

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09419

研究課題名（和文）テネイシンX-TRPチャネル系を標的とした神経麻痺性角膜症の新規治療戦略の確立

研究課題名（英文）Establishment of a Novel Therapeutic Strategy for Neurotrophic Keratopathy by Targeting the Tenascin X-TRP Channel System

研究代表者

住岡 孝吉（Sumioka, Takayoshi）

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40433362

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：角膜上皮剥離後のマウス角膜創傷治癒におけるテネイシンXの役割を明らかにする。野生型マウス（WT）の角膜上皮では創傷後テネイシンXはアップレギュレートされていた。テネイシンX欠失（KO）マウスでは角膜上皮の創傷治癒が遅延し、上皮剥離に対する好中球の炎症反応を増加させた。KOマウスでは角膜知覚神経の再生遅延がみられたが、WTマウスとKOマウスでTRPV1、TRPV4、TRPA1の発現に著明な差はみられなかった。テネイシンXは、傷害に対する再生反応をサポートするために必要な好中球の浸潤を制御し、酸化ストレスメディエーターが細胞毒性レベルまで上昇するのを防ぐことに寄与している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テネイシンX欠失（KO）マウスでは好中球浸潤の制御が阻害されることで角膜上皮の治癒が遅延していた。またKOマウスでは角膜のコラーゲン線維の密度が低下しており、角膜上皮のみならず角膜実質の創傷治癒の遅延も確認された。これらの研究結果からテネイシンXを原因遺伝子としたエーラス・ダンロス症候群の患者では角膜外傷ひいては角膜切開での白内障手術時に創傷治癒が遅延する可能性が高いと考え感染対策あるいは創縫合など慎重に個別対応を検討する必要があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of the study was to uncover the role of tenascin X in modulation of healing in mouse corneas subjected to epithelium debridement. Tenascin X protein was upregulated in the wounded wild-type (WT) corneal epithelium. Loss of tenascin X prolonged corneal epithelial wound healing and increased neutrophilic inflammatory response to debridement in mice. Although tenascin-deficient (KO) mice showed delayed regeneration of corneal sensory nerves, there was no difference in TRPV1, TRPV4, or TRPA1 expression between WT and KO mice. Tenascin X contributes to the control of neutrophil infiltration needed to support the regenerative response to injury and prevent the oxidative stress mediators from rising to cytotoxic levels.

研究分野：角膜創傷治癒

キーワード：テネイシンX 角膜創傷治癒 マトリセラー蛋白質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

角膜上皮障害の創傷治癒過程では、上皮細胞、実質細胞、炎症細胞のそれぞれが発現する成長因子や細胞外マトリックスの関与以外に、局所の知覚神経からの神経ペプチドやカルシトニン遺伝子関連ペプチドも角膜上皮細胞の遊走や増殖の促進や炎症制御を介して大きく関係する。従って角膜知覚を司る三叉神経の障害は、角膜上皮の治癒を遅延させ、難治化させる。

感覚神経に特異的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の中心的な分子群に transient receptor potential (TRP) チャネルがある。TRP チャネルには7つのサブファミリーがあり、その中の TRPV1、TRPV4、TRPA1 など痛みに関与する TRP チャネルをコントロールすることで、神経麻痺性角膜症をはじめ難治性の角膜上皮疾患の新規治療法の開発の手がかりとなることが期待できる。代表研究者は、TRP 型カチオンチャネル受容体の角膜上皮創傷治癒での役割についての研究に指導的立場で従事してきたが、痛み刺激が強いことが課題となり点眼や眼軟膏などの実用化までには至っていない。

テネイシン X (TNX) はエーラス・ダンロス症候群の原因遺伝子の一つであり、同疾患では知覚神経の異常に基づく四肢などの知覚異常の合併が報告されている。そのため TNX が血管新生以外に知覚神経の形成と機能維持にも関与している可能性があると考えられる。TNX の制御により知覚神経の再生促進と角膜創傷治癒の促進が期待できる。

