

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：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791857

研究課題名(和文)角膜接着能評価による再発性角膜上皮びらん治療薬の検索

研究課題名(英文) Searching the drugs for recurrent corneal erosion by evaluating the corneal epithelial adhesion ability

研究代表者

山田 直之(YAMADA, Naoyuki)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70437630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、本研究を通じて、実験動物(ラット)を用いた角膜上皮接着能の評価モデルを構築できた。糖尿病動物群と対照群について角膜上皮接着能を測定したところ、糖尿病動物群で 24.9 ± 13.4 g、対照動物群で 33.2 ± 18.9 gとなり、糖尿病動物群は対照動物群より低い傾向にあったが、有意差は認められなかった。本実験手技の精度向上が得られれば、in vivoにおける角膜上皮接着能の定量的評価が行えるようになると思われる。また、本系を用いることが、角膜上皮接着能を向上させる点眼薬、すなわち角膜上皮創傷治癒促進薬の開発・スクリーニングにおける評価機構として有用になるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：We were able to build an evaluation model of the corneal epithelium adhesion ability using the laboratory animal. Measuring corneal epithelium adhesion ability with diabetes group and control group, it was 24.9 ± 13.4 g and 33.2 ± 18.9 g. But there was no significant difference between diabetes group and control group. If the experimental procedure is improved, we are able to know a quantitative evaluation of the corneal epithelium adhesion ability in vivo. In addition, this system will be useful to develop the corneal epithelial wound healing eye drops.

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：眼薬理学

1. 研究開始当初の背景

角膜は眼球の最前面に位置するドーム状の組織である。特にその最表層に位置する角膜上皮は外界からのストレスに常に曝露されており、その創傷治癒が損なわれると視力障害の原因となりうる感染や穿孔などの危険に常にさらされることとなる。

一方、糖尿病患者において、角膜上皮の接着性が低下することは以前より知られており、日常生活で受ける小さな外傷や眼球治療に伴う侵襲でも角膜びらんなどの角膜上皮障害をきたす。非糖尿病患者であれば速やかに修復される角膜上皮障害であっても、糖尿病に起因する細胞機能障害、特に接着能の低下により上皮欠損修復が遅延し角膜上皮欠損の遷延化を来すこととなる。このように、糖尿病患者においては糖尿病角膜症は常に潜在的に存在し、いったん発症すると治療に難渋する疾患であるといえる。これまで我々は、サブスタンス P 由来ペプチド FGLM-NH₂ とインスリン様成長因子-1 SSSR の同時投与および合剤点眼が角膜上皮欠損をすみやかに修復することを見出し、臨床応用してきた。この効果は、糖尿病動物モデルおよび糖尿病患者における角膜上皮欠損治癒遅延を回復することも報告してきた。また、フィブロネクチン由来ペプチド PHSRN の角膜上皮進展促進効果に着目し、その有効性を証明し臨床応用した。対象に含まれた糖尿病角膜症患者における遷延性角膜上皮欠損の治癒も促進することも確認しており、これまで我々が開発した角膜上皮欠損治療薬が糖尿病患者における角膜上皮障害を改善する効果が期待できると考えている。

2. 研究の目的

近年の本邦における糖尿病患者数は増加の一途をたどっており、それに伴い種々の慢性合併症患者数も増大している。眼科領域における糖尿病慢性合併症は網膜症だけではなく、角膜に障害をきたす糖尿病角膜症もたびたび問題となる。この糖尿病角膜症の病態には、上皮基底膜レベルでの角膜上皮の接着性が低下していることが原因であると考えられている。一方、我々は以前より FGLM-NH₂+SSSR 点眼薬や PHSRN が角膜上皮の創傷治癒促進薬として有効であることを報告してきた。

本研究の目的は、第一に動物モデルにおける角膜上皮接着能の評価システムの構築である。臨床に直結した動物モデルの作成を行い、比較的簡便に角膜上皮接着能を評価できるようになることを目的とした。

