

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462730

研究課題名(和文) 自律神経障害によるドライアイに関する基礎的、臨床的研究と新規治療の研究

研究課題名(英文) Research on dryeye by autonomic neuropathy, clinical research and new treatment

研究代表者

友寄 勝夫 (tomoyose, katsuo)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00453176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ドライアイマウスを作成し、涙液分泌量、角膜上皮障害を野生型と比較する予定であった。また摘出涙腺から炎症性サイトカイン、免疫染色などの検討を腎不全マウスも用いて比較し、マウスでの涙液動態を調べる予定であったが、発表には至らなかった。また透析患者を糖尿病患者と非糖尿病患者に分け、比較検討を行う予定であったが発表には至らなかった。

他にTRPV1欠失マウスにおける角膜新生血管の動態を研究した。マウス角膜を熱凝固し、角膜輪部から伸展する角膜新生血管はTRPV1欠失マウスでは野生型マウスに比べ伸展を抑制していた。この研究をJournal of Ophthalmology に投稿し医学博士を授与した。

研究成果の概要(英文)：We create a dry eye model mice, compared with the wild-type mouse corneal tear secretion, epithelial disorder. Also inflammatory cytokines from excised lacrimal gland, a study of such immunostaining comparative study renal failure mouse be used, was scheduled to investigate the tear fluid dynamics in mice, did not lead to the announcement. Also divided the dialysis patients in diabetes patients and non-diabetic patients as a clinical study, did not lead to the announcement was scheduled to perform a comparative study.

Other was to study the dynamics of corneal neovascularization in TRPV1-deficient mice. The mouse the central cornea to heat coagulation, corneal neovascularization that stretched from the limbus was to suppress the extension compared by wild-type mice with TRPV1-deficient mice. The study was awarded a Docor of Medicine posted on Journal of Ophthalmology.

研究分野：眼科

キーワード：角膜

1. 研究開始当初の背景

ドライアイ患者数は推定800万人とも言われており、近年増加傾向にある。涙液は眼表面を潤すだけでなく、外界からの保護、感染予防、防御としても重要な役割があり、同時に屈折系としても作用している。さらに現代社会ではVDT作業による眼精疲労患者が増加しているが、その要因の一つとしてもドライアイがあげられている。VDT作業自体が瞬目回数の減少を引き起こし、ドライアイ発生や増悪に影響を与えているとも考えられている。

2. 研究の目的

涙液は副交感神経支配によりその調節がなされる。ドライアイは涙液欠乏タイプと涙液蒸発タイプの2つに分けられる。角膜上での涙液層は3層(油分・水層・粘液層)から成り、いずれの要素が欠乏しても涙液全体のバランスが崩壊し、ドライアイと繋がる。この機序については解明されていない部分が多い。この病態解明のためにボツリヌス毒素B型を用いた副交感神経型ドライアイモデル動物を作成し、自律神経障害とドライアイの関係を研究する。また自律神経障害を引き起こしやすい血液透析患者及び糖尿病患者ではドライアイの頻度が高いと言われている。また自律神経障害だけでなく重症ドライアイをきたす難治性全身疾患である慢性移植片対宿主病、Stevens-Johnson症候群、類天疱瘡などは免疫異常を基盤とし、眼表面における免疫反応により眼表面の粘膜が障害され、繊維化をきたす。例えばStevens-Johnson症候群では涙液の主な供給源である涙液だけでなく結膜にもリンパ球浸潤が起き、涙液分泌不全となっているがそのメカニズムについてはすべてが解明されているわけではない。この状態が続けば癒痕化した角膜は透明性を維持されず混濁し、疾患は治癒しても視力障害が残る。これらの重症疾患でなくても、眼表面に涙液がまんべんなく広がった状態が崩れることにより屈折の状態が変化して視力障害を起こすことがある。

3. 研究の方法

1)ドライアイ動物モデルの作成

ボツリヌス毒素B型(10-40mU)をマウス涙腺に注射する。経時的に、涙液分泌量、瞬目回数、角膜上皮障害の状態などを観察する。マウス涙腺を摘出し、炎症性サイトカインや好中球、マクロファージ、MAPキナーゼなどのシグナル伝達系の蛋白発現を免疫染色、Westernblot法を用いて野生型マウスと比較検討する。

2)自然発症肥満2型糖尿病モデルによる基礎研究

自然発症肥満2型糖尿病モデルの涙液分泌量、瞬目回数、角膜上皮剥離の状態などを観察し、野生型マウスと比較検討する。また、各々のマウス涙腺を摘出し、炎症性サイトカイン、好中球、マクロファージ、MAPキナーゼなど

