

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791712

研究課題名(和文)

Semaphorin 3A 阻害薬による角膜の神経再生

研究課題名(英文)

A semaphorin 3A inhibitor accelerates corneal reinnervation following penetrating keratoplasty on mice

研究代表者

大本 雅弘 (OMOTO MASAHIRO)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：50385241

研究成果の概要(和文):

マウス角膜移植モデルに対して2日毎にSema3A阻害薬を投与し、対照群と比較した。再生神経の機能評価として角膜知覚を測定し、さらに、術後3週程度で摘出した角膜移植片の再生神経長および移植片内への新生血管を定量し、評価した。結果として、マウス角膜移植モデルにおいて、Sema3A阻害薬投与群では、対照群と比較して、有意に移植片内への神経再生が促進されており、角膜知覚も改善されていた。血管新生の亢進は認められなかった。

研究成果の概要(英文):

The purpose of this study is to elucidate the effect of semaphorin3A inhibitor as a potential therapeutic agent.

Penetrating keratoplasty requires a full-thickness 360° corneal incision that cuts corneal nerves and results in complete denervation of the graft. Several studies have reported a marked reduction in corneal sensation after penetrating keratoplasty, and it requires many years to recover the corneal sensation.

Recent research has demonstrated that semaphorin3A (Sema3A) is one of the major inhibitors of axonal regeneration, and strong semaphorin3A inhibitor enhances regenerative responses of the injured spinal cord on rats.

PO-Cre/Floxed-EGFP mice, whose keratocytes, endothelial cells and nerves in corneas express GFP, was used as a recipient of corneal transplantation, and the syngeneic wild-type mouse cornea was used as a donor. The Sema3A inhibitor was administered every two days by subconjunctival injection. To the control group, only its solvent without the inhibitor was administered. They were followed up for three weeks postoperatively. Corneal sensitivity, length of nerves and neovessels in the corneal grafts were evaluated.

In the mouse corneal transplantation model, nerve regeneration into the grafts was significantly facilitated in the Sema3A inhibitor administered group compared to the control group. It was also revealed in the Sema3A inhibitor administered group that corneal sensitivity was improved and that functions of nerves were recovered. Although nerve regeneration into corneal grafts was successfully facilitated by administering the Sema3A inhibitor, more detailed examination is necessary, e.g., in order to elucidate physiological action of Sema3A in corneas, and lack of neovascularization even by the Sema3A inhibitor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：眼科学、三叉神経

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、眼球内部の組織を化学物質や病原体などの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、それに続く涙液分泌が非常に重要であるため、角膜には多数の神経線維が存在しており、角膜は体の中で最も知覚の鋭敏な組織と言われている。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いるが、知覚が傷害されると瞬目反射が減弱し、また涙液の反射性分泌が低下するため、外的刺激からの防御能力が低下する。さらに、角膜知覚は涙液の基礎分泌にも影響していると考えられている。ほぼ全周の角膜表層切開後に角膜実質をレーザー焼灼するレーザー屈折矯正手術(LASIK: laser in situ keratomileusis)は、アメリカでは年間100万件以上行われているが、術後、涙液分泌の低下に伴う角膜上皮障害が高頻度に見られる。この知覚低下は術後6ヶ月にもおよび、涙液分泌は術後1年を経過しても完全には回復しない(Toda, Tsubota et al, *Am J Ophthalmol*, 132, 1-7, 2001)。また神経終末から分泌される substance P が角膜上皮細胞に作用し、上皮の修復を促進することも知られており(Chikama et al, *Lancet*, 351, 1783-4, 1998)。神経の障害により創傷治癒が遅延し生じる、神経障害性角膜潰瘍は眼科的に非常に重要な疾患である。動脈瘤や手術による三叉神経障害、ヘルペス感染や糖尿病などでは、角膜の知覚低下とともに神経障害性角膜潰瘍を生じやすい。また角膜移植眼では全周で神経が切断され、角膜知覚の低下は数年にも及ぶため、術後に神経障害性角膜潰瘍が高頻度に見られる。

一方、神経細胞が発生において神経軸索を特定の経路に沿って標的組織に向かって伸張していく過程は、軸索伸張促進因子や軸索反発因子によって制御されているが、成体においてもこれらの因子は神経の再生に深く関わっており、なかでも反発因子である Sema3A がその受容体である neuropilin1 とともに、軸索の成長円錐を崩壊させることで再生を抑制していることが報告された(Pasterkamp et al, *Eur J Neurosci*, 13, 457-71, 2001)。さらに、近年カビから抽出された強力な Sema3A 阻害薬が、ラットの脊髄損傷モデルにおいて損傷部位の神経線維の再生を促し、下肢運動機能を回復させることが示された(Kaneko, Okano et al, *Nat Med*,

12, 1380-9, 2006)。Sema3A は眼球においても、角膜や毛様体など広範囲に発現していることを確認しており、角膜における神経の再生に少なからず関与していると予想できる。

2. 研究の目的

角膜内での三叉神経の再生を解明することは、LASIK や角膜移植の術後管理、神経障害性角膜潰瘍の治療に役立つばかりでなく、角膜の上皮・実質細胞の創傷治癒機構や、さらには正常な角膜組織の恒常性をより深く理解するためにも有用であると考えられる。我々は、すでにマウス全層角膜移植モデルを神経再生の評価系として確立した。通常、移植片内への神経再生は非常に緩徐で、移植片内ではわずかに神経線維が認められるに過ぎないことが明らかになった。本研究では、抹消神経再生を抑制する主要な因子が Sema3A であるのかということをもより詳細に検証する。

3. 研究の方法

抹消神経再生を抑制する主要な因子が Sema3A であるのかということをもより詳細に検証するために、ドキシサイクリンによって誘導される shRNA による Sema3A ノックダウンマウスを用いる。ドキシサイクリンの眼局所投与によって片眼のみで Sema3A をノックダウンしたうえで、両眼に角膜移植を行って再生神経を観察、比較する。Sema3A のノックダウンによって神経再生が促進されれば、Sema3A が末梢神経再生を抑制する重要な因子であることが確認できる。

また、神経再生を促進させる薬剤として期待される Sema3A 阻害薬が、点眼薬として使用可能かどうか、至適濃度や溶剤、点眼回数を検討する。将来的に LASIK 術後知覚低下の治療薬として利用することも視野に入れ、マウス角膜移植モデルおよびウサギ LASIK モデルに対して Sema3A 阻害薬を点眼投与し、再生神経の観察や、角膜知覚および涙液量の測定によってその効果を判定する。

4. 研究成果

神経再生を促進させ得ると考えられる Sema3A 阻害薬を用いた実験を行った。全層角膜移植を行ったマウスに対し、Sema3A 阻害薬を定期的に結膜下注射で投与すること

により、術後3週という早期に神経断端からの活発な神経再生を観察する事ができた。またコントロールと統計的に比較するため再生神経の程度を定量化する必要があるが、フラットマウントしたグラフト内の神経線維を蛍光顕微鏡で撮影し、撮影した写真で神経線維の蛍光をトレースすることによって、再生神経の総延長を数値化する方法を確立した。さらに、再生神経の機能を評価する方法として、角膜知覚を測定した。臨床で用いられる角膜知覚計によって、マウスにおいても知覚測定が可能であることを確認した。

ドキシサイクリンによって誘導される shRNA による Sema3A ノックダウンマウスを作製し、全身で Sema3A 遺伝子がノックダウンされていることを確認した。

このノックダウンマウスを用いて、角膜移植実験を行った。予想に反し、ドキシサイクリンを投与して誘導したノックダウンマウスでは、ノックダウン非誘導群と比較して、神経再生が抑えられていた。野生型群と誘導群はほぼ同様の結果であった。これは、ドキシサイクリンの持つ神経再生抑制効果が強く影響したものと思われた。

Sema3A 阻害薬を投与することで、角膜移植片への神経再生を促進することができたが、角膜での Sema3A の生理作用や、Sema3A 阻害薬を用いても血管新生が亢進しないメカニズムの解明など、より詳細な検討が必要であると思われた。

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3件)

Omoto M, Shimmura S, Tsubota K, et al. Simultaneous deep anterior lamellar keratoplasty (DALK) and limbal allograft (KLAL) in bilateral limbal stem cell deficiency. 査読有り
Jpn J Ophthalmol. 2010 in press.

Kurihara T, Omoto M, Tsubota K, et al. Retinal phototoxicity in a novel murine model of intraocular lens implantation. Mol Vis. 2009 12;15:2751-61. 査読有り

Omoto M, Miyashita H, Shimmura S, Tsubota K, et al. The use of human mesenchymal stem cell-derived feeder cells for the cultivation of transplantable epithelial sheets.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009;50(5):2109-15. 査読有り

[学会発表](計3件)

発表者：大本雅弘・榛村重人・吉田悟・川北哲也・坪田一男

発表標題：マウス角膜移植モデルにおける Semaphorin 3A 阻害薬による神経再生促進

学会：第35回日本角膜学会総会

発表年月日：2011年5月12日

場所：東京

発表者：M. Omoto, S. Shimmura, S. Yoshida, T. Kawakita, K. Tsubota,

発表標題：A semaphorin 3A inhibitor accelerates corneal reinnervation following penetrating keratoplasty on mice.

学会：The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2011 annual meeting

発表年月日：2011年5月1日

場所：アメリカ、フォートローダーデール

発表者：大本雅弘・榛村重人・吉田悟・川北哲也・坪田一男

発表標題：Semaphorin 3A 阻害薬による角膜グラフトへの神経再生促進

学会：第35回日本角膜学会総会

発表年月日：2011年2月17日

場所：東京

[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]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大本 雅弘 (OMOTO MASAHIRO)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：50385241

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

榛村 重人 (SHIMMURA SHIGETO)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：00235780

坪田 一男 (TSUBOTA KAZUO)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：40163878

岡野 栄之 (OKANO HIDEYUKI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：60160694