



Title	ドライアイにおける角膜痛覚過敏およびレバミピドによる角膜痛覚過敏の改善
Author(s)	田川, 義晃
Description	配架番号 : 2468
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13454号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13454
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91649
Type	doctoral thesis
File Information	Yoshiaki_Tagawa.pdf



学 位 論 文

ドライアイにおける角膜痛覚過敏および
レバミピドによる角膜痛覚過敏の改善

(Corneal hyperalgesia in patients with dry eye
disease and improvement of corneal hyperalgesia
by rebamipide)

2019 年 3 月

北海道大学

田川義晃

学 位 論 文

ドライアイにおける角膜痛覚過敏および
レバミピドによる角膜痛覚過敏の改善

(Corneal hyperalgesia in patients with dry eye
disease and improvement of corneal hyperalgesia
by rebamipide)

2019 年 3 月

北海道大学

田川義晃

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
緒言	5 頁
略語集	7 頁
第 1 章	
緒言	8 頁
方法	10 頁
結果	13 頁
考察	18 頁
結論	20 頁
第 2 章	
緒言	21 頁
方法	23 頁
結果	29 頁
考察	47 頁
結論	52 頁
総括	53 頁
謝辞	53 頁
利益相反	53 頁
引用文献	54 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. **Tagawa, Y.**, Noda, K., Ohguchi, T., Tagawa, Y., Ishida, S., and Kitaichi, N. (2018). Corneal hyperalgesia in patients with short tear film break-up time dry eye. *The ocular surface*. (in press)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. **田川義晃**、北市伸義、大口剛司、山本哲平、水内一臣、田川義継、石田 晋. ドライアイ患者の角膜痛覚に対するレバミピド点眼の効果. 第 67 回臨床眼科学会, 2013 年 11 月 横浜
2. **田川義晃**、大口剛司、山本哲平、水内一臣、田川義継、北市伸義、石田晋. ドライアイ患者の自覚症状と角膜知覚および痛覚についての検討 第 118 回日本眼科学会総会、2014 年 4 月 東京
3. **Tagawa Y**, Noda K, Miyamoto R, Otsuguro K, Ishizuka ET, Inafuku S, Ohguchi T, Kanda A, Ishida S. Rebamipide reduces the response to capsaicin in sensory ganglion cells. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting 2015 年 5 月 Denver, USA
4. **田川義晃**、野田航介、宮本 亮、乙黒兼一、石塚タンエルダ、神田敦宏、石田 晋. レバミピドは三叉神経節細胞におけるコレシストキニン応答を抑制する. 第 120 回日本眼科学会総会、2016 年 4 月 仙台
5. **Tagawa Y**, Noda K, Miyamoto R, Otsuguro K, Ishizuka E, Ohguchi T, Kanda A, Ishida S. Suppression of cholecystokinin response by rebamipide in trigeminal ganglion cells. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting 2016 年 5 月 Seattle, USA
6. **田川義晃**、野田航介、宮本 亮、乙黒兼一、石塚タンエルダ、神田敦宏、石田 晋. 三叉神経節細胞におけるレバミピドのコレシストキニン経路抑制機序の検討. 第 121 回日本眼科学会総会、2017 年 4 月 東京
7. **Tagawa Y**, Noda K, Otsuguro K, Ishizuka ET, Kanda K, Ishida S. Mechanism in suppression of CCK pathway by rebamipide in trigeminal neurons. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting 2017 年 5 月 Baltimore, USA

要旨

【緒言】ドライアイは、様々な要因によって涙液層の安定性が低下し、眼不快感や視機能異常を生じる眼表面疾患、と定義される。過去には、ドライアイは涙液量が不足する疾患と考えられていたが、涙液量低下だけでは説明できない強い自覚症状(乾燥感・異物感・眼痛など)を訴える症例が存在することがわかってきた。例えば、近年になって複数の新規ドライアイ治療薬が臨床導入されたが、これらの薬剤によって涙液の量・質、角結膜上皮の親水性が改善された後もなかなか自覚症状が改善しない症例や、一方で眼表面の所見は改善していないにも関わらず自覚症状のみが著明に改善する症例などが実臨床上よく経験される。このドライアイ患者における他覚所見と自覚症状の不一致には、角膜神経の感受性変化が関与している可能性がある。

本学位論文では、臨床および基礎的実験からドライアイと角膜神経の関係について検討した結果をまとめた。

第一章:涙液層破壊時間短縮型ドライアイ患者は角膜痛覚過敏を有する

【背景と目的】ドライアイの病型の一つとして、開眼後に眼表面の涙液層が乾き始めるまでの時間が短くなる涙液層破壊時間(BUT)短縮型ドライアイがある。この BUT 短縮型ドライアイは、涙液量の低下はなく、眼表面の他覚所見が少ないにも関わらず自覚症状が非常に強いドライアイの一病型である。しかし、その病態については未だ十分に解明はなされていない。本検討では、角膜知覚測定の際に使用される Cochet-Bonnet 角膜知覚計を用いて、BUT 短縮型ドライアイにおける角膜知覚および痛覚を評価し、自覚症状との相関について検討した。

【対象と方法】 BUT 短縮型ドライアイ患者 60 例、および健常者 46 例を対象とした。眼表面の他覚所見(角結膜上皮障害、涙液層破壊時間、涙液量)、質問票によるドライアイの自覚症状および角膜知覚・痛覚を調べた。さらに、眼表面の他覚所見、角膜知覚・痛覚と自覚症状の相関を検討した。

【結果と考察】 BUT 短縮型ドライアイ患者では健常者と比較して角膜知覚には変化がなかったが、角膜痛覚が亢進していた。痛覚過敏を有する BUT 短縮型ドライアイ患者では痛みの自覚症状と角膜痛覚が強く相関していたことから、その自覚症状の一部は角膜痛覚過敏によって説明が可能であることが示された。痛覚過敏は神経障害性疼痛に特徴的な兆候であり、本研究結果は BUT 短縮型ドライアイ患者において神経障害性疼痛が生じている可能性を示した。

【結論】 BUT 短縮型ドライアイの自覚症状発現には角膜痛覚過敏が関連していた。

第二章:コレシストキニン受容体はドライアイの痛覚過敏に対する新規治療標的である

- レバミピドの作用機序解明から -

【背景と目的】ドライアイ患者において、治療薬レバミピドが眼表面の他覚所見の改善に先行して自覚症状を軽快させることは臨床しばしば経験されることである。しかし、この自覚症状のみが改善する詳細なメカニズムは同剤の開発から 30 年以上経過した現在も不明なままである。過去に、レバミピドはコレシストキニン(CCK)1 受容体(CCK-1R)に作用すると報告されている。CCK 受容体

には、CCK-1R および CCK-2R が存在し、両者ともに痛みに関与することが以前から知られている。そのため、CCK 経路は疼痛治療における新規創薬標的として注目されているが、ドライアイにおける病態への関与については十分に解明されていない。本検討では、ドライアイ患者に対する臨床的検討とドライアイモデルラットおよびラット三叉神経節細胞を用いた基礎的検討によってレバミピドの治療効果を評価し、その作用機序について検討した。

【対象と方法】レバミピド点眼によって治療された BUT 短縮型ドライアイ患者 21 例を対象とし、治療前後に眼表面の他覚所見と角膜知覚・痛覚および自覚症状を検討した。

雌雄 Wistar, Long Evans Tokushima Otsuka, CCK-1R が欠損している Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットを用いた。Fura-2 カルシウムイメージングを用いてラット三叉神経節細胞におけるカプサイシン(痛み受容体 transient receptor potential cation channel subfamily V member 1(TRPV1)作動薬)、CCK、レバミピド、CCK 受容体阻害薬の作用を検討した。また、レバミピドの CCK 受容体に対する結合親和性を検討した。

さらに、角膜痛覚過敏を誘導するため、眼窩外涙腺摘出ドライアイモデルラットを作成した。角膜痛覚過敏に対するレバミピドおよび CCK 受容体阻害薬の効果を検討するため、それらを前投与したドライアイモデルラットにカプサイシン点眼投与をおこない、ラットが眼を拭う回数(ぬぐい運動数)を評価した

【結果と考察】 BUT 短縮型ドライアイ患者においてレバミピドは他覚所見の改善に先行して、角膜痛覚過敏と自覚症状を改善していた。このことは、レバミピドが BUT 短縮型ドライアイ患者の角膜痛覚過敏を改善することで自覚症状を軽快することを示唆している。ラット培養三叉神経細胞における Fura-2 カルシウムイメージングによる検討では、CCK は痛み受容体である TRPV1 を感作し、レバミピドは CCK による TRPV1 の感作を抑制した。これは、レバミピドが CCK 受容体を阻害して CCK による TRPV1 の感作を抑制することを示している。

次に、CCK による TRPV1 の感作は CCK-1R 阻害薬 devazepide では抑制されなかったが、CCK-2R 阻害薬 L365260 で抑制された。このことから、レバミピドの TRPV1 抑制作用は CCK-2R を介している可能性が推測されたが、CCK-1R 欠損 OLETF ラット三叉神経細胞においてレバミピドは CCK による応答を抑制しなかった。さらに、結合親和性の検討ではレバミピドは CCK-1R に結合することが確認された。これらの一見矛盾した結果から導かれる推論は、レバミピドが CCK-1R-2R ヘテロダイマーに作用して、CCK 経路を抑制している可能性である。過去に、CCK-1R 阻害薬 devazepide は CCK-1R には結合するが、CCK-1R-2R ヘテロダイマーには結合しないことが報告されている。一方で、CCK-2R 阻害薬 L365260 は CCK-2R のみならず、CCK-1R-2R ヘテロダイマーにも結合能を有することが明らかにされている。これらの知見および本研究の結果から、レバミピドは CCK-1R-2R ヘテロダイマーに作用することで、その下流に存在する TRPV1 の感作を抑制し、ドライアイ患者の角膜痛覚過敏を改善することが推定される。

最後に、ドライアイモデルラットについて検討をおこなった。眼窩外涙腺摘出ドライアイモデルラットでは、正常眼と比較してカプサイシン点眼によるぬぐい運動数が増加し、角膜痛覚過敏が観察された。また、レバミピドおよび CCK-2R 阻害薬 L365260 は眼窩外涙腺摘出ドライアイモデルラット

の角膜痛覚過敏を抑制した。さらに、CCK-1R 欠損 OLETF ラットでは眼窩外涙腺摘出による角膜痛覚過敏を誘導できなかった。これらの結果は、CCK 受容体がドライアイにおける角膜痛覚過敏の発現および維持に重要な役割を果たしていることを示していた。

【結論】 レバミピドは、CCK 経路を介してドライアイ患者の角膜痛覚過敏を抑制することでその自覚症状を改善していると考えられた。また、CCK およびその受容体はドライアイの角膜痛覚過敏に対する新規治療標的になる可能性が示された。

【総括】 従来、ドライアイの治療標的は眼表面の涙液や上皮であったが、本研究は1)ドライアイ患者の中に角膜痛覚過敏を有する一群が存在すること、2)角膜神経がその新たな治療標的となり得ること、3)CCK とその受容体はその新規治療標的となり得ること、を示した。ドライアイというバスケットネームで診断されている患者の中には、極めて強い眼不快感に苛まれ、ほとんどの時間を閉瞼して過ごすなど著しい QOL の低下をきたす症例が存在する。そのようなケースを解決するためにも、今後は角膜神経をターゲットにした治療薬開発が急務であり、本研究の成果を基にさらなる病態解明と治療薬開発に結び付けたいと考えている。

緒言

ヒトは、外界からの情報の 9 割を視覚から得ているとされる。眼球に入射する光が最初に通過する部位である角膜は外界に常時露出される組織であり、涙液によって常に保湿・栄養されることでその透明性を維持している。涙液は眼球の外上方に存在する涙腺および結膜上皮で産生され、瞬目によって眼表面全体に分布することでその湿潤をおこなっている(図 1)。涙液はその 98%が水分であるが、涙腺由来のラクトフェリンやリゾチームなどのタンパクも含まれており、眼表面はその抗菌作用や抗炎症作用によって外来微生物や炎症から保護されている。また、球結膜の杯細胞からは涙液の親水性を保持するために糖タンパク質であるムチンが、結膜下リンパ組織からは IgA が分泌されることが知られている(図 2)。さらに、眼瞼縁にはマイボーム腺と呼ばれる皮脂腺が存在し、涙液表面に脂質成分を供給してその蒸発を防ぐ役割を果たしている。このように涙液は単なる水分ではなく、様々な分子を含有した液層とその表面に存在する油層によって二層構造を形成し、角結膜上皮と接している(図 3)。そして、その涙液は眼瞼縁内側に位置する涙点から排出(図 1)、もしくは眼表面から蒸発、あるいは眼球結膜に吸収される。

涙液は眼表面の恒常性維持を担っているため、その異常はドライアイと呼ばれる病的状態の形成につながる。ドライアイは、眼表面の様々な要因によって涙液層の安定性が低下し、眼不快感や視機能異常を生じ、眼表面の障害を伴うことがある疾患、と定義される(Tsubota et al., 2017)。本邦におけるその患者数は約 1600 万人とされ、患者は眼の乾燥感のみならず、異物感、眼痛、羞明、開瞼困難、眼精疲労、充血、霧視など実に様々な眼症状を呈することが知られており、慢性的に持続する眼不快感によって QOL の低下を来す本疾患は眼科診療における主要疾患の一つとなっている。長

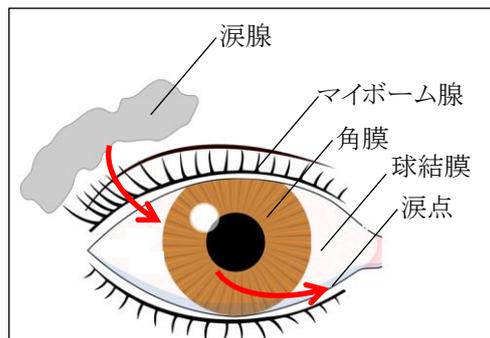


図1 眼表面の構造

眼表面は角結膜に被覆され、涙腺から分泌される涙液によって湿潤に保たれている。赤線は涙液の動態。



図2 ヒト結膜組織

眼表面を覆う結膜には、ムチンを産生、分泌する杯細胞(黒丸)があり、結膜下リンパ組織からは IgA が産生される。



図3 涙液の構造

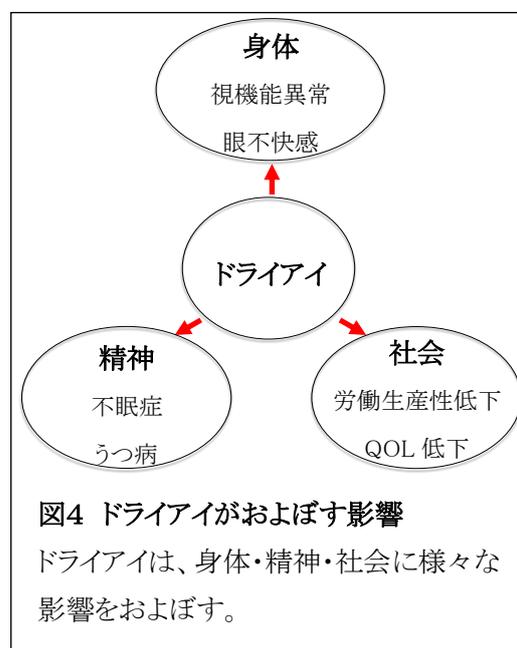
涙液は脂質である油層が表面に、その下に水分と分泌型ムチンを有する液層があり、角結膜上皮と接して存在している。

時間のディスプレイ作業に伴う乾燥感、眼疲労感などは健常者でも経験するが、その眼不快感に比して圧倒的に強いドライアイ症状に悩まされている患者を実臨床ではしばしば経験する。一例として、非常に強い眼痛を有する患者は開瞼を維持することができずに日中の大半を閉瞼して過ごし、点眼を手放せず外出もままならないこともある。また、冒頭に述べたようにヒトは外界からの情報のほとんどを視覚から得ているため、そのような症例では日常生活や知的活動が脅かされ、QOLの低下は計り知れない。さらに、ドライアイによる生活上の困難は眼不快感や視機能異常といった眼症状のみにとどまらず、不眠症やうつ病などの精神疾患、あるいは身体の慢性疼痛の合併も引き起こすと報告されている。また、ドライアイによる影響は身体・精神のみならず社会的な影響も無視できない。オフィスワーカーにおけるドライアイは1人当たりの年間生産性を約48万円低下させると試算されており(Uchino et al., 2014)、罹患率の高さから国全体の労働生産性にも影響を与えることが指摘されている(図4)。

このように身体、精神、社会にまで影響を与えるドライアイだが、従来、このドライアイは単に涙液量が不足だけの疾患と捉えられてきた。しかし、涙液量の低下だけでは説明できない強い乾燥感・異物感・眼痛などを訴える症例が存在することから(Toda et al., 1995)、涙液の量のみならず、分泌型ムチン減少にともなう質の低下、角結膜上皮の膜型ムチン発現減少による親水性の低下、さらにはマイボーム腺の機能障害から生じる油層の異常による涙液の蒸発亢進などが関与すると考えられるようになった。また、眼表面の上皮障害などを背景に二次的な炎症が生じることもその病態を悪化要因となっていることも明らかとなってきた。

近年、本邦では新規のドライアイ治療薬が開発され、ジクアホソルナトリウムやレバミピドの点眼製剤が臨床で使用されている。両者は眼表面における涙液の量、分泌型・膜型ムチンの両者の増加から涙液の質および角結膜上皮の親水性を向上させる薬理作用を有するため(Shigeyasu et al., 2015; Urashima et al., 2004)、患者の自覚症状を改善することが期待されていた薬剤である。しかしながら、これらの薬剤を投与することによって涙液の量・質、角結膜上皮の親水性が改善された後も自覚症状が改善しない症例、その一方でまだ眼表面の所見が改善していないにも関わらず自覚症状が改善する症例が存在し、眼表面の他覚所見と自覚症状が必ずしも一致しないということが臨床上しばしば経験される(Yokoi et al., 2015)。そして、この他覚所見と自覚症状の不一致には、角膜神経の感受性の変化が関与している可能性があり、ドライアイ患者において角膜神経の形態的な異常も指摘されている。(Rosenthal and Borsook, 2016)

本学位論文では、申請者が大学院在学中に臨床および基礎的実験からドライアイと角膜神経の関係について検討した結果をまとめる。



略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

BIM I, bisindolylmaleimide I

BK, bradykinin

BUT, break up time of tear film

Cap, capsaicin

CCK, cholecystokinin

CCK-8S, cholecystokinin sulfated octapeptide

DEQS, dry eye-related quality of life score

ELG, extraorbital lacrimal gland

FG, fluorogold

FISH, fluorescence in situ hybridization

GPCR, G protein coupled receptor

KCl, potassium chloride

OETF, otsuka long evans tokushima fatty

LETO, long evans tokushima otsuka

PBS, phosphate buffered saline

sBUT, short break up time of tear film

SPK, superficial punctate keratitis

TRPV1, transient receptor potential cation channel subfamily V member 1

V_i/V_c, trigeminal interpolaris/caudalis transition region

第1章

涙液層破壊時間短縮型ドライアイ患者は角膜痛覚過敏を有する

緒言

ドライアイの病型には涙液減少型と蒸発亢進型がある(Tsubota et al., 2017)。涙液減少型のドライアイは、涙腺の機能低下、結膜杯細胞の障害などから涙液量やムチンが減少し、角結膜上皮も障害される。一方、蒸発亢進型のドライアイは必ずしも涙液量の低下を伴わず、角結膜上皮障害も軽度だが、マイボーム腺機能障害による蒸発亢進や角結膜上皮の膜型ムチン低下による眼表面の親水性低下などが原因と考えられている。涙液減少型の代表としてはシェーグレン症候群にともなうドライアイが(図5)、蒸発亢進型の代表としては開瞼後に眼表面の涙液層が乾き始めるまでの時間が短くなる涙液層破壊時間(break up time, BUT)短縮型ドライアイがある(図6)。BUTが短いということは、眼表面の涙液が乾きやすいことを意味しており、角結膜上皮あるいは涙液自体の親水性低下、油層異常による蒸発亢進などが原因として想定されている。この BUT 短縮型ドライアイでは涙液量の低下はなく、また上皮障害などの眼表面の他覚所見が少ないにも関わらず、自覚症状が非常に強いドライアイの一病型として報告されている(Toda et al., 1995)。眼表面における他覚所見は、上皮にまで障害が及ぶ涙液減少型ドライアイの方が強いにも関わらず、自覚症状は BUT 短縮型ドライアイに代表される蒸発亢進型でも同等かむしろ強いことさえある。このように、ドライアイにおいては以前から眼表面の他覚所見と自覚症状に乖離が認められることが広く知られていた(Yokoi et al., 2015)。しかし、その原因については未だ十分に解明されていない。

以前からドライアイ患者の角膜知覚が変化することは知られており、ドライアイにおける他覚所見と自覚症状の乖離については、角膜神経の感受性変化がその一因として注目されている。角膜知覚の測定には、角膜表面に柔らかいナイロンフィラメントを接触させて被検者がそれを知覚できたかどうかを調べる Cochet-Bonnet 角膜知覚計が用いられる(図7)(Cochet and Bonnet,

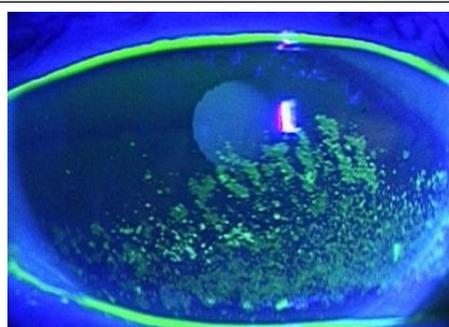


図5 涙液減少型ドライアイ

涙液減少型ドライアイ患者の涙液量は減少しており、眼表面にはフルオレセインで緑色に染色される上皮障害がみられる。



図6 BUT 短縮型ドライアイ

BUT 短縮型ドライアイ患者は眼表面の他覚所見は少ないが、強い自覚症状を訴える。

1961)。ナイロンフィラメントが長ければ接触時の刺激は弱く、短ければ刺激が強いので、このナイロンフィラメントの長さを変えることで、角膜接触時の刺激強度を変化させて半定量的に角膜知覚を検査することができる。前述の涙液減少型ドライアイでは角膜知覚が減少するが(Xu et al., 1996)、蒸発亢進型ドライアイでは必ずしも角膜知覚が減少していないことが知られている(Labbe et al., 2013)。

