

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592555

研究課題名(和文)角膜血管新生におけるセマフォリンの機能

研究課題名(英文)Roles of Semaphorin in corneal neovascularization

研究代表者

白井 智彦 (Usui, Tomohiko)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80282557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：角膜は眼球の最前面に位置する500ミクロン程度の無血管透明組織である。この角膜に感染、外傷などが生じた際、角膜は炎症や血管侵入を伴い混濁し、失明に至ることもある。このような疾患に対しては現在有効な薬物治療はなく、角膜移植を行っても拒絶反応の発症率が高い事が知られている。そこで近年抗炎症や抗血管新生効果が報告されているセマフォリン3Aの角膜化学外傷に対する有効性を検討した。セマフォリン3Aをマウス化学外傷モデルに局所投与したところ、角膜上皮の創傷治癒を促進し、角膜炎症や血管新生、リンパ管新生を抑制することが確認された。よってセマフォリン3Aは角膜化学外傷の治療薬として有望である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the therapeutic potential of semaphorin 3A (SEMA3A) in corneal chemical injury.

Corneal chemical injury was induced in mice by limbal scraping after the application of NaOH. Epithelial wound healing, hemangiogenic, lymphangiogenic responses, and macrophages infiltrations were investigated after administration of SEMA3A or control. The healing of epithelial defects in SEMA3A-treated mice were significantly faster than those of the control mice. The areas of hemangiogenesis and lymphangiogenesis in the animals treated with SEMA3A were significantly decreased as compared to those treated with control treatment. The number of F4/80-positive cells in corneas was significantly lower in mice treated with SEMA3A than in control mice. Our findings demonstrate that exogenous administration of SEMA3A is effective for healing epithelial wounds and inhibiting corneal angiogenesis and inflammation. SEMA3A may have therapeutic potential for preventing blindness.

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 血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

角膜は眼球の最も表面に位置する無血管透明組織であり、健全な視機能を得るためには、角膜に血管侵入がなく透明であることが必須条件である。しかしアルカリ被爆などの化学外傷、熱傷、Stevens-Johnson 症候群や眼類天疱瘡などの炎症性疾患、角膜ヘルペスや感染性角膜潰瘍などの感染性疾患、先天無虹彩症などの輪部機能不全疾患、角膜移植後の縫合糸に対する炎症反応、コンタクトレンズ装用など、さまざまな刺激や侵襲によって角膜の透明性は脅かされ、病的な血管が角膜内へ侵入してしまうことがある。角膜内に侵入した血管は脆弱であり、透過性が亢進していることから新生血管から漏出した成分により角膜混濁や瘢痕を招き、角膜の透明性維持が困難となり、最終的には重篤な視機能低下を残してしまう。また角膜は従来リンパ管も存在しない組織であるが、血管侵入角膜では同時にリンパ管新生も生じていることが明らかとなってきた。

このような角膜血管新生による角膜混濁の患者様は本邦において約100万人以上存在するのではないかと考えられており、眼科における大きな問題の一つとなっている。現在血管侵入を生じた角膜混濁を改善する唯一の治療法は角膜移植であるが、血管侵入角膜では、免疫的バランスが崩壊していることが問題である。すなわち、侵入したリンパ管を介して抗原提示細胞が容易に所属リンパ節へ遊走しやすく、かつ侵入血管を介して活性化されたリンパ球が容易に角膜へ遊走しやすくなる。そのため血管侵入角膜に対する角膜移植術の拒絶反応の発症率は高く、術後成績は極めて不良である。また本邦ではドナー角膜の供給が不十分であり、現時点での唯一の治療法である角膜移植ですら十分行うことができず、多くの患者がこのような角膜混濁による視機能低下に苦しんでいる。このような背景から、角膜血