次に今回我々が構築した動物モデルを使って、正常動物及び角膜上皮接着能が低下すると考えられる糖尿病動物の角膜上皮接着能を評価することを二番目の目的とした。

3. 研究の方法

糖尿病動物の作製には、Whister rat を用いた。絶食 20 時間後にストレプトゾトシンを STZ バッファーで溶解し、ラット体重当たり 70mg/kg 腹腔内投与した。投与翌日、尿糖試験紙を用いて尿中の糖の検出を確認し、糖尿病と判断した。普通飼料で 9 週間飼育し、研究に用いた。対照群として絶食 20 時間後に STZ バッファーのみを腹腔内投与したものを準備した。

使用する接着剤については、市販されている接着剤のうち比較検討の結果、最大接着力を有する接着剤を用いた。

Whister rat を用いて角膜上皮細胞の接着性を評価した。全身麻酔下で局所麻酔薬を点眼し、角膜上皮の剥離面積が一定となるように直径 3mm の皮膚生検トレパンで角膜上皮に切開を作成、接着剤を塗布し絹糸を介して角膜上皮を牽引した。牽引した絹糸が離脱したときの重量すなわち直径 3mm の角膜上皮を角膜上皮基底膜から剥離するのに必要な重量 N (g) を測定した。角膜上皮が剥離されているかどうかを確認するために、測定後フルオレセイン染色で角膜上皮欠損を確認した。

4. 研究成果

正常 Whister rat 6 匹の左眼に対し角膜上皮接着能について測定評価を行ったところ、角膜から絹糸が離脱した力は、 $N = 55.83 \pm 18.16$ (g) であった。角膜上皮剥離した角膜上皮細胞が直径 3mm の円すなわち 7.065 mm^2 であることから、Whister rat 角膜上皮細胞が角膜上皮基底膜に接着する単位面積あたりの力 $N/7.065$ は、約 7.90 g/mm^2 であると換算できた。また、Whister rat 角膜上皮基底細胞の面積は $92.2 \times 10^{-6} \text{ mm}^2$ であることから、角膜上皮基底細胞一つが角膜上皮基底膜に接着している力 $N \cdot \text{AA}/7.065$ は、約 0.732 mg/cell と換算できた。単一細胞が基底膜に接着する力を測定評価できたことはこれまでなかったと考えられる。

次に、糖尿病動物群と対照群について角膜上皮接着能を測定し、平均 ± 標準偏差について比較した。結果は糖尿病動物群で $24.9 \pm 13.4 \text{ g}$ 、対照動物群で $33.2 \pm 18.9 \text{ g}$ となり、糖尿病動物群の平均 ± 標準偏差は対照動物群より低いことが分かった。t 検定では、 $P = 0.20$ ($P > 0.05$) となり、有意差は認められなかった。次に角膜上皮接着能の中央値について、結果は糖尿病動物群で 19.0 g 、対照動物群で 25.5 g となり、糖尿病動物群の中央値は対照動物群よりも低いことが分かった。以上より、糖尿病動物群と対照動物群、この 2 群間において角膜上皮接着能に有意差はみられないものの、糖尿病動物群の角膜上皮接着能は対照動物群と比較して平均値、中央値ともに低い傾向にあることが分かった。

本実験の手技の精度向上が得られれば, in vivo での角膜上皮接着能の評価が定量的に行えるようになると思われる。また, 本系を用いることが, 角膜上皮接着能を向上させる点眼薬, すなわち角膜上皮創傷治癒促進薬の開発・スクリーニングにおける評価機構として有用となりうる。

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 6件)

Morishige N, Hatabe N, Morita Y, Yamada N, Kimura K, Sonoda KH: Spontaneous healing of corneal perforation after temporary discontinuation of erlotinib treatment. Case Reports in Ophthalmology 5(1): 6-10, 2014, 査読有

Morishige N, Yamada N, Morita Y, Kimura K, Sonoda KH. Persistence of structural changes at the anterior cornea in bullous keratopathy patients after endothelial keratoplasty. PLOS ONE 8: e74279. Doi:10.1371/journal.pone.0074279. 2013, 査読有