2. 研究の目的

TNX の角膜知覚神経や TRP 型カチオンチャネル受容体への関与の解明し、角膜創傷治癒過程での TNX の役割を明らかにすること。

3. 研究の方法

野生型 (Wild Type : WT) マウスおよびテネイシン X 欠失 (Knock-out : KO) マウスを使用した。

(1) WT マウスおよび KO マウスの知覚を cochet-bonnet 角膜知覚計を用いて測定し比較した。

(2) WT マウスおよび KO マウスを屠殺し角膜を摘出した。パラフォルムアルデヒド固定後に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) 抗体を用いて FITC 標識で免疫染色し、TNX をローダミン標識二次抗体で染色した免疫二重染色を試み、共焦点顕微鏡を用いて撮影し比較検討した。同様にパラフィン切片も作成し、TRPV1、TRPV4、TRPA1 の局在を免疫組織化学で検討した。

(3) WT マウスおよび KO マウスに円形の角膜上皮欠損 (直径 2mm) を既報 (Sumioka T, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014) に従って作成する。6 時間毎に写真撮影し残存角膜上皮欠損の面積を統計学的に評価した。また別途に角膜を採取し、RNA 抽出後、TRPV1、TRPV4、TRPA1、神経ペプチドや炎症性サイトカインの mRNA 発現を real-time RT-PCR で検討した。免疫染色法を用いて real-time RT-PCR で検討した因子の蛋白質局在、炎症細胞の分布、上皮での細胞遊走や増殖に関与するシグナルを検討した。同様にホルマウントで、神経線維の再生を免疫組織化学的に比較検討した。

1. 研究成果

(1) KO マウスでは WT マウスと比較し角膜知覚の有意な低下が確認された。

(2) WT マウスと KO マウスの正常角膜の角膜知覚神経の密度に差はみられなかった。また TRPV1、

TRPV4, TRPA1 の局在も両者に差はみられなかった。

(3) テネイシン X は、上皮欠損後の WT 角膜上皮でアップレギュレートされた。テネイシン X の欠失は、WT 組織の反応と比較して、上皮欠損の治癒を遅らせ、好中球の創傷周辺への浸潤を加速させた。Interleukin-6 (IL-6)、Transforming growth factor- (TGF-) 1、Matrix metalloproteinase (MMP) の発現はテネイシン X 欠失による影響を受けなかった。マロンジアルデヒドの顕著な蓄積が、WT と比較して KO の治癒上皮で観察された。抗体の全身投与によって誘発された好中球減少症は、上皮細胞のマロンジアルデヒドレベルの低下とともに、KO 角膜の上皮治癒の障害をレスキューした。また抗酸化物質である N-アセチル-L-システイン (NAC) の阻害により、マロンジアルデヒドの組織レベルの低下を伴って、KO 角膜の上皮治癒の障害をレスキューした。テネイシン X 欠失は、マウスの角膜上皮創傷治癒を遅延させ、創面切除に対する好中球性の炎症反応を増加させた。また KO マウスでは WT マウスと比較し角膜知覚の再生が遅延していたが、TRPV1, TRPV4, TRPA1 の発現に差はみられなかった。

以上の成果は Sumioka T, Iwanishi H, Okada Y, Miyajima M, Ichikawa K, Reinach PS, Matsumoto KI, Saika S. Impairment of corneal epithelial wound healing is association with increased neutrophil infiltration and reactive oxygen species activation in tenascin X-deficient mice. *Lab Invest.* 101: 690-700, 2021 として論文に掲載された。

TNX の制御により知覚神経の再生促進と角膜創傷治癒の促進が期待できるが、TNX は TGF β -Smad シグナルを修飾するマトリセルラー蛋白質であるとも報告されており、角膜透明治癒の治療においてはさらなるメカニズムの解明が必要である。

