

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592671

研究課題名(和文) 3次元ゲル培養法を応用した角膜神経誘導法の開発

研究課題名(英文) Development of corneal nerve induction system using three dimensional gel culture system

研究代表者

近間 泰一郎(Chikama, Taiichiro)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(医)・准教授

研究者番号：00263765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：角膜移植やレーシック術後などに生じる神経麻痺性角膜症に対して、正常な神経線維再生を得るために必要な因子とその制御方法開発を目的とした研究である。神経細胞を生体(角膜実質)に見立てた3次元ゲル内培養を試み、ゲル内での神経細胞(PC12)の培養は可能であるが、神経成長因子(NGF)の濃度勾配による神経線維の誘導結果が安定せず検討を続けている。

一方で、コラーゲンビトリゲルによる共培養システムを利用して、角膜上皮重層化に三叉神経が必須であることを明らかにした。さらに、Substance PあるいはCGRPがその機能を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：For neurotrophic keratopathy in eyes with keratoplasty or LASIK, we will generate a new treatment of corneal nerve regenerative induction.

We have tried to develop three dimensional gel culture system which can carry out quantitative estimation constantly. Until now, co-culture of neural cells (PC12) and corneal fibroblasts in three dimensional gel have been successful. However, nerve fiber induction rate by gradient concentration of the nerve growth factor (NGF) have been unstable. On the other hand, with co-culture system by vitrigel, trigeminal nerve is essential for corneal epithelial stratification. Furthermore, our results revealed that substance P and CGRP play important role for corneal epithelial stratification.

研究分野：眼科学

キーワード：神経再生 神経麻痺性角膜症

1. 研究開始当初の背景

角膜は、生体内でももっとも神経終末の密度の高い組織である。この知覚神経支配が角膜の構造維持や創傷治癒に大きな役割を果たしている。臨床的にも角膜知覚が低下している症例では、角膜上皮の創傷治癒が遅延し角膜混濁につながる神経麻痺性角膜症を発症する。神経麻痺性角膜症の発症には、さまざまな神経因子の関与は明らかになってきてはいるものの神経再生にかかわる角膜細胞との詳細なインタラクションや神経線維走行の正常な再生を実現した治療法は未だに確立されていない。

われわれの最近の研究において角膜上皮細胞と実質細胞の相互作用を調べるために、コラーゲンビトリゲルを用いることで共培養を確立し、互いの細胞の存在下で角膜上皮細胞ではタイトジャンクション蛋白質の発現、実質細胞では Connexin43, N-cadherin などの細胞間接着因子の発現と制御因子 (IGF-1, EGF など) を明らかにした。

このような背景から、角膜移植や角膜屈折矯正手術であるレーシック術後などに生じる角膜神経再生異常に伴う神経麻痺性角膜症に対して、神経走行をより正常化させるとともに神経線維再生を得るために必要な因子とその制御方法をについて検討した後に、特殊コンタクトレンズなどによるドラッグデリバリーシステムを利用した角膜神経再生治療法の開発を最終目標としている。

2. 研究の目的

3次元ゲル培養法を用いた神経線維誘導を評価できる培養システムの確立とコラーゲンビトリゲルを併用した共培養系を用いて神経細胞と角膜細胞(上皮細胞,実質細胞)との相互作用および調節機構を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

1. 神経細胞を生体(角膜実質)に見立てた3次元ゲル内培養を試み、神経線維の伸展を指標に神経線維誘導に必要な環境や因子を検索できる培養系を確立する。

2. 角膜細胞と神経細胞それぞれの細胞の存在・非存在下で変化する因子(分化マーカー,分泌されるサイトカインなど)を明らかにし、角膜細胞と神経細胞の相互作用ならびに調節機構を明確にする。

3. 2で得られた情報をもとに、神経線維誘導因子や調節因子を選択し、ラット角膜移植モデルを用いてその効果を検討する。

1-3の予定で研究を開始した。

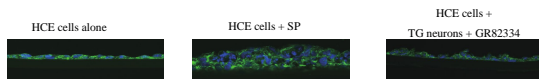
株化神経細胞(PC12)単独および角膜実質細胞との3次元ゲル内培養を試みた。培養条件の確立を行い、神経誘導の方法と定量化を模索した。

また、株化の神経細胞(PC12)ならびに初代神経細胞(三叉神経)と角膜上皮細胞の共培養法を用いた解析を行った。そこで、どちらの共培養系でも同様の結果が得られるかどうか解析を行った。その際に神経細胞の有無で角膜上皮細胞内に生じる様々な因子の発現変化を Western Blot 法, 蛍光抗体法, RT-PCR 法により解析した。共培養系における神経細胞から分泌される角膜上皮細胞への制御因子の同定については、角膜上皮細胞と神経細胞(PC12または三叉神経)の共培養の結果から得られた角膜上皮細胞重層化を元に神経細胞と共培養した際に、角膜上皮細胞単独培養の medium から神経細胞から分泌される因子,あるいはその因子に反応する角膜上皮細胞の相互作用因子を角膜上皮細胞の今までの報告されているいくつかの神経栄養因子,神経ペプチド,さらにそれらのアンタゴニストを投与することで、角膜上皮細胞での重層化に影響を与えている神経ペプチドを同定した。

