

令和元年5月24日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11299

研究課題名(和文) Sema3A阻害薬ピナキサントンによる角膜神経再生を介したドライアイ治療

研究課題名(英文) Effect of a Sema3A inhibitor treatment in a murine dry eye model

研究代表者

吉田 悟 (Satoru, Yoshida)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：50398781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ドライアイモデルマウスを用いて検討を実施した結果、ピナキサントン点眼群ではピナキサントン非点眼群に比べ角膜知覚、涙液量が保たれていることを確認できた。また、実際にピナキサントン点眼群で角膜上皮下の神経が保たれていること、角膜上皮障害面積が少なく、びらん形成も抑制されることを確認できた。以上の結果は、Semaphorin-3A阻害薬であるピナキサントンの点眼が新たなドライアイ治療法となる可能性を示すものである。作用機序については角膜上皮との相互作用や抗炎症作用も含めた詳細な解析が引き続き必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドライアイは有病率が高い疾患であるが、神経再生または保護の観点からの治療法はなく、現行の涙液構成成分の補充療法だけでは治療が不十分な例も多い。神経再生を促進するピナキサントンを新たなドライアイ治療薬として開発できれば、より多くのドライアイ患者の症状を軽減できると考えられ、本研究でその可能性を示すことができた。ピナキサントンを用いることで、レーザー屈折矯正手術(レーシック)や全層角膜移植術の後に生じることのある知覚低下や涙液分泌低下の症状を緩和できる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：Semaphorin 3A (Sema3A) is expressed in corneal epithelium and is known to act as a repellent for axonal growth of neurons. In dry eye disease (DED), corneal nerves, which responsible for corneal sensations and tear secretion, are compromised. Therefore, inhibition of Sema3A may protect corneal nerve dysfunction in DED. Using a murine dry eye model, which developed by removing an extra-orbital lacrimal gland, we found that topical application of a selective Sema3A inhibitor, vinaxanthone, prevent disruption of corneal nerves, preserve corneal sensitivity and tear volume. Furthermore, formation of corneal epithelial erosion was suppressed in DED model mice treated with the inhibitor. These results suggest that topical application of the selective Sema3A inhibitor may be effective for treatment of DED.

研究分野：再生医療

キーワード：角膜神経再生 Semaphorin3A ドライアイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

角膜は眼球の前面を構成する透明な組織であり、その高いバリア機能によって眼球内部の組織を外的刺激から保護している。眼球を保護する機構の中でも、角膜の知覚刺激による瞬目と、それに引き続いて起こる涙液分泌が重要であり、角膜には非常に密な神経線維が存在している。この角膜の知覚は三叉神経第 1 枝である眼神経に支配されており、ヘルペス感染や糖尿病、外傷、手術等により角膜神経が障害されると瞬目反射が減弱し、涙液の反射性分泌が低下することが明らかにされている。角膜知覚は涙液の基礎分泌にも影響しており、その障害はドライアイや角膜上皮障害の原因となる。

ドライアイとは、様々な原因による涙液および角結膜上皮の慢性疾患であり、日本における患者数は 2200 万人と推定され、高齢化、生活習慣、環境の変化を背景に増加の一途をたどっている。近年、ドライアイ患者における角膜内の神経障害が注目されており (Labbe A, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 54:5144-50, 2013)、角膜神経が障害されると、知覚低下や涙液分泌減少が生じ、ドライアイ症状がさらに増悪するという悪循環に陥ると考えられる。重症ドライアイや、神経障害により創傷治癒が遷延して生じる神経障害性角膜潰瘍は難治性疾患であり、眼科的に重要な疾患であるが、これまで角膜の神経障害に対する有効な治療法はなく、治療法の開発が望まれている。

Semaphorin は神経発生過程における軸索反発因子として知られており、なかでも Semaphorin3A は形態形成時に角膜内で神経が適切に展開するために重要な役割を果たしていることが分かってきている。また、これまでにラットの脊髄損傷モデルにおいて Semaphorin-3A 阻害薬が損傷部神経線維の再生を促進することが報告されており (Kaneko S, et al. Nat Med. 12:1380-9, 2006)、加えて、マウス角膜移植モデルを用いて、我々は Semaphorin-3A 阻害薬であるピナキサントンが角膜の神経再生の促進にも有効であることを報告した (Omoto M, Yoshida S, et al. PLoS One. 7, 2012)。全周性に神経を切断された角膜移植モデルマウスに対してピナキサントンを定期的結膜下注射することにより移植片内の神経再生が促進され、角膜知覚の改善されることを確認できている。また、正常な神経終末から分泌される substance P は、角膜上皮や角膜実質細胞から分泌されるインスリン様増殖因子とともに、角膜上皮細胞に作用することで上皮の修復を促進することが知られている (Chikama T et al. Lancet. 354:1613-4, 1999)。ドライアイにおいては、神経の障害により角膜上皮再生が遅延し、結果として上皮障害が慢性化している可能性が高い。そこで、ピナキサントンによる角膜神経再生の促進により角膜上皮再生を促すことができれば、新たなドライアイの治療法の開発にもつながると考えられる。

