

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09937

研究課題名(和文) 神経膜性角膜症の重症例での角膜実質融解機序の解明に基づいた治療戦略の樹立

研究課題名(英文) The establishment of therapeutic strategy based on corneal stroma melting mechanism in severe cases of neurokeratopathy

研究代表者

岡田 由香 (Okada, Yuka)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50264891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス三叉神経第1枝を18Gバイポーラ電極で熱凝固することで神経麻痺性角膜症重症モデルを作成した。

このマウスモデルを用いて検討したところ、重症モデルでは早期(6時間後)から角膜混濁や炎症が出現した。最長2年目まで観察したところ、長期にわたり角膜実質への炎症細胞の侵入を認め、角膜実質は菲薄化していた。また角膜上皮は反対に重層化し肥厚していた。これは実質の菲薄化を代償しているかもしれないと考えている。角膜炎上皮は角膜上皮に特異的なケラチン12の免疫染色性が消失していたことから角膜上皮ではなく結膜上皮に置き換わり角化のマーカーであるインボルクリンの染色を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経麻痺性角膜症は難治性疾患で、現在対症療法しかない。重症モデルの詳細な組織病理学的検討とその発症メカニズムは重要な課題であるものの、十分な検討が行われていなかったため、重症神経麻痺性角膜症について検討を行う必要がある。

マウスモデルを作成し、病態を解明することで、難治性で、対症療法しか行えなかった神経麻痺性角膜症の病態ターゲットを標的とした治療に繋がると考えている。

研究成果の概要(英文)：To understand pathobiology of neurotrophic keratopathy we established a severe mouse model of neurotrophic keratopathy by coagulating(18G) the first branch of the trigeminal nerve (V1 nerve).

The corneal opacity and inflammation appeared from an early stage (6 hours later) in the severe model. When observed until 2 years, invasion of inflammatory cells into the corneal stroma was observed for a long period of time, and the corneal stroma was thinner. The corneal epithelium was layered and thickened. This phenomenon may be compensating for the stromal thinning. Since the immunostaining property of keratin 12 (specific keratin of the corneal epithelium) had disappeared, the corneal epithelium was replaced with the conjunctival epithelium instead of the corneal epithelium, and staining of involucrin, which is a marker of keratinization, was observed.

研究分野：眼科

キーワード：神経麻痺性角膜症 マウスモデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

角膜上皮は眼表面に位置するため、外界からの刺激を受ける機会が多いが、その一方で迅速な治癒は透明性維持、感染予防の観点で必須である。三叉神経第一枝領域が障害され角膜知覚が低下した症例では、角膜上皮障害と角膜創傷治癒遅延(遷延性上皮欠損)が惹起され(神経麻痺性角膜症)、重症例では、角膜潰瘍から角膜実質の融解、穿孔を来し眼球崩壊に至る。極めて難治性で、臨床現場では非常に苦慮する。一般には対症療法のみで、根治的な治療法がない。

サブスタンス P(SP)由来ペプチドとインスリン様成長因子(IGF-1)由来ペプチドの同時投与による研究的治療方法の有効性が報告され、ヨーロッパでは、Nerve growth factor (NGF)点眼が承認されたが、作用機序は十分に解明されていない。近年、感覚神経などに発現して侵害刺激受容に関わるイオンチャンネル型受容体が近年明らかにされつつあり、その中心的な分子群が TRP チャンネル群である。TRP チャンネルには TRPC、TRPV、TRPM、TRPML、TRPN、TRPP、TRPA の7つのサブファミリーがある。例えば TRPV1 は、唐辛子の主成分であるカプサイシン、プロトン、熱(43度以上)という複数の侵害刺激によって活性化し、陽イオン流入から細胞興奮をもたらす。TRPV1 が多刺激痛み受容体として機能することは、遺伝子欠損マウスの行動解析からも明らかになっている。TRPA1 は、マスタードやわさびの刺激成分である allyl isothiocyanate(AITC)や、アルカリ、熱(17度以下)などの複数の刺激で活性化することが明らかになっており、最近では TRP イオンチャンネル群の非神経組織での発現も報告されている。前回の科研費のテーマでは軽症モデルで一見正常に見える角膜での、病態解明と TRP チャンネルを用いた治療効果を検討した。その結果軽症モデルでは、角膜上皮の Stem cell が障害されており、創傷治癒の遅延につながる事が判明し、TRP チャンネルの遺伝子を残存三叉神経で過剰に発現させることで、創傷治癒遅延を回復させることができることを発表した(Lab Invest, 2019)。

神経麻痺性角膜症の克服には、その病態解明と病態理解に基づいた根本的な治療戦略の確立が望まれる。

### 2. 研究の目的

神経麻痺性角膜症は、角膜知覚を司る三叉神経第一枝が障害され角膜知覚が低下した症例に生じ、角膜上皮の創傷治癒が遅延し、上皮障害と角膜実質の融解が特徴的であり非常に難治性である。

18G 針での障害による重症モデルの詳細な組織病理学的検討とその発症メカニズムは重要な課題であるものの、十分な検討が行われていなかったため、重症神経麻痺性角膜症について検討を行う。

### 3. 研究の方法

マウス三叉神経を障害し神経麻痺性角膜症の動物モデルを作製する。方法としては、頭蓋外から18Gのジアテルミー電極を挿入し、三叉神経第1枝を凝固する(2MHz, 13W, 250-180秒)。角膜障害の程度や知覚障害、三叉神経の障害程度を検討した。角膜障害の程度については6時間～2年後まで経時的に写真撮影を行った。角膜知覚については経時的にCochet-Bonnet角膜知覚計で計測した。

