

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16932

研究課題名（和文）TRPチャンネルに着目したPG製剤角膜上皮障害の治療戦略

研究課題名（英文）The treatment strategy for corneal epithelial disorder by PG analog focusing on TRP channel

研究代表者

高田 幸尚（TAKADA, YUKIHISA）

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70647495

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：薬剤性角膜上皮障害は角膜知覚神経障害は深く関与し、角膜知覚に關与するTRPチャンネルに注目した。そこでTRPV1欠失マウスを用いてPG-F2 製剤による角膜知覚神経への影響を検討した。今回の研究結果から、PG-F2 製剤主薬は長期にわたる点眼により角膜知覚の低下をもたらすものの、角膜知覚神経の走行や形態異常はみられなかった。この結果は、野生型マウス、TRPV1欠失マウスともにみられたことからPG-F2 製剤主薬による角膜知覚低下はTRPV1制御でレスキューされていないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障点眼治療において、眼圧下降効果が最も高い第一選択薬であるPG-F2 製剤による薬剤性角膜上皮障害は治療継続において時に重要な問題となる。これまでは薬剤による角膜毒性に注目され、他剤への変更が主な選択肢であった。角膜知覚に關与するTRPVチャンネルに着目してPG-F2 製剤による角膜知覚のレスキュー効果を検討することで薬剤性角膜上皮障害に対する治療戦略の構築を目指したが、TRPV1の制御はPG-F2 製剤による角膜知覚低下をレスキューしないことがわかった。

研究成果の概要（英文）：Drug-induced corneal epithelial disorder is involved in corneal sensory neuropathy, and we focused on the TRP channel. Therefore, we examined the effect of PGF2 alpha analog on corneal sensory nerves using TRPV1 KO mice. Based on the results of the this study, Corneal perception was reduced due to long term eye drop of ingredient of PGF2 alpha analog. However, there were no change in the shape of corneal sensory nerve. These results were observed in both wild type mice and TRPV1 KO mice, therefore these were suggested that the reduction in corneal perception caused by ingredient of PG analog was not rescued by TRPV1 control.

研究分野：角膜

キーワード：薬剤性角膜上皮障害

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

緑内障は中途失明原因の最上位疾患で、エビデンスを有する唯一の有効な治療法は眼圧下降である。眼圧下降は点眼薬による治療が主であり、進行を十分抑制できるレベルの眼圧下降を得られない場合に手術療法が選択される。緑内障治療の第一選択薬はプロスタグランジン (PG) - F2 製剤である。しかし時には重症の薬剤性角膜上皮障害が理由で緑内障点眼薬の使用を中止や変更を余儀なくされ、手術療法を選択せざるを得ないケースも存在する。薬剤性角膜上皮障害は点眼薬に含まれる化合物 (主薬、添加物) により角膜上皮細胞の増殖、遊走、接着が変化し、重層扁平上皮のターンオーバーによる生理的な動的平衡 (恒常性) が破綻した状態である。

また、他の研究者から生体内共焦点顕微鏡を用いた臨床報告として PG-F2 製剤による角膜知覚神経障害の可能性が報告されているが、主薬と添加物である防腐剤の塩化ベンザルコニウムの影響を分けて検討は十分になされていない。また、マウスを用いた基礎実験で PG-F2 製剤による角膜知覚神経障害に関する報告はない。

国内で承認を受けている先発品のプロスタグランジン (PG) - F2 製剤の中でトラバタンズ® (主薬トラボプロスト) のみ防腐剤として塩化ベンザルコニウムを含有しておらず、それ以外は濃度が異なるが塩化ベンザルコニウムを含有している。

近年、三叉神経を含む角膜知覚神経機能に関わるイオンチャネル受容体の機能が明らかにされつつあり、その中心的な分子群が transient receptor potential (TRP) チャネルである。TRP チャネルと角膜知覚神経の障害の関連が注目され、角膜上皮の傷害、創傷治癒、瘢痕化などとの関係が報告されている。

これまで PG-F2 製剤による角膜上皮障害に対しては、臨床的にも基礎研究においても防腐剤の塩化ベンザルコニウムの影響が主に報告されてきたが、主薬自体の作用が角膜上皮障害の一因となることを研究代表者はこれまで Annual Meeting Association for Research in Vision Ophthalmology (2016 年、2017 年)、Gordon Research Conferences (2016 年)、日本眼科学会総会 (2016 年) などの国内外の学会にて発表を行ってきた。また、本科研費採択後に、主薬の影響について、臨床研究 (高田幸尚 他: 同一プロスタグランジン主薬の単回使用製剤へ変更後の角膜上皮障害の変化. 眼科. 863-867. 2019)、基礎研究 (Takada Y, et al: Effects of a prostaglandin F2alpha derivative glaucoma drug on EGF expression and E-cadherin expression in a corneal epithelia cell line. Cutan Ocul Toxicol. 75-82. 2020) を報告した。

近年、TRPV1 の神経毒性増強作用 (遅発性アポトーシス増強) が報告されている。TRPV1 は PG-E に反応することが知られているが、PG-F2 との関係性は報告されていない。同じ PG 系であることから、所属教室における角膜障害部位における TRPV1 の発現亢進と合わせて、PG-F2 製剤による角膜障害の背景に角膜神経障害が存在し、その要因に TRPV1 のニューロンでのアポトーシス増強作用が関与している可能性を考える。それらの関連性を検索することで、PG-F2 製剤による薬剤性角膜上皮障害の新しい機序の提言につながるものと考ええる。

