

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791686

研究課題名(和文) 角膜における神経ガイダンス分子の発現と生理的機能の解明

研究課題名(英文) Investigation for the expression and the physiological role of Semaphorin3A in the cornea

研究代表者

森重 直行 (MORISHIGE NAOYUKI)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40346565

研究成果の概要(和文)：角膜上皮創傷治癒過程において、角膜上皮において Sema3A は上皮基底細胞の基底膜部および側部において発現が増加し、その後速やかに減少した。Sema3A の発現が変化しているのに対し、密着結合構成タンパク Zonular Occludens-1 やギャップ結合構成タンパク コネキシン 43 は変化していなかった。Sema3A は角膜上皮創傷治癒過程の早期において何らかの役割を果たしていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Sema3A expressed at the basal-lateral side of corneal epithelial cells in the epithelial wound closure, suggesting that Sema3A may play a regulatory role in the corneal wound healing process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：角膜, 神経ガイダンス分子, semaphorin, 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

角膜は神経線維分布に富んだ組織であり、体内で最も知覚の鋭敏な組織である。これまでの研究で、角膜の生理的恒常性維持に神経因子が重要な役割を果たしていることが報告され、我々の研究室でも神経性因子を用いた角膜上皮の創傷治癒機構の制御の研究およびその臨床応用を行ってきた。角膜における神経性因子が、恒常的かつ適切に機能す

るためには、知覚神経が角膜内に適切に分布する必要がある。角膜内における知覚神経の分布には、神経制御因子がその制御担っていることが推測される。近年注目されている神経ガイダンスタンパクは、脳の発生や脊椎の障害モデルでの発現が研究され、その役割や機能、またその働きを臨床へと応用する研究が進んでいる。角膜創傷治癒モデルにおいて、神経線維の再分布を Semaphorin のサブタイ

プである Semaphorin3A (Sema3A) が制御することや、発生過程で水晶体に発現した Sema3A が角膜に分布する神経線維を制御していることが報告されてきた。さらに、我々は正常の成動物において、角膜に神経ガイダンスタンパクの代表である Sema3A が発現していることを報告した (Exp Eye Res. 2008: 669-74)。また、in vitro の系において、角膜線維芽細胞が EGF 刺激により Sema3A の発現を亢進させるということも報告した (Biochem Biophys Res Commun. 2008:104-8)。神経線維分布の豊富な角膜において、神経ガイダンスタンパクの役割は未知ではあるが、その制御が重要な役割を有していることが考えられる。正常角膜における神経ガイダンスタンパクの役割、創傷治癒・発生、角膜知覚障害を来す疾患との関与など、Semaphorin を中心とする神経ガイダンスタンパクの研究を行うことは、角膜の生理的恒常性維持機構の解明だけでなく、種々の角膜疾患の病態解明、さらには治療への応用など、今後幅広い展開が期待される研究領域であると考えられ、本研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

角膜は高密度に神経線維が分布する組織であるため、角膜内での神経線維の分布と Sema3A の発現がどのような関係にあるかを研究することとした。また、角膜は外界に暴露されている組織であるため常に創傷治癒を繰り返し、その透明性を維持している組織である。その角膜における創傷治癒過程において、Sema3A の発現がどのように変化してい

るかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 正常成ラット眼球を摘出し、速やかに固定する。角膜を切り出し、2~3mm 四方の角膜小片を作成し、whole mount 法を用いて角膜における Sema3A や神経線維を染色した。
- (2) 正常成ラット角膜上皮の機械的搔爬を行い、経時的に眼球を摘出、凍結包埋を行った。凍結薄切切片を作成後、Sema3A をはじめとする種々のタンパク質の免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) 正常成ラットにおける Sema3A の発現

角膜には、周辺部より中央に向かって抗 neurofilament 抗体に陽性の神経線維が進展していた。Sema3A は周辺部角膜上皮細胞の基底膜側に強く発現していた。

(2) 角膜上皮創傷治癒過程における Sema3A の発現の変化

角膜上皮中央部の角膜上皮を機械的に剥離し、上皮欠損を作成した。上皮欠損は速やかに修復し、上皮搔爬翌日には消失した。免疫組織学的な検討では、上皮欠損作成翌日には、中央部角膜の上皮は 6~7 層に過形成していた。このとき、正常角膜上皮と比較して、角膜上皮基底細胞の基底膜側および側面における Sema3A が顕著に発現していたことが明らかとなった。この Sema3A の発現は搔爬 3 日後には正常角膜とほぼ同等となっていた。搔爬後 7 日における観察でも同様であった。ウエスタンブロッティングによる検討で

