsu, Yoshihiko Usui, Shigeto Kumakura and Hiroshi Goto
2. 発表標題 UTP accelerates corneal nerve regeneration via macrophages probably by releasing BDNF
3. 学会等名 the 7th Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting（国際学会）
4. 発表年 2021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	服部 貴明 (Hattori Takaaki)	東京医科大学	
研究協力者	阿部 駿 (Abe Shun)	東京医科大学	

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