三叉神経第一枝である眼神経は角膜知覚・痛覚を司るが、その障害によって生じる疾患としては神経麻痺性角膜症があり(図 8)(Rodger, 1953)、脳梗塞や糖尿病などの全身疾患を背景にして三叉神経全体に障害が生じるものや、眼局所のヘルペスウイルス感染による角膜神経の障害などを原因とするものなどが知られている。神経麻痺性角膜症では眼神経が障害されるため、角膜知覚が低下し、眼表面には重篤な角結膜上皮障害を生じるものの眼痛・異物感などの自覚症状はほとんど生じない。つまり、神経麻痺性角膜症でも眼表面の他覚所見と自覚症状は、ただし BUT 短縮型ドライアイの場合とは逆の形であるが、乖離が生じる。このように、角膜神経の変化は眼表面疾患の病因となるため(Cavalcanti et al., 2017; Hamrah et al., 2017; Kheirkhah et al., 2015)、BUT 短縮型ドライアイにおける自覚症状と他覚所見の乖離にも三叉神経の異常が関わることが想定される。しかし、BUT 短縮型ドライアイの角膜痛覚についての検討はほとんどなされていない(Kaido et al., 2016; Spierer et al., 2016)。

本章では、BUT 短縮型ドライアイにおいて Cochet-Bonnet 角膜知覚計を用いて角膜痛覚を検討し、自覚症状との相関について検討した結果を記述する。



図 7 Cochet-Bonnet 角膜知覚計
先端のナイロンフィラメントの長さを変えて角膜に接触させることで角膜知覚を測定する機器である。

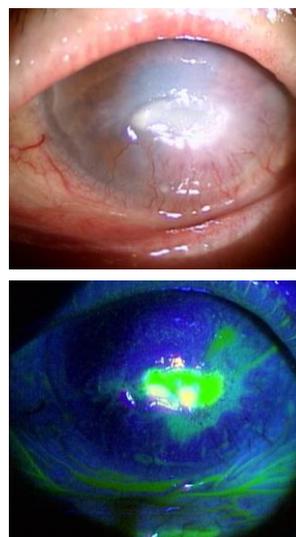


図 8 神経麻痺性角膜症

上段:神経麻痺性角膜症患者の前眼部写真、下段:フルオレセイン染色後の前眼部写真。脳梗塞後の神経麻痺性角膜症患者においては重篤な角膜潰瘍(緑色の部分)が生じるが、眼痛などの自覚症状の訴えは無い。

方法

1. 対象

2012年9月から2017年3月にかけて、北海道大学病院および北海道医療大学病院に定期的に外来通院していた BUT 短縮型ドライアイ患者(男性 18 例、女性 42 例 計 60 例、年齢 22-93 歳、平均年齢 63.8 ± 15.8 歳)および健常者(男性 11 例、女性 35 例 計 46 例、年齢 22-94 歳、平均年齢 61.1 ± 17.7 歳)を対象とした(表1)。対象は全て日本人であった。本研究は、北海道大学病院および北海道医療大学病院における倫理審査委員会にて承認を受け(IRB #014-0146 および#2012-007)、ヘルシンキ宣言にしたがって書面による十分な説明と同意を得た後に施行した。

対象	sBUT	健常者	p 値
男女比(男:女)	18:42	11:35	
年齢(歳)	63.8 ± 15.8	61.1 ± 17.7	0.43

表 1 対象者の男女比および年齢

BUT 短縮型ドライアイの診断基準は、既報(van Bijsterveld, 1969; Yokoi et al., 2015) に準じて「ドライアイ症状を有し、BUT が 5 秒以下、涙液量についてはシルマー試験 I 法(図 9)で 5mm 以上、角結膜上皮障害については van Bijsterveld system (図 10)を用いて点状表層角膜症(SPK)を 9 点満点で評価し、3 点以下のもの」とした。

健常者はドライアイ症状を有していない者とした。BUT 短縮型ドライアイ患者の除外基準は、1)ドライアイ治療薬点眼を除く何らかの点眼薬を使用している者、2)コンタクトレンズ装用者、3)過去に屈折矯正手術・緑内障手術・網膜硝子体手術を施行された者、4)12 か月以内に白内障手術を施行された者、とした。

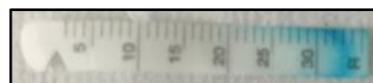


図 9 シルマー試験紙
涙液量測定に使用する試験紙。

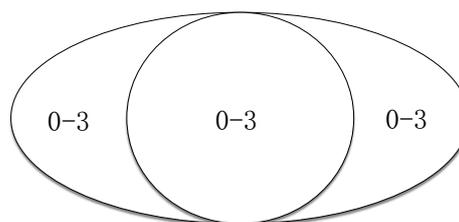


図 10 角結膜上皮障害評価
耳側結膜・角膜・鼻側結膜の上皮障害を各 0-3 点で評価した。

2. 質問票による自覚症状評価

ドライアイ症状として、異物感・眼精疲労・乾燥感・眼痛・開眼困難・早朝眼不快感・霧視の 7 項目について自己記入式の質問票を用いて、その頻度を 5 段階で評価した(図 11)。この質問票は、ドライアイの自覚症状評価において国内で最もよく用いられている Dry Eye-related Quality

of life Score(DEQS)を外来でも簡便に施行できるように簡略化したものである(Sakane et al., 2013)。頻度については、0:症状が全くない、1:ほとんどない、2:時々ある、3:頻繁にある、4:常にある、と評価を行い、7項目の点数の合計を自覚症状合計点として解析に用いた。

	0 全くない	1 ほとんどない	2 時々ある	3 ひんぱんにある	4 常にある
例	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
目がゴロゴロする (異物感)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
目が疲れる (疲労感)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
目が乾いた感じがする (乾燥感)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
目が痛い (眼痛)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
朝、目が開けにくい	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
朝、ものが見づらい (朝の目の違和感)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ものがかすんで見える (霧視)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

図 11 自覚症状質問票
上記の質問票を自己記入してもらい、自覚症状を調査した。

3. 眼表面の他覚的評価

涙液および角結膜上皮をフルオレセインで染色し、SPK、BUT を計測した。耳側および鼻側の結膜と角膜をそれぞれ3点ずつ、計9点で角結膜上皮障害を評価した(図8)。涙液層の安定性は、開眼後に角膜上の涙液層が破綻するまでの時間、すなわち BUT を用いて評価した。全ての対象者に対して、SPK と BUT を測定した 10 分後に、角膜知覚および痛覚を測定した。さらに、10 分後にシルマー試験 I 法を施行し涙液量を測定した。これらを BUT 短縮型ドライアイ全例で施行した。健常者では SPK を 46 例全例で測定し、BUT とシルマー試験 I 法については 46 例中 24 例で測定をおこなった。

4. 角膜知覚・痛覚測定

角膜知覚は、細隙灯顕微鏡観察下で Cochet-Bonnet 角膜知覚計(Luneau Ophthalmologie, Chartres, France)を用いて測定した(Cochet and Bonnet, 1961)。直径 0.12mm、長さ 60 mm のナイロンモノフィラメントを使用した。まず、角膜知覚については従来通りの方法でナイロンモノフィラメントを被検者の角膜中央に垂直にゆっくりと接触させた後に、モノフィラメント長を 60mm から 10 mm ずつ短くしていくことで徐々に接触時の刺激を増強させ、被験者がフィラメントの接触を知覚し

た最も長い時点を角膜知覚とした。

一方、角膜痛覚については、角膜知覚の測定後に痛みを感じなければさらにフィラメントを 10 mm ずつ短くし、痛みを感じた場合は 5 mm 長くして再度測定を行い、痛みを感じた最も長いフィラメント長を角膜痛覚と定義した。また、健常者における角膜痛覚の 95 パーセンタイルである 40 mm 以上を角膜痛覚過敏の状態であると定義した。

5. 統計解析

結果は平均値±標準偏差で示した。各群内で Shapiro-Wilk の正規性検定をおこなった。各群間の比較には正規性が仮定できる場合には、Independent t test を用い、正規性の仮定が棄却される場合には Mann-Whitney test にて解析をおこなった。角膜知覚・痛覚の解析には Mann-Whitney test を用いた。角膜知覚・痛覚とドライアイ症状および他覚所見との相関解析には Spearman の順位相関係数を用いた。p 値が 0.05 未満を呈した場合に統計学的に有意差があると評価した。

結果

1. 被験者の他覚所見および自覚症状

BUT 短縮型ドライアイ患者の他覚所見の平均値は、BUT が 3.1 ± 1.9 秒、SPK が 0.8 ± 1.1 、シルマー試験 I 法が 11.1 ± 8.9 mm であった(表 2)。SPK とシルマー試験 I 法については、日本、ヨーロッパ、アメリカのドライアイ診断ガイドラインで正常範囲内だった(Baudouin et al., 2014; Tsubota et al., 2017; Wolffsohn et al., 2017)。また、患者群では健常群と比較して BUT は有意に短縮していたが、SPK とシルマー試験 I 法については有意差がなかった(表 2)。BUT 短縮型ドライアイ患者の自覚症状は表 3 に示す結果であった。

他覚所見	sBUT	健常者	p 値
SPK score	0.8 ± 1.1	0.5 ± 1.0	0.12
BUT (s)	3.1 ± 1.9	6.3 ± 2.5	0.01 >
Schirmer (mm)	11.1 ± 8.9	13.0 ± 7.8	0.49

表 2 sBUT の他覚所見

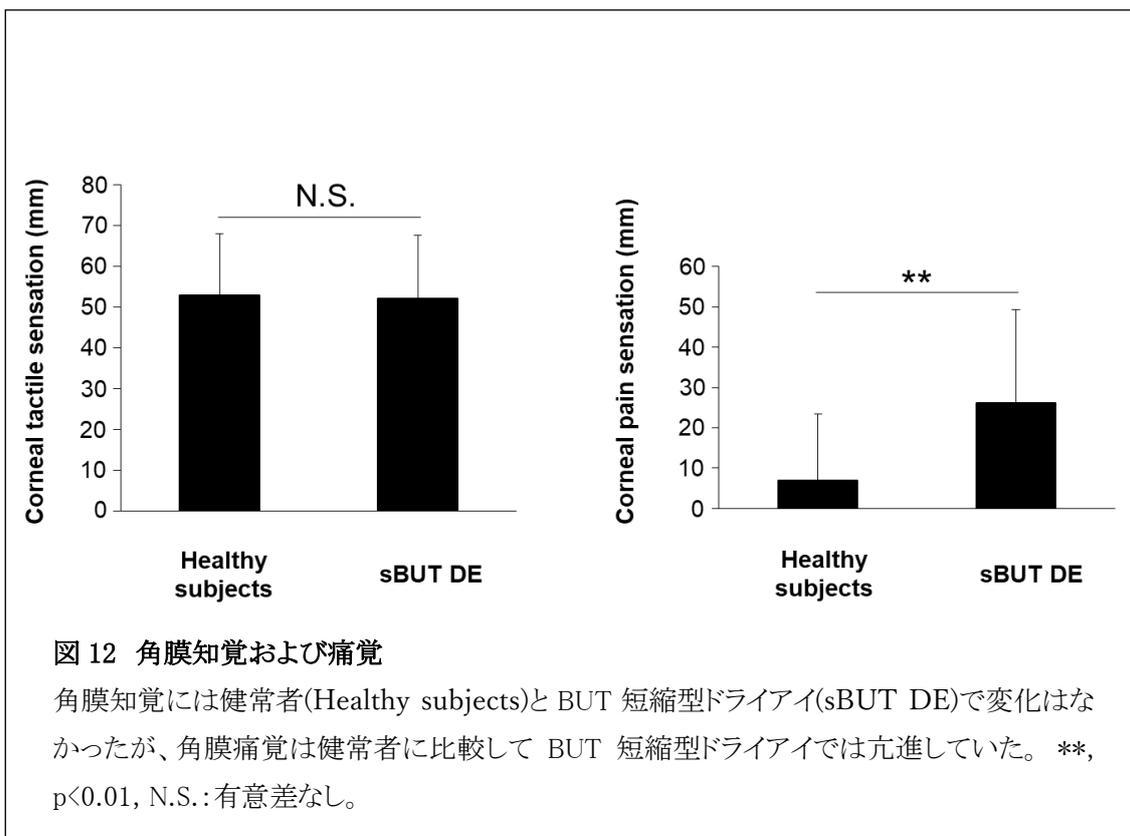
自覚症状	平均値 ± SD
異物感	1.8 ± 1.3
疲れ	2.5 ± 1.3
乾き	2.4 ± 1.3
痛み	1.9 ± 1.3
開けづらさ	1.1 ± 1.2
早朝不快感	1.1 ± 1.3
見えづらさ	1.7 ± 1.4
合計	12.5 ± 5.8

表 3 sBUT の自覚症状

2. 角膜知覚・痛覚

BUT 短縮型ドライアイ患者の角膜知覚および痛覚の定量をおこなった。BUT 短縮型ドライアイにおける角膜知覚は(52.0 ± 15.5 mm, n=60)、健常者における角膜知覚(52.9 ± 14.9 mm, n=46, p=0.60)と有意差は認められなかった。一方で、角膜痛覚については、BUT 短縮型ドライアイにおいて(26.3 ± 23.1 mm, n=60)、健常者(6.9 ± 16.4 mm, n=46, p<0.01, 図 12)と比較して有意に鋭敏であった。このことは、BUT 短縮型ドライアイでは健常者と比較して角膜知覚は同程度だが、角

膜痛覚は亢進していることを意味していた。



3. 角膜痛覚とドライアイの自覚症状

BUT 短縮型ドライアイ患者における病態に角膜痛覚が関与しているかを調べるために、BUT 短縮型ドライアイ患者の自覚症状と角膜痛覚に相関があるかどうかを検討した。痛みの自覚症状と角膜痛覚には弱い正の相関が認められた($R=0.24$, $p < 0.05$, 表 2 および図 13)。しかし、痛みの自覚症状と角膜痛覚以外の他覚所見 (SPK、BUT、シルマー試験 I 法、角膜知覚)の間には有意な相関は認められなかった。また、痛み以外の自覚症状 6 項目と角膜痛覚の間にも有意な相関はなかった(表 4)。さらに、自覚症状合計点と他覚所見の間にも有意な相関はなかった(表 5)。

健常者における角膜痛覚の平均値は、 6.9 ± 16.4 mm であった。その値を用いて、健常者の角膜痛覚の 95 パーセンタイル値以上の角膜痛覚を有する BUT 短縮型ドライアイ患者を角膜痛覚過敏群と定義した。この基準では BUT 短縮型ドライアイ患者 60 人中 22 人が角膜痛覚過敏群に属し、この群では痛みの自覚症状と角膜痛覚が強い正の相関を示した($R=0.79$, $p < 0.01$, $n=22$, 図 14)。さらに、角膜痛覚過敏群では、自覚症状合計点と角膜痛覚の値にも有意な相関が認められた($R=0.52$, $p < 0.05$, $n=22$, 図 15)。

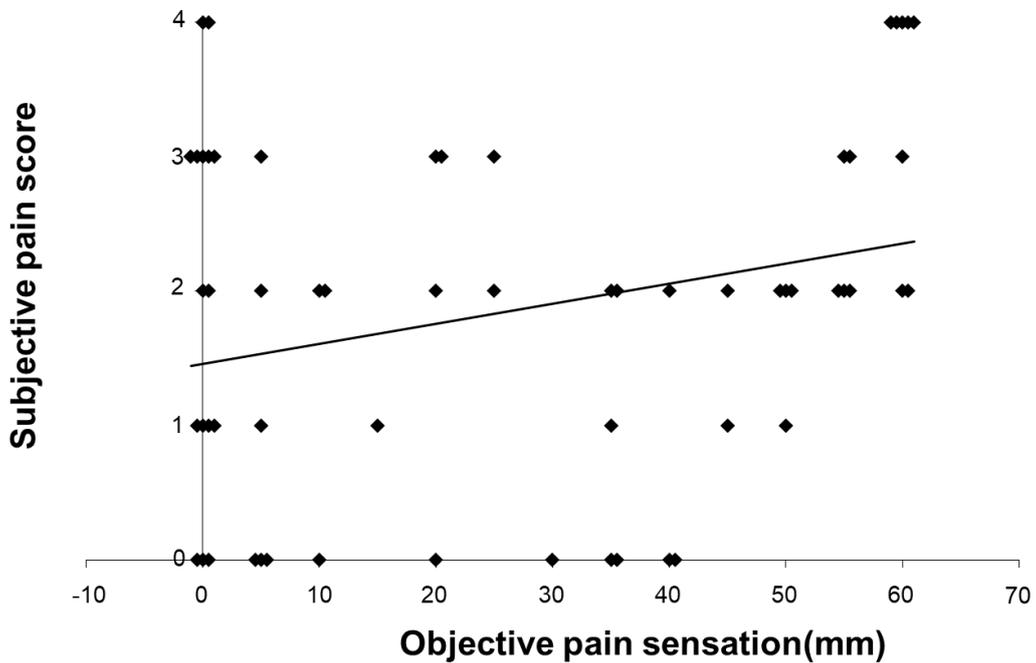


図 13 角膜痛覚と痛みの自覚症状

角膜痛覚と痛みの自覚症状には弱い正の相関が認められた。

自覚症状								
	異物感	疲れ	乾き	痛み	開けづらさ	早朝不快感	見えづらさ	合計
知覚	0.07	-0.08	0.17	0.01	-0.08	-0.01	0.14	0.05
痛覚	0.07	0.02	0.07	0.24*	0.08	0.20	0.19	0.15

他覚所見			
	SPK	BUT	Schirmer
知覚	0.13	0.00	-0.08
痛覚	0.09	-0.10	0.16

表 4 他覚所見および自覚症状と角膜知覚・痛覚(全体 n=60)

痛みの自覚症状と角膜痛覚のみに弱い正の相関が認められた。*, $p < 0.05$ 。

自覚症状								
	異物感	疲れ	乾き	痛み	開けづらさ	早朝不快感	見えづらさ	合計
知覚	-0.15	-0.14	0.08	-0.24	-0.10	-0.13	-0.39	-0.30
痛覚	0.23	0.29	0.39	0.79*	0.17	0.37	0.39	0.52*

他覚所見			
	SPK	BUT	Schirmer
知覚	0.32	-0.12	0.11
痛覚	0.08	0.30	0.20

表 5 他覚所見および自覚症状と角膜知覚・痛覚(角膜痛覚過敏 n=24)
痛みおよび自覚症状の合計点と角膜痛覚のみに有意な正の相関が認められた。
**, p<0.01。

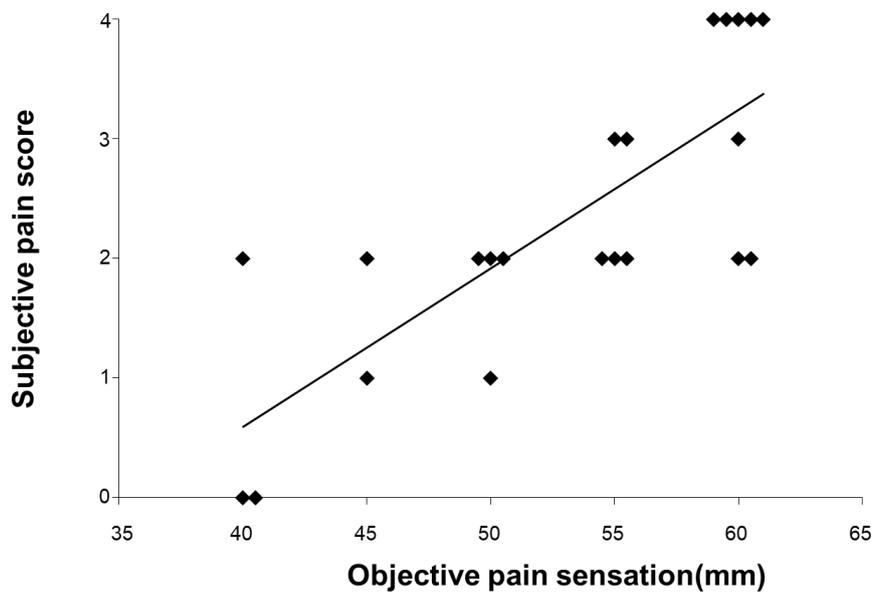


図 14 角膜痛覚過敏を有する BUT 短縮型ドライアイ患者における角膜痛覚と痛みの自覚症状

角膜痛覚過敏を有する症例では、角膜痛覚と痛みの自覚症状に有意な正の相関が認められた。

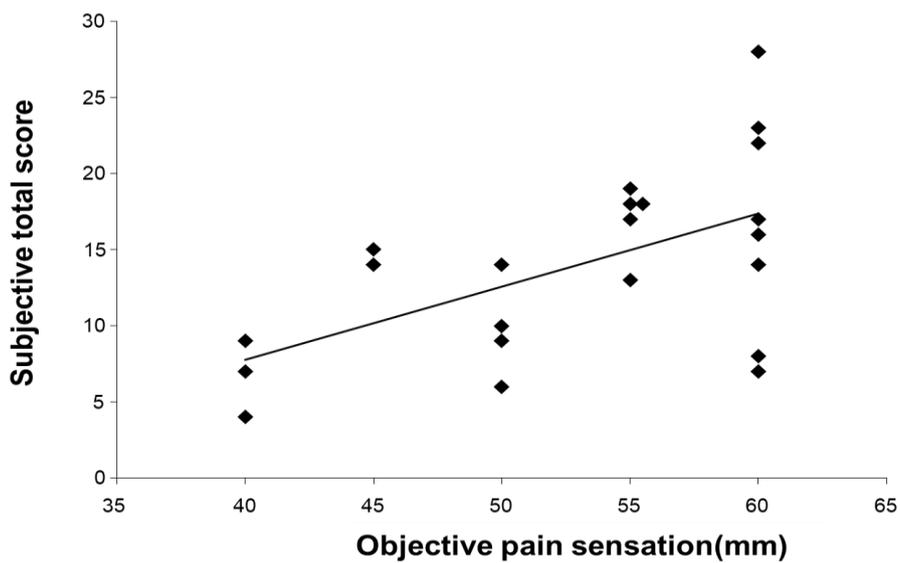


図 15 角膜痛覚過敏を有する BUT 短縮型ドライアイ患者における角膜痛覚と自覚症状

角膜痛覚過敏を有する症例では、角膜痛覚と自覚症状の合計点に有意な正の相関が認められた。

考察

本検討において、BUT 短縮型ドライアイ患者は健常者と比較して角膜知覚はほぼ変わらないにも関わらず、角膜痛覚については有意に亢進していることが示された。また、BUT 短縮型ドライアイ患者の角膜痛覚と痛みの自覚症状には弱い正の相関が認められた。さらに、角膜痛覚過敏を有する BUT 短縮型ドライアイ患者に限定すると、角膜痛覚と痛みの自覚症状は強く相関していた。これらの結果は、BUT 短縮型ドライアイ患者における角膜痛覚の亢進を示していると考えられる。痛覚過敏は、通常の痛み刺激に対しても強く痛みを感じてしまうことと定義されるが (Moalem and Tracey, 2006)、角膜痛覚過敏が BUT 短縮型ドライアイ患者の自覚症状と関連していることが本研究から示された。

