

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791879

研究課題名(和文) ミクログリアを介した角膜神経再生メカニズムの解析と治療法の開発

研究課題名(英文) The mechanism of corneal nerve regeneration associated with microglia

研究代表者

服部 貴明 (Hattori, Takaaki)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：20408173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞にグリアの関係注目が集まっている。角膜は知覚の最も敏感な組織であり、神経が最も密に存在すると考えられているが、角膜内のミクログリアに関して研究がなされていない。そこで角膜内にもミクログリアが存在し、角膜神経の修復に関与しているという仮説を立て研究を行った。その結果、角膜内にはミクログリア様の細胞が存在しており、この細胞がATP受容体の一つであるP2Y2からのシグナルを介して角膜内に神経再生に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。今後さらに検討を続け、さらなるメカニズムを解明していく予定である。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have focused on the microglia for the maintenance of central nerve system. Cornea is endowed with highest density of nerve fiber in whole body. However, little is known about association between corneal nerve maintenance and other cells such as microglia in central nerve system. We hypothesized that cornea also has microglia like cells who have a capacity to repair corneal nerves in corneal injury. We found that there were microglia like cells in periphery of cornea and also found that P2Y2, which is ATP receptor known as expressing microglia, positive cells in peripheral cornea. Stimulation of P2Y2 by P2Y2 agonist showed significant acceleration of corneal nerve repair. We are continuing to study more precise mechanism of corneal nerve repair.

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

## 1. 研究開始当初の背景

角膜は、体内の中でも知覚の最も敏感な組織の一つであり、神経が最も密に存在している組織と言われている。三叉神経第一枝が眼窩内を通過し、角膜輪部より放射状に侵入した神経枝は実質浅層に分布し、さらにボーマン膜を貫通後、上皮下で神経叢を形成し細胞間に分布する。これら角膜内の神経は、知覚を司っているのはもちろんであるが、角膜内の特に角膜膜上皮の恒常性維持に大変重要な役割を担っていることが最近解明されてきた。角膜三叉神経から産生される神経栄養因子、サイトカイン、成長因子などが角膜上皮に働きかけ角膜上皮の恒常性を維持しているといわれている。中枢神経、末梢神経は神経細胞に付随して存在する3つのグリア細胞(アストロサイト、オリゴデンドロサイトさらにミクログリア)により機能的に支えられ神経伝達能を維持している。近年、なかでもミクログリアに注目が集まっている。ミクログリアは神経細胞に異常が起こると形を変え、神経細胞の修復を手助けするような成長因子を放出する。とくにATPは、ミクログリアの機能に重要な役割を担っているとされ近年研究が進んでいる。ATPの受容体であるP2受容体はP2XとP2Yに分別されミクログリアに発現している。神経細胞の障害時に放出されたATPによりミクログリアが障害部位に集積しP2受容体に結合することで、ミクログリアは活性化し様々なサイトカインや増殖因子を放出する。このように神経細胞とミクログリアの関係が近年の研究成果により明らかになり、様々な病態にミクログリアが関与していることが分かりつつある。一方、最も密に存在する臓器と考えられている角膜内のミクログリアに関してはその機能だけでなく存在自体も明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

角膜内にもミクログリアが存在し、角膜神経の修復に関与することで角膜の透明性を維持しているという仮説を立て研究を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 正常角膜をIba-1、CD11b、CD11cに対する抗体で染色し、ミクログリアの存在、ミクログリアの角膜内での分布を共焦点顕微鏡で検討する。

(2) 角膜上皮を搔扱することで角膜神経を消失させることが可能であり、その後神経が再生してくる。このモデルを用いて三叉神経の再生とミクログリアの関係を検討する。さらにこのミクログリアのP2受容体の発現を検討する。

(3) P2Y2受容体を促進する薬剤であるジクアスルホン酸ナトリウムを角膜上皮搔扱モデルに使用し、角膜神経の修復変化および角膜上皮の変化を検討する。

## 4. 研究成果

正常角膜にはIba-1<sup>+</sup>細胞が角膜実質周辺部に存在していた。さらにこれらの細胞は角膜上皮には存在せず、角膜実質の浅層に存在していた。また、P2Y2受容体陽性細胞も角膜実質周辺部に存在し、Iba-1<sup>+</sup>細胞と同様に角膜実質の浅層に存在していた。これらの細胞が同一のものであるかを確認するために、Iba-1とP2Y2の二重染色を現在検討中である。さらに、P2Y2に対する抗体と、マクロファージのマーカであるCD11bに対する抗体で角膜を二重染色したところ、P2Y2は一部のマクロファージに発現していることがわかった。