4. 研究成果

神経細胞を生体（角膜実質）に見立てた3次元ゲル内培養を試み、神経線維の伸展を指標に神経線維誘導に必要な環境や因子を検索できる培養系を確立すること目的で行っているゲル内での神経細胞(PC12)の培養は可能であるが、神経成長因子(NGF)の濃度勾配による神経線維の誘導結果が安定せず、定量的評価が困難であった。そこで、いったんカルチャースライド上での3次元ゲル内培養観察に移行して安定した条件の獲得を目指した検討を続けている。

一方で、すでに確立しているコラーゲンビトリゲルによる神経細胞と角膜細胞の共培養システムを利用して、角膜上皮細胞の機能のうち最も重要であるバリアー機能における重層化に三叉神経が必須であることを三叉神経節細胞と角膜上皮細胞との共培養条件下で明らかにした。さらに、重層化の促進とともに上皮細胞の分化に重要であるN-cadherinの発現が神経細胞の存在下で促進されることと、神経ペプチドの中でもSubstance PあるいはCGRPがその機能を果たしていることを明らかにした。各神経ペプチドの阻害剤を用いた結果、角膜上皮細胞の重層化やN-cadherinの発現は抑えられることから、三叉神経から分泌されるSubstance PあるいはCGRPが角膜上皮細胞の重層化に強く関与していることが示唆された。



今後、安定した培養条件の決定を急ぎ、当初の予定である相互作用の解明と動物モデルによる検討へ進みたいと考えている。

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 6件)

- 1) Ko J-A, Mizuno Y, Ohki C, Chikama T, Sonoda KH, Kiuchi Y. Neuropeptides released from trigeminal neurons promote the stratification of human corneal epithelial cells. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 査読有, 55, 2014, 125-133.
- 2) Chikama T, Araie M, Nishida T. Influence on ocular surface and intraocular pressure of switching from preservative-containing to preservative-free carbetolol hydrochloride ophthalmic solution. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*. 査読有, 117, 2013, 419-26.
- 3) Nakamura-Shibasaki M, Ko J-A, Takenaka J, Chikama T, Sonoda KH, Kiuchi Y. Matrix metalloproteinase and cytokine expression in Tenon fibroblasts during scar formation after glaucoma filtration or implant surgery in rats. *Cell Biochemistry & Function*, 査読有, 31, 2013, 482-488.
- 4) Ko J-A, Chikama T, Sonoda KH, Kiuchi Y. Up-regulation of matrix metalloproteinase-1 and interleukin-6 expression in cocultures of corneal fibroblasts and neural cells. *Biochemistry Biophysical Research Communication*, 査読有, 419, 2012, 537-542.
- 5) Yamada N, Morishige N, Yanai R, Morita Y, Kimura K, Chikama T, Nomizu M, Sonoda KH, Nishida T. Open clinical study of eye drops containing the fibronectin-derived peptide PHSRN for treatment of persistent corneal

epithelial defects. *Cornea*. 査読有, 31, 2012, 1408-1413.

- 6) Ko J-A, Mizuno Y, Shibasaki M, Yamane K, Chikama T, Sonoda KH, Kiuchi Y. Differential expression of semaphorin 3A and its receptors during mouse retinal development. *Cell Biochemistry & Function*, 査読有, 30, 2012, 563-568.

[学会発表](計 5件)

- 1) Ko J-A, Ohki C, Chikama T, Kiuchi Y. Neuropeptides Released from Trigeminal Neurons Promote the Stratification of Human Corneal Epithelial Cells. The American Society for Cell Biology, 2013, Dec 16th, New Orleans, USA
- 2) 近間泰一郎. 遷延性角膜上皮欠損に対する薬物療法. 第67回日本臨床眼科学会シンポジウム, 2013年10月31日, 横浜
- 3) Ko J-A, Ohki C, Chikama T, Kiuchi Y. Neuropeptide from trigeminal nerve promotes the stratification of human corneal epithelial cells. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2013, May 6th, Seattle, USA
- 4) 高知愛, 多木千寛, 近間泰一郎, 木内良明. 三叉神経の神経ペプチドによる培養角膜上皮細胞の重層化促進作用. 日本眼科学会総会, 2013年4月4日, 東京
- 5) Ko J-A, Shibasaki M, Chikama T, Yamane K, Kiuchi Y. Up-regulation of semaphoring 4A expression in retinal pigment epithelial cell by neural cells. The American Society for

Cell Biology, 2012, Dec 17th, San Francisco, USA

[図書](計 1件)

- 1) 近間泰一郎: 栄養障害性角膜潰瘍. 井上幸次編: 眼科診療クオリファイ 25. 角膜混濁のすべて. 東京: 中山書店: 2014, p142 - 147

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

近間 泰一郎 (CHIKAMA, Tai-ichiro)
広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・准教授

研究者番号: 00263765

(2)研究分担者

高 知愛 (KO, Ji-Ae)
広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・講師
研究者番号: 70314797