

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10904

研究課題名(和文) 神経栄養因子による副交感神経保護及び神経修復作用を介した角結膜上皮創傷治癒効果

研究課題名(英文) The effect of corneal and conjunctival epithelial wound healing through the parasympathetic nerve protection and repairing by neurotropic factor

研究代表者

土至田 宏 (Toshida, Hiroshi)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：00306961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：主涙腺からの涙液分泌は主に副交感神経支配であり、その脆弱性や損傷などにより涙液分泌減少やそれに伴う角結膜上皮障害が生じる。本研究では家兔の副交感神経除神経モデルを用いて、神経修復を介して涙液分泌減少やそれに伴う角結膜上皮障害が抑制される可能性について研究を行った。主涙腺に逆行性軸索輸送を利用した色素のTracing studyを行い、大半が同側の副交感神経の神経節である翼突口蓋神経節への貯留であることを確認した。神経栄養因子のうち、既報で角膜で発現が証明されているグリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)を同神経徐神経部位に投与したものの、涙液分泌量および角結膜上皮障害像に著変を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Lacrimation from main lacrimal gland (LG) is mainly innervated by parasympathetic nerve. Injury of the nerve leads to decrease tear flow and damage in corneal and conjunctival epithelia. We have studied possibility that recovering from decreased tear fluid secretion and corneal and conjunctival epithelia through regeneration of the nerve using a parasympathetic denervated rabbit model. Retrograde dye tracing study was performed to confirm that the most innervated ganglia was the pterygopalatine ganglion in parasympathetic nervous system on the same side. As glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), one of neurotropic factor, we have treated with GDNF in the surgical area, but few remarkable change were shown in the tear fluid secretion and a corneal and conjunctival findings.

研究分野：眼科学

キーワード：副交感神経 ドライアイ 角結膜上皮 涙腺 除神経

1. 研究開始当初の背景

我が国のドライアイ患者は、現代社会における IT 化や室内空調の整備などにより増加し、軽症例も含めると推定で約 2000 万人いると考えられている。近年、これまでの涙液補充型点眼液に加え、涙液成分の一部を分泌促進させるタイプの点眼液が市販されるようになったが、根本的な解決には至っていない。加齢や自律神経失調症、外傷などによる神経機能低下により廃用性萎縮は全ての器官で生じうるが、涙腺や眼表面支配の副交感神経でも同様の事が生じていれば、いくらムチンなどの涙液成分を分泌促進させる点眼薬を投与しても、作用には限界がある事が推察される。ここから考えられることは、この主涙腺支配の副交感神経を保護、修復することで、低下した機能が改善する可能性である。

申請者らは涙腺や眼表面を支配領域とする副交感神経除神経モデルを家兎とラットで作成 (Toshida et al, IOVS 2009, Nguyen, Toshida et al, Auton Neurosci 2006)、術後も生存可能な初の動物モデルとして完成させた。同モデルでは、涙液分泌量の減少のみならず、乾燥防止目的で瞼々縫合を施した場合でも角結膜上皮障害を生じたことから、眼表面の恒常性維持にも副交感神経が重要な役割を果たしていることを明らかにした。同副交感神経の節前神経 (浅大錐体神経) 除神経後における翼突口蓋神経節の病理組織学的検索では、節前線維とともに節前線維を取り巻く神経膠細胞の消失が観察された (Toshida et al, IOVS 2007)。

一方、グリア細胞は当初、シナプス機能、神経伝達物質の調整や、神経細胞へのエネルギー供給などの補助作用をしていると考えられていたが、近年、病的状態下におかれると活性化されてサイトカインのほか成長因子の遊離などを行い、障害部位の再生や神経保護における重要な役割を演じていることが明らかになってきた。具体的には、こうした有害刺激下で活性化されたグリア細胞は、インターロイキン (IL)1、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α : TNF- α) などの有害作用をもたらす炎症性サイトカインのほか、グリア細胞由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor: GDNF) をはじめとする神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) の産生・遊離も促進する。特に GDNF は神経細胞生存促進ならびに障害後の神経修復・回復過程に寄与している事が注目され、中枢神経系ではアルツハイマー型痴呆症への治療効果や、脳虚血後の神経保護作用などが報告されており、神経の再生医療への応用が試みられている。また、GDNF は角膜上皮障害時にも産生され、細胞増殖と分化を促すことが報告されつつある。

2. 研究の目的

このように、中枢神経系において臨床応用やそのための研究が進んでいる GDNF などの

NGF であるが、特に眼に対する効果は未解明な部分が多い。本研究では、眼表面における神経栄養因子の神経保護作用や回復作用によるこれら未解明な箇所を明らかにし、眼科的臨床応用に向けた基礎的エビデンスを構築することを目的とした。