Sumioka et al. Fig. 1

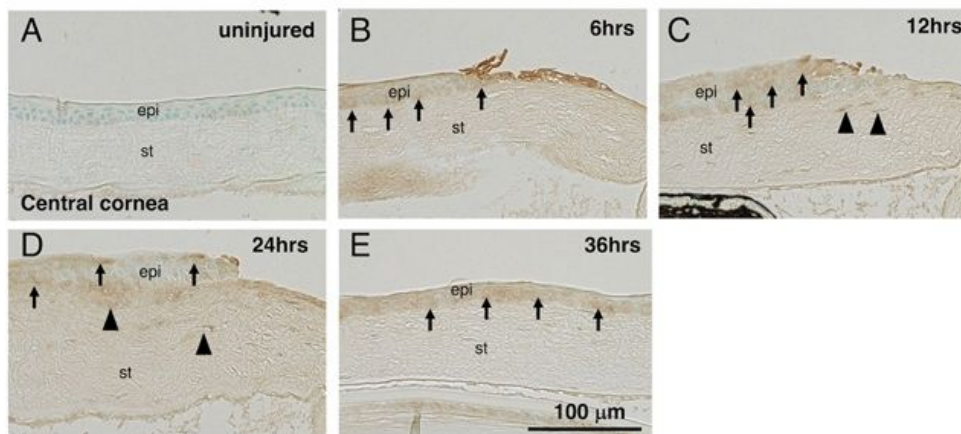
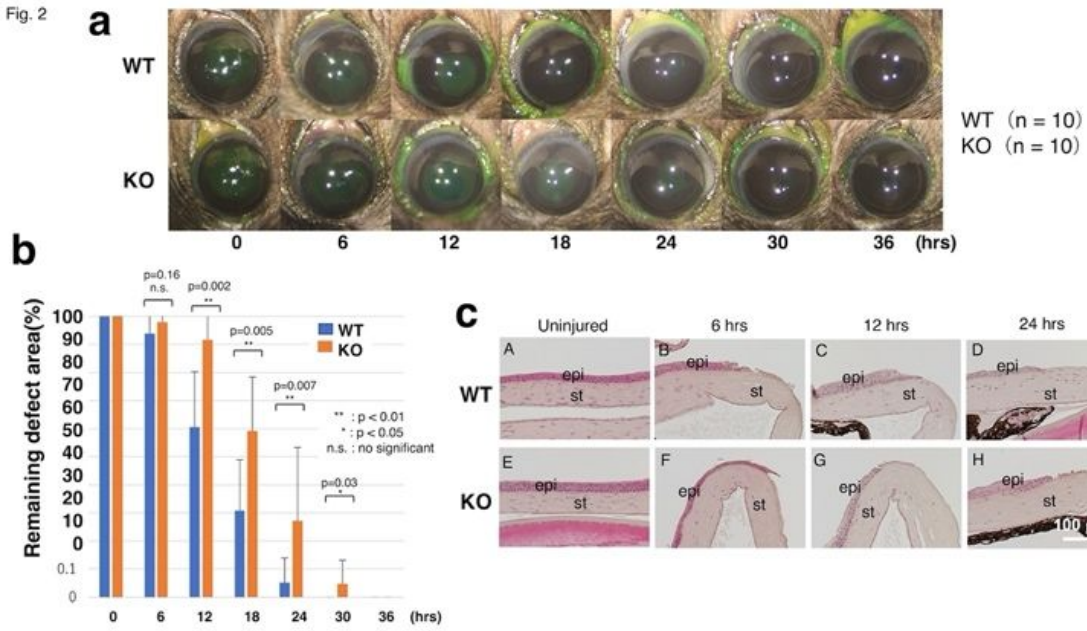
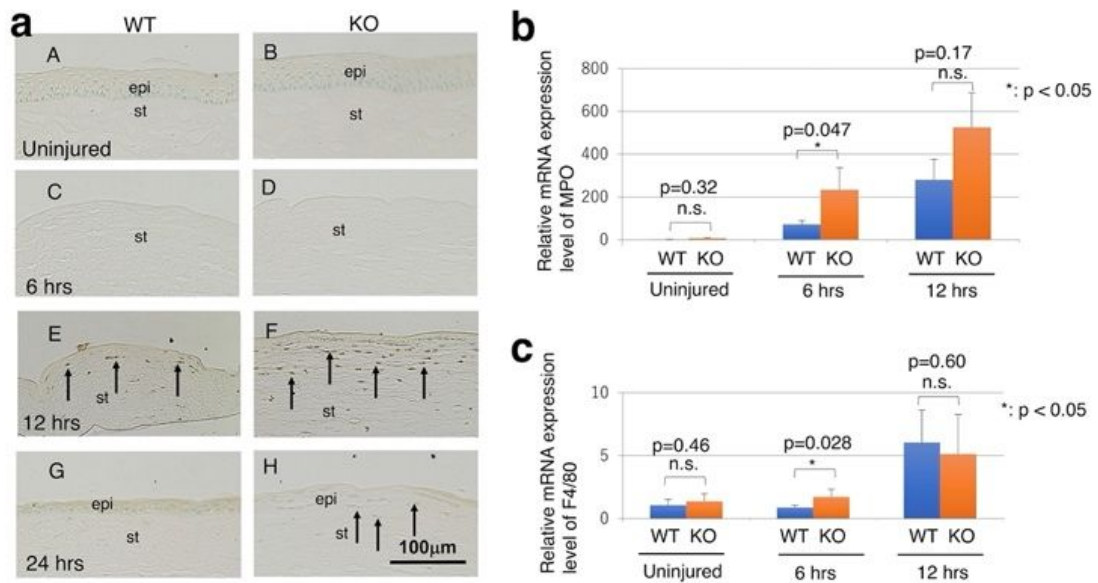