山田 直之: 角膜ジストロフィ. 眼科ケア 目の解剖と病気 0(2013年冬期増刊), 96-101 2013, 査読有

山田 直之: 円錐角膜. 眼科ケア 目の解剖と病気 0(2013年冬期増刊), 92-95 2013, 査読有

Yamada N, Morishige N, Yanai R, Morita Y, Kimura K, Chikama T, Nomizu M, Sonoda KH, Nishida T: Open Clinical Study of Eye Drops Containing the Fibronectin-Derived Peptide PHSRN for Treatment of Persistent Corneal Epithelial Defects. Cornea 31(12): 1408-1413, 2012, 査読有

Morishige N, Yamada N, Zhang X, Morita Y, Yamada N, Kimura K, Takahara A, Sonoda KH. Abnormalities of Stromal Structure in the Bullous Keratopathy Cornea Identified by Second Harmonic Generation Imaging Microscopy. Investigative Ophthalmology & Visual Science 53(8): 4998-5003, 2012, 査読有

[学会発表](計 10件)

山田 直之, 守田 裕希子, 森重 直行, 園田 康平: フィブロネクチン由来ペプチド PHSRN 点眼で治癒した角膜穿孔の一例. 角膜カンファランス 2014 第 38 回日本角膜学会総会 第 30 回日本角膜移植学会, 沖縄県(沖縄コンベンションセンター), 2014/01/30

山田 直之, 守田 裕希子, 森重 直行, 木村 和博, 園田 康平: フィブロネクチン由来ペプチド PHSRN 点眼で加療した角膜穿孔の 1 例. 六大学合同眼科研究会(九州大学), 福岡県, 2013/09/28

山田 直之: 角膜ジストロフィ その臨床所見と遺伝子所見の相関. 第 3 回 UAC 霧島眼科研学会, 宮崎県(宮田眼科病院), 2013/09/22

山田 直之, 守田 裕希子, 森重 直行, 木村 和博, 園田 康平: フィブロネクチン由来ペプチド PHSRN 点眼が著効した角膜穿孔の一例. 第 17 回眼創傷治癒研究会, 広島県(グランドプリンスホテル広島), 2013/08/31

山田 直之: 角膜移植後に発症したサイトメガロウイルス角膜内皮炎. 日本眼科学会総会, 東京都(東京国際フォーラム), 2013/04/05

山田 直之: 難治性モーレン腫瘍に対するチューブシャント手術併用強角膜移植. 第 7 回西日本オキュラーサーフェスクラブ 2013, 福岡県(ホテル日航福岡), 2013/04/1

山田 直之: 角膜移植後に発症したサイトメガロウイルス角膜内皮炎. 第 12 回高次統合感覚器医療研究会, 山口県(山口大学), 2013/03/05

山田 直之, 守田 裕希子, 森重 直行, 園田 康平: レシピエント角膜に残存した病巣にポリコナゾールが著効したカンジダ角膜炎の一例. 角膜カンファランス 2013, 和歌山県(白浜町立総合体育館), 2013/02/15

山田 直之, 守田 裕希子, 森重 直行, 園田 康平: 治療方針の決定に前眼部 OCT が役立ったカンジダ角膜炎の一例. 第 66 回日本臨床眼科学会, 京都府(京都国際会館), 2012/10/27

山田 直之: 1. 「角膜ジストロフィの臨床所見と遺伝子所見」 2. 「神経麻痺性角膜症に対する新しい点眼薬 FGLM-NH2+SSSR」. 第 209 回高知大学眼科研究会, 高知県(高知大学), 2012/10/03

[図書](計 2件)

山田 直之, 園田 康平: 結膜炎. 臨床フロンティア 風邪症候群と関連疾患 そのすべてを知ろう 2013, 中山書店, 304 (108-112)

山田 直之, 園田 康平: アレルギー性結膜炎. 免疫・アレルギー疾患イラストレイテッド 2013, 羊土社, 359 (340-342)

[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

山田 直之 (YAMADA, Naoyuki)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70437630

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：