即ち、眼表面においても損傷や脆弱化した神経を再生する事を介して涙液分泌能回復や眼表面恒常性維持ができれば、根本的なドライアイをはじめとする眼表面治療法に繋がるものと考えた。

涙液分泌減少の原因の一つには、加齢や神経の萎縮による機能低下が存在する。神経原性の場合、廃用性萎縮が涙腺組織でも生じて、腺房の萎縮や線維化、腺腔の拡大、導管の閉塞などが生じた結果として、涙液分泌量や涙液蛋白分泌反応が低下する。そこで我々は最近、神経萎縮による涙液分泌機能低下の動物モデルとして副交感神経徐神経モデル家兎を用いて、切断した副交感神経節前線維の再生させる試みを行うこととした。

そこで本研究では、副交感神経除神経モデル家兎を用いて、副交感神経損傷後の神経栄養因子投与を介した神経機能回復によるドライアイおよび角結膜上皮障害効果を評価し、これら眼表面疾患に対する新しい治療法への臨床応用を目指して研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 副交感神経除神経モデルの作成および評価実験

はじめに、当施設における既報の副交感神経除神経モデル家兎の術前後の評価を行い、本実験への導入が適切かどうかについて検証した。

モデル作成のための手術手技は、疼痛回避のため、吸入麻酔による全身麻酔下で行った。剃毛、皮膚・筋切開後、外耳道經由のアプローチで脳からの顔面神経が頭蓋外へ抜けた箇所まで開創していき、顔面神経から浅大錐体神経が分岐した後の箇所での浅大錐体神経を切断し、約 2~3mm 程度切除した。抗菌薬を適量局所投与および筋肉内注射による全身投与を行って、筋縫合および皮膚縫合をして手術終了とした。術後は全身状態の観察を毎日行い、眼科学的検査としては、前眼部観察、蛍光色素染色試験、ローズベンガル染色試験、シルマー 法による涙液分泌試験の各項目を、術前および術後の双方で行った。蛍光色素染色とローズベンガル染色はいずれも染色像からスコア化を行った。

(2) 主涙腺支配神経の確認実験

主涙腺の神経支配は副交感神経が主で、他にも交感神経、三叉神経の関与が指摘されている。また、既報では神経支配は同側のみなのか、対側への影響があるのかどうかの検証に乏しいため、神経支配確認実験を行った。

具体的には、家兎の主涙腺に神経親和性の高い蛍光色素を注入し、逆行性軸索輸送を利

用した色素 Tracing study を行った。色素の逆行性軸索輸送は一日 1mm とされていることから、投与後の移動を十分な日数とする事から、投与後約 3 か月経過してから家兔を安楽死後、副交感神経の神経節である翼突口蓋神経節、交感神経の神経節である頸部神経節および知覚神経の神経節である三叉神経節を摘出し、蛍光顕微鏡でその集積状況を確認した。

(3) 神経栄養因子投与実験

神経障害による涙液分泌減少およびそれに伴う角結膜上皮障害が、神経栄養因子の投与によって神経保護・修復の推進を介して改善するかどうかについて研究を行った。上述の副交感神経除神経モデル家兔を作成した際に、手術用顕微鏡下の術野における神経切断部位に、既報で角膜での発現が証明されている GDNF を投与し、治療効果判定を行った。術後は全身状態の観察を毎日行い、眼科学的検査として、前眼部観察、蛍光色素染色試験、涙液層破壊時間 (BUT) 測定、ローズベンガル染色試験、シルマー法による涙液分泌試験の各項目を、術前後に行った。

4. 研究成果

(1) 副交感神経除神経モデルの作成および評価実験結果

今回我々は、同術式による動物モデルを作成し、ドライアイを生じる過程をまず経時的観察に in vivo で行った。その結果、副交感神経除神経術後 1 日後に涙液分泌量が最低となることが判明 (図 1)、細隙灯顕微鏡検査ではフルオレセイン染色とローズベンガル染色が著明となるのを確認した。蛍光色素染色スコア (図 2) とローズベンガル染色スコア (図 3) はともに、反対側の非手術側である対照ではほぼ 0 であったのに対し、副交感神経除神経側では著明なスコア上昇が見られた。さらには、手術侵襲を行ったものの神経切断を行わない、いわゆる Sham 手術を行った動物でも同様な評価を行ったが、涙液分泌量の低下や蛍光色素染色スコアやローズベンガル染色スコアの上昇は見られなかった。