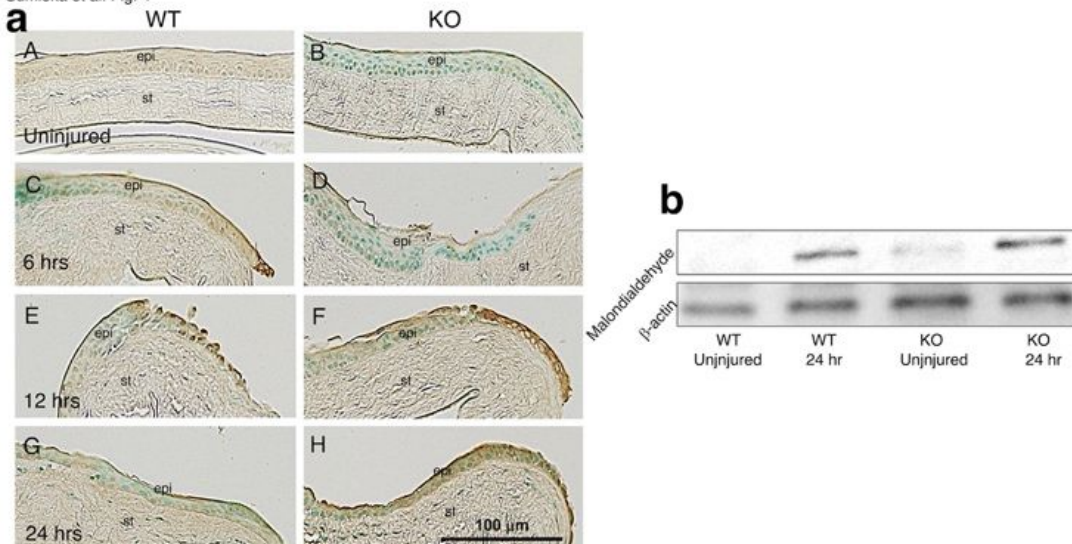
Fig. 2



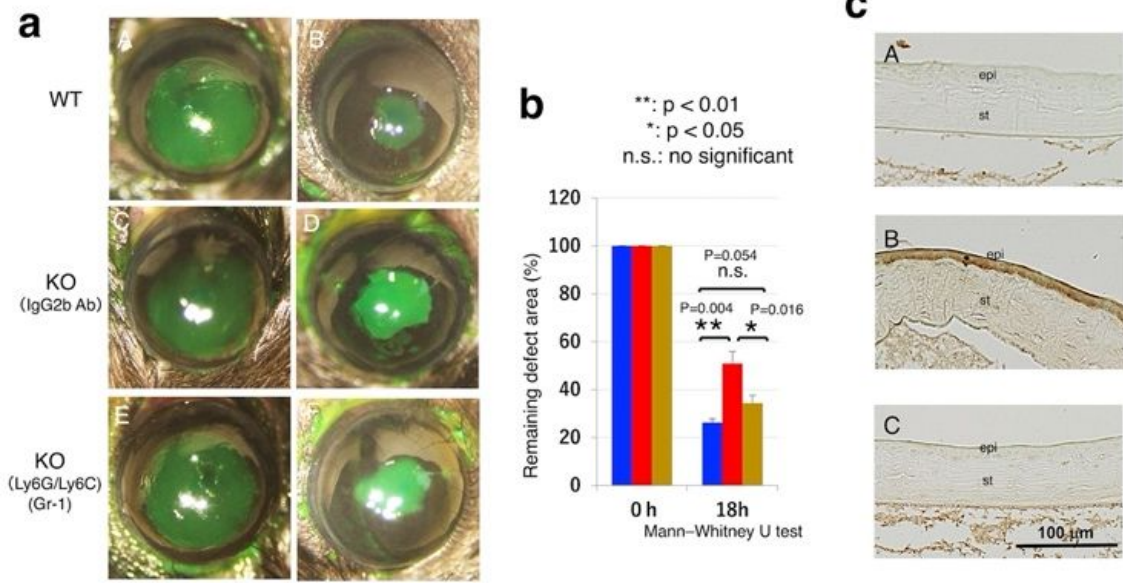
Sumioka et al. Fig. 3



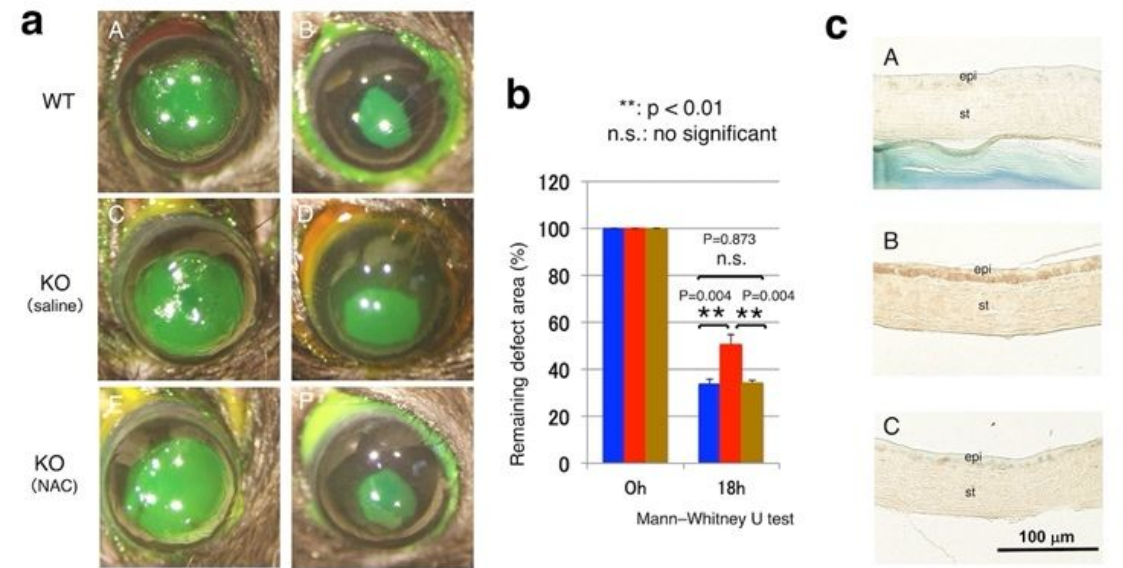
Sumioka et al. Fig. 4



Sumioka et al. Fig. 5



Sumioka et al. Fig. 6



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Sumioka T, Iwanishi H, Okada Y, Miyajima M, Ichikawa K, Reinach PS, Matsumoto KI, Saika S.	4. 巻 101
2. 論文標題 Impairment of corneal epithelial wound healing is association with increased neutrophil infiltration and reactive oxygen species activation in tenascin X-deficient mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 690-700
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-020-00505-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Okada Y, Sumioka T, Reinach PS, Miyajima M, Saika S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Roles of Epithelial and Mesenchymal TRP Channels in Mediating Inflammatory Fibrosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Flontier Immunology	6. 最初と最後の頁 731674
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2021.731674.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Sumioka T, Iwanishi H, Okada Y, Miyajima M, Ichikawa K, Reinach PS, Matsumoto KI, Saika S.	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Impairment of corneal epithelial wound healing is association with increased neutrophil infiltration and reactive oxygen species activation in tenascin X-deficient mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-021-00576-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yasuda S, Sumioka T, Iwanishi H, Okada Y, Miyajima M, Ichikawa K, Reinach PS, Saika S.	4. 巻 101
2. 論文標題 Loss of sphingosine 1-phosphate receptor 3 gene function impairs injury-induced stromal angiogenesis in mouse cornea	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 245-257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-020-00505-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Takada Y, Yamanaka O, Okada Y, Sumioka T, Reinach PS, Saika S.	4. 巻 6