管新生に対するあたらしい創薬が期待されている。

そこで本研究ではセマフォリン分子に着目した。セマフォリンは神経ガイダンス因子として同定された分子群であるが、近年神経系以外にも免疫系、血管新生、癌細胞浸潤、様々な器官形成への関与が報告されている。神経細胞に関しては、発生段階で神経軸索の方向性を決定するガイダンス因子であるが、生体においては神経の伸長を阻害することが知られている。血管新生においても、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)を競合阻害することにより、血管新生を抑制することが報告されている一方、血管の透過性は抑制しないことがわかっている。これは角膜には大変都合の良い因子である。それは、正常角膜の代謝機構において、輪部血管からの拡散は、角膜恒常性維持のため大変重要であることが考えられているからである。すなわちもしセマフォリンが角膜で機能していれば、無血管を維持しつつ、輪部血管からの拡散は阻害しないことになる。

しかし角膜におけるセマフォリンの研究は、セマフォリン3Aの発現が角膜上皮の創傷過程で上昇することがわかっているのみである。また眼科領域のみならず、セマフォリンとリンパ管新生に関する研究はほとんどなされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、角膜の無血管無リンパ管透明維持機構として重要であると推察されるセマフォリンの発現や、炎症性角膜血管新生過程に対するセマフォリン投与の効果を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

動物モデルには、マウス(C57BJ/6)角膜アルカリ外傷モデルを用いた。マウス角膜に麻酔下で0.1Nの水酸化ナトリウムを点眼することにより角膜血管新生、リンパ管新生を誘導した。

この過程において、1日おきに3種類の濃度のセマフォリン 3A (10ng/ml, 100ng/ml, 1000ng/ml) の結膜下投与を行った。コントロールにはリン酸バッファーを用いた。

アルカリ外傷誘導後、血管新生や上皮欠損の程度は2日おきに顕微鏡で観察し、gradingを行った。上皮欠損の観察にはフルオレセイン染色を用いた。

またアルカリ外傷誘導後14日後に眼球を摘出し、新生血管や新生リンパ管の定量のため、血管内皮特異的マーカーであるCD31とリンパ管内皮特異的マーカーであるLYVE-1の免疫染色を角膜のホルマウントで行った。染色後実体蛍光顕微鏡を用いて血管新生、リンパ管新生領域部分を撮影し、NIH imageを用いて角膜血管新生やリンパ管新生領域を算出した。また角膜組織切片を作製し、組織内での炎症細胞浸潤の重症度や血管新生、リンパ管新生の状態をCD11b, F4/80 (マクロファージマーカー) に対する免疫染色により行った。

さらに神経に対する影響を確認するために、同様に角膜組織切片を作成し、神経線維のマーカーであるIII tubulin に対する免疫染色も行った。

#### 4. 研究成果

セマフォリン 3A を結膜下注射を行った群ではその他の濃度やコントロール群と比較して、もっとも早く上皮欠損が修復し、また角膜血管新生のgrading が最も低かった。なかでも100ng/ml の群で最も上皮欠損が早く被覆した。

CD31, LYVE-1 による免疫染色においても、100ng/ml のセマフォリン 3A を結膜下投与した群で最も血管新生、リンパ管新生を有意に抑制し、また組織において、マクロファージなどの炎症細胞浸潤が抑制されていた。

III tubulin の組織免疫染色の結果、角膜三叉神経においては、セマフォリン 3A 投与群においてもコントロール群と有意な差は見られなかった。

これらの結果からセマフォリン 3A の投与は、マウス角膜化学外傷モデルにおいて、上皮欠損を早くに修復し、炎症や血管新生を抑制する治療効果

を持つことが示された。よってセマフォリン 3A は角膜化学外傷をはじめとした、炎症性角膜血管新生を来す疾患に対する新たな治療薬として有効である可能性が示された。

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2件)  
臼井智彦:角膜血管新生のメカニズムと治療. 臨眼 2012年増刊号 66: 357-361, 2012  
Toyono T, Usui T, Yokoo S, Nakagawa S, Kimakura M, Yamagami S, Miyata K, Oike Y, Amano S. Angpt12 is a potent hemangiogenic and lymphangiogenic factor in corneal inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54; 4278-4285, 2013

[学会発表](計1件)  
田中純美、臼井智彦、豊野哲也、山上聡、天野史郎 マウスアルカリ外傷に対するセマフォリン 3A の効果 第117回日本眼科学会 2013年4月4日(東京)

[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  
臼井 智彦 (USUI TOMOHIKO)  
東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80282557

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：