のシグナル伝達系の蛋白発現を免疫染色、Westernblot法を用い、mRNA発現はin situ hybridization法、real-time RT-PCR法を用いて検討する。また、自然発症肥満2型糖尿病マウスの腎臓を部分切除したものを腎障害マウスモデルとして、マウス涙液分泌量、瞬目回数、角膜上皮剥離の状態などを観察し野生型マウスとの比較検討を行う。同様に炎症性サイトカイン、好中球、マクロファージ、MAPキナーゼなどのシグナル伝達系の蛋白発現を免疫染色、Westernblot法を用い、mRNA発現はin situ hybridization法、real-time RT-PCR法を用いて検討する。

3)ドライアイ患者による臨床研究

当院では手術施設があり、糖尿病患者、透析患者が眼科手術を行う機会も多い。患者に同意を得た上で、手術の際に結膜などの組織採取が可能である。採取した結膜組織から炎症性サイトカインや好中球、マクロファージ、MAPキナーゼなどのシグナル伝達系蛋白の発現やMRN発現など検討する。

糖尿病患者に同意を得た上で、細隙灯顕微鏡により結膜炎、結膜結石、マイボーム腺の状態、涙液三角の大きさ、角膜びらの程度などドライアイに関する診察を行う。同様に血液透析患者にも同意を得た上で、細隙灯顕微鏡により結膜炎、結膜結石、マイボーム腺の状態、涙液三角の大きさ、角膜びらの程度などドライアイに関する診察を行う。透析前に涙液の基礎分泌量の測定(シルマー法変法)を行い、涙液のpHを測定する。涙液の成分分析、impression cytologyを行う。透析終了時に同様の測定を行う、さらに透析患者を糖尿病患者と非糖尿病患者に分けて、副交感神経障害の透析による改善を推測し、新たな治療戦略を探る。

4. 研究成果

基礎研究では発表に至らず、臨床研究に置いても、糖尿病患者、透析患者への説明及び同意が遅れたため、診察による臨床研究が遅れた。このため研究発表が行えなかった。この研究期間にはマウス角膜における新生血管の研究を行った。この研究結果はJournal of Ophthalmologyに投稿し医学博士を授与した。その研究結果について述べる。

重度ドライアイやStevens-Johnson症候群により炎症が高度な場合疾患が治癒しても、癒痕化のため角膜混濁が残存し恒久的な視力障害となりえる。癒痕化の抑制には種々の炎症性サイトカインを抑制することが重要であり、治療においても重点が置かれている。しかし、これらサイトカインの抑制を行っても新生血管の発現による角膜の線維化・癒痕化が起こりえる。消炎し、疾患が治癒しても恒常的な角膜混濁が残るため視力障害となりえる。癒痕化を抑制し角膜混濁を

残さないためには、新生血管の発現および、その抑制が更なる治療の課題と考える。疾患の治療とさらに新生血管の発生を抑制する事も視力維持には重要であると考えられる。この発生には、血管内皮増殖因子 (VEGF) に代表されるサイトカインや細胞外マトリックスが関与している。これらを抑制するために新たな研究として、侵害刺激受容体に関わるイオンチャンネル型受容体の中心的な分子群である TRP チャンネルに注目した。TRP チャンネルファミリーの中に、カプサイシンの受容体として知られている TRPV1 がある。これは感覚神経の他に炎症関連メディエーターの代謝型受容体と機能関連することが報告されている。この TRPV1 に置ける新生血管の動態を調べる研究として、TRPV1 欠損マウスと培養細胞を用いて角膜血管新生過程における TRPV1 の役割について検討し、角膜混濁の治療の可能性として研究した。

1 血管様管腔構造での検討

血管内皮細胞と線維芽細胞の共培養系において形成された血管様管腔構造 (HUVECs) の変化を、伸展長、分岐数を計測し比較検討した。培養には VEGF 添加、TRPV1 のアンタゴニストである SB366791 添加との比較検討を行った。

2 マウス角膜障害モデルによる検討

マウスにおける角膜中央部を電気焼灼し、周辺角膜への血管新生 (血管侵入) の誘導をおこなった。野生型および TRPV1 欠失マウスにそれぞれ角膜中央部に電熱焼灼を行い、角膜障害モデルを作成した。角膜の創傷治癒反応として角膜輪部から誘導される角膜新生血管を観察した。角膜中央部を焼灼後 3, 7, 14 日目に屠殺し摘出したマウス眼から凍結切片を作成し、免疫染色を行い角膜輪部から中央部へ伸展した血管の長さを測定し比較検討した。

マウスにおける角膜中央部の電気焼灼による血管新生および創傷治癒の免疫組織学的検討もおこなった。野生型及び TRPV1 欠失マウスそれぞれについて、マウス角膜中央を焼灼後に 1, 3, 7, 日目に屠殺し摘出したマウスの角膜からトランスフォーミング成長因子 (TGF 1), VEGF, サブスタンス P による免疫組織学的染色を行い、TGF

