

令和元年6月21日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10878

研究課題名(和文) 神経麻痺性角膜症に対する TRP チャンネルを標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutics targeting TRP channel for neurotrophic keratopathy

研究代表者

岡田 由香 (OKADA, YUKA)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50264891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス三叉神経第1枝を頭蓋外から挿入したジアルミー電極で焼灼することで安定して神経麻痺性角膜症マウスモデルを作成することに成功した。このモデルマウスの角膜は透明性が維持されるものの角膜知覚が低下し、角膜上皮欠損の修復遅延が起こる。このマウスの障害三叉神経にTRPV4 AAVを注入し、障害三叉神経及び角膜の残存三叉神経でTRPV4を強制発現させることで角膜上皮欠損の修復遅延を回復することができた。またこの修復過程で角膜のNGF発現が上昇していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経麻痺性角膜症は、三叉神経第1枝領域が障害され角膜知覚が低下することで角膜障害と角膜創傷治癒遅延が惹起される疾患であるが、病態解明が不十分でそれに基づく根治的な治療法はない。角膜保護剤や抗生剤点眼などの対症療法のみできわめて難治性である。知覚神経麻による神経終末からの神経ペプチドが病態に大きく関与していると想定する中、それらの神経ペプチドの分泌に関与するTRPV4を障害三叉神経で強制発現させることが神経麻痺性角膜症の治療標的となる可能性を示せた。

研究成果の概要(英文)：A mouse model of neurotrophic keratopathy was produced in the cranium by using a needle at the point described above, a bipolar coagulation. Sensory loss was confirmed by the lack of the blink reflex on air jet stimulation as well as by confirming less response with cochet-bonnet aesthesiometer. The cornea of a mouse following electrolysis coagulation of the first branch of the trigeminal nerve showed significant delayed epithelial defect closure. TRPV4 gene introduction into a damaged V1 nerve rescues the impairment of epithelial healing. The system composed of sensory nerve TRPV4 - maintenance of cell stemness - NGF is one of the major mechanisms of homeostasis of corneal epithelium.

研究分野：眼科

キーワード：神経麻痺性角膜症 TRPチャンネル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

角膜上皮は眼表面に位置するため、外界からの刺激を受ける機会が多いが、その一方で迅速な治癒は透明性維持、感染予防の観点で必須である。三叉神経第一枝領域が障害され角膜知覚が低下した症例では、角膜上皮障害と角膜創傷治癒遅延(遷延性上皮欠損)が惹起される(神経麻痺性角膜症)。極めて難治性で、臨床現場では非常に苦慮する。サブスタンス P(SP)由来ペプチドとインスリン様成長因子(IGF-1)由来ペプチドの同時投与による研究的治療方法の有効性が報告されているが、一般には対症療法のみで、根治的な治療法がない。神経麻痺性角膜症の克服には、その病態解明と病態理解に基づいた根本的な治療戦略の確立が望まれる。

2. 研究の目的

知覚神経障害と創傷治癒遅延

古典的にも褥瘡などの経験から知覚神経の創傷治癒に対する関与は大きいと考えられている。知覚神経線維終末は情報伝達だけでなく SP や calcitonin gene-related peptide (CGRP)などの神経ペプチドを分泌し、局所の細胞の挙動や全身的な生理反応を調節することで組織恒常性維持に大きな役割を担っている。皮膚などで組織損傷時に知覚神経が障害されると、その刺激で SP や CGRP などの神経ペプチドが分泌され、損傷局所の細胞の治癒に向けた挙動を末梢組織の血流維持による組織の虚血壊死と血液由来の細胞の動員を持って、創傷治癒を促進する方法を促進するとされている。

神経麻痺性角膜症は、角膜知覚を司る三叉神経第一枝が障害され角膜知覚が低下した症例に生じ、角膜上皮の創傷治癒が遅延し、上皮障害と角膜実質の融解が特徴的であり非常に難治性である。これまで、その治療として角膜上皮を保護する療法や、神経伝達物質である SP と IGF-1 由来ペプチドの投与が有効とされている。