本検討で対象とした BUT 短縮型ドライアイ患者は、上皮障害や涙液量においては健常者と比較して有意な変化は認められず、眼表面の他覚所見は軽微であったと言えるが、自覚症状としては様々なドライアイ症状を有していた。このように軽微な他覚所見からは説明困難な強い自覚症状を呈しているという状態は、その支配領域の神経に何らかの感受性変化が生じていることを意味する。整形外科領域における代表的な慢性疼痛である慢性腰痛でも、近年これに類似した現象が注目されている。腰椎 MRI などの他覚的な画像検査からは明らかな異常が検出されないにも関わらず、慢性的に持続する腰痛を訴える患者が 8 割を超えるとも指摘されており、その多くに支配領域神経の感受性変化が関わるとされている。この腰痛に関する知見は、BUT 短縮型ドライアイ患者においてもその支配神経である角膜神経の感受性変化が生じている可能性を推測させるものである。

知覚神経のその支配領域における感受性変化を評価する方法として、実臨床では機械的刺激の閾値を測定するのが一般的である。Cochet-Bonnet 角膜知覚計は 1960 年代に Cochet と Bonnet が開発して以来、角膜知覚を臨床的に評価できる方法として広く用いられてきた (Cochet and Bonnet, 1961)。この角膜知覚計を用いた検討によって、涙液減少型ドライアイ患者では角膜知覚が低下することは以前から報告がある (Xu et al., 1996)。したがって、我々は BUT 短縮型ドライアイ患者では角膜知覚が亢進し、角膜が鋭敏になることで他覚所見からは説明困難な強いドライアイ症状を呈していると仮説をたてた。そこで、まず BUT 短縮型ドライアイ患者の角膜知覚を Cochet-Bonnet 角膜知覚計を用いて測定してみたが、非常に強い自覚症状を呈する症例であっても、健常者と比較して角膜知覚の亢進は検出できなかった。本結果からは、Cochet-Bonnet 角膜知覚計は最大長が 60mm であり、さらに微弱な刺激を与えることのできる機器がなければ BUT 短縮型ドライアイ患者における知覚亢進を検出できない可能性が考えられた。実際に、蒸発亢進型ドライアイでは必ずしも角膜知覚は低下しないことも報告されているため (Rahman et al., 2015)、妥当な推論であると考えている。しかし、角膜知覚測定時にナイロンフィラメントで触知する際に、健常者では触知したことを申請者に伝えてくれるのみであったが、BUT 短縮型ドライアイ患者では触知したことを伝える前に痛みを感じて閉瞼し、申請者に痛みを伝える者が多かった。そこで、申請者は角膜知覚の測定に加えて、被験者が痛みを感じているかを調べるため角膜痛覚を定義し、評価の一項目に加えることにした。

角膜痛覚も含めた検討結果は、BUT 短縮型ドライアイ患者では健常者と比較して角膜知覚は保たれるが、角膜痛覚は亢進しているというものであった。角膜痛覚を検討に加えることによって、健常者と BUT 短縮型ドライアイ患者の角膜神経の感受性には差異があることが示され、当初の仮説を支持する結果が得られた。しかし、角膜痛覚と自覚症状の相関を検討したところ、痛みの自覚症状と弱い相関が得られるのみであり、自覚症状を説明する因子としては角膜痛覚の値だけでは不十分であると考えられた。眼表面には機械的刺激のみならず、涙液の蒸発のため気化熱が奪われることによる温度低下や涙液浸透圧上昇などの刺激があり、これらは乾燥感として知覚されることが既に知られている。そのため、自覚症状を説明するには機械的刺激に対する感受性変化のみならず、その他の侵害刺激による感受性変化の検討も必要だと考えられた。

次に、機械的刺激に対する感受性が亢進している BUT 短縮型ドライアイでは、角膜痛覚の亢進がその自覚症状を説明できる可能性があると考え、痛覚過敏を有する BUT 短縮型ドライアイに限定して角膜痛覚と自覚症状の相関を検討した。痛覚過敏とは、痛み刺激に対して通常よりも強く感じてしまうような神経学的異常であると定義される(Moalem and Tracey, 2006)。検討結果は、角膜痛覚が 40 mm以上の痛覚過敏を有する BUT 短縮型ドライアイ患者では角膜痛覚の値と痛みの自覚症状に相関が認められるというものであった。これらの結果は、BUT 短縮型ドライアイ患者の自覚症状の一部は、機械的刺激に対する角膜痛覚過敏によって説明が可能であることを示している。また、痛覚過敏は神経障害性疼痛の特徴的な兆候の一つである。神経障害性疼痛とは、体性感覚系の障害や疾病によって生じる痛みのことであるが(Moalem and Tracey, 2006)、ドライアイ患者においては角膜に神経障害性疼痛を生じている可能性が推測されており(Belmonte et al., 2015; Borsook and Rosenthal, 2011; Galor et al., 2015)、我々の結果も BUT 短縮型ドライアイ患者において神経障害性疼痛が生じていることを示唆するものと考えられた。

前述の慢性腰痛においては、支配領域の神経の感受性変化、すなわち神経障害性疼痛を契機として腰痛が慢性化していくことが想定されている。一般的には、ドライアイは眼の慢性疼痛という認識はなされていないが、器質的原因が回復した後も疼痛が 3 か月以上持続する場合は慢性疼痛と定義されるため、疼痛という視点からはドライアイも眼の慢性疼痛、すなわち慢性眼痛として捉えることができる。ドライアイ患者においても腰痛などと同様に、角膜における神経障害性疼痛が慢性化に寄与している可能性が考えられる。

本研究を解釈する上で留意点が4つ挙げられる。まず初めに、本検討における BUT 短縮型ドライアイ患者では BUT の低下はみられるが、涙液中ムチン濃度など BUT の低下につながる涙液組成を評価することができなかった。次に、本検討では機械的痛覚過敏のみを測定しており、温度感受性もしくは化学性痛覚過敏がドライアイ症状の発現に関与しているかは不明である。3 点目として、BUT 短縮型ドライアイ患者の一部には角膜神経障害性疼痛が生じていると考えられるが、角膜神経の形態学的な異常を本検討では評価できなかった。最後に、Cochet-Bonnet 角膜知覚計は 5mm 以下の痛覚閾値もしくは 60mm 以上の知覚閾値を定量することができず、過小評価もしくは過大評価となっている可能性がある。最後の点については、角膜知覚および痛覚をより正確に定量できる装置が必要であり、今後の詳細な検討が望まれる。

以上、我々は Cochet-Bonnet 角膜知覚計を用いて角膜痛覚を測定することで、ドライアイ症状の重症度と角膜痛覚過敏が相関することを示した。近年、ドライアイ患者の神経学的異常を診断・治療しようという検討が行われており(Dieckmann et al., 2017; Galor et al., 2018)、ドライアイ患者に対して鎮痛を目的にした治療法が注目を集めている(Benitez-Del-Castillo et al., 2016)。本検討で得られた知見は、ドライアイ患者に対する鎮痛治療の臨床的な根拠の一つと考える。

結論

1. BUT 短縮型ドライアイでは健常者と比較して角膜知覚には変化がなかった。
2. BUT 短縮型ドライアイでは健常者と比較して角膜痛覚が亢進していた。
3. 痛覚過敏を有する BUT 短縮型ドライアイでは痛みの自覚症状と角膜痛覚が強く相関していた。
4. 本検討から、BUT 短縮型ドライアイの自覚症状発現には角膜痛覚過敏が関連していることが示唆された。

以上の検討結果を、我々は学術誌 *Ocular Surface* に報告した(Tagawa et al., 2018)。

第2章

コレシストキニン受容体はドライアイの痛覚過敏に対する新規治療標的である

- レバミピドの作用機序解明から -

緒言

ドライアイは様々なリスク因子がある疾患であり、涙液の量・質の低下による涙液層の不安定性、角結膜上皮の親水性の低下、マイボーム腺機能障害、さらにはそれらが眼表面における涙液浸透圧の上昇、炎症などを引き起こし悪循環を生じることがその主要な発症機序と考えられてきた(Craig et al., 2017)。しかし、近年になって角膜神経の神経障害性疼痛が様々なドライアイ症状の発現に強く関与することが示され、注目を集めている(Rosenthal and Borsook, 2016)。第1章では、BUT 短縮型ドライアイ患者における角膜痛覚過敏が説明困難な自覚症状と他覚所見の乖離の原因であり、角膜に神経障害性疼痛が生じている可能性を指摘したが、第2章ではその詳細な機序についての検討をおこなった。

ドライアイに対する治療は従来水分の補充で十分であると考えられていたが、痛覚過敏の合併が疑われるような強い自覚症状を有する症例では既存治療に抵抗を示すことから、新規治療薬の登場が期待されていた。近年、胃炎・胃潰瘍の治療薬であるレバミピドの適応が拡大され、日本においてドライアイ治療薬として用いられるようになった。実際にドライアイ患者にレバミピド点眼を開始すると、眼表面の他覚所見の改善に先行して自覚症状が改善することをしばしば経験する。このドライアイに対するレバミピドの治療効果は炎症抑制や杯細胞数増加によるムチン産生などで説明されているが(Rios et al., 2008; Takeji et al., 2012; Urashima et al., 2012)、この自覚症状のみが改善する詳細なメカニズムは同剤の開発から30年以上経過した現在も不明なままである。

過去の報告からは、レバミピドが膵臓の腺房細胞においてコレシストキニン(CCK)1受容体の部分作用薬として作用し、細胞内Ca振動およびアミラーゼ分泌を引き起こすと報告されている(図16)(Moon et al., 2000; Moon et al., 2004)。CCKは生体内に広く分布する消化管ホルモンあるいは神経ペプチドであり(Van Dijk et al., 1984)、その受容体はGタンパ

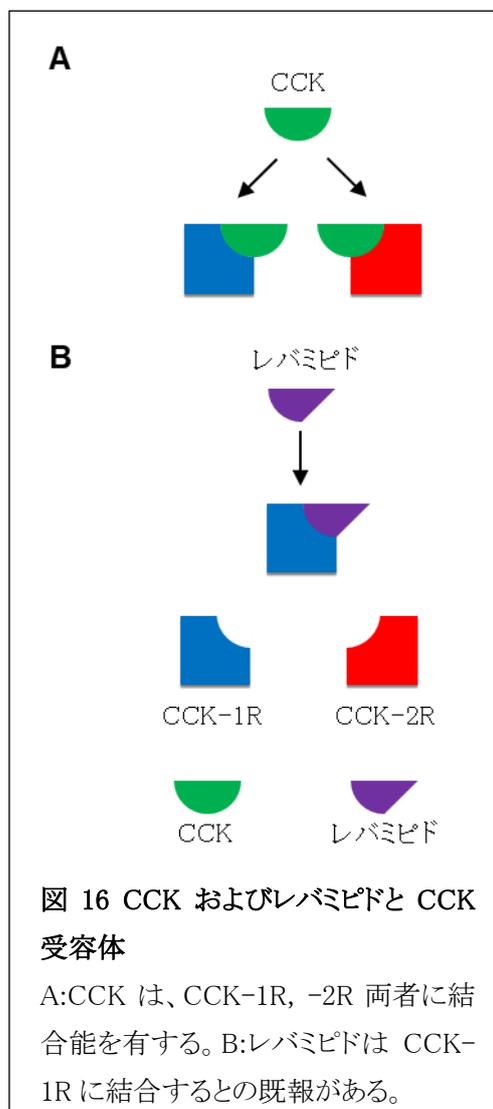


図 16 CCK およびレバミピドと CCK 受容体

A:CCK は、CCK-1R, -2R 両者に結合能を有する。B:レバミピドは CCK-1R に結合するとの既報がある。

ク質共役型受容体 (GPCR) である CCK1 受容体 (CCK-1R) および 2 受容体 (CCK-2R) である。CCK-1R は摂食、消化、体温調節などに、CCK-2R は行動や不安衝動などに関与することが知られている (Crawley and Corwin, 1994)。CCK-1R と 2R はそれぞれ異なる機能を有していると考えられているが、どちらの受容体も痛みに関与することが示されている。さらに、CCK 受容体に対する競合的拮抗薬が麻薬耐性の神経障害性疼痛を抑制することが以前から知られており、CCK とその受容体が慢性疼痛に対する新規治療標的になる可能性が指摘されている (Hanlon et al., 2011; Kim et al., 2015)。ブラジキニンやセロトニンのような痛みを増強する発痛物質の受容体の多くは GPCR である。これらの GPCR は代表的な痛みレセプターである transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) を感作することが知られており (Bhave et al., 2003)、GPCR である CCK 受容体も TRPV1 経路に関与している可能性がある。しかし、CCK が痛みに関与するという既報はあるが、TRPV1 の関与、そして CCK の痛みへの関与については十分に解明がなされていない。

本章では、ドライアイ患者と同モデル動物を用いてレバミピドの治療効果を評価し、ラット三叉神経節細胞を用いてその詳細な機序について検討した結果を記述する。

方法

1. 対象

北海道医療大学病院眼科に外来通院していた BUT 短縮型ドライアイ患者(男性 7 例、女性 14 例 計 21 例、年齢 36-87 歳、平均年齢 62.5±14.8 歳)を対象とした。対象は全て日本人であった。本研究は、北海道医療大学病院における倫理審査委員会にて承認を受け(自主臨床研究番号 #2012-007)、ヘルシンキ宣言にしたがって書面による十分な説明と同意を得た後におこなわれた。

他覚所見は軽微ではあるが、強い自覚症状を有する BUT 短縮型ドライアイ症例を対象とした。選定基準は、レバミピドを除く他のドライアイ治療薬(人口涙液、ヒアルロン酸ナトリウム、ステロイドなど)では症状の改善が不十分で、ドライアイ症状を有し、BUT が 5 秒以下、涙液量についてはシルマー試験 I 法(図 9)で 5mm 以上、角結膜上皮障害については van Bijsterveld system(van Bijsterveld, 1969)を用いて 9 点満点で評価を行い(図 10)、3 点以下のものを障害ありとした。症状が強い眼を統計解析に用いたが、左右の眼が同程度の症状を有している場合は角膜痛覚がより鋭敏な方を用いた。明らかな眼瞼痙攣、眼精疲労、半年以内に眼科手術の既往がある症例は除外した。

2. 治療

患者は 1-2 週間レバミピド点眼によって治療された(1 日 4 回、2%レバミピド点眼、大塚製薬株式会社、東京、日本)。全ての患者が一般的なドライアイ治療を受けており、効果が不十分な症例であった。

3. 自覚症状

ドライアイ症状として、異物感・眼精疲労・乾燥感・眼痛・開瞼困難・早朝眼不快感・霧視の 7 項目について、自己記入式の質問票(図 11)を用いてその頻度を 5 段階で評価した。頻度については、0-4 点(0:症状が全くない、1:ほとんどない、2:時々ある、3:頻繁にある、4:常にある)で評価し、レバミピド点眼投与前後で比較した。

4. 他覚所見

眼表面の他覚所見の指標として、SPK、BUT、シルマー試験 I 法を用いた。涙液および角結膜上皮をフルオレセインで染色し、SPK、BUT を計測した。耳側および鼻側の結膜と角膜をそれぞれ 3 点ずつ、計 9 点で角結膜上皮障害を評価した(図 10)。涙液層の安定性は、BUT を用いて評価した。全ての対象者において SPK と BUT を測定した 10 分後に、角膜知覚および痛覚を測定した。さらに、10 分後にシルマー試験 I 法を施行し涙液量を測定した。これらをレバミピド点眼投与前後に比較検討した。

5. 角膜知覚・痛覚測定

角膜知覚および角膜痛覚については、第1章で述べた手法(10-11 頁)を用いてレバミピド点眼投与前後で測定した。

6. 試薬

カプサイシン、ブラジキニン(BK)、CCK(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)、Devazepide (CCK-1R antagonist, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA)、L365260 (CCK-2R antagonist, Tocris Bioscience, Bristol, UK)は購入した。レバミピドは大塚製薬(Tokyo, Japan)より供与を受けた。H89 (PKA inhibitor, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) と Bisindolylmaleimide I (BIM I, PKC inhibitor, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)は細胞内シグナル伝達を阻害するために用いられた。

7. 動物

本実験におけるラットの扱いは「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に準拠しておこなった。また、Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)で定められたガイドラインに基づいて実施した。実験プロトコルは北海道大学動物実験倫理委員会で承認され(研究番号 #15-0093)、動物実験に伴う苦痛を最小限にして使用する動物の数をできるだけ減らすように最善の努力を図った。雌雄 Wistar ラット(clea Japan, Tokyo, Japan)を用いて、*in vitro* 実験では 2-4 週齢、動物実験では 4-6 週齢のラットを用いた。CCK-1R が遺伝的に欠損している Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF, 生後 4-6 週齢) ラット雌および OLETF のコントロールとして Long Evans Tokushima Otsuka(LETO, 生後 4-6 週齢)ラットの雌を用いた(Sankyo Labo, Tokyo, Japan)。

8. 細胞培養

二酸化炭素吸入による安楽死後にラットから三叉神経節(TG)を摘出し(図 17)、Hank's balanced salt solution にコラゲナーゼ (1mg/ml, Worthington, Lakewood, USA), DNase (0.1g/ml, Roche, Indianapolis, USA) および trypsin (1mg/ml, Worthington, USA) を溶解し、処理した。三叉神経細胞はピペッティング操作で分離後に 10%ウシ胎児血清およびペニシリン(100U/ml, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA)、ストレプトマイシン (100 μ g/ml, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA)添加 Dulbecco's Modified Eagle Medium を用いて 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、95%空気下で培養した。



図 17 ラット三叉神経節(TG)

断頭後に開頭し、頭蓋底にあるラット三叉神経節(赤丸)を摘出した。

9. Ca イメージング

分離されたラット三叉神経細胞を、poly-D-lysine (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)コーティングされたカバーガラス上で 24 時間以上培養した。三叉神経細胞は界面活性剤である 0.002% cremophor EL (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) および Ca^{2+} indicator である $10\mu\text{M}$ fura-2 acetoxymethyl ester (Dojindo, Kumamoto, Japan)を添加された灌流液(137mM NaCl, 5.4mM KCl, 10mM HEPES, 10mM D-glucose, 2.5mM CaCl_2 , 1.2mM MgCl_2 , NaOH で pH 7.4 に滴定)で 37°C 、30 分間静置した後に実験をおこなった。Fura-2 の蛍光強度は、蛍光強度イメージングシステム (ORCA-ER, Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan)を搭載した倒立顕微鏡(Diaphot 300, Nikon, Tokyo, Japan)を用いて測定した(図 18)。2 秒ごとに 61.1msec 間の 340nm、380nm の紫外光で前述の灌流液下にある三叉神経細胞に対して照射をおこない、340nm と 380nm の紫外光照射による蛍光シグナル強度を 500nm で検出した。