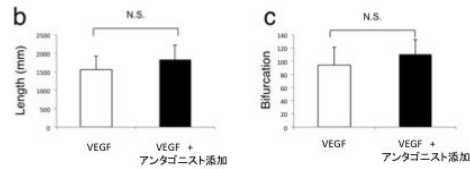
1, VEGF, Substance P それぞれの mRNA の発現を RT-PCR で測定した。

研究結果

1 血管様管腔構造の研究結果

ヒト血管内皮細胞と皮膚線維芽細胞の共培養で観察される血管様管腔形成の変化をその伸展長および分岐数を計測することで検討した。VEGF-A 添加での培養では CD31 で染色された管腔様構造が観察され、カプサイシンを添加すると VEGF-A による血管新生の発

現を抑制した。TRPV1 のアンタゴニストの添加では管腔構造の形成に対する VEGF 作用に影響を及ぼさなかった。(図 1)



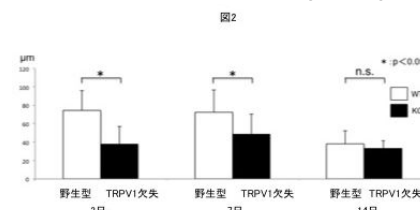
2 マウス角膜障害モデルによる検討結果

マウス角膜中央部の焼却による周辺角膜への血管新生 (血管侵入) の誘導。

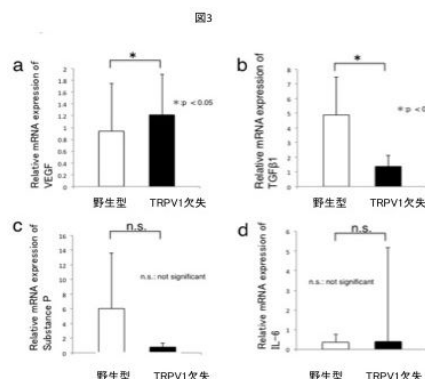
野生型マウスでは角膜輪部からの焼却部位に伸展する新生血管長は 14 日後には減少していた。TRPV1 欠失マウスでは 7 日後で新生血管の伸展長はピークに達し、14 日後には減少していた。

野生型に比べて新生血管長は 3 日後、7 日後いずれも TRPV1 欠失マウスで有意に抑制されていた。

14 日後では野生型マウスと TRPV1 欠失マウスとで有意差はなかった。(図 2)



マウスにおける角膜中央部の焼却による血管新生および創傷治癒の免疫組織学的検討。TGF 1 は 3.7 日後で角膜上皮間に野生型マウスより多く染色されていた。VEGF は野生型および TRPV1 欠失マウスの焼却後 1 日目では共に染色が少なく、3 日後で野生型に染色が多くみられた。サブスタンス P は 1, 3 日後で角膜の基底層に多く染色され、TRPV1 欠失マウスでより強く染色されていた。mRNA の発現は VEGF では欠失マウスで多く発現され有意差があった。TGF 1 は野生型マウスで多く発現され統計学的に有意差があった。サブスタンス P, インターロイキン-6, ミエロペルオキシダーゼ, F4/80 では有意差がなかった。図 3



TRPV1 欠損マウスでは新生血管を抑制するこ

とを示した。HUVECではTRPV1の制御は血管新生に影響をあたえなかった。TRPV1の制御はミエロペルオキシダーゼ,F4/80では野生型,TRPV1欠失マウスとで有意差がなかった。このことからTRPV1の欠失には好中球やマクロファージには影響を及ぼさないことを示した。

TRPV1の制御は invitro での HUVEC における血管新生に影響を与えなかった。

しかしマウス角膜を焼却した場合には血管新生の増殖因子には関与していた。TRPV1の制御することで In vivo での角膜における血管新生の制御できる可能性がある。

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 1 件)

友寄勝夫 岡田由香 住岡孝吉
宮嶋正康 Kathleen C.Flanders 白井久美
森井智也 Peter S.Reinach 山中修
雑賀司珠也
Suppression of In Vivo Neovascularization
by the loss of tRPV1 in Mouse Cornea
Journal of Ophthalmology 査読有 2015
404-413 DOI 10.1155/2015/706404
〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

友寄 勝夫 (tomoyose katsuo)
和歌山県立医科大学 医学部 助教
研究者番号：00453176

(2)研究分担者

雑賀司珠也 (saika shizuya)
和歌山県立医科大学 医学部 教授
研究者番号：4025454

岡田 由香 (okada yuka)
和歌山県立医科大学 医学部 講師
研究者番号：50264891

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()