2. 論文標題 Effects of a prostaglandin F2alpha derivative glaucoma drug on EGF expression and E-cadherin expression in a corneal epithelial cell line.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cutan Ocul Toxicol.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15569527.2020.1722152.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nidegawa-Saitoh Y, Sumioka T, Okada Y, Reinach PS, Flanders KC, Liu CY, Yamanaka O, Kao WW, Saika.	4. 巻 374(2)
2. 論文標題 Impaired healing of cornea incision injury in a TRPV1-deficient mouse.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 323-338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-018-2878-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 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.	4. 巻 99
2. 論文標題 Sensory nerve supports epithelial stem cell function in healing of corneal epithelium in mice: the role of trigeminal nerve transient receptor potential vanilloid 4.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 210-230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-018-0118-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Usui-Kusumoto K, Iwanishi H, Ichikawa K, Okada Y, Sumioka T, Miyajima M, Liu CY, Reinach PS, Saika S.	4. 巻 181
2. 論文標題 Suppression of neovascularization in corneal stroma in a TRPA1-null mouse.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 90-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2019.01.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Sumioka T, Okada Y, Iwanishi H, Yamanaka O, Miyajima M, Matsumoto K, Saika S.
2. 発表標題 Impairment of cornea epithelial wound healing in a Tenascin X-deficient mouse.