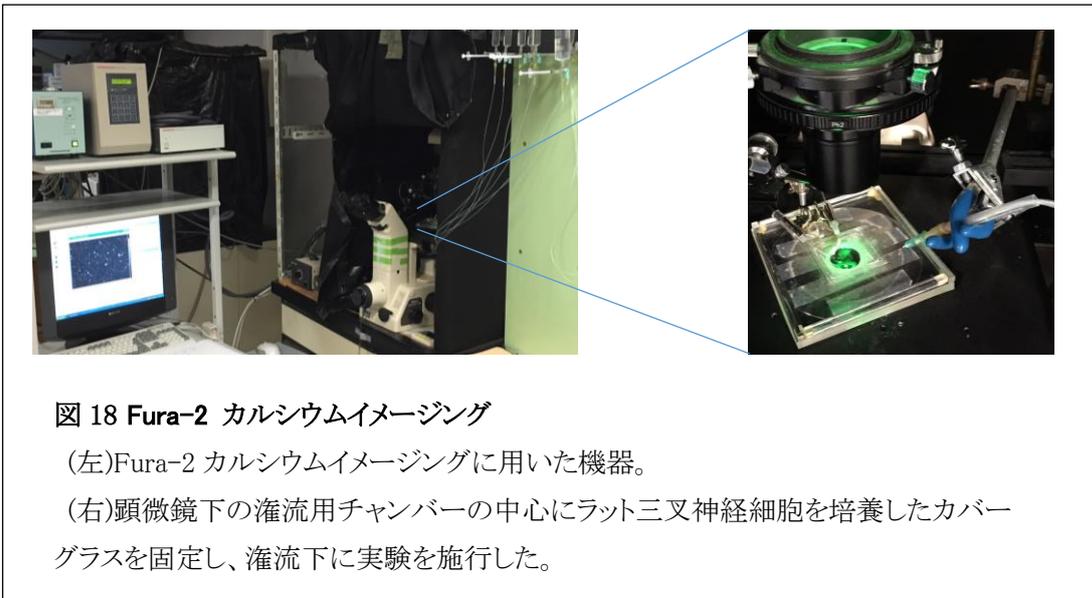


図 18 Fura-2 カルシウムイメージング

(左)Fura-2 カルシウムイメージングに用いた機器。

(右)顕微鏡下の灌流用チャンバーの中心にラット三叉神経細胞を培養したカバーガラスを固定し、灌流下の実験を施行した。

10. 結合親和性測定

ヒト CCK-1R リコンビナントタンパク質(PerkinElmer, Inc., Waltham, USA)を 50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4)に、ヒトCCK-2Rリコンビナントタンパク質(Merck Millipore, Burlington, USA)を50mM HEPES-NaOH 緩衝液(pH 7.4)にそれぞれ懸濁させ、 ^{125}I BH-CCK-8S および各種濃度のレバミピドまたは CCK-8S を混合した溶液 250 μl を作成し、 25°C で 60 分間反応させた後に GF/C ガラス繊維濾紙を用いて吸引下で急速濾過を行うことによって反応を終了させた。緩衝液で 3 回洗浄をおこなった後、濾紙の放射能活性をガンマカウンターで測定した。CCK-8S を過剰量($10\mu\text{M}$)加えたサンプルを測定することで非特異的な結合量を計算で求めた。レバミピドおよび CCK-8S を添加していないときに観察される ^{125}I BH-CCK-8S の結合量を 100%として、レバミピドおよび

CCK-8S が各濃度のときの結合率を算出した。以上の実験を独立して 2 回おこなって平均値を算出し、CCK-1R および 2R に対するレバミピドと CCK-8S の結合親和性を回帰モデルを用いた用量反応曲線から導いた(Sankaran et al., 1980)。

11. 蛍光 in situ hybridization 法

CCK-1R(nucleotides 348-1658bp; GenBank accession number, NM_009827)および2R (206-1243bp; NM_007627)のマウス cDNA フラグメントをコードする pBluescript II プラスミドベクターを用いてジゴキシゲニン(DIG)およびフルオレセインラベルされた cRNA プローブを作成した。組織切片は以前の報告にしたがってハイブリダイズさせた後に十分洗浄をおこなった(Yamasaki et al., 2010)。DIG もしくはフルオレセインを免疫組織化学的手法によって検出するために、DIG blocking solution (1% blocking reagent [Roche Diagnostics, Basel, Switzerland])を含む TNT buffer および 4% ヒツジ正常血清)に 30 分間、0.5% TSA blocking reagent (PerkinElmer) を溶解した TNT buffer に 30 分間、さらに peroxidase-conjugated anti-DIG (Roche Diagnostics; 1:1000)もしくは anti-fluorescein antibody (Roche Diagnostics; 1:1000)に 1 時間浸漬させた。二重染色をおこなうため、最初に FITC-TSA plus amplification kit (PerkinElmer, Waltham, MA)を用いて peroxidase-conjugated anti-fluorescein antibody を発色させ、残存するペルオキシダーゼを 1%過酸化水素水、30 分間で不活性化した後に、Cy3-TSA plus amplification kit (PerkinElmer)を用いて peroxidase-conjugated anti-DIG antibody を発色させた。レーザー共焦点顕微鏡を用いて蛍光画像を撮像し、mRNA の発現を評価した。

12. 抗体

抗体は、北大医学部解剖学講座 解剖発生学教室で作成されたラット TRPV1 の C 末端 20 アミノ酸残基に対するポリクローナル抗体を使用した。以下の分子に対する一次抗体を使用した：phosphor-c-Fos (Cell Signaling Technology, Danvers, USA)、fluorogold (北大医学部解剖学講座 解剖発生学教室より供与)。

13. 免疫組織化学

ラットをペントバルビタール(200mg/kg)腹腔内投与により安楽死させ、生理食塩水および 4%ホルムアルデヒド含有 0.1M リン酸緩衝液(PB; pH 7.4)による経心腔的灌流後に、さらに眼球、三叉神経節、脳(延髄)を室温で 6 時間、4%ホルムアルデヒド含有 0.1M リン酸緩衝液(PB; pH 7.4)を用いて後固定し、クライオスタットで 30 μ m 厚の凍結切片を作成するため 30%スクロース含有 0.1M PB に浸漬した。0.3% Triton X-100 含有リン酸緩衝液(PBS, pH 7.2)で 1 時間処理した後、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害するために 0.3% H₂O₂/methanol に浸漬した。10%正常ロバ血清で 20 分間ブロッキングし、一次抗体(1000 倍希釈)を一晩、Alexa 488、Cy3 もしくは Alexa 647 で標識された二次抗体(200 倍希、Invitrogen; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)で 2 時間反応させた。レーザー共焦点顕微鏡を用いて蛍光画像を撮像し、発現を評価した。

14. 角膜知覚神経の逆行性標識

ラットに対してペントバルビタール(50mg/kg)腹腔内注射による麻酔を行い、角膜上皮擦過後に逆行性トレーサーである 2%フルオロゴールド(FG) (Fluorochrome Inc., USA)を溶解した生理食塩水をガラスピペット(G-1.2; Narishige)を用いてラット角膜に点眼した。10 分間静置後に生理食塩水点眼で洗浄し、FG が十分に洗浄されているかを紫外光で確認した。5 日後、前項 13 で解説した方法で三叉神経節の凍結切片を作成し、紫外線で励起される FG 標識された角膜神経由来の三叉神経を同定した(図 19)。FISH と免疫組織化学による二重あるいは三重染色の際には FG の免疫組織化学による検出前に FISH が行われるが、FISH により FG の蛍光が消失するため本検討では FG トレーサーはウサギ抗 FG 抗体(1000 倍希釈)および Cy3-labeled anti-rabbit secondary antibody を用いて免疫組織化学によって検出した。

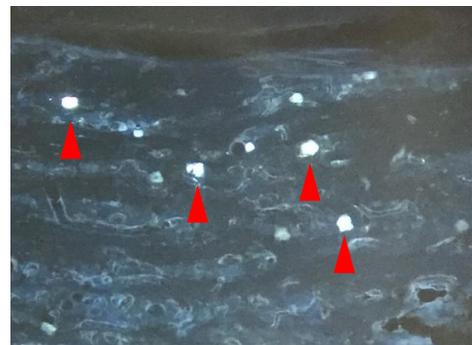


図19 フルオロゴールドで逆行性標識された三叉神経細胞

ラット三叉神経節において、紫外線励起によってフルオロゴールドで逆行性標識された、角膜へ投射するラット三叉神経細胞(赤矢頭)が観察された。

15. 涙腺摘出および点眼処置

雌の個体がドライアイ症状に対して鋭敏であると報告されているため(Nakamachi et al., 2016)、雌の LETO および OLETF ラットを用いた。ラットに対してペントバルビタール(50 mg/kg)腹腔内注射による麻酔をおこない、右耳介下方を 15mm 横方向に切開し、眼窩外涙腺(ELG)を摘出した(図 20)。角膜上皮障害および涙液分泌を涙腺摘出前および 10 日後に評価した。レバミピド点眼(2%, Otsuka Pharmaceutical Co, Tokyo, Japan)30 μ l、あるいは生理食塩水点眼 30 μ l を 1 日 2 回、10 日間毎日右眼(ELG 摘出側)に点眼した。



図 20 ラット眼窩外涙腺の摘出手法
麻酔下のラットの右耳介下方を切開し、眼窩外涙腺(黒点線)を摘出した。

16. 角膜上皮障害の評価

角膜のフルオレセイン染色は、0.5%フルオレセインナトリウム溶液 2 μ l の点眼後にコバルトブルー光を用いて細隙灯顕微鏡で評価した。フルオレセインが過剰な場合は涙液三角の端から吸収

して適切な量に調整した。角膜上皮障害は、角膜を上方、中央、下方の 3 部位に分割し、それぞれ 0-3 点で評価した。フルオレセイン染色スコアは3つの部位のスコアの合計点 0-9 点満点で評価した (Ohguchi et al., 2013) (図 21)。

17. 綿糸法

フェノールレッド含有の綿糸 (Zone-Quick; Menicon Co. Ltd, Nagoya, Japan)を用いた綿糸法によって涙液分泌能を測定した。涙液分泌に影響する自律神経系の反射を抑制するためにペントバルビタール(50mg/kg)腹腔内注射により麻酔を施行し、下眼瞼に綿糸先端を 30 秒間留置、涙液吸収によって変色した長さを mm 単位で測定することによって涙液基礎分泌能を評価した (図 22)。

18. 点眼試験

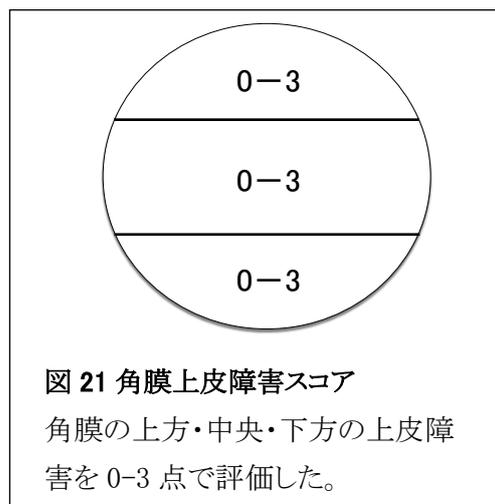
LETOもしくはOLETFラットの眼表面に、TRPV1 アゴニストであるカプサイシン(10^{-4} M)を点眼し、痛みに対する過敏性を評価するために、カプサイシン点眼後 1 分間で前肢および後肢で目を拭った回数を計測した。カプサイシン点眼の 10 および 20 分前に、2%レバミピド点眼、CCK-2R antagonist である L-365260 (10^{-4} M)点眼、生理食塩水点眼のいずれかを前投与した。

19. リン酸化 c-Fos 陽性細胞の測定

門周囲 2mm 以内にある三叉神経脊髄路核中間/尾側亜核を同定し、ソフトウェア MetaMorph (Molecular Devices)により、リン酸化 c-Fos 陽性細胞の数を定量した。

20. 統計解析

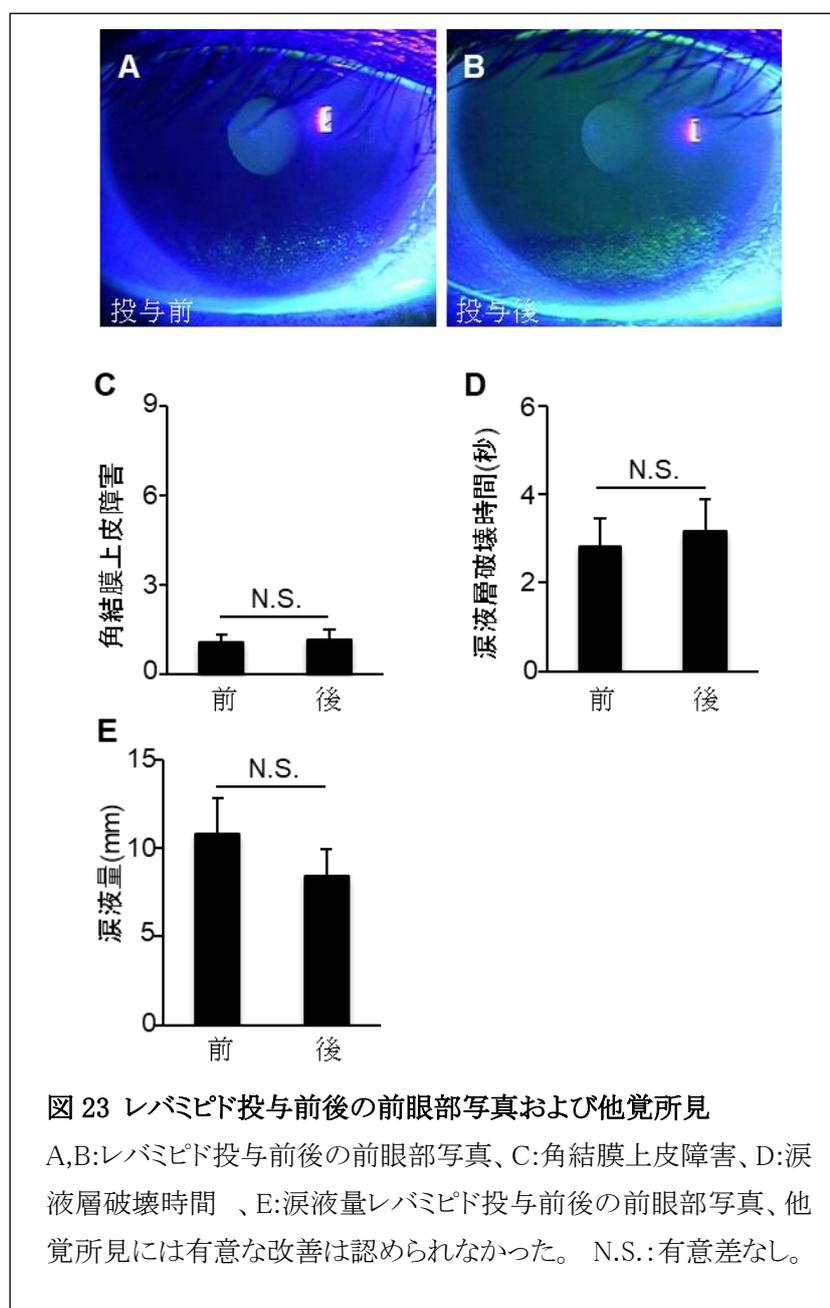
結果は平均値±標準誤差で示した。また各群間の比較検討は Student's t-test を用いて解析し、p 値が 0.05 を下回った場合に統計学的に有意差ありとした。



結果

1. レバミピド点眼は角膜痛覚と自覚症状を改善する

BUT 短縮型ドライアイ患者にレバミピド点眼薬を使用した際に他覚所見に先行して自覚症状が改善する機序を検討するために、BUT 短縮型ドライアイ患者 21 例の他覚所見、自覚症状と角膜知覚・痛覚をレバミピド点眼前後に評価した。レバミピド点眼は、眼表面の他覚所見である SPK、BUT、シルマー値については改善しなかったが(図 23)、眼の疲れ、乾燥、痛み、開眼困難の自覚症状を有意に改善した($n=21$, $*p<0.05$ $**p<0.01$, 図 24)。また、レバミピド点眼は角膜知覚を改善しなかったが、角膜痛覚を改善した($n=21$, $**p<0.01$, 図 24)。



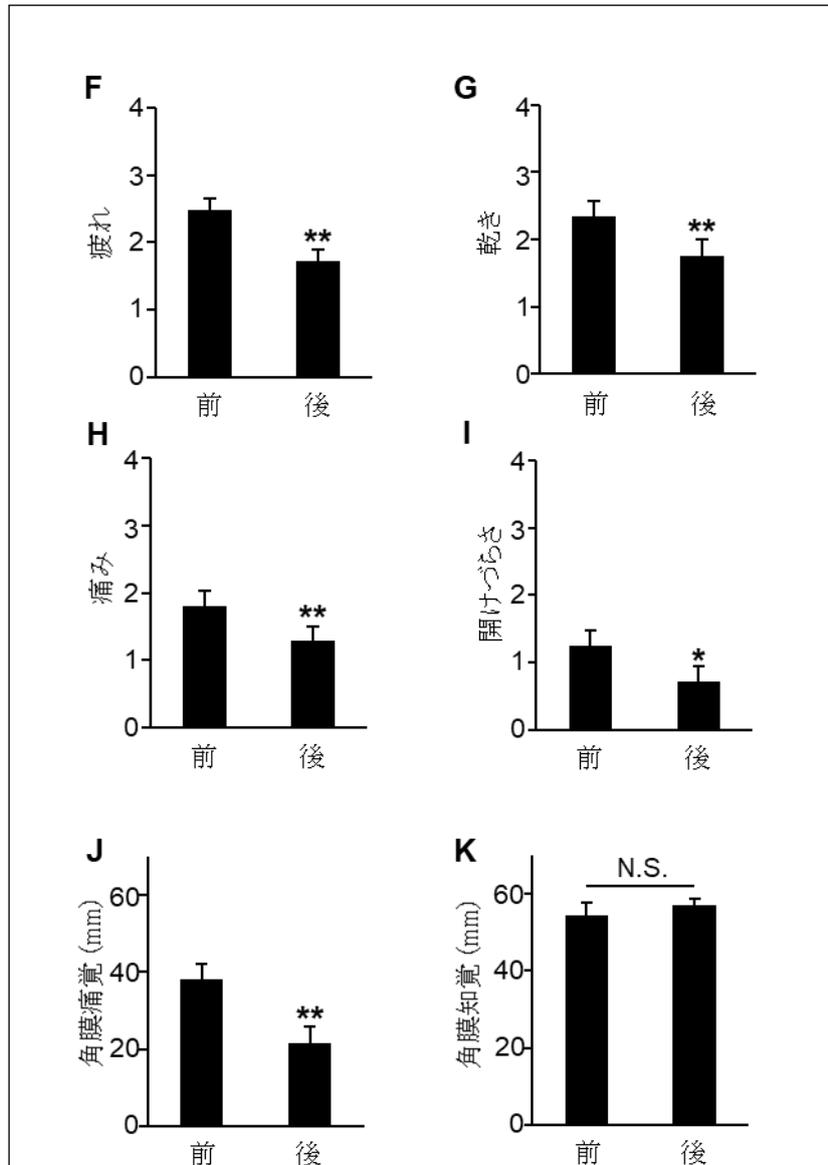


図 24 レバミピド投与前後の自覚症状および角膜知覚・痛覚

F-I: レバミピド投与前後の自覚症状(F: 疲れ G: 乾き H: 痛み I: 開けづらさ)、J-K: レバミピド投与前後の J: 角膜痛覚および K: 角膜知覚。レバミピド投与前後の自覚症状の平均値は、疲れ、乾き、痛み、開けづらさで有意な改善が認められた。また、角膜痛覚は有意に改善していたが、角膜知覚には変化が認められなかった。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ 。N.S.: 有意差なし。

2. レバミピドは三叉神経細胞においてコレシストキニンの反応を抑制する

レバミピド点眼が角膜の痛みを緩和するという前項の結果(図 24)は、同化合物が角膜知覚神経にその作用点を有することを示唆していた。過去に、レバミピドは腭液分泌における CCK 経路に作用することが報告されている(Moon et al., 2000)。CCK は 8 個のアミノ酸から構成される神経ペプチドであり、三叉神経節細胞に発現する痛覚増強作用を有する分子として知られている(Broberger et al., 2001; Idanpaan-Heikkila et al., 1997)。また、その受容体は 7 回膜貫通型 GPCR であり、三叉神経節細胞における発現が確認されている。本研究では、CCK が三叉神経に作用するかどうかを検証するため、ラット培養三叉神経細胞を CCK で刺激した。CCK (1-100nM) は三叉神経細胞に対して濃度依存的に細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こした(n=50, *p<0.05, 図 25)。本検討では、CCK による細胞内カルシウム濃度上昇は灌流液からカルシウムを除去しても 80%以上の細胞において抑制されなかったことから、同反応は細胞内カルシウムストア由来のカルシウム動員と考えられた。

次に、CCK に対するレバミピドの関与を調べるためにラット三叉神経細胞に CCK とレバミピドを同時に投与したところ、CCK(100nM)による細胞内カルシウム濃度上昇はレバミピド(300 μ M)によって有意に抑制された(図 26)。さらに、レバミピド(3-300 μ M)は濃度依存的に CCK(100nM)による細胞内カルシウム濃度上昇を抑制した(n=41-43, *p<0.05, **p<0.01, 図 26)。