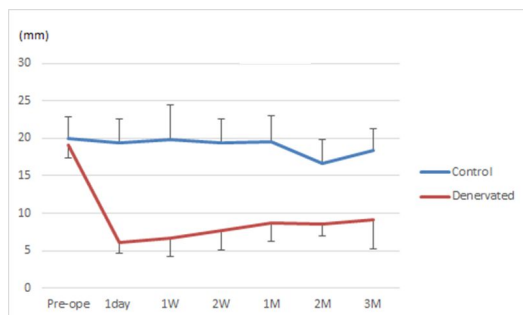


図 1. 副交感神経除神経術後の涙液分泌量の変化。

Denervated: 除神経側。Control: 除神経側の反対側で正常対照。術後は除神経側のみで涙液分泌量の減少が継続してみられた。

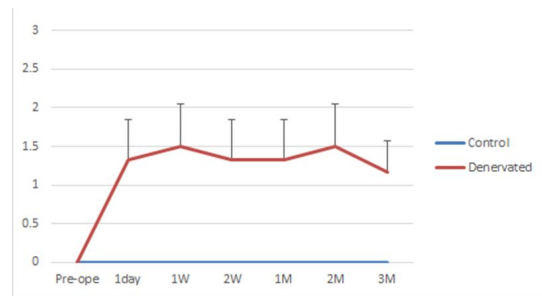


図 2. 蛍光色素染色スコア。除神経側 (Denervated) のみで角結膜上皮障害を示す蛍光色素染色スコア上昇を認めた。

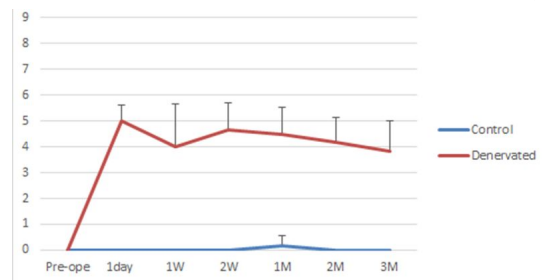


図 3. ローズベンガル染色スコア。除神経側 (Denervated) のみでムチン異常を示すローズベンガル染色スコア上昇を認めた。

(2) 主涙腺支配神経の確認実験

除神経と同側の翼突口蓋神経節、頸部神経節、三叉神経節のいずれにおいても蛍光色素の集積を認めた。翼突口蓋神経節では大半の細胞で集積を認めたが (図 4)、頸部神経節と三叉神経節ではごく少数の細胞に限られた。また、全ての神経節では反対側に蛍光色素は認められなかった (図 5)。

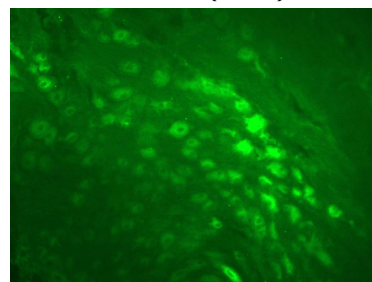


図 4. 蛍光色素 Tracing study による翼突口蓋神経節の蛍光像 (x40)。神経節細胞への蛍光色素集積を多数認めた。

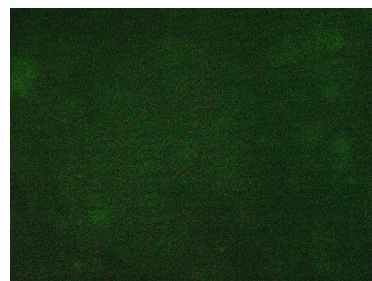


図 5. 図 4 の対側の蛍光像 (x40)。翼突口蓋神経節の神経節細胞への蛍光色素

は認められなかった

これらの結果から、家兔の主涙腺は主に同側の副交感神経支配下にあると思われた。

(3) 神経栄養因子投与実験

副交感神経除神経モデル家兔では、(GDNF)を同神経徐神経部位に投与したものの、涙液分泌量(図6)、蛍光色素染色スコア(図7)、ローズベンガル染色像(図8)に統計学的な有意差は認められなかった。