Transient receptor potential(TRP)イオンチャネル

感覚神経などに発現して侵害刺激受容に関わるイオンチャネル型受容体が近年明らかにされつつあり、その中心的な分子群が TRP チャネル群である。TRP チャネルには TRPC、TRPV、TRPM、TRPML、TRPN、TRPP、TRPA の 7 つのサブファミリーがある。例えば TRPV1 は、唐辛子の主成分であるカプサイシン、プロトン、熱(43 度以上)という複数の侵害刺激によって活性化し、陽イオン流入から細胞興奮をもたらす。TRPV1 が多刺激痛み受容体として機能することは、遺伝子欠損マウスの行動解析からも明らかになっている。TRPA1 は、マスタードやわさびの刺激成分である allyl isothiocyanate(AITC)や、アルカリ、熱(17 度以下)などの複数の刺激で活性化することが明らかになっており、最近では TRP イオンチャネル群の非神経組織での発現も報告されている。

TRP イオンチャネルシグナルと創傷治癒反応：神経麻痺性角膜症の病態解明と治療戦略に向けて。

申請者らは TRPV1 欠失マウス(TRPV1 KO)では野生型マウス(WT)に比べアルカリ外傷後の角膜炎症を抑制される(Okada Y et.al. *Am J Pathol.* 2011)一方で、単純角膜上皮欠損の修復が遅延し、TRPV1 シグナルは角膜上皮修復に重要な因子であることを報告した。この時、TRPV1-KO 上皮治癒遅延には Interleukin-6(IL-6)と SP の発現の低下が影響していることを報告している(Sumioka T et.al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*2014)。申請者の予備実験では、TRPV1-KO 同様に、TRPA1 欠失マウス(TRPA1 KO)、TRPV4 欠失マウス(TRPV4 KO)

も角膜上皮欠損の修復遅延を確認している。知覚神経終末では TRP チャネルシグナルの活性化によって上記のような創傷治癒に重要な神経ペプチド (SP、CGRP など) の放出増強が生じる。従って臨床的に神経麻痺性角膜症で TRP チャネル由来シグナルを調節することで神経麻痺性角膜症の治療の新しい治療法となることが期待できる。本研究では、その可能性を探索すべく、マウスを用いた基礎研究を立案した。マウス角膜上皮障害の治癒過程での神経ペプチドの発現動向、マウス神経麻痺性角膜症モデルの確立、そのモデルでの三叉神経でのアデノ随伴ウイルスベクターを用いた TRP チャネルの強制発現の治療効果の有無を評価する。

3. 研究の方法

1. TRPA1-KO, TRPV4-KO および WT に直径 2mm も上皮欠損を作成、6～30 時間後屠殺眼球を摘出し角膜を採取する。角膜創傷治癒に関わるとされている神経ペプチド (SP、CGRP など) 炎症性サイトカイン (IL-6, Transforming growth factor α (TGF α), IGF-1 など) の蛋白発現は免疫染色法、Western blot 法を用い、mRNA の発現は in situ hybridization 法、real-time RT-PCR 法を用いて検討する。細胞増殖は、BrdU 染色を行い、陽性細胞をカウントする。

2. マウス三叉神経を障害し神経麻痺性角膜症の動物モデルを作製する。方法としては、定位脳手術装置を使用し、頭蓋外から 18～20G のジアテルミー電極を挿入し、三叉神経第 1 枝を凝固する。三叉神経凝固の程度による角膜障害の程度や知覚障害、三叉神経の障害程度を検討する。角膜障害の程度については 1 日～6 ヶ月後まで経時的に写真撮影を行う。角膜知覚については経時的にエアージェット刺激で瞬目反応の低下の有無を確認する。同マウスを経時的に屠殺、眼球摘出し、角膜三叉神経障害の程度は、共焦点顕微鏡を用い、角膜のホールマウントでニューロンを標識するマーカーである neuron specific Class III β -tubulin (12B10) を免疫染色する。屠殺したマウスの頭蓋骨を切除、大脳を摘出し、三叉神経を観察、写真撮影する。三叉神経を摘出し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE) ならびにクリューバー・バレラ染色での神経障害の程度を確認する。

3. 三叉神経障害マウスモデルで TRPV4 アデノ随伴 (AAV) ウイルスベクターを三叉神経に注入し、角膜で強制発現することで、角膜上皮欠損の修復遅延が回復するか検討する。TRPV4 の AAV ウイルスベクターを、それぞれ定位脳手術で、頭蓋外から三叉神経第 1 枝に微量注入装置を用いて注入する。コントロールとしては、プラスミドの入っていない AAV ウイルスベクターを同様の方法で投与する。