## 2. 研究の目的

我々は Semaphorin-3A 阻害薬ピナキサントンが角膜内の神経再生を促進することを見出し、本薬剤はドライアイ患者で認められる角膜神経障害の抑制、さらにはドライアイの治療にも応用できる可能性がある。本研究では、涙腺摘出ドライアイモデルマウスを用いて以下の事項について検討し、ピナキサントンが新たなドライアイ治療薬となる可能性を検証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ドライアイモデル作製

平山らの方法 (Hirayama M et al. Nat Commun. 4:2497, 2013) に基づき主涙腺摘出ドライアイモデルマウスを作製する。

### (2) 角膜上皮障害、涙液量の評価系の確立

フルオレセイン染色液により角膜上皮障害部位を染色し、蛍光実態顕微鏡で観察する。全身麻酔

下で観察を行い、モデルマウスの経時的な評価により上皮障害発症の経過を確認する。また、画像処理ソフトを用いて角膜上皮障害の程度を定量化して評価する。涙液量の測定は、無麻酔下でフェノールレッド系（Zone-quick）を用いて行う。

#### （3）Semaphorin3A 阻害薬投与による上皮障害抑制の検証

無麻酔下でピナキサントンを点眼する。作製したドライアイモデルマウスにおける上皮障害発症の経過を参考に、ピナキサントン投与開始時期、投与回数、投与期間、投与濃度について条件検討を行う。対照群としてPBS点眼群を用意し、それと比較することでピナキサントンの効果を確認する。また、投与前後で涙液量を測定し、ピナキサントン点眼の効果を確認する。

#### （4）Semaphorin3A 阻害薬投与による角膜内神経障害抑制の評価

角膜上皮下に分布する眼神経を - チュプリン抗体を用いた免疫染色し、ピナキサントン投与の効果を確認する。

#### （5）作用機序の解明

ピナキサントンによる角膜上皮障害改善効果、神経保護作用が確認された場合、さらにその作用機序を検討する。神経終末に発現しているイオンチャネルである TRPV1 などに関して免疫染色によりその発現を確認する。

### 4．研究成果

涙腺摘出により作出したドライアイモデルマウスを用いて検討を実施した結果、ピナキサントン点眼群ではピナキサントン非点眼群に比べ角膜知覚が保たれており、涙液量も保たれていることを確認できた。加えて、角膜上皮下神経叢を神経マーカーである  $\beta$ -tubulin に対する抗体を用いて免疫染色したところ、対照群に比べて実際にピナキサントン点眼群では角膜上皮下神経が保たれている像を確認できた。また、フルオレセイン染色により、角膜上皮障害の程度を検証した結果、対照群と比較してピナキサントン点眼群では角膜上皮障害面積が少なく、びらん形成も抑制されることを確認できた。これらの結果は、Semaphorin-3A 阻害薬であるピナキサントンの点眼が新たなドライアイ治療法となる可能性を示すものである。作用機序については角膜上皮との相互作用なども含めた詳細な解析を引続き必要とする。

### 5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

The Semaphorin 3A inhibitor SM-345431 preserves corneal nerve and epithelial integrity in a murine dry eye model.  
Yamazaki R, Yamazoe K, Yoshida S, Hatou S, Inagaki E, Okano H, Tsubota K, Shimmura S.  
Scientific Reports 2017 Nov 14;7(1):15584. doi: 10.1038/s41598-017-15682-1. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

発表者名：山崎梨沙、山添克弥、吉田悟、羽藤晋、稲垣絵海、岡野栄之、坪田一男、榛村重人  
発表標題：セマフォリン 3A 阻害薬ピナキサントンによる新規ドライアイ治療の可能性  
学会名：角膜カンファランス 2018  
発表年：2017 年度

### 6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：榛村 重人  
ローマ字氏名：(SHIMMURA, shigeto)  
所属研究機関名：慶應義塾大学  
部局名：医学部  
職名：准教授  
研究者番号(8桁): 00235780

(2)研究協力者

研究協力者氏名：坪田 一男  
ローマ字氏名：(TSUBOTA, kazuo)  
研究者番号(8桁): 40163878

研究協力者氏名：岡野 英之  
ローマ字氏名：(OKANO, hideyuki)  
研究者番号(8桁): 60160694

研究協力者氏名：山添 克弥  
ローマ字氏名：(YAMAZOE, katsuya)

研究協力者氏名：山崎 梨沙  
ローマ字氏名：(YAMAZAKI, risa)

研究協力者氏名：清水 翔太  
ローマ字氏名：(SHIMIZU, shota)

研究協力者氏名：安田 実幸  
ローマ字氏名：(YASUDA, miyuki)  
研究者番号(8桁): 80574912

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。