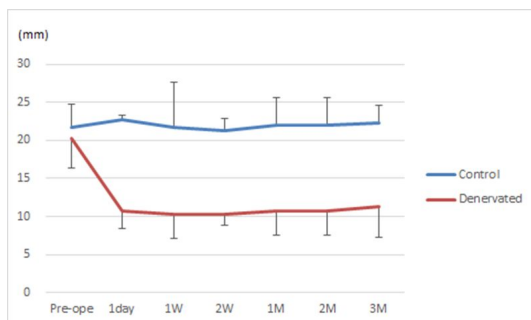


図6. 除神経モデル家兔へのGDNF投与後の涙液分泌量の変化。

除神経術後に減少した涙液分泌量はGDNF投与後も回復を認めなかった。

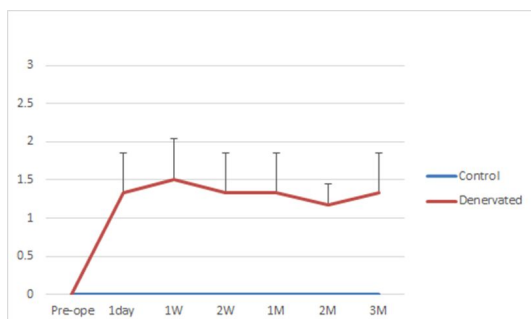


図7. 除神経モデル家兔へのGDNF投与後の蛍光色素染色スコア。

除神経術後のスコア上昇はGDNF投与後も改善を認めなかった。

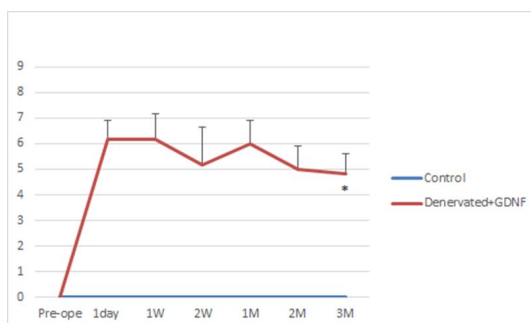


図8. 除神経モデル家兔へのGDNF投与後のローズベンガル染色スコア。

除神経術後のスコア上昇はGDNF投与後に著明な変化を認めなかった(3か月後の有意差出現に関しては有効であったか結論が出ていない)。

結果のまとめ

以上の結果をまとめると、以下の如くに集約される。

副交感神経除神経モデル家兔は、術後に手術施行側のみで涙液分泌量減少、蛍光色素染色スコア上昇、ローズベンガル染色スコア上昇を認めた。

主涙腺からの支配神経の神経節への蛍光色素 Tracing study の結果、主たる支配神経は副交感神経であるが、交感神経、三叉神経も僅かながら支配されている事が示唆された。

副交感神経除神経モデルへのGDNF投与実験では、涙液分泌量、蛍光色素・ローズベンガル染色スコアともに著明な改善を認めなかった。

(4) 結論と本研究の今後の展望

主涙腺の涙液分泌には主に副交感神経が重要な働きをしており、その除神経モデルは著明な角結膜上皮障害をもたらした。神経栄養因子は眼にもその存在が証明されているが、神経障害部位への直接単回投与ではその効果に限界があると考えられた。その理由としては、術野への投与故の持続投与の困難さ、投与部位から周辺組織への吸収などが挙げられる。これらの本研究結果からは、

- 1) 更なる高濃度のGDNF投与
 - 2) 投与後の物質の吸収、拡散防止策
 - 3) 他の神経栄養因子に代えての投与実験
 - 4) 神経再生材料を用いた同様の実験
- などの新たな課題が挙げられた。

<引用文献>

Toshida H, Nguyen DH, Beuerman RW, Murakami A: Neurological evaluation of acute lacrimomimetic effect of Cyclosporine in an experimental rabbit dry eye model. Invest Ophthalmol Vis Sci 50:2736-41, 2009.

Nguyen DH, Vadlamudi V, Toshida H, Beuerman RW. Loss of parasympathetic innervation leads to sustained expression of pro-inflammatory genes in the rat lacrimal gland. Auton Neurosci. 2006;124:81-89.

Toshida H, Nguyen DH, Beuerman RW, Murakami A. Evaluation of novel dry eye model: preganglionic parasympathetic denervation in rabbit. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007;48:4468-4475.

Honig MG, Hume RI. DiI and DiO: versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. Trends Neurosci. 1989;12:333-335.

Toshida H, Ohta T, Suto C, Murakami A. Effect of subconjunctival lacrimal gland

transplantation in a rabbit dry eye model.
Cornea. 2013 Nov;32 Suppl 1:S46-51.

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)

Toshida H, Suto C. Pre-ganglionic Parasympathetic Denervation Rabbit Model for Innervation Studies. Cornea (in press)
(査読有)

Miura-Karasawa M, Toshida H, Ohta T, Murakami A. Papilloma and sebaceous gland hyperplasia of the lacrimal caruncle: a case report. Int Med Case Rep J 27;11:91-95, 2018. (査読有)

[学会発表](計1件)

Toshida H. Characteristics and impact of parasympathetic denervation animal model for dry eye diseases. Kyoto Cornea Club, Kyoto, Japan. Nov. 24. 2017

6. 研究組織

(1)研究代表者

土至田 宏 (TOSHIDA, Hiroshi)
順天堂大学・医学部・前任准教授
研究者番号：00306961

(2)研究分担者

須藤 史子 (SUTO Chikako)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：30246467