同マウスを経時的に屠殺、眼球摘出し、角膜特異的なケラチンであるケラチン12や角化のマーカであるインボルクリンなどの免疫染色をおこなった。屠殺したマウスの頭蓋骨を切除、大脳を摘出し、三叉神経を観察、写真撮影した。三叉神経をHE染色で観察し、神経線維の状態や

走行を観察した。

#### 4．研究成果

マウス三叉神経第1枝を18Gパイポラ電極で熱凝固することで神経麻痺性角膜症重症モデルを安定して作成することに成功した。

このマウスモデルを用いて検討したところ、早期（6時間後）から角膜混濁や炎症が出現した。最長2年目まで観察したところ、長期にわたり角膜実質への炎症細胞の侵入を認め、角膜実質は菲薄化していた。また角膜上皮は反対に重層化し肥厚していた。これは実質の菲薄化を代償しているかもしれないと考えている。角膜炎上皮は角膜上皮に特異的なケラチン12の免疫染色性が消失していたことから角膜上皮ではなく結膜上皮に置き換わったと考えた。また、角膜上皮で正常では認めない角化のマーカであるインポルクリンの染色を認めた。三叉神経は受傷後1週間目には神経線維が脱落し、2年御でも回復しなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 8件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Usui-Kusumoto K, Iwanishi H, Ichikawa K, Okada Y, Sumioka T, Miyajima M, Liu CY, Reinach PS, Saika S.   | 4. 巻<br>181           |
| 2. 論文標題<br>Suppression of neovascularization in corneal stroma in a TRPA1-null mouse  | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Exp Eye Res.  | 6. 最初と最後の頁<br>90-97   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.exer.2019.01.002.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する          |
| 1. 著者名<br>Seino S, Matsuoka R, Masuda Y, Kunou M, Okada Y, Saika S.   | 4. 巻<br>39            |
| 2. 論文標題<br>Topical hyaluronan alone promotes corneal epithelial cell migration whereas combination with benzalkonium chloride impairs epithelial wound healing  | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Cutan Ocul Toxicol.   | 6. 最初と最後の頁<br>13-20   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1080/15569527.2019.1673402.  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-             |
| 1. 著者名<br>Okada Y, Zhang Y, Zhang L, Yeh LK, Wang YC, Saika S, Liu CY.  | 4. 巻<br>100           |
| 2. 論文標題<br>Shp2-mediated MAPK pathway regulates Np63 in epithelium to promote corneal innervation and homeostasis   | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Lab Invest.   | 6. 最初と最後の頁<br>630-634 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41374-019-0338-2.  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する          |
| 1. 著者名<br>Izutani-Kitano A, Okada Y, Ichikawa K, Reinach PS, Saika S.   | 4. 巻<br>10            |
| 2. 論文標題<br>Alteration of expression pattern of transient receptor potential vanilloid 2 and transient receptor potential vanilloid 3 in ocular surface neoplasm | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Taiwan J Ophthalmol.  | 6. 最初と最後の頁<br>106-110 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.4103/tjo.tjo_12_20.  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する          |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Takada Y, Yamanaka O, Okada Y, Sumioka T, Reinach PS, Saika S.   | 4. 巻<br>39          |
| 2. 論文標題<br>Effects of a prostaglandin F2alpha derivative glaucoma drug on EGF expression and E-cadherin expression in a corneal epithelial cell line | 5. 発行年<br>2020年     |
| 3. 雑誌名<br>Cutan Ocul Toxicol.  | 6. 最初と最後の頁<br>75-82 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1080/15569527.2020.1722152.   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>該当する        |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Yasuda S, Sumioka T, Iwanishi H, Okada Y, Miyajima M, Ichikawa K, Reinach PS, Saika S.                                | 4. 巻<br>101           |
| 2. 論文標題<br>Loss of sphingosine 1-phosphate receptor 3 gene function impairs injury-induced stromal angiogenesis in mouse cornea | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>Lab Invest.   | 6. 最初と最後の頁<br>245-257 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41374-020-00505-1.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する          |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Sumioka T, Iwanishi H, Okada Y, Miyajima M, Ichikawa K, Reinach PS, Matsumoto KI, Saika S.  | 4. 巻<br>101           |
| 2. 論文標題<br>Impairment of corneal epithelial wound healing is association with increased neutrophil infiltration and reactive oxygen species activation in tenascin X-deficient mice | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>Lab Invest.   | 6. 最初と最後の頁<br>690-700 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41374-021-00576-8.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する          |

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Okada Y, Sumioka T, Reinach PS, Miyajima M, Saika S.                                 | 4. 巻<br>12           |
| 2. 論文標題<br>Roles of Epithelial and Mesenchymal TRP Channels in Mediating Inflammatory Fibrosis | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>Front Immunol.   | 6. 最初と最後の頁<br>731674 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fimmu.2021.731674.   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>該当する         |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|                                  |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>岡田由香 雑賀司珠也            |
| 2. 発表標題<br>重症マウス神経麻痺性角膜症モデルの長期経過 |
| 3. 学会等名<br>日本眼科学会総会              |
| 4. 発表年<br>2020年                  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|-------|--|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 雑賀 司珠也<br><br>(Saika Shizuya)<br><br>(40254544)    | 和歌山県立医科大学・医学部・教授<br><br><br>(24701)  |    |
| 研究分担者 | 住岡 孝吉<br><br>(Sumioka Takayoshi)<br><br>(40433362) | 和歌山県立医科大学・医学部・准教授<br><br><br>(24701) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|