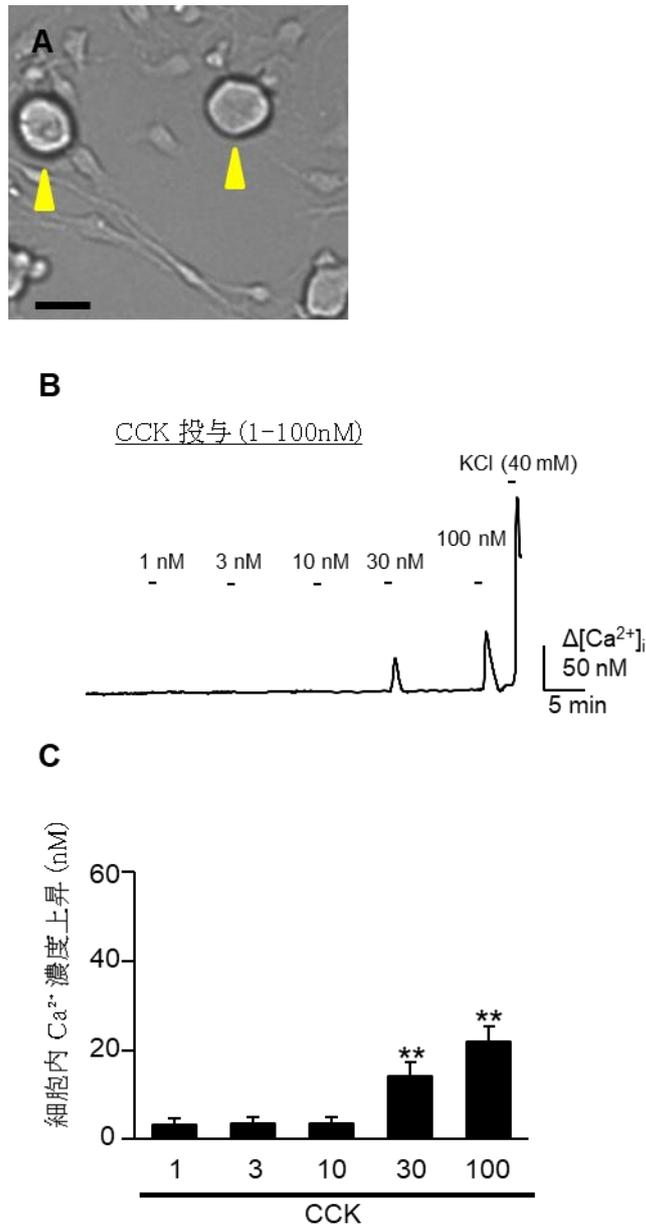
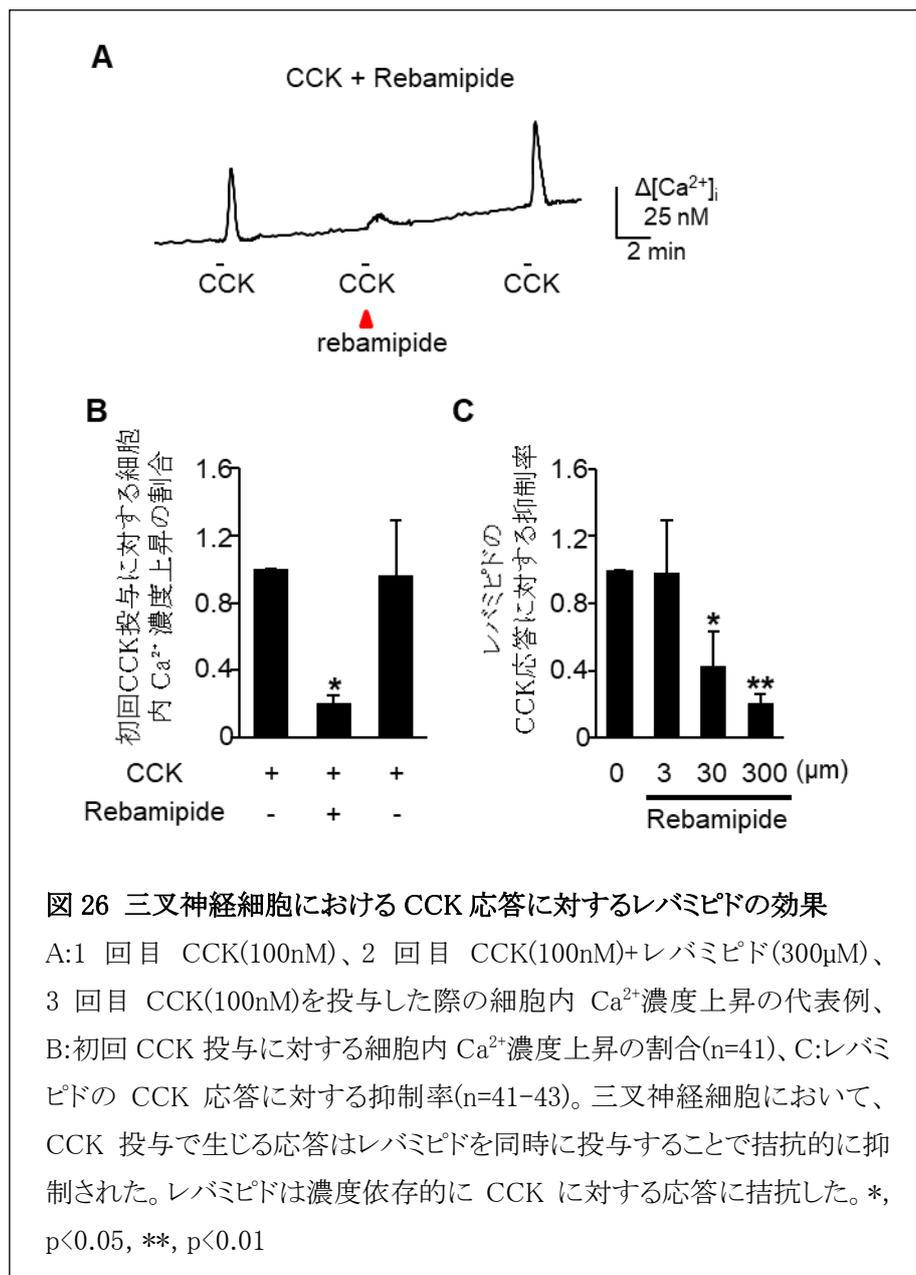
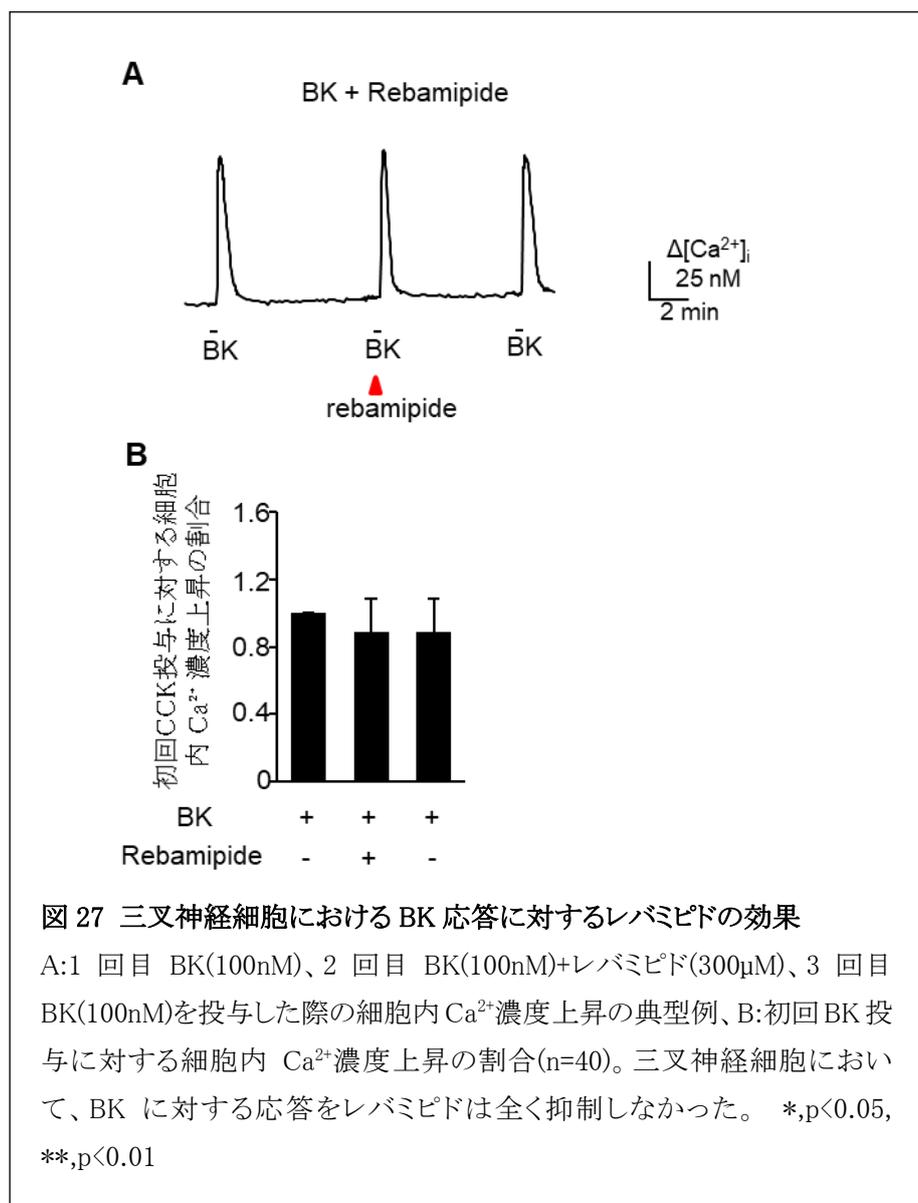


図 25 三叉神経細胞および三叉神経細胞における CCK に対する応答

A: 三叉神経細胞の顕微鏡像 Bar=20 μ m、B,C: CCK 投与(1-100nM)に対する三叉神経細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の B:典型例 C:平均値のグラフ(n=50)。三叉神経細胞において、CCK 投与に対して濃度依存的に、細胞内カルシウム濃度上昇がみとめられた。*, $p < 0.05$ 。



さらに、レバミピドの特異性を検討するために三叉神経細胞におけるブラジキニン(BK)誘導性細胞内カルシウム濃度上昇をレバミピドが抑制できるかどうかを検討した。BK は最も強い内因性痛覚増強物質であり(Tang et al., 2004)、ラット三叉神経細胞の細胞内カルシウム濃度上昇を引き起こすことが知られているが(Kawaguchi et al., 2015)、レバミピドは BK による細胞内カルシウム濃度上昇を抑制しなかった(n=40, 図 27)。さらに、レバミピドは 40mM KClによる細胞内カルシウム濃度上昇も抑制しなかった。これらの結果は、レバミピドが三叉神経細胞において CCK の反応を特異的に抑制することを示していた。



3. レバミピドはラット三叉神経細胞において CCK による TRPV1 の感作を抑制する

レバミピド点眼がドライアイ患者の痛覚過敏を緩和するという臨床的検討結果(図 24)から、申請者は痛みレセプターTRPV1 に着目した。レバミピドは CCK の反応を抑制するため、CCK と TRPV1 の関係を調べる目的で TRPV1 アゴニストであるカプサイシンを三叉神経に 2 回繰り返し投与した後に、2 回目のカプサイシン投与前に CCK を投与して 1 回目と 2 回目のカプサイシンによる反応に違いが生じるかを調べた。結果として、カプサイシンの 1 回目の投与と比べて、2 回目のカプサイシンに対する細胞内カルシウム濃度上昇は CCK によって有意に増強されていた(n=83, *p<0.05, 図 28)。一方、レバミピド(1mM)の存在下では、CCK のカプサイシンによる反応への増強作用は観察されなかった。また、レバミピド単独ではカプサイシンに対する応答には影響を与えなかった。これらのデータから、CCK は TRPV1 の活性を増強させ、レバミピドはその増

強作用を抑制することが示された。

次に、CCK が TRPV1 を感作するメカニズムを明らかにするため、PKC 阻害薬である BIM I(1 μ M)を投与したところ、CCK のカプサイシンによる反応への増強作用は消失した(n=41, 図 29)。これらのデータは、TRPV1 は PKC 経路を介して CCK によって感作され、その感作はレバミピドによって阻害されることを示していた。

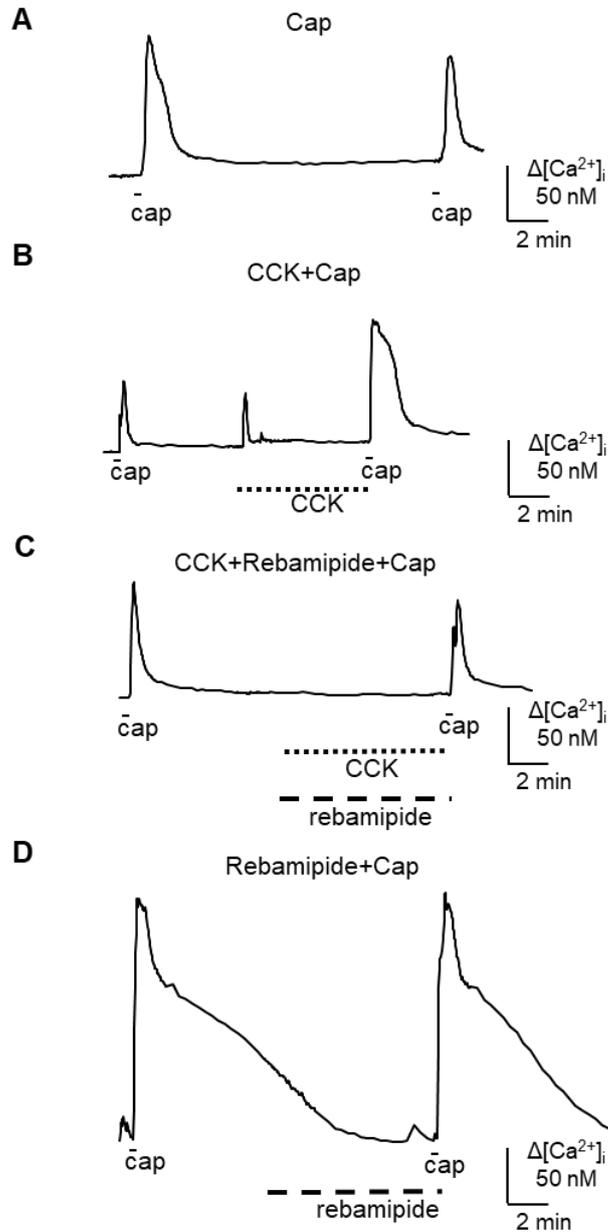
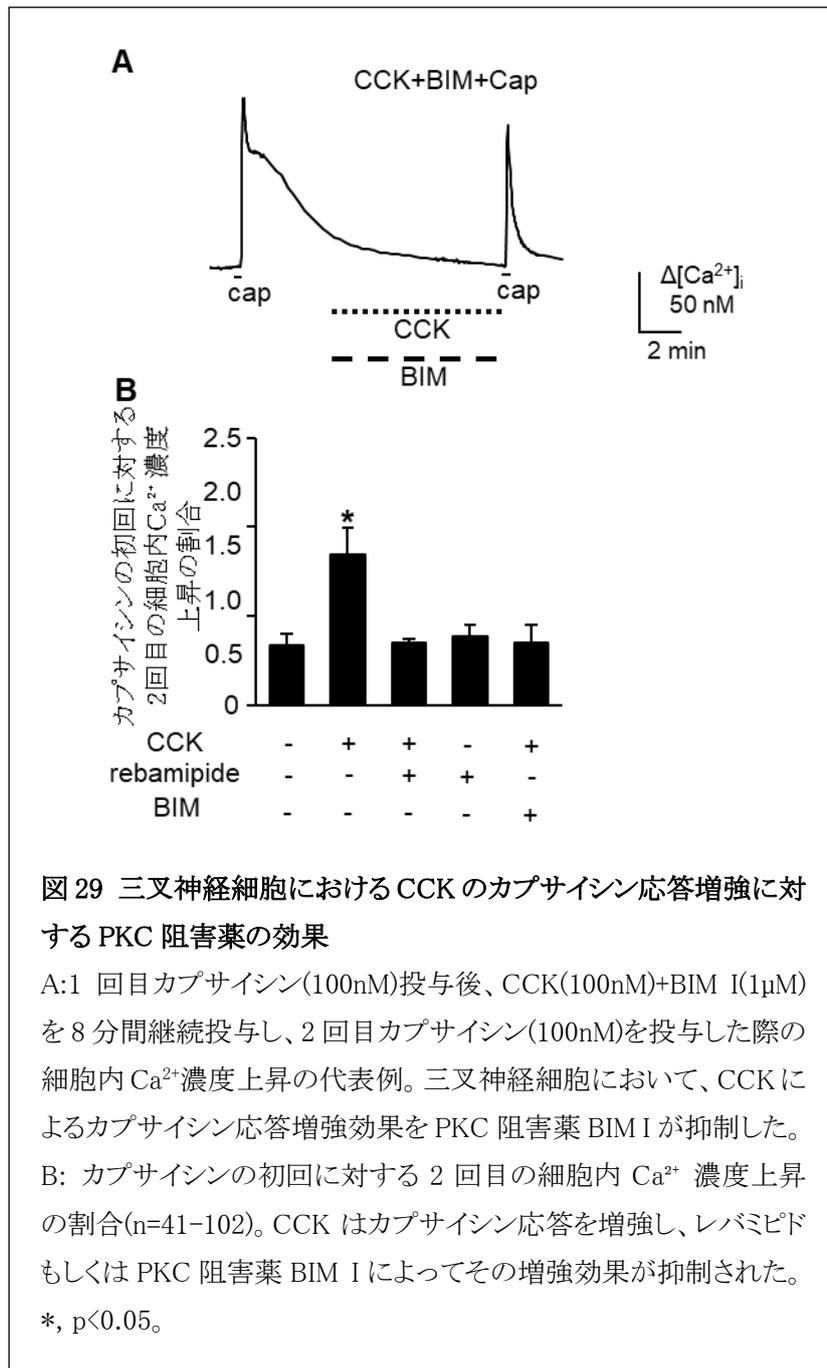


図 28 三叉神経細胞におけるカプサイシン応答に対する CCK およびレバミピドの効果

A-D:1 回目カプサイシン(100nM)投与後、B:CCK(100nM) C:CCK(100nM)+レバミピド(300 μ M) D:レバミピド(300 μ M)をそれぞれ 8 分間継続投与し、2 回目カプサイシン(100nM)を投与した際の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の代表例。三叉神経細胞において、カプサイシンに対する応答を CCK は増強するが、レバミピドはそれを抑制した。また、レバミピド単独ではカプサイシン応答に影響を与えなかった。



4. ラット三叉神経細胞には CCK-1R, -2R, TRPV1 が発現している

CCK 受容体と TRPV1 の発現を確認するため、ラット三叉神経に対して FISH および免疫組織化学をおこなった。CCK-1R および-2R の mRNA は TRPV1 陽性三叉神経細胞に発現していた(図 30)。

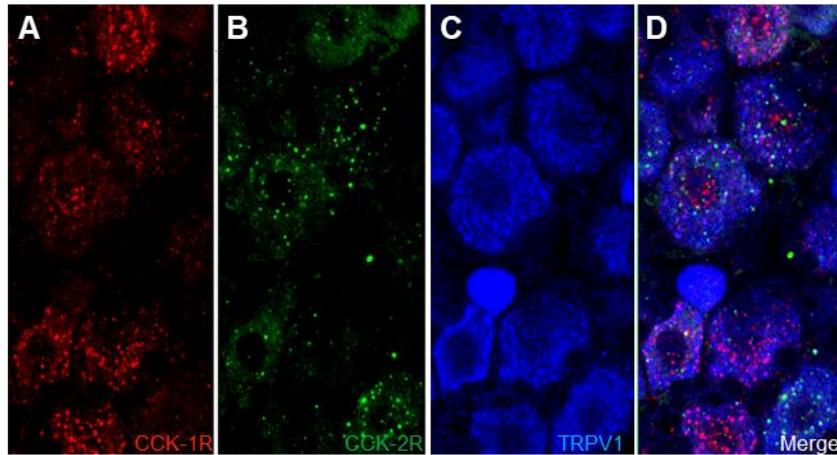
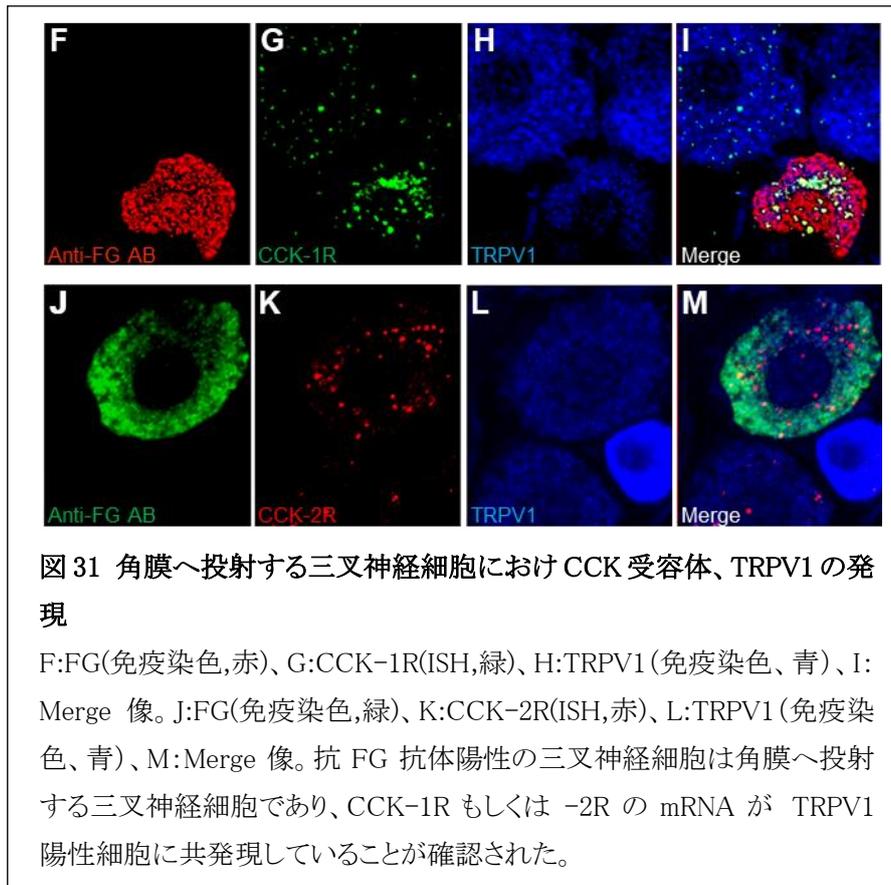


図 30 三叉神経細胞における CCK 受容体、TRPV1 の発現

A:CCK-1R(ISH,赤)、B:CCK-2R(ISH,緑)、C:TRPV1 (免疫染色、青)、
D:Merge 像。三叉神経細胞において、CCK-1R, -2R mRNA が TRPV1
陽性細胞に共発現していることが確認された。

角膜に投射する三叉神経を同定するために、逆行性トレーサーである FG をラット角膜から投与し、FG 標識された三叉神経細胞に CCK-1R および-2R、TRPV1 が発現することを確認した(図 31)。これらの結果は、角膜へ投射する TRPV1 陽性三叉神経細胞には CCK-1R および-2R が発現していることを示していた。



5. CCK-2R 阻害薬はラット三叉神経において CCK による細胞内カルシウム濃度上昇および TRPV1 感作を抑制する

レバミピドの作用は CCK 受容体どちらのサブタイプに由来しているのかを同定するために、CCK-1R もしくは-2R の阻害薬および CCK-1R を遺伝的に欠損している OLETF ラットを用いて実験をおこなった。OLETF ラットから採取した三叉神経節細胞では、CCK-1R 阻害薬である devazepide(1 μ M) を投与しても CCK による細胞内カルシウム濃度上昇は変化しなかった(n=32, 図 32)。一方、CCK-2R 阻害薬である L365260(10 μ M)の投与は CCK による細胞内カルシウム濃度上昇を抑制した(n=32, **p<0.01, 図 32)。

次に、CCK による TRPV1 感作作用に対する CCK 受容体阻害薬の影響を調べたところ、CCK のカプサイシン反応に対する増強作用は L365260(10 μ M)で有意に抑制されたものの、devazepide(1 μ M)では影響されなかった(n=38-43, 図 33)。これらの結果は、CCK による細胞内カルシウム濃度上昇と TRPV1 の感作には CCK-2R が関与していることを示唆していた。

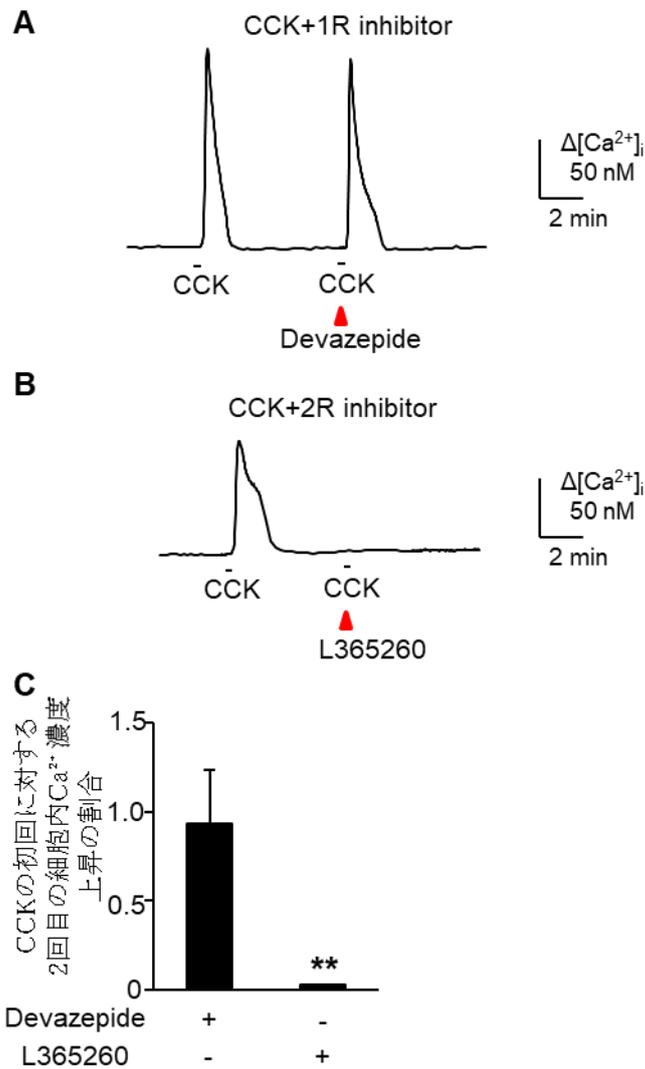


図 32 CCK 応答に対する CCK 受容体阻害薬の作用

A,B: A:1 回目 CCK(100nM)、2 回目 CCK(100nM)+CCK-1R 阻害薬 devazepide(1 μ M)を、B:1 回目 CCK(100nM)、2 回目 CCK(100nM)+CCK-2R 阻害薬 L365260(10 μ M)を投与した際の細胞内 Ca²⁺濃度上昇の代表例。C: CCK の初回に対する 2 回目の細胞内 Ca²⁺濃度上昇の割合 (n=32)。CCK による細胞内カルシウム濃度上昇を CCK-1R 阻害薬 devazepide は抑制しなかったが、CCK-2R 阻害薬 L365260 は抑制した。**, p<0.01。

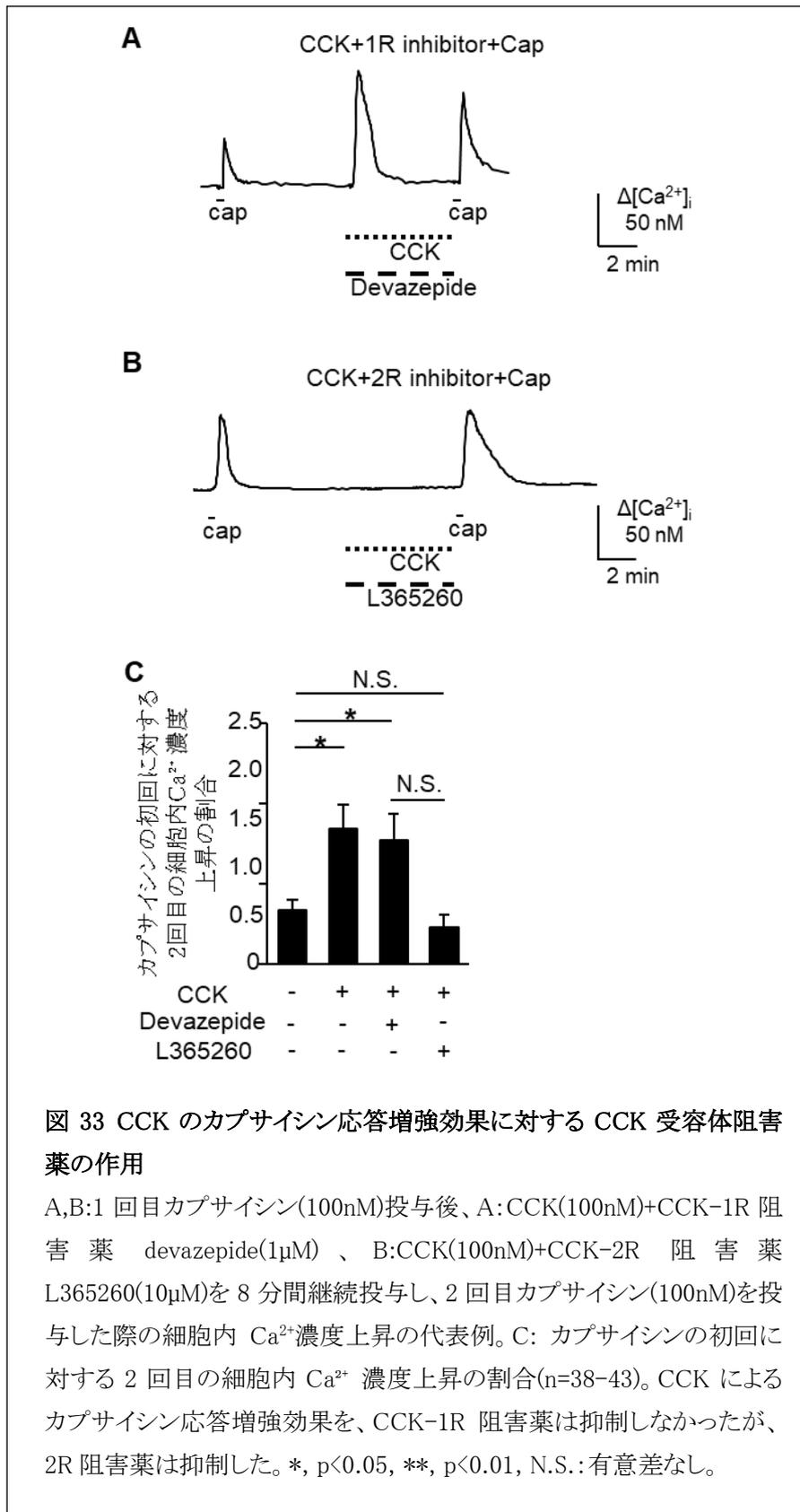
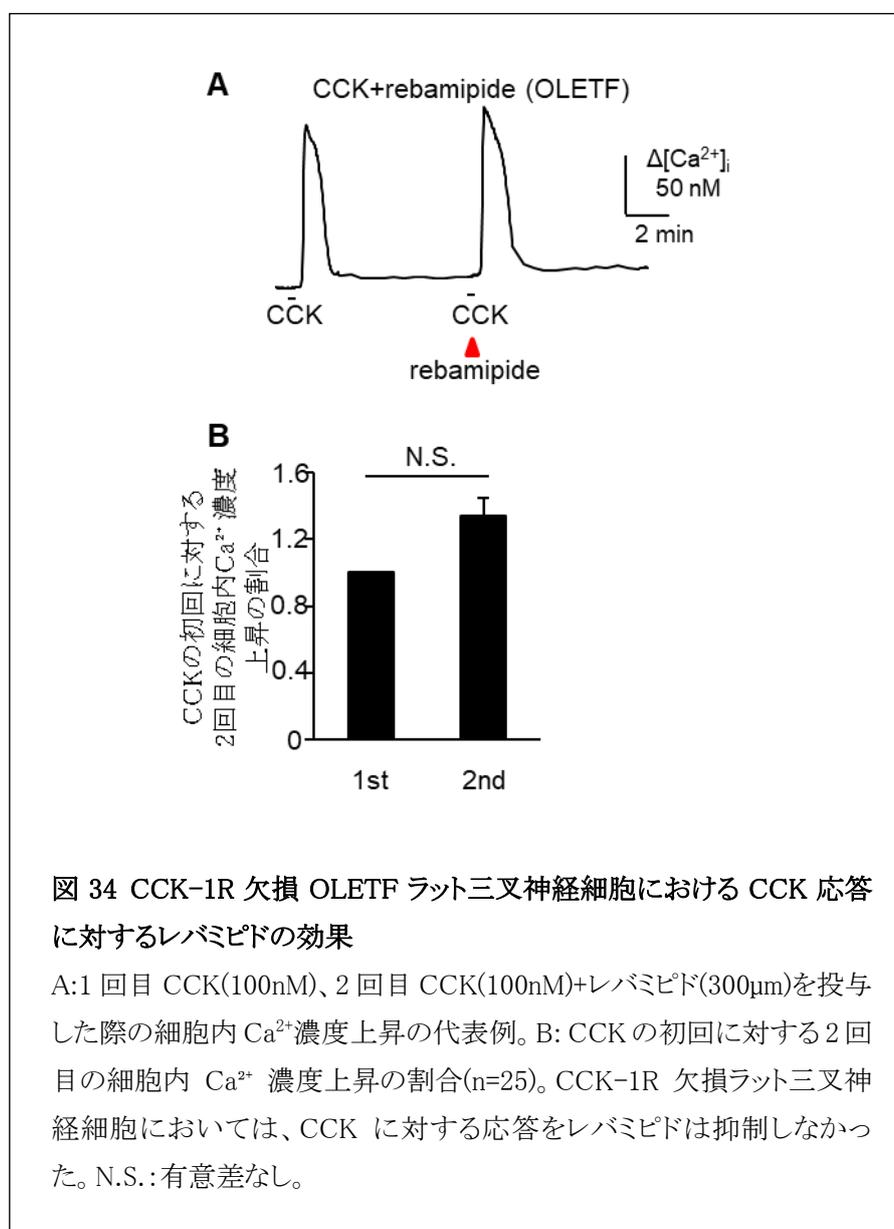


図 33 CCK のカプサイシン応答増強効果に対する CCK 受容体阻害薬の作用

A,B:1 回目カプサイシン(100nM)投与後、A:CCK(100nM)+CCK-1R 阻 害 薬 devazepide(1 μ M) 、 B:CCK(100nM)+CCK-2R 阻 害 薬 L365260(10 μ M)を 8 分間継続投与し、2 回目カプサイシン(100nM)を投与した際の細胞内 Ca²⁺濃度上昇の代表例。C: カプサイシンの初回に対する 2 回目の細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇の割合(n=38-43)。CCK によるカプサイシン応答増強効果を、CCK-1R 阻害薬は抑制しなかったが、2R 阻害薬は抑制した。*, p<0.05, **, p<0.01, N.S.:有意差なし。

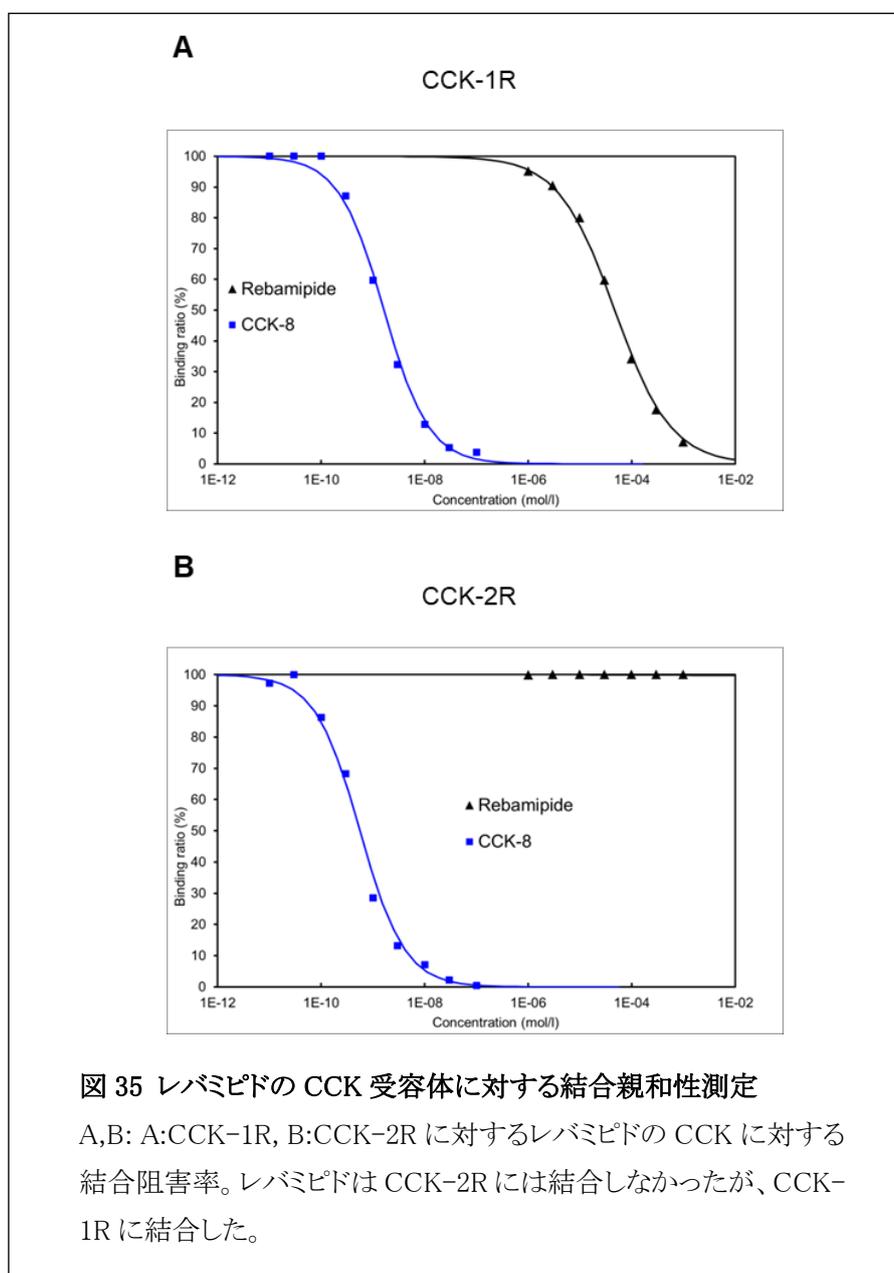
CCK-1R 欠損 OLETF ラットの三叉神経細胞においては、低濃度の CCK(10nM)でも CCK-2R を介していると推測される十分な細胞内カルシウム濃度上昇が認められた。ところが、OLETF 由来の三叉神経細胞では、CCK による細胞内カルシウム濃度上昇はレバミピド(30 μ M)によって抑制されなかった(n=25, 図 34)。

OLETF ラットの三叉神経細胞においてカプサイシンに対する反応を CCK が増強するかを検討したが、CCK およびカプサイシンの両者に感受性のある細胞の数は全体の 3%未満であり、野生型に比べて非常に少なくなっていたため、本研究ではその評価ができなかった。



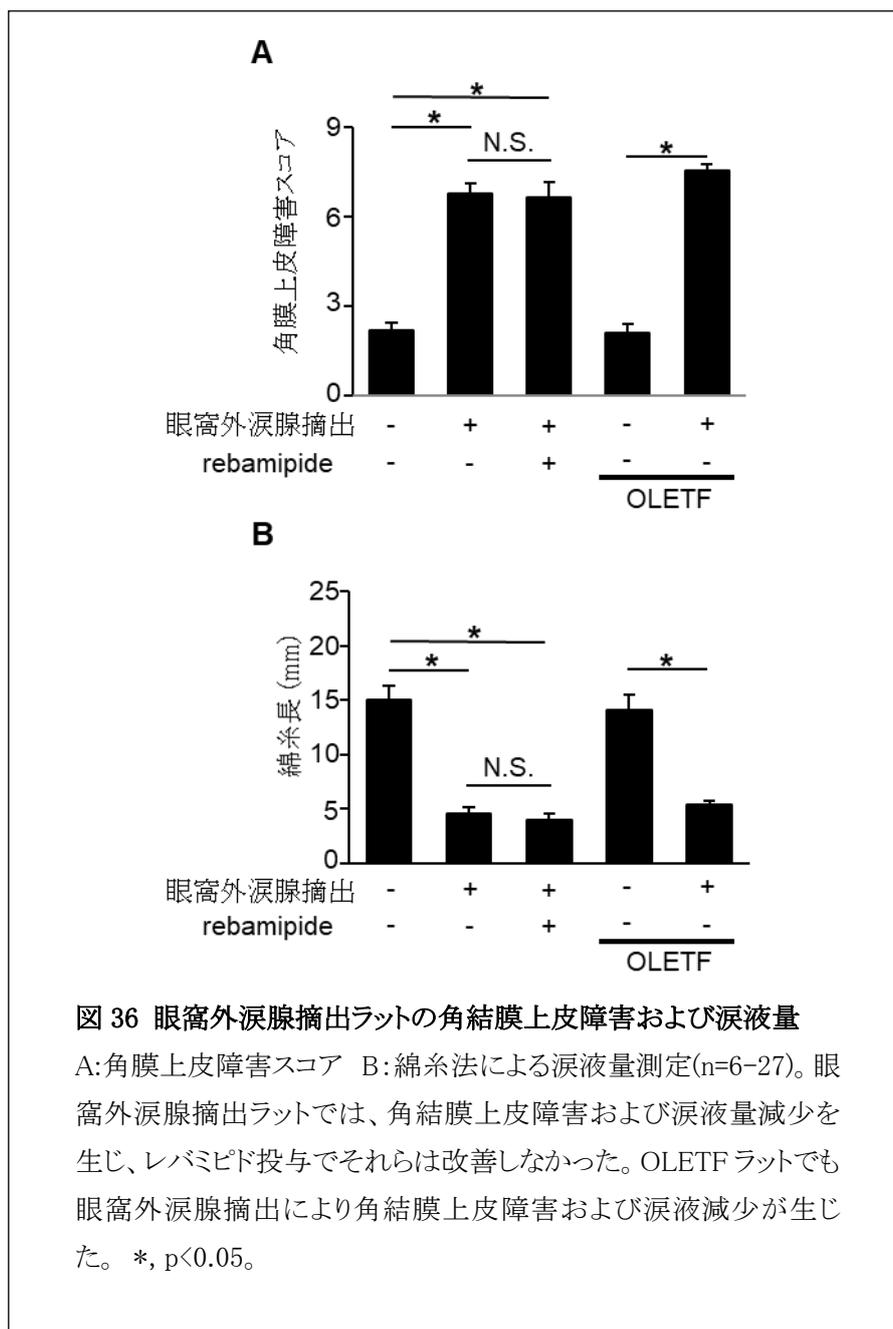
6. レバミピドは CCK-1R に結合する

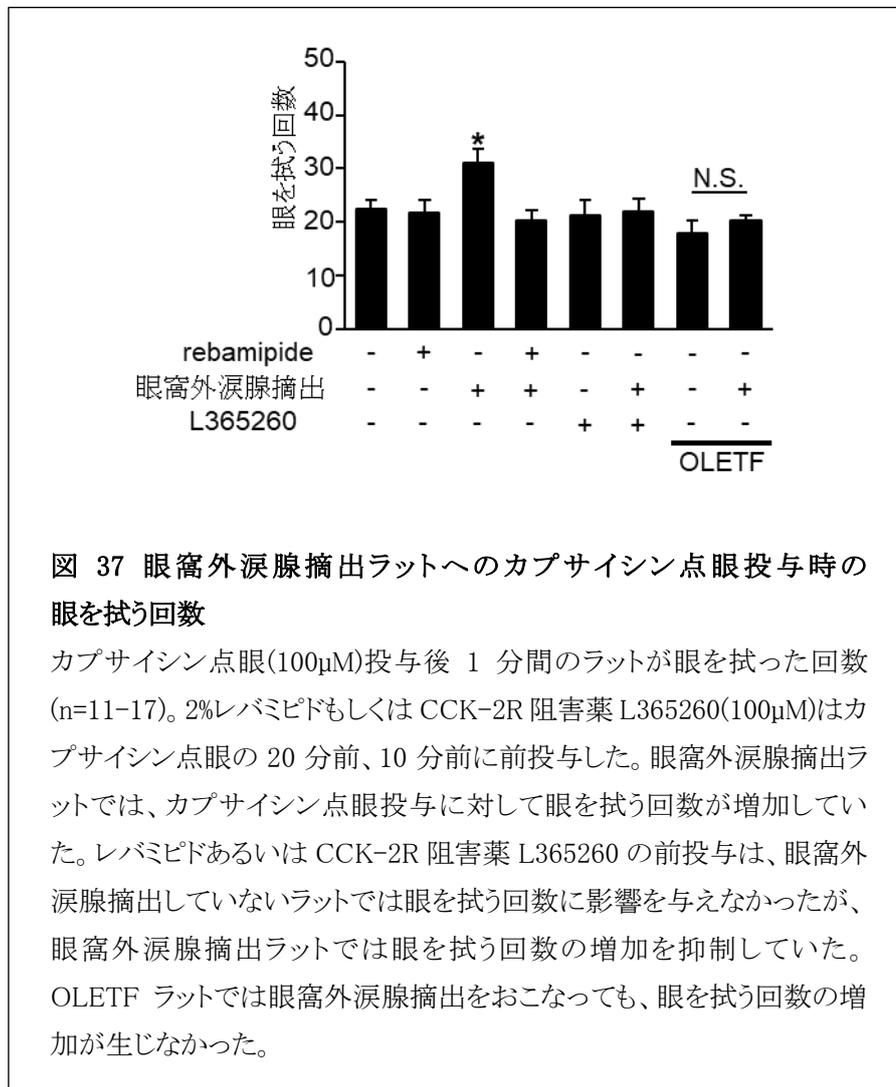
CCK-2R 阻害薬は野生型ラットの CCK の細胞内カルシウム濃度上昇を十分に抑制したが、レバミピドは CCK-1R 欠損 OLETF ラットの三叉神経細胞の CCK-2R 由来の細胞内カルシウム濃度上昇を抑制しなかった。さらに詳細な検討をおこなうために、まずレバミピドがヒト由来 CCK-1R および-2R に結合するのかをアイトープ標識されたリガンド^[125I]BH-CCK-8S を用いて評価した。CCK-1R に対する IC₅₀ は CCK-8S は 1.63nM, レバミピドは 47.0μM だった。CCK-2R に対する IC₅₀ は CCK-8S は 0.56nM だったが、レバミピドは 1mM までの濃度では少なくとも CCK-2R には結合しないという結果だった(図 35)。これらの結果は、レバミピドは CCK-2R ではなく、CCK-1R に結合することを示していた。



7. レバミピドもしくはL365260 点眼はラットにおいてカプサイシン点眼による角膜痛覚過敏を抑制する

眼窩外涙腺摘出によってドライアイを誘発したラットモデルでは、涙液量が低下して角膜上皮障害と角膜痛覚過敏を生じた(n=6-27, *p<0.05, 図 36, 37)。誘導されたカプサイシン点眼に対する痛覚過敏は、レバミピドもしくは L365260 点眼の前投与によって抑制された。一方、CCK-1R 欠損 OLETF ラットでは眼窩外涙腺摘出によって涙液量減少と角膜上皮障害は LETO ラットと同程度まで引き起こすことができたものの、カプサイシン点眼に対する痛覚過敏を誘導することはできなかった(n=6-27, 図 36, 37)。





8、レバミピド点眼は慢性眼痛を緩和する

角膜痛覚を支配する三叉神経の投射先である三叉神経脊髄路核中間-尾側亜核 (V_i/V_o) の活性化を調べた。眼窩外涙腺摘出によって三叉神経脊髄路核中間-尾側亜核が活性化されることについては既報があるため(Katagiri et al., 2015)、同領域におけるリン酸化 c-Fos 陽性細胞数を神経活動のマーカーとして評価した。

眼窩外涙腺摘出ラットの延髄における三叉神経脊髄路核中間-尾側亜核にリン酸化 c-Fos の発現が認められたが、対側(眼窩外涙腺を摘出していない側)ではほとんど発現していなかった(図 36)。さらに、1 日 2 回、10 日間のレバミピド点眼投与によって、角膜上皮障害や涙液量に改善は認められなかったが、三叉神経脊髄路核中間-尾側亜核におけるリン酸化 c-Fos の発現は有意に抑制されており、鎮痛効果が示された。(n=9, *p<0.05, 図 38)

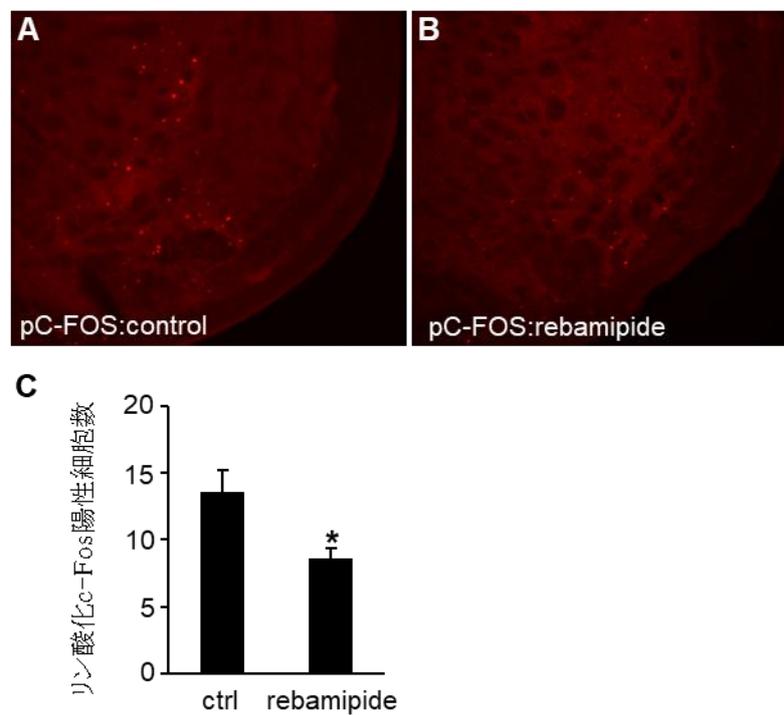


図 38 眼窩外涙腺摘出ラットにおけるレバミピドの Vi/Vc におけるリン酸化 c-Fos 発現の抑制作用

A-B:眼窩外涙腺摘出ラットの三叉神経脊髄路核中間-尾側亜核におけるリン酸化 c-Fos の免疫染色 A:生理食塩水、B:2%レバミピド 1日2回、10日間点眼後。C:三叉神経脊髄路核中間-尾側亜核におけるリン酸化 c-Fos 陽性細胞数(n=9)。眼窩外涙腺摘出ラットでは三叉神経脊髄路核中間-尾側亜核におけるリン酸化 c-Fos の発現が認められるが、レバミピド点眼投与によってリン酸化 c-Fos の発現が抑制された。

考察

本研究は、1)レバミピドはドライアイ患者の他覚所見の改善に先行してその自覚症状を改善すること、2)レバミピドはドライアイ動物モデルにおける角膜痛覚過敏を改善し、その作用機序は角膜神経に発現する CCK 受容体を介した痛み受容体 TRPV1 の感作抑制であること、の 2 点を初めて明らかにした。

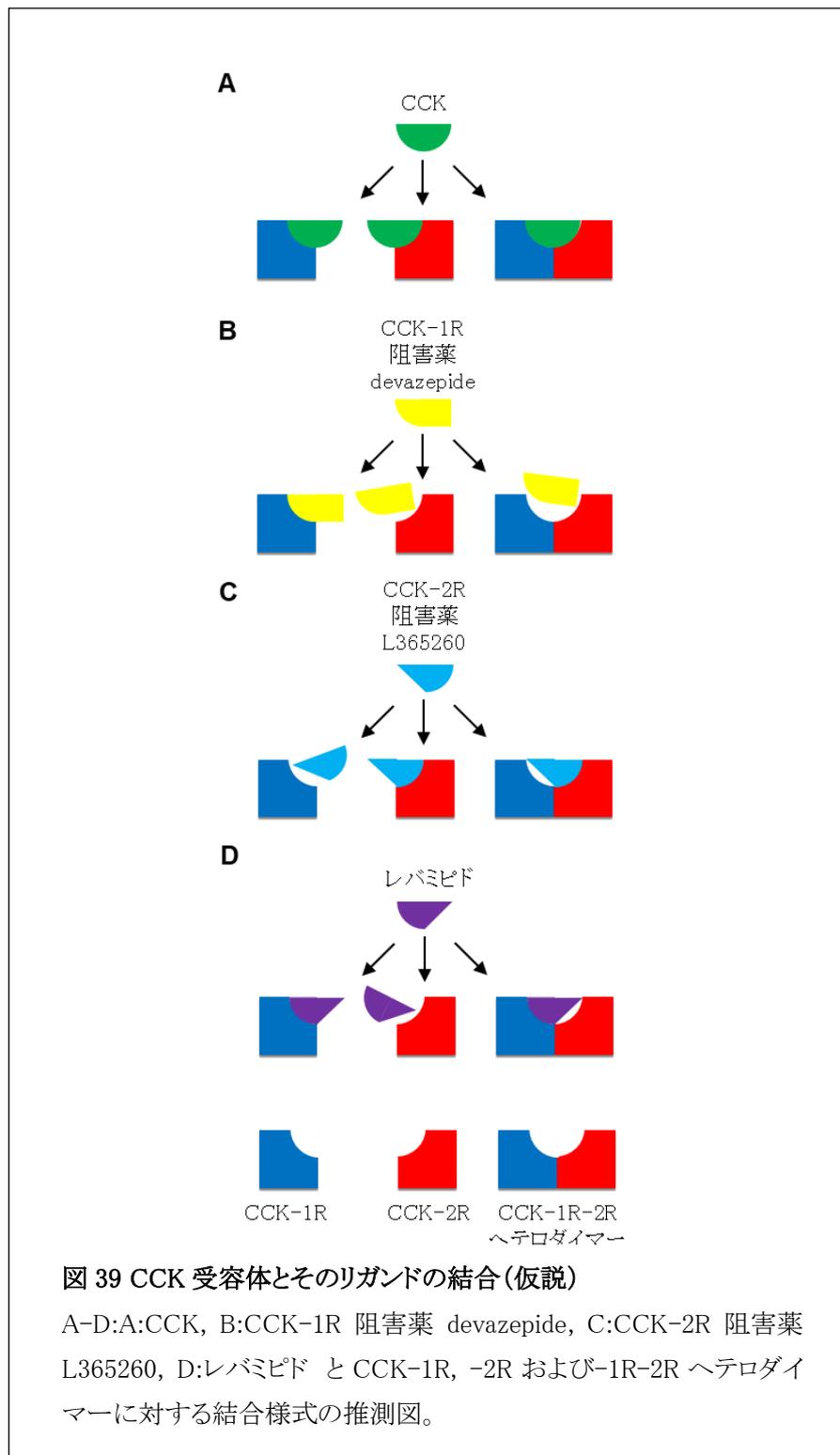
実臨床では、レバミピドで治療されたドライアイ患者が非常に早期に自覚症状が改善するということをしばしば経験する。レバミピド点眼薬が認可されて間もない頃、申請者は眼表面異物感に数年来悩まされているという BUT 短縮型ドライアイ患者にレバミピド点眼薬を処方した。3 日後、その患者は長年苦しんだ眼表面の異物感が消失したと喜んで来院されたが、眼表面の他覚的所見は全く変化していないということを経験し、この現象に強い興味を抱いた。当初、レバミピドのドライアイに対する治療効果は、その抗炎症効果、結膜杯細胞におけるムチン産生増加作用などによると考えられていたが(Takeji et al., 2012; Urashima et al., 2012)、これらの作用発現には 2 週間以上を要するため、その前に症状が早期に改善するメカニズムは十分には説明されていなかった。第 1 章で述べた検討結果から、BUT 短縮型ドライアイ患者では角膜痛覚過敏が存在するという知見を得ていたため、実臨床での経験とあわせて、レバミピドの早期自覚症状改善効果は角膜痛覚過敏の改善に起因しているという仮説をたて検討をおこなった。その結果、他覚所見にはまだ改善が認められないレバミピド点眼開始 2 週間後という段階で、ドライアイ患者の自覚症状と角膜痛覚過敏が有意に改善するという知見を得た。痛覚過敏は痛み刺激に対する感受性が亢進する状態であるため痛み受容体である TRPV1 の感作が一因であると考えられる。事実、ドライアイ患者に対する TRPV1 阻害薬 SYL1001 の治験(II 相)は既に施行されており、同阻害薬の点眼は眼表面の他覚所見を改善せずにドライアイの自覚症状のみを改善するという結果が報告された(Benitez-Del-Castillo et al., 2016)。この結果は、本検討結果を支持する結果であると考えられる。一方、消化器疾患に対してレバミピドを服用しているドライアイ患者の自覚症状は改善しないため、レバミピドは末梢である角膜に直接作用することでその作用を発揮していると考えられる。これらのことから、レバミピド点眼はドライアイ患者の角膜痛覚過敏を改善することで、他覚所見の改善に先行して自覚症状を改善するという着想に至った。

次に、レバミピドが角膜痛覚過敏を改善する機序に関する検討をおこなった。まず、レバミピドはラット膀胱において CCK 受容体に作用すると報告されているため(Moon et al., 2000; Moon et al., 2004)、CCK に着目して実験をおこなった。CCK 阻害が神経障害性疼痛を改善することは既に報告されていたため、レバミピドは CCK 受容体を阻害することで角膜痛覚過敏を改善しているという仮説をたて検討をおこなった。その結果、CCK は培養ラット三叉神経細胞において細胞内カルシウム濃度上昇および痛み受容体 TRPV1 の感作を生じることが明らかとなった。CCK 受容体は主に $G_{p/11}$ と共役する GPCR であり(Piiper et al., 1997)、今回観察された CCK による細胞内カルシウム濃度上昇は PLC/IP₃ 経路を介した細胞内カルシウムストアから放出された Ca^{2+} によると考えられる。一方で、CCK による TRPV1 の感作が PKC 阻害薬によって阻害されたことから、PKC 経路を介した反応と推定される。膀胱や舌味覚細胞においても、CCK-1R はその下流で

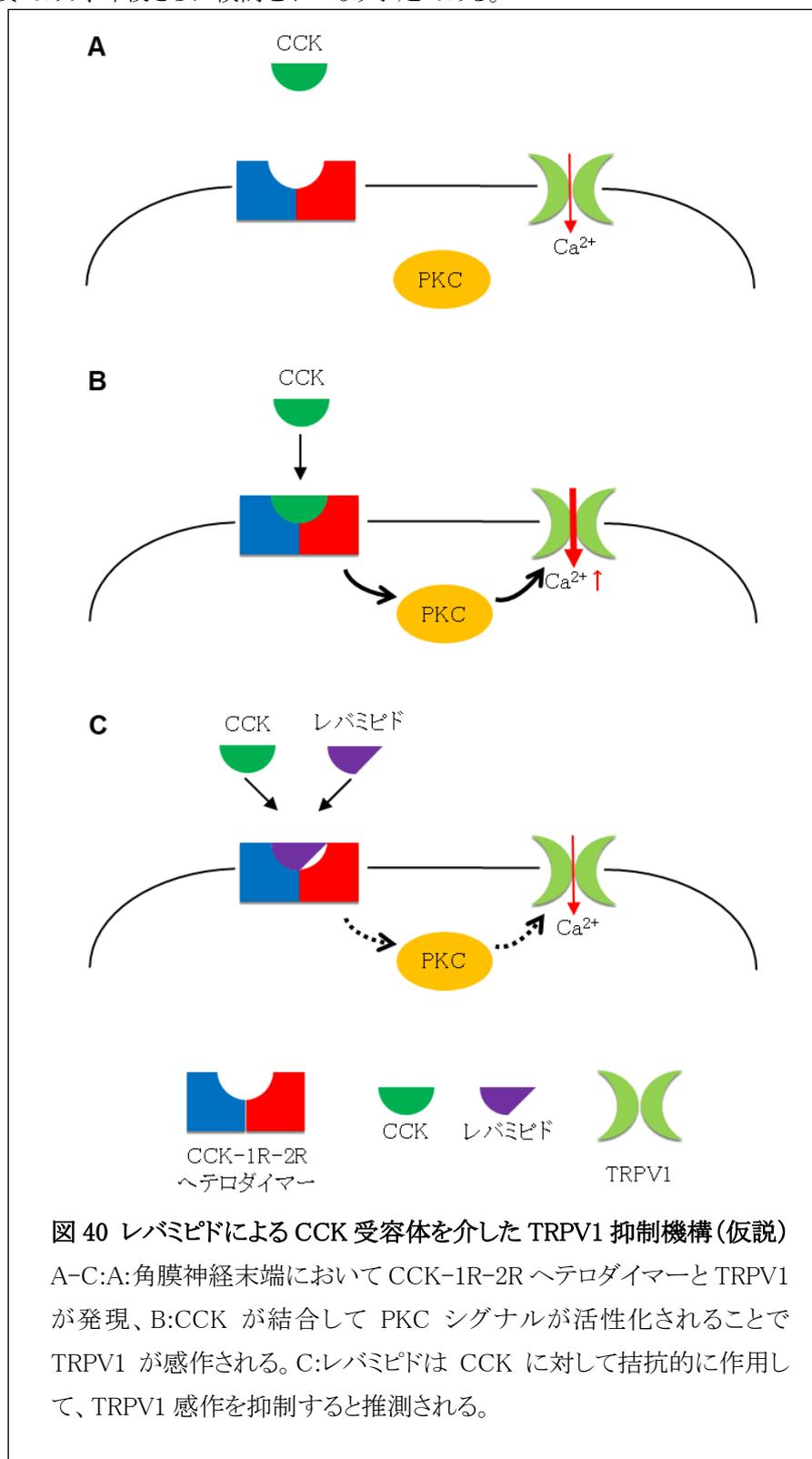
PKC を活性化することが報告されており(Herness et al., 2002; Wang et al., 1996)、さらに TRPV1 はブラジキニン、ヒスタミン、セロトニンのような痛覚増強作用のある物質によって PKC 経路を介して感作されることが知られている(Mandadi et al., 2011)。これらの既報は、CCK が PKC を介して TRPV1 を感作しているという本検討結果を支持するものと考えられた。一方、レバミピドについては CCK による細胞内カルシウム濃度上昇および TRPV1 の感作の双方を抑制した。レバミピドはブラジキニンあるいは KCl による細胞内カルシウム濃度上昇には影響しないことから、CCK 受容体に特異的に作用していると考えられる。これらの事実は、レバミピドが CCK 受容体を阻害し、CCK による細胞内カルシウム濃度上昇と TRPV1 の感作を抑制することを示していた。

また、本検討ではラット三叉神経細胞における CCK による細胞内カルシウム濃度上昇と TRPV1 感作作用が、CCK-1R もしくは CCK-2R のどちらに由来した作用であるかを調べた。既報においてレバミピドは CCK-1R に作用すると報告されていたため、まず「TRPV 感作は CCK-1R に由来した作用であり、レバミピドは CCK-1R に結合することでその感作を抑制している」と仮説をたてて、CCK 受容体の阻害薬による検討をおこなった。しかしその結果は、ラット三叉神経細胞における CCK 刺激による細胞内カルシウム濃度上昇と TRPV1 感作作用は、CCK-2R 阻害薬 L365260 によって抑制されるが、CCK-1R 阻害薬 devazepide では抑制されないというものであった。本結果とレバミピドの CCK 経路に対する抑制効果を併せ考えると、レバミピドは CCK-1R ではなく、CCK-2R に対する抑制効果を有すると推測される。一方、結合親和性を測定した検討ではレバミピドは CCK-2R ではなく、CCK-1R に結合するという結果となった。このように、カルシウムイメージングによる生理学的な検討はレバミピドの CCK-2R に対する抑制効果を、結合親和性を測定する生化学的な検討はレバミピドの CCK-1R への結合能を示しており、二つの結果は当初の「TRPV 感作は CCK-1R に由来した作用であり、レバミピドは CCK-1R に結合することでその感作を抑制している」という仮説を否定するものであった。そこで、レバミピドは CCK-1R に結合して作用することで、CCK-2R 由来の細胞内カルシウム濃度上昇および TRPV1 感作を抑制すると仮説をたて直した。その仮説を検証するため CCK-1R 欠損 OLETF ラットの三叉神経細胞を用いて、レバミピドの CCK に対する作用を検討した。結果は、CCK-1R 欠損 OLETF ラットの三叉神経細胞においてレバミピドは CCK による細胞内カルシウム濃度上昇を抑制しなかった。このことは CCK-1R 非存在下ではレバミピドは CCK-2R を抑制できないことを意味しており、これらの結果から導かれる推論は、「レバミピドは CCK-1R-2R ヘテロダイマーに作用して、CCK 経路を抑制している可能性」であった。過去に GPCR は生理的な条件下でヘテロダイマーを形成することが知られており(Jordan and Devi, 1999; White et al., 1998)、CCK 受容体もヘテロダイマーを形成するという知見が報告されている(Zhou et al., 2014)。また、CCK-1R 阻害薬 devazepide は CCK-1R には結合するが、CCK-1R-2R ヘテロダイマーには結合できない一方で(Cheng et al., 2003)、CCK-2R 阻害薬 L365260 は CCK-2R のみならず、CCK-1R-2R ヘテロダイマーにも結合能を有することが既に示されている(Cheng et al., 2003)。レバミピドと同様に、CCK-2R 阻害薬 L365260 は CCK による細胞内カルシウム濃度上昇も TRPV1 感作もほぼ完全に抑制した。これらの知見および本検討の結果は、CCK は CCK-2R のみを介してではなく、CCK-1R-2R ヘテロダイマー

を介して細胞内カルシウム濃度上昇を引き起こし、レバミピドは CCK-1R-2R ヘテロダイマーを阻害している可能性を示している。以上の検討結果から申請者が推測したレバミピド、CCK-1R、-2R およびヘテロダイマーに対する結合様式仮説を図 39 に示す。



また、これらの結果から推測されたレバミピドの角膜痛覚過敏改善機序仮説を図 40 に示す。しかし、これらの解釈については CCK-1R-2R ヘテロダイマーにレバミピドが結合することを示すデータが必要であり、今後さらに検討をおこなう予定である。



最後に、上記 *in vitro* の検討で得られた TRPV1 感作を CCK 受容体が上流で制御するという機構は、眼窩外涙腺摘出ラットに誘導された角膜痛覚過敏をレバミピドもしくは CCK-2R 阻害薬 L365260 の前投与で正常化できたことから、生体内でも機能していることが推測される。また、CCK-1R 欠損 OLETF ラットにおいては眼窩外涙腺摘出による角膜痛覚過敏が誘導できなかったことから、CCK-1R が痛覚過敏の誘導に必須であることが示唆されるが、ドライアイにおいて痛覚過敏が生じる詳細な機序は未だに不明であり動物モデルを用いた更なる検討を行う必要がある。

一般的に、炎症の持続や神経障害性疼痛は痛覚過敏を引き起こすことが知られている。ドライアイにおける痛覚過敏にも眼表面の炎症や角膜神経障害性疼痛の関与があると指摘されている (Belmonte et al., 2015)。CCK 受容体阻害薬は神経障害性疼痛による痛覚過敏を抑制するため、CCK は神経障害性疼痛による痛覚過敏の発現に関与すると考えられてきたが (Coudore-Civiale et al., 2000; Hanlon et al., 2011; Idanpaan-Heikkila et al., 1997; Kim et al., 2015; Zhou et al., 1993)、近年では炎症の持続による痛覚過敏発現にも CCK 受容体が重要な役割を果たすことが指摘されている (Yin et al., 2016)。ドライアイの自覚症状が神経障害や炎症による痛覚過敏を原因としているならば、眼表面の内因性 CCK はドライアイで生じる痛覚過敏の一因である可能性がある。抗炎症作用や結膜杯細胞数増加はドライアイの他覚所見に対するレバミピドの長期効果として報告されているが (Urashima et al., 2012)、そのメカニズムも未だに明らかにされていない。CCK-1R は炎症細胞にも発現していると報告されており (El-Kassas et al., 2016; Jia et al., 2014)、レバミピドの抗炎症効果にも関係している可能性がある。これらの事実は、CCK が炎症と痛覚過敏の両者に関与することでドライアイの病因に重要な役割を果たしていることを疑わせるものだが、現時点で眼表面における CCK の生理的役割は未だ十分に解明されておらず、今後の研究が期待される。

以上、申請者が大学院在学中に臨床および基礎的実験からドライアイと角膜神経の関係について検討した結果をまとめた。ドライアイにおいて鎮痛をターゲットに開発された治療薬は、現在のところ存在しない。本研究はレバミピドが鎮痛によってドライアイの自覚症状を軽減するタイプの薬剤であることを明らかとし、レバミピドによる鎮痛を標的とした治療を従来の涙液や上皮、炎症を標的としたドライアイ治療に加えることで、自覚症状と他覚所見の両面からドライアイを加療することが可能となることを示すものである。近年、ドライアイ患者の角膜末梢神経の感受性変化が自覚症状発現に重要であることが指摘されており (Belmonte et al., 2015; Dieckmann et al., 2017)、ドライアイによる慢性的な眼痛を改善するには鎮痛薬投与という戦略が効果的であると考える。本研究は、CCK もしくはその受容体がドライアイに対する新たな鎮痛治療の標的であることを明らかとした。本研究の成果が、CCK 経路を標的としたドライアイ治療における新規創薬に寄与することを強く望む。

結論

1. BUT 短縮型ドライアイにおいてレバミピドは角膜痛覚を抑制し、自覚症状を改善した。
2. ラット培養三叉神経細胞においてレバミピドは CCK による細胞内カルシウム濃度上昇を抑制した。
3. CCK は TRPV1 を感作し、レバミピドは CCK による TRPV1 の感作を抑制した。
4. CCK-2R 阻害薬 L365260 は CCK による細胞内カルシウム濃度上昇および TRPV1 の感作を抑制した。
5. CCK-1R 欠損 OLETF ラット三叉神経細胞において、レバミピドは CCK による細胞内カルシウム濃度上昇を抑制しなかった。
6. 結合親和性を検討した結果、レバミピドは CCK-1R に結合することが確認された。
7. レバミピドおよび L365260 は眼窩外涙腺摘出ドライアイモデルラットの角膜痛覚過敏を抑制した。
8. CCK-1R 欠損 OLETF ラットでは眼窩外涙腺摘出による角膜痛覚過敏を誘導できなかった。
9. レバミピドは、角膜神経に由来する三叉神経脊髄路核中間-尾側亜核の c-Fos 発現を抑制した。

総括

第 1 章

BUT 短縮型ドライアイの他覚所見からは説明困難な強い自覚症状の発現には、角膜痛覚過敏が関与していることが示唆された。

第 2 章

レバミピドは CCK 経路を介してドライアイの角膜痛覚過敏を抑制することで自覚症状を改善していると考えられた。CCK もしくはその受容体はドライアイの角膜痛覚過敏に対する治療ターゲットになる可能性がある。

従来、ドライアイの治療ターゲットは眼表面の涙液や上皮であったが、ドライアイの中に角膜痛覚過敏がある一群が存在することを示せたことで、角膜神経が新たなターゲットとなりうること、さらに CCK 経路がその分子標的になる可能性を示すことができた。ドライアイというバスケットネームで診断されている患者の中には、極めて強い眼不快感に苛まれ、ほとんどの時間を閉瞼して過ごすなど著しい QOL の低下をきたす症例が存在する。そのようなケースを解決するためにも、今後は神経をターゲットにした治療薬開発が急務であり、本研究を基に更なる病態解明と治療薬開発に結び付けたいと考えている。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて下さり、また御指導と御校閲を賜りました北海道大学大学院医学研究院眼科学教室 石田 晋教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究全般にわたり直接御指導を頂きました野田 航介准教授に深く感謝の意を表します。そして、研究の遂行にあたり多くの御助言を頂きました北海道医療大学 北市 伸義病院長(眼科学 教授)、北海道大学大学院獣医学研究院 乙黒 兼一教授、北海道大学大学院医学研究院解剖学教室 岩永 敏彦教授、渡邊 雅彦教授、今野 幸太郎助教、北海道大学大学院医学研究院眼科学教室 神田 敦宏特任講師、村田 美幸特任助教に厚く御礼を申し上げます。さらに、様々な実験のサポートをして頂いた、廣瀬 育代技術補助員、吉田 志帆研究補助員に心より感謝の意を表します。最後に、公私ともにサポートして下さいました大学院の諸先輩方、ならびに大学院生の仲間達に深く感謝いたします。

利益相反

この研究の一部は、大塚製薬からの支援によりおこなった。

引用文献

- Baudouin, C., Aragona, P., Van Setten, G., Rolando, M., Irkec, M., Benitez del Castillo, J., Geerling, G., Labetoulle, M., Bonini, S., and members, O.E.C.G. (2014). Diagnosing the severity of dry eye: a clear and practical algorithm. *The British journal of ophthalmology* *98*, 1168-1176.
- Belmonte, C., Acosta, M.C., Merayo-Llodes, J., and Gallar, J. (2015). What Causes Eye Pain? *Current ophthalmology reports* *3*, 111-121.
- Benitez-Del-Castillo, J.M., Moreno-Montanes, J., Jimenez-Alfaro, I., Munoz-Negrete, F.J., Turman, K., Palumaa, K., Sadaba, B., Gonzalez, M.V., Ruz, V., Vargas, B., *et al.* (2016). Safety and Efficacy Clinical Trials for SYL1001, a Novel Short Interfering RNA for the Treatment of Dry Eye Disease. *Investigative ophthalmology & visual science* *57*, 6447-6454.
- Bhave, G., Hu, H.J., Glauner, K.S., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D.J., Oxford, G.S., and Gereau, R.W.t. (2003). Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 12480-12485.
- Borsook, D., and Rosenthal, P. (2011). Chronic (neuropathic) corneal pain and blepharospasm: five case reports. *Pain* *152*, 2427-2431.
- Broberger, C., Holmberg, K., Shi, T.J., Dockray, G., and Hokfelt, T. (2001). Expression and regulation of cholecystokinin and cholecystokinin receptors in rat nodose and dorsal root ganglia. *Brain research* *903*, 128-140.
- Cavalcanti, B.M., Cruzat, A., Sahin, A., Pavan-Langston, D., Samayoa, E., and Hamrah, P. (2017). In vivo confocal microscopy detects bilateral changes of corneal immune cells and nerves in unilateral herpes zoster ophthalmicus. *The ocular surface*.
- Cheng, Z.J., Harikumar, K.G., Holicky, E.L., and Miller, L.J. (2003). Heterodimerization of type A and B cholecystokinin receptors enhance signaling and promote cell growth. *The Journal of biological chemistry* *278*, 52972-52979.
- Cochet, P., and Bonnet, R. (1961). [Corneal esthesiometry. Performance and practical importance]. *Bulletin des societes d'ophtalmologie de France* *6*, 541-550.
- Coudore-Civiale, M.A., Courteix, C., Fialip, J., Boucher, M., and Eschalier, A. (2000). Spinal effect of the cholecystokinin-B receptor antagonist CI-988 on hyperalgesia, allodynia and morphine-induced analgesia in diabetic and mononeuropathic rats. *Pain* *88*, 15-22.
- Craig, J.P., Nichols, K.K., Akpek, E.K., Caffery, B., Dua, H.S., Joo, C.K., Liu, Z., Nelson, J.D., Nichols, J.J., Tsubota, K., *et al.* (2017). TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *The ocular surface* *15*, 276-283.
- Crawley, J.N., and Corwin, R.L. (1994). Biological actions of cholecystokinin. *Peptides* *15*, 731-755.
- Dieckmann, G., Goyal, S., and Hamrah, P. (2017). Neuropathic Corneal Pain: Approaches for

Management. *Ophthalmology* 124, S34-S47.

El-Kassas, S., Odemuyiwa, S., Hajishengallis, G., Connell, T.D., and Nashar, T.O. (2016). Expression and Regulation of Cholecystokinin Receptor in the Chicken's Immune Organs and Cells. *Journal of clinical & cellular immunology* 7.

Galor, A., Moein, H.R., Lee, C., Rodriguez, A., Felix, E.R., Sarantopoulos, K.D., and Levitt, R.C. (2018). Neuropathic pain and dry eye. *The ocular surface* 16, 31-44.

Galor, A., Zlotcavitch, L., Walter, S.D., Felix, E.R., Feuer, W., Martin, E.R., Margolis, T.P., Sarantopoulos, K.D., and Levitt, R.C. (2015). Dry eye symptom severity and persistence are associated with symptoms of neuropathic pain. *The British journal of ophthalmology* 99, 665-668.

Hamrah, P., Qazi, Y., Shahatit, B., Dastjerdi, M.H., Pavan-Langston, D., Jacobs, D.S., and Rosenthal, P. (2017). Corneal Nerve and Epithelial Cell Alterations in Corneal Allodynia: An In Vivo Confocal Microscopy Case Series. *The ocular surface* 15, 139-151.

Hanlon, K.E., Herman, D.S., Agnes, R.S., Largent-Milnes, T.M., Kumarasinghe, I.R., Ma, S.W., Guo, W., Lee, Y.S., Ossipov, M.H., Hruby, V.J., *et al.* (2011). Novel peptide ligands with dual acting pharmacophores designed for the pathophysiology of neuropathic pain. *Brain research* 1395, 1-11.

Herness, S., Zhao, F.L., Lu, S.G., Kaya, N., and Shen, T. (2002). Expression and physiological actions of cholecystokinin in rat taste receptor cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 10018-10029.

Idanpaan-Heikkila, J.J., Guilbaud, G., and Kayser, V. (1997). Prevention of tolerance to the antinociceptive effects of systemic morphine by a selective cholecystokinin-B receptor antagonist in a rat model of peripheral neuropathy. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 282, 1366-1372.

Jia, X., Cong, B., Zhang, J., Li, H., Liu, W., Chang, H., Dong, M., and Ma, C. (2014). CCK8 negatively regulates the TLR9-induced activation of human peripheral blood pDCs by targeting TRAF6 signaling. *European journal of immunology* 44, 489-499.

Jordan, B.A., and Devi, L.A. (1999). G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399, 697-700.

Kaido, M., Kawashima, M., Ishida, R., and Tsubota, K. (2016). Relationship of Corneal Pain Sensitivity With Dry Eye Symptoms in Dry Eye With Short Tear Break-Up Time. *Investigative ophthalmology & visual science* 57, 914-919.

Katagiri, A., Thompson, R., Rahman, M., Okamoto, K., and Bereiter, D.A. (2015). Evidence for TRPA1 involvement in central neural mechanisms in a rat model of dry eye. *Neuroscience* 290, 204-213.

Kawaguchi, A., Sato, M., Kimura, M., Yamazaki, T., Yamamoto, H., Tazaki, M., Ichinohe, T., and Shibukawa, Y. (2015). Functional expression of bradykinin B1 and B2 receptors in neonatal rat

trigeminal ganglion neurons. *Frontiers in cellular neuroscience* 9, 229.

Kheirkhah, A., Dohlman, T.H., Amparo, F., Arnoldner, M.A., Jamali, A., Hamrah, P., and Dana, R. (2015). Effects of corneal nerve density on the response to treatment in dry eye disease. *Ophthalmology* 122, 662-668.

Kim, J., Kim, Y., Hahm, S.C., and Yoon, Y.W. (2015). Effect of the Combination of CI-988 and Morphine on Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury in Rats. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 19, 125-130.

Labbe, A., Liang, Q., Wang, Z., Zhang, Y., Xu, L., Baudouin, C., and Sun, X. (2013). Corneal nerve structure and function in patients with non-sjogren dry eye: clinical correlations. *Investigative ophthalmology & visual science* 54, 5144-5150.

Mandadi, S., Armati, P.J., and Roufogalis, B.D. (2011). Protein kinase C modulation of thermo-sensitive transient receptor potential channels: Implications for pain signaling. *Journal of natural science, biology, and medicine* 2, 13-25.

Moalem, G., and Tracey, D.J. (2006). Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain research reviews* 51, 240-264.

Moon, S.J., Ahn, W., Lee, M.G., Kim, H., Lee, S.I., Seo, J.T., Case, R.M., and Kim, K.H. (2000). A novel effect of rebamipide: generation of $[Ca(2+)](i)$ oscillations through activation of CCK(1) receptors in rat pancreatic acinar cells. *European journal of pharmacology* 388, 17-20.

Moon, S.J., An, J.M., Kim, J., Lee, S.I., Ahn, W., Kim, K.H., and Seo, J.T. (2004). Pharmacological characterization of rebamipide: its cholecystokinin CCK1 receptor binding profile and effects on Ca^{2+} mobilization and amylase release in rat pancreatic acinar cells. *European journal of pharmacology* 505, 61-66.

Nakamachi, T., Ohtaki, H., Seki, T., Yofu, S., Kagami, N., Hashimoto, H., Shintani, N., Baba, A., Mark, L., Lanekoff, I., *et al.* (2016). PACAP suppresses dry eye signs by stimulating tear secretion. *Nature communications* 7, 12034.

Ohguchi, T., Kojima, T., Ibrahim, O.M., Nagata, T., Shimizu, T., Shirasawa, T., Kawakita, T., Satake, Y., Tsubota, K., Shimazaki, J., *et al.* (2013). The effects of 2% rebamipide ophthalmic solution on the tear functions and ocular surface of the superoxide dismutase-1 (sod1) knockout mice. *Investigative ophthalmology & visual science* 54, 7793-7802.

Piiper, A., Stryjek-Kaminska, D., Klengel, R., and Zeuzem, S. (1997). CCK, carbachol, and bombesin activate distinct PLC-beta isoenzymes via Gq/11 in rat pancreatic acinar membranes. *The American journal of physiology* 272, G135-140.

Rahman, E.Z., Lam, P.K., Chu, C.K., Moore, Q., and Pflugfelder, S.C. (2015). Corneal Sensitivity in Tear Dysfunction and its Correlation With Clinical Parameters and Blink Rate. *American journal of ophthalmology* 160, 858-866 e855.

- Rios, J.D., Shatos, M.A., Urashima, H., and Dartt, D.A. (2008). Effect of OPC-12759 on EGF receptor activation, p44/p42 MAPK activity, and secretion in conjunctival goblet cells. *Experimental eye research* *86*, 629-636.
- Rodger, F.C. (1953). Source and nature of nerve fibers in cat cornea. *AMA archives of neurology and psychiatry* *70*, 206-223.
- Rosenthal, P., and Borsook, D. (2016). Ocular neuropathic pain. *The British journal of ophthalmology* *100*, 128-134.
- Sakane, Y., Yamaguchi, M., Yokoi, N., Uchino, M., Dogru, M., Oishi, T., Ohashi, Y., and Ohashi, Y. (2013). Development and validation of the Dry Eye-Related Quality-of-Life Score questionnaire. *JAMA ophthalmology* *131*, 1331-1338.
- Sankaran, H., Goldfine, I.D., Deveney, C.W., Wong, K.Y., and Williams, J.A. (1980). Binding of cholecystokinin to high affinity receptors on isolated rat pancreatic acini. *The Journal of biological chemistry* *255*, 1849-1853.
- Shigeyasu, C., Hirano, S., Akune, Y., and Yamada, M. (2015). Diquafosol Tetrasodium Increases the Concentration of Mucin-like Substances in Tears of Healthy Human Subjects. *Current eye research* *40*, 878-883.
- Spierer, O., Felix, E.R., McClellan, A.L., Parel, J.M., Gonzalez, A., Feuer, W.J., Sarantopoulos, C.D., Levitt, R.C., Ehrmann, K., and Galor, A. (2016). Corneal Mechanical Thresholds Negatively Associate With Dry Eye and Ocular Pain Symptoms. *Investigative ophthalmology & visual science* *57*, 617-625.
- Tagawa, Y., Noda, K., Ohguchi, T., Tagawa, Y., Ishida, S., and Kitaichi, N. (2018). Corneal hyperalgesia in patients with short tear film break-up time dry eye. *The ocular surface*.
- Takeji, Y., Urashima, H., Aoki, A., and Shinohara, H. (2012). Rebamipide increases the mucin-like glycoprotein production in corneal epithelial cells. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* *28*, 259-263.
- Tang, H.B., Inoue, A., Oshita, K., and Nakata, Y. (2004). Sensitization of vanilloid receptor 1 induced by bradykinin via the activation of second messenger signaling cascades in rat primary afferent neurons. *European journal of pharmacology* *498*, 37-43.
- Toda, I., Shimazaki, J., and Tsubota, K. (1995). Dry eye with only decreased tear break-up time is sometimes associated with allergic conjunctivitis. *Ophthalmology* *102*, 302-309.
- Tsubota, K., Yokoi, N., Shimazaki, J., Watanabe, H., Dogru, M., Yamada, M., Kinoshita, S., Kim, H.M., Tchah, H.W., Hyon, J.Y., *et al.* (2017). New Perspectives on Dry Eye Definition and Diagnosis: A Consensus Report by the Asia Dry Eye Society. *The ocular surface* *15*, 65-76.
- Uchino, M., Uchino, Y., Dogru, M., Kawashima, M., Yokoi, N., Komuro, A., Sonomura, Y., Kato, H., Kinoshita, S., Schaumberg, D.A., *et al.* (2014). Dry eye disease and work productivity loss in

visual display users: the Osaka study. *American journal of ophthalmology* *157*, 294-300.

Urashima, H., Okamoto, T., Takeji, Y., Shinohara, H., and Fujisawa, S. (2004). Rebamipide increases the amount of mucin-like substances on the conjunctiva and cornea in the N-acetylcysteine-treated in vivo model. *Cornea* *23*, 613-619.

Urashima, H., Takeji, Y., Okamoto, T., Fujisawa, S., and Shinohara, H. (2012). Rebamipide increases mucin-like substance contents and periodic acid Schiff reagent-positive cells density in normal rabbits. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* *28*, 264-270.

van Bijsterveld, O.P. (1969). Diagnostic tests in the Sicca syndrome. *Archives of ophthalmology* *82*, 10-14.

Van Dijk, A., Richards, J.G., Trzeciak, A., Gillissen, D., and Mohler, H. (1984). Cholecystokinin receptors: biochemical demonstration and autoradiographical localization in rat brain and pancreas using [³H] cholecystokinin₈ as radioligand. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *4*, 1021-1033.

Wang, J., Chakravarthy, B.R., Morley, P., Whitfield, J.F., Durkin, J.P., and Begin-Heick, N. (1996). Glucose, potassium, and CCK-8 induce increases in membrane-associated PKC activity that correspond to increases in [Ca²⁺]_i in islet cells from neonatal rats. *Cellular signalling* *8*, 305-311.

White, J.H., Wise, A., Main, M.J., Green, A., Fraser, N.J., Disney, G.H., Barnes, A.A., Emson, P., Foord, S.M., and Marshall, F.H. (1998). Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* *396*, 679-682.

Wolffsohn, J.S., Arita, R., Chalmers, R., Djalilian, A., Dogru, M., Dumbleton, K., Gupta, P.K., Karpecki, P., Lazreg, S., Pult, H., *et al.* (2017). TFOS DEWS II Diagnostic Methodology report. *The ocular surface* *15*, 539-574.

Xu, K.P., Yagi, Y., and Tsubota, K. (1996). Decrease in corneal sensitivity and change in tear function in dry eye. *Cornea* *15*, 235-239.

Yamasaki, M., Matsui, M., and Watanabe, M. (2010). Preferential localization of muscarinic M1 receptor on dendritic shaft and spine of cortical pyramidal cells and its anatomical evidence for volume transmission. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *30*, 4408-4418.

Yin, K., Deuis, J.R., Lewis, R.J., and Vetter, I. (2016). Transcriptomic and behavioural characterisation of a mouse model of burn pain identify the cholecystokinin 2 receptor as an analgesic target. *Molecular pain* *12*.

Yokoi, N., Uchino, M., Uchino, Y., Dogru, M., Kawashima, M., Komuro, A., Sonomura, Y., Kato, H., Tsubota, K., and Kinoshita, S. (2015). Importance of tear film instability in dry eye disease in office workers using visual display terminals: the Osaka study. *American journal of ophthalmology* *159*, 748-754.

Zhou, L., Yang, H., Okoro, E.U., and Guo, Z. (2014). Up-regulation of cholesterol absorption is a mechanism for cholecystokinin-induced hypercholesterolemia. *The Journal of biological chemistry* *289*, 12989-12999.

Zhou, Y., Sun, Y.H., Zhang, Z.W., and Han, J.S. (1993). Increased release of immunoreactive cholecystokinin octapeptide by morphine and potentiation of mu-opioid analgesia by CCKB receptor antagonist L-365,260 in rat spinal cord. *European journal of pharmacology* *234*, 147-154.