3. 学会等名 Annual Meeting of ARVO (the Association for Research in Vision and Ophthalmology) (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Sumioka T, Okada Y, Iwanishi H, Yamanaka O, Takada Y, Ichikawa K, Miyajima M, Matsumoto K, Saika S.
2. 発表標題 Loss of tenascin X impaired corneal epithelial wound healing in mice.
3. 学会等名 Gordon Research Conferences (Biology & Pathobiology of The Cornea) (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Takayoshi Sumioka
2. 発表標題 Loss of tenascin X gene function impairs injury-induced stromal angiogenesis in mouse corneas.
3. 学会等名 京都コルネアクラブ
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Takayoshi Sumioka, Yuka Okada, Hiroki Iwanishi, Osamu Yamanaka, Masayasu Miyajima, Ken-ichi Matsumoto, Shizuya Saika
2. 発表標題 Impairment of corneal epithelial wound healing in a Tenascin X-deficient mouse model
3. 学会等名 2018 The Catholic University - Wakayama Medical University Joint Meeting on Ophthalmology and Visual Science (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Takayoshi Sumioka, Yuka Okada, Hiroki Iwanishi, Osamu Yamanaka, Masayasu Miyajima, Ken-ichi Matsumoto, Shizuya Saika
2. 発表標題 Impairment of cornea epithelial wound healing in a Tenasin X-deficient mouse
3. 学会等名 ARVO2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 住岡孝吉、岡田由香、山中 修、岩西宏樹、宮嶋正康、松本健一、雑賀司珠也
2. 発表標題 角膜上皮創傷治癒過程におけるテネインXの役割
3. 学会等名 第122回日本眼科学会
4. 発表年 2018年～2019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
研究分担者	雑賀 司珠也 (Saika Shizuya) (40254544)	和歌山県立医科大学・医学部・教授 (24701)	
研究分担者	岡田 由香 (Okada Yuka) (50264891)	和歌山県立医科大学・医学部・教授 (24701)	
研究分担者	山中 修 (Yamanaka Osamu) (50254545)	和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員 (24701)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	平井 秀一 (Hirai Syu-ichi) (80228759)	和歌山県立医科大学・医学部・教授 (24701)	
研究分担者	松本 健一 (Matsumoto Ken-ichi) (30202328)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授 (15201)	
研究分担者	小出 隆規 (Koide Takaki) (70322253)	早稲田大学・理工学術院・教授 (32689)	

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