一方、角膜上皮搔扱後に角膜神経が消失することをB-tubulinの染色で確認できた。この時点ではP2Y2受容体陽性細胞数は減少していた。

そこで、角膜上皮搔扱後にP2Y2受容体の刺

激薬であるジクアスルホン酸ナトリウムを一日4回点眼し、角膜上皮の再生をフルオレセイン染色で検討し、角膜神経の再生を4日目に採取した角膜をB-tubulinの染色で確認した。その結果、角膜上皮の進展は促進されなかった。一方角膜神経は有意に再生が促進されていた。

以上の結果から角膜内には中枢神経内に存在するミクログリアと同じような表現型をもった細胞が存在しており、この細胞がP2Y2状態からのシグナルを介して角膜内に神経再生に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。

中枢神経系の神経進展にはミクログリアの存在が大きくかかわっていると考えられている。近年研究が進み、その詳細なメカニズムが分かってきた。神経進展時にミクログリアは脳由来神経栄養因子(BDNF)を産生する。このBDNFが作用することで、直接ミクログリアが神経の進展に関与していると報告されている。一方従来角膜内での神経の再生について詳細なメカニズムの検討はなされていなかったが、近年報告が増え、注目が集まっている。セマフォリン3Aは近年角膜神経再生に重要な因子であることが報告され、セマフォリン3Aにより直接神経の再生が促される。また血管内皮増殖因子(VEGF)も直接神経再生を促していると報告されている。一方、神経周囲の細胞と神経再生のメカニズムについては報告が少ない。近年、我々の今回の結果と同様に、神経周囲にIba-1陽性のマクロファージの存在が報告されている。中枢神経系に存在するマクロファージに似た細胞をミクログリアとすれば、末梢神経系に存在する同じような細胞をミクログリアと呼ぶには、議論があるところであるが、少なくともミクログリアと同じような表現型の細胞が存在し、末梢においても中枢神経系と同様にこれらの細胞が神経の再生、維持にかかわっ

ている可能性を、今回の結果で示せたと考えている。今後さらに検討を続け、そのメカニズムを解明していく予定である。

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 5件)

In vivo challenging of polymyxins and levofloxacin eye drop against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. Tajima K, Miyake T, Koike N, Hattori T, Kumakura S, Yamaguchi T, Matsumoto T, Fujita K, Kuroda M, Ito N, Goto H. *J Infect Chemother*. 2014 Jun;20(6):343-9. (査読有)  
doi: 10.1016/j.jiac.2013.10.015.

Alterations in the corneal nerve and stem/progenitor cells in diabetes: preventive effects of insulin-like growth factor-1 treatment. Ueno H, Hattori T, Kumagai Y, Suzuki N, Ueno S, Takagi H. *Int J Endocrinol*. 2014;2014:312401. (査読有)  
doi: 10.1155/2014/312401.

Peroxisome proliferator-activated receptor-agonist pioglitazone suppresses experimental autoimmune uveitis. Okunuki Y, Usui Y, Nakagawa H, Tajima K, Matsuda R, Ueda S, Hattori T, Kezuka T, Goto H. *Exp Eye Res*. 2013;116:291-7. (査読有)  
doi: 10.1016/j.exer.2013.09.017.

Non-Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty for bullous keratopathy secondary to iridoschisis. Minezaki T, Hattori T, Nakagawa H, Kumakura S, Goto H. *Clin Ophthalmol*. 2013;7:1353-5. (査読有)  
doi: 10.2147/OPHT.S43180.

Depiction of cavity formation in Terrien marginal degeneration by anterior segment optical coherence tomography. Hattori T, Kumakura S, Mori H, Goto H. *Cornea*. 2013 ;32(5):615-8. (査読有)  
doi:10.1097/ICO.0b013e318259c970.

Expression of toll-like receptor 4 contributes to corneal inflammation in experimental dry eye disease. Lee HS, Hattori T, Park EY, Stevenson W, Chauhan SK, Dana R. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 17;53(9):5632-40. (査読有) doi: 10.1167/iovs.12-9547.

(3)連携研究者 ( )

研究者番号 :

〔学会発表〕(計 2件)

緑膿菌感染による角膜リンパ管新生.  
服部貴明 田島一樹 高橋広樹 中川 迅  
片平晴己 熊倉重人 後藤 浩. 角膜カン  
ファランス 2014年1月30日 沖縄

抗 CD70 抗体はマウス角膜移植拒絶反応  
を抑制する. 服部貴明 本橋良祐 白井嘉  
彦 熊倉重人 秋葉久弥 後藤 浩 日本  
眼科学会 2012年4月5日 東京

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況(計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

服部 貴明 (HATTORI, Takaaki)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 20408173

### (2)研究分担者

( )

研究者番号 :