4. 研究成果

1. TRPA1 遺伝子欠失マウス (TRPA1 KO), TRPV4 遺伝子欠失マウス (TRPV4 KO) および野生型マウス (WT) に直径 2mm も上皮欠損を作成。上皮欠損の残存面積を測定した結果、WT に比べ、TRPA1 KO、TRPV4 KO とともに、18 時間、24 時間後上皮欠損面積が有為に残存していた。また、細胞増殖を BrdU 染色を行い確認した結果、WT に比べ、TRPA1 KO 及び TRPV4 KO では角膜上皮細胞での BrdU 要請細胞数が有為に減少していた。

角膜創傷治癒に関わるとされている神経ペプチド、炎症性サイトカインなどを real time

RT-PCR法で測定した結果、上皮欠損作成6時間後TRPA1 KOでは、WTに比べTransforming growth factor 1(TGF 1), Substance P (SP)の発現が減少し、TRPV4 KOでは6時間後Nerve growth factor(NGF)が、12時間後TGF 1とcalcitonin gene-related peptide(CGRP)の発現が減少していた。これら因子の発現低下が、TRPA1 KO及びTRPV4 KOの角膜上皮創傷治癒遅延に関与していると考えられた。

2. 定位脳手術の手法で頭蓋外から20Gのジアテルミー電極を挿入し、三叉神経第1枝を凝固する。三叉神経凝固し、三叉神経障害マウスモデルを作成した。このモデルマウスは、角膜知覚は低下するものの角膜の透明性や形態は維持している。このマウスの角膜のホルマウントでニューロンを標識するマーカーであるneuron specific Class III β -tubulin (TUJ1)の免疫染色を行なった。正常角膜に比べ三叉神経障害角膜ではTUJ1陽性神経が減少し、角膜周辺部に認められるのみであった。このモデルマウスの頭蓋骨を切除、大脳を摘出し、三叉神経を観察後、三叉神経を摘出し、ヘマトキシリン・エオジン染色ならびにクリューパー・バレラ染色での神経障害の程度を確認した結果、障害部では神経細胞が線維化していた。

この三叉神経障害角膜及び正常角膜に直径2mmの角膜上皮欠損を作成し、欠損部の閉鎖速度を比較した結果、三叉神経障害角膜で角膜上皮欠損の閉鎖が遅延することを確認した。

3. 定位脳手術の手法で頭蓋外から20Gのジアテルミー電極を挿入し、三叉神経第1枝を凝固する。三叉神経凝固し、三叉神経障害マウスモデルを作成した。このモデルマウスは、角膜知覚は低下するものの角膜の透明性や形態は維持している。このマウスの角膜のホルマウントでニューロンを標識するマーカーであるneuron specific Class III β -tubulin (TUJ1)の免疫染色で正常角膜に比べ三叉神経障害角膜では陽性神経が減少し、角膜上皮欠損の創傷治癒が遅延する。この障害三叉神経にDs-RedでラベルしたTRPV4 AAVを注入すると、4週間後に角膜の残存三叉神経でDs-Redが発現する。この角膜に直径2mmの角膜上皮欠損を作成し、欠損部の閉鎖速度を比較した結果、TRPV4AAVを注入し、角膜でTRPV4を強制発現した角膜では、control AAVを注入したものに比べ、上皮欠損が早く治癒した。

またこの時、角膜のNGFの発現が上昇していた。

5. 主な発表論文等

Okada Y, Sumioka T, Ichikawa K, Sano H, Nambu A, Kobayashi K, Uchida K, Suzuki Y, Tominaga M, Reinach PS, Hirai SI, Jester JV, Miyajima M, Shirai K, Iwanishi H, Kao WW, Liu CY, Saika S. Sensory nerve supports epithelial stem cell function in healing of corneal epithelium in mice: the role of trigeminal nerve transient receptor potential vanilloid 4. Lab Invest. 2019 Feb;99(2):210-230.

〔雑誌論文〕(計1件)

〔学会発表〕(計6件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：雑賀 司珠也

ローマ字氏名： Saika Shizuya

所属研究機関名：和歌山県立医科大学 医学部

部局名：眼科

職名：教授

研究者番号（8桁）：40254544

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。