も免疫組織学的な検討と同様に搔爬後1日で有意に Sema3A の発現が増加していた。搔爬後1日において Sema3A を強発現する上皮基底細胞では、細胞増殖を示す Ki67 の発現が見られなかった。

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 9 件)

- ① Morishige N, Takagi Y, Chikama T, Takahara A, Nishida T: Three-Dimensional Analysis of Collagen Lamellae in the Anterior Stroma of the Human Cornea Visualized by Second Harmonic Generation Imaging Microscopy. Invest Ophthalmol Vis Sci 51: 911-915, 2011, 査読有
- ② Morishige N, Ko JA, Morita Y, Nishida T: Expression of semaphorin 3a in the rat corneal epithelium during wound healing. Biochem Biophys Res Commun 395: 451-457, 2010, 査読有
- ③ Morishige N, Teranishi S, Kondo T, Nishida T: Abnormal cytokeratin expression in low-grade conjunctival intraepithelial neoplasia. Clinical and Experimental Ophthalmology 38(9):899-900, 2010, 査読有
- ④ Morishige N, Yamada N, Teranishi S, Chikama T, Nishida T, Takahara A: Detection of subepithelial fibrosis associated with corneal stromal edema by second harmonic generation imaging microscopy. Invest Ophthalmol Vis Sci 50: 3145-3150, 2009, 査読有
- ⑤ Morishige N, Nishida T, Jester JV :

Second harmonic generation for visualizing 3-dimensional structure of corneal collagen lamellae. Cornea 28 (9) : S46-S53, 2009, 査読なし

- ⑥ Yanai R, Ko JA, Nomi N, Morishige N, Chikama T, Hattori A, Hozumi K, Nomizu M, Nishida T: Upregulation of zo-1 in cultured human corneal epithelial cells by a peptide (PHSRN) corresponding to the second cell-binding site of fibronectin. Invest Ophthalmol Vis Sci 50: 2757-2764, 2009, 査読有
- ⑦ Yanai R, Ko JA, Morishige N, Chikama T, Ichijima H, Nishida T: Disruption of zonula occludens-1 localization in the rabbit corneal epithelium by contact lens-induced hypoxia. Invest Ophthalmol Vis Sci 50: 4605-4610, 2009, 査読有
- ⑧ Yamada N, Kawamoto K, Morishige N, Chikama T, Nishida T, Nishioka M, Okayama N, Hinoda Y: Double mutation (R124H, N544S) of tgfb1 in two sisters with combined expression of avellino and lattice corneal dystrophies. Mol Vis 15: 974-979, 2009, 査読有
- ⑨ Ko JA, Yanai R, Morishige N, Takezawa T, Nishida T: Upregulation of connexin43 expression in corneal fibroblasts by corneal epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 50: 2054-2060, 2009, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 森重直行 : 第2次高調波発生を応用した正常角膜および疾患角膜の3次元構造解析. 第35回角膜カンファレンス・第27回日本角膜移植学会, 東京都, 品川プリンスホテル, 2011/2/17

- ② 森重直行：内皮疾患に対する全層角移植～パーツ移植の時代におけるその必要性～. 第 34 回日本眼科手術学会総会, 京都府, 京都国際会議場, 2011/1/31
- ③ Morishige N : Three-Dimensional Analysis of Collagen Lamellae in the Anterior Stroma of the Human Cornea Visualized by Second Harmonic Generation Imaging Microscopys. 2010 ARVO Annual Meeting, Fort Lauderdale, FL, USA2010/5/5
- ④ 森重直行, 山田直之, 近間泰一郎, 中村義邦, 西田輝夫：前眼部ヘルペス感染症患者における単純ヘルペスウイルス由来タンパク ICPO の発現. 第 114 回日本眼科学会総会, 愛知県, 名古屋国際会議場, 2010/4/16
- ⑤ 森重直行, 高木雄基, 近間泰一郎, 西田輝夫, 高原 淳：正常ヒト角膜における実質浅層コラーゲン線維束の 3 次元構造の評価. 第 34 回角膜カンファランス・第 26 回日本角膜移植学会, 宮城県, 仙台国際センター, 2010/2/11
- ⑥ 森重直行, 高 知愛, 西田輝夫：創傷治癒過程における神経ガイダンス分子 Semaphorin3A の発現の変化. 第 113 回日本眼科学会総会, 東京都, 東京国際フォーラム, 2009/4/16

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森重 直行 (MORISHIGE NAUYUKI)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40346565

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし