

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09753

研究課題名（和文）Semaphorin 3a による角膜上皮創傷治癒および炎症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Mechanisms of Corneal Epithelial Wound Healing and Inflammation by Semaphorin 3a

研究代表者

羽藤 晋（Hatou, Shin）

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：70327542

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）： Semaphorin3A（以下Sema3A）は、神経末端の成長や炎症を制御する分子の一つである。角膜の創傷治癒におけるSema3Aの役割を、神経保護と炎症の観点から解明するために、涙腺神経切断モデルマウスを作製し、PBS点眼群、Sema3a阻害剤点眼群、Sham群の3群で、比較検討を実施した。その結果、Sema3A阻害剤による涙液量の回復、角膜上皮傷害の抑制、角膜中心部の樹状細胞の個数と活性化の減少が認められた。また、涙腺の萎縮や線維化の抑制傾向を確認した。

Sema3A阻害剤の樹状細胞への直接的な作用が、抗炎症効果となり、角膜上皮保護および涙液量の回復につながったのではないかと考えられる。

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、現行の涙液成分の補充療法や、ステロイドによる抗炎症療法だけでは治療が不十分な例も多い。

神経末端の成長や炎症を制御するSema3A阻害剤の研究は、角膜の神経損傷や炎症の分子メカニズムを解明し、ドライアイの根本的な原因に直接作用する新たな治療法を提供できる可能性がある。本研究では、Sema3A阻害剤による涙液量の回復や角膜上皮障害の抑制、樹状細胞を介した眼表面炎症の抑制効果の機序を見出すことができた。Sema3A阻害剤が、ステロイドの副作用となる眼圧上昇、易感染性等を伴わない抗炎症剤として実用化できれば、臨床的意義が高い治療選択肢の1つになる可能性がある。

研究成果の概要（英文）： Semaphorin 3A (Sema3A) is one of the molecules that regulate nerve terminal growth and inflammation. To elucidate the role of Sema3A in corneal wound healing from the perspectives of neuroprotection and inflammation, a mouse model with lacrimal gland nerve transection was created. Three groups were compared: a PBS eye drop group, a Sema3A inhibitor eye drop group, and a sham group. The results showed that the Sema3A inhibitor promoted the recovery of tear production, suppressed corneal epithelial damage, and reduced both the number and activation of dendritic cells in the central cornea. Additionally, there was a tendency to prevent atrophy and fibrosis of the lacrimal gland.

It is hypothesized that the direct effect of the Sema3A inhibitor on dendritic cells resulted in anti-inflammatory effects, leading to the protection of the corneal epithelium and the recovery of tear production.

研究分野：角膜細胞生物学

キーワード：Semaphorin3A 樹状細胞 角膜神経 角膜上皮 ドライアイ 抗炎症作用 涙腺神経切断

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ドライアイは、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、日本には推定 2200 万人の患者が存在し、高齢化、生活習慣、環境の変化により増加傾向にある。ドライアイの病態概念は、日米の間で全く異なり、その結果、診断法や治療法も日米で異なるという特異な疾患群である。すなわち、本邦では、主に、角膜上皮保護による涙液安定化を目標とした点眼治療が行われ、欧米では、ドライアイを炎症性疾患として考え、抗炎症治療が行われている。

Semaphorin3A (以下 Sema3A) は、神経末端の成長の抑制や炎症の制御に関わる分子の一つであるが、その機能は複雑で未解明な部分も多い。我々は、ドライアイモデルマウスにおいて Sema3A 阻害剤の点眼により、角膜内三叉神経の進展と角膜上皮創傷治癒を促すことを報告したが、その詳細な機序については未解明である。最近の研究では、Sema3A が眼の乾燥や炎症に関連していることが示されている。角膜の創傷治癒における Sema3A の役割を、神経保護と炎症の観点から解明するために、涙腺神経切断モデルマウスを作製した。

2. 研究の目的

本研究では、ドライアイの病態において、眼表面や角膜、その周辺組織に対する Sema3A 阻害剤の作用とその治療効果との関係を明らかにする。また、ドライアイモデルとして涙腺神経切断モデルマウスを作製し、Sema3A 阻害剤を点眼投与し、Sema3A 阻害剤の神経保護と炎症コントロールの作用を明らかにする。これまでに、ドライアイ治療の点眼薬として、直接的に神経保護作用を有する点眼薬やステロイド以外の抗炎症点眼薬が開発されていないことから、新規治療薬の開発を目的とする。

3. 研究の方法

ドライアイ動物モデルとして、9 週雌性 C57BL/6J マウスを用いて、涙腺神経切断モデルを作成した。涙腺神経切断は、左眼側のみに行い、sham 群の開創・縫合も左眼側のみに行った。点眼は、PBS 点眼群、Sema3A 阻害剤 (0.5mg/ml) 点眼群、sham 群の 3 群 (n=18-21) に対し、両眼に 1 日 3 回行った。その後、1 週間おきに、体重測定・涙液量測定・角膜のフルオレセイン染色、生体共焦点顕微鏡撮像、免疫組織化学によるホールマウント染色の比較検討を 4 週間実施した。ホールマウント染色のために、1 週間おきに各群のマウス 5 匹から角膜を摘出した。

4. 研究成果

- (1) 体重変化は、実験開始から 4 週の間、Sema3A 阻害剤点眼群、PBS 点眼群、Sham 群ともに有意差は認めなかった。
- (2) 涙腺神経切断後 1 週間までは、Sema3A 阻害剤点眼群、PBS 点眼群ともに涙液量が低下し、その後、Sema3A 阻害剤点眼群は、PBS 点眼群と比較し、有意に、かつ Sham 群と同程度まで涙液量が回復した (図 1)。(Sema3A 阻害剤 N=21, PBS N=21, Sham N=18 Mean ± SEM Sema3A 阻害剤 vs PBS * p<0.05, **p<0.01)

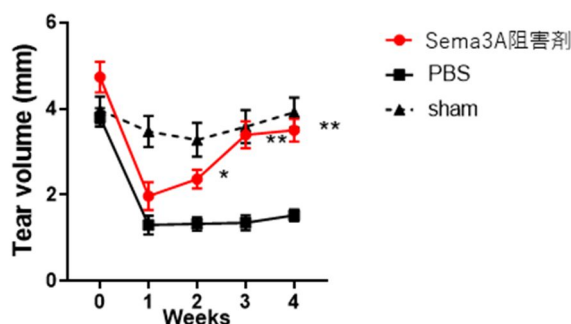


図1 Sema3A阻害剤点眼による涙液量の回復

- (3) 角膜フルオレセイン染色と生体共焦点顕微鏡において、角膜上皮傷害の範囲は、Sema3A 阻害剤点眼群では PBS 点眼群と比較し、有意に抑制されていた (図 2,3) (図 2: Sema3A inhibitor N=21, PBS N=21, Sham N=18 Mean ± SEM Sema3A 阻害剤 vs PBS * p<0.05, **p<0.01), (図 3: Sema3A 阻害剤 vs PBS; **p<0.01 Two way ANOVA Bonferroni's multiple comparisons test N= 8-11 per group, mean ± SEM)

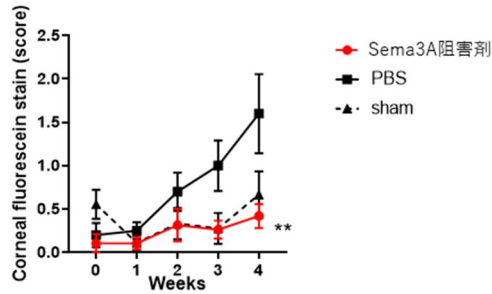


図2 Sema3A阻害剤点眼による角膜上皮障害の抑制効果 (フルオレセイン染色による評価)

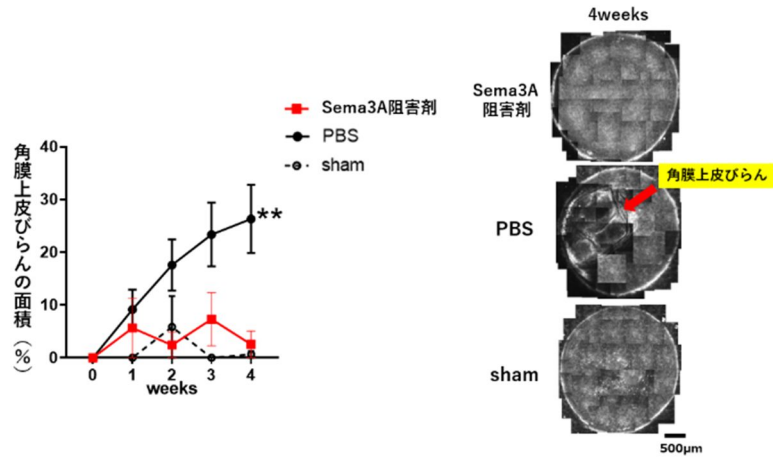


図3 Sema3A阻害剤の点眼による角膜上皮障害の抑制効果 (生体共焦点顕微鏡による評価)

- (4) 角膜ホルマウントの中心から直径 3mm の円を描き、円内の MHC 陽性細胞をカウントした。角膜ホルマウント免疫染色では、Sema3A 阻害剤点眼群で、角膜中心部の樹状細胞の個数と活性化の減少が認められた (図 4)

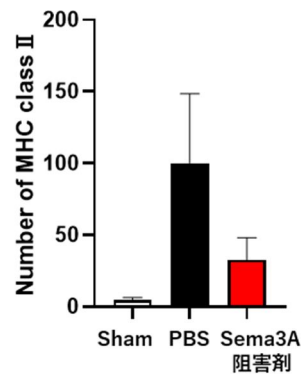


図4 Sema3A阻害剤点眼による角膜中心部の樹状細胞の活性化および増殖の抑制

- (5) 角膜神経密度は 3 群間で有意差は認められなかった。群内での個体差が大きく、今後の課題となった。
- (6) 涙腺の病理標本を比較した結果、PBS 点眼群と比較して、Sema3a 阻害剤点眼群で涙腺の萎縮や線維化が抑制されている傾向であった (図 5)。(Ordinary one-way ANOVA. Tukey ' smultiple comparisons test N=4-5, Mean ± SEM)

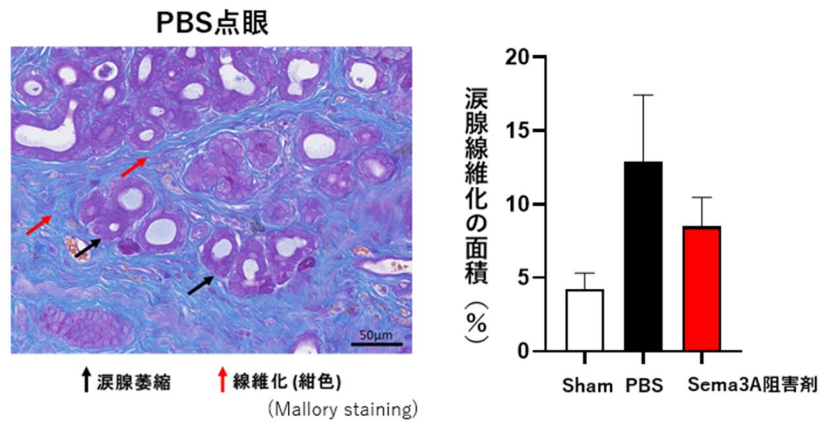


図5 Sema3A阻害剤点眼群による涙腺の萎縮と線維化の抑制効果

【考察】

当初、仮説では、Sema3A 阻害剤の作用により、角膜神経の密度増加に伴い、知覚が増加し、涙液量が増加して、角膜上皮が保護されるメカニズムがあると考えられた。しかし、角膜神経密度は、群間において有意差は認められなかった。角膜内における Sema3A 阻害剤の樹状細胞への直接的な作用が、抗炎症効果となり、角膜上皮保護および涙液量の増加につながったのではないかと考えられる。また、Sema3A 阻害剤の抗炎症作用が、涙腺神経切断で萎縮する涙腺に対して、何らかの保護効果を与えたのではないかと考えられる。今後、マウス個体数を増やし、眼周囲のリンパ節内の炎症の比較検討をすることで、Sema3A 阻害剤の前眼部炎症に対する作用を明らかにすることが望まれる。

Sema3A を阻害することで、樹状細胞を介した眼表面炎症が抑制できるとすると、ドライアイ、あるいは前眼部炎症に対する新たな治療戦略の1つになる可能性がある。現在、前眼部炎症に対してはステロイド点眼が主に用いられるが、ステロイドは眼圧上昇、易感染性等の副作用も多い。Sema3A 阻害剤がこうした副作用を伴わない抗炎症剤として実用化できれば、臨床的意義が高い治療選択肢の1つになる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 清水翔太、谷口ヒロ子、羽藤晋、平山雅敏、榛村重人、根岸一乃 |
| 2. 発表標題 ドライアイモデルマウス角膜内の生体共焦点顕微鏡による経時的観察 |
| 3. 学会等名 角膜カンファランス2023 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 清水翔太、谷口ヒロ子、佐藤真理、羽藤晋、平山雅敏、榛村重人、根岸一乃 |
| 2. 発表標題 涙腺神経切断モデルマウスにおけるSemaphorin3a阻害剤のドライアイ治療効果の評価 |
| 3. 学会等名 第127回日本眼科学会総会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|