2. 研究の目的

本研究では、緑内障点眼治療において対応が必要とされる課題の一つである PG-F2 製剤による薬剤性角膜上皮障害の原因究明を目的とする。これまでに PG-F2 製剤による角膜上皮への細胞毒性について臨床、基礎研究がなされてきた。神経障害に関して PG-F2 製剤での角膜知覚神経障害の臨床報告はあるが、PG-F2 主薬そのものによる検討はなされていない。申請者の所属の研究の角膜障害モデルでは障害部位に TRPV1 の発現を認める。また、近年 TRPV1 による神経毒性 (アポトーシス増強) の報告があるため、PG-F2 製剤と角膜障害に TRPV1 の関与が示唆される。その解明に PG-F2 主薬による角膜神経への影響と TRPV1 の関係について研究を行う必要がある。

そこで、新しい薬剤性角膜上皮障害に関与する因子として角膜知覚神経毒性の関与について、所属教室がこれまで行ってきた TRP シグナルの研究結果に立脚して、TRPV1 遺伝欠失マウスを用いて、PG-F2 主薬による角膜神経への影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) TRPV4 欠失マウスに、トラボプロスト (臨床使用濃度) を 1 日 1 回、1 週間点眼、トラボプロストを 1 日 1 回、1 か月点眼、PBS を 1 日 1 回、1 か月点眼した後にと殺、眼球摘出、ホルマリン固定、免疫組織化学染色法 (TuJ1) 施行し、角膜神経走行を比較する。

(2) C57BL6 マウスにトラボプロストあるいは PBS を 1 日 1 回、1 か月点眼した後に眼球摘出、電子顕微鏡検査にて角膜神経を比較する。

(3) C57BL6 マウスあるいは TRPV4 欠失マウスに、トラボプロストあるいは PBS を 1 日 1 回、1 か月点眼後にコシュボ角膜知覚計を用いて角膜知覚を測定、トラボプロストあるいは PBS を

1日1回、1か月点眼した後に直径2.0大の角膜上皮欠損作成し、角膜上皮欠損の修復後にコシュボネ角膜知覚計を用いて角膜知覚を測定し、多重比較検定(Turkey-Kramer法)で比較検討を行った。

4. 研究成果

(1) TuJ1の免疫組織化学染色法の結果から、トラボプロストの1週間点眼、トラボプロストの1か月点眼、PBSの1か月点眼による角膜知覚神経の走行に差は認めなかった。(図1)

(2) 電子顕微鏡写真からトラボプロストあるいはPBSの点眼による角膜神経の違いはわからなかった。

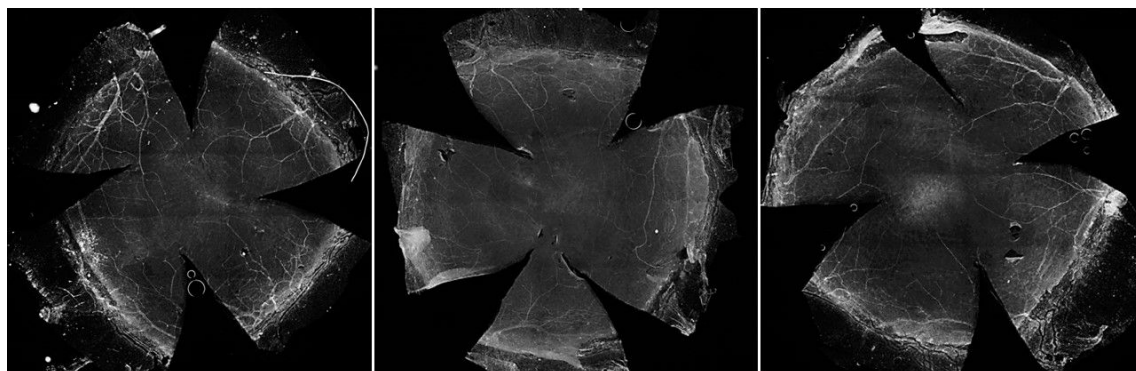
(1)(2)の結果から当初予定していたが、トラボプロストを点眼により角膜知覚神経の形態変化がC57BL6マウスでみられなかったため、TRPV4欠失マウスを用いた同実験系を行わなかった。

(3) PBSを点眼したC57BL6マウス群、トラボプロストを点眼したC57BL6マウス群、PBSを点眼したTRPV4欠失マウス群、トラボプロストを点眼したTRPV4欠失マウス群のコシュボネ角膜知覚計の圧迫値は各々 $1.76 \pm 0.20 \text{g/mm}^3$ 、 $2.35 \pm 0.27 \text{g/mm}^3$ 、 $1.67 \pm 0.23 \text{g/mm}^3$ 、 $2.21 \pm 0.31 \text{g/mm}^3$ であった。C57BL6マウスおよびTRPV4欠失マウスともにPBS点眼群に比してトラボプロスト点眼群で有意に高値であった。しかし、PBSを点眼したC57BL6マウス群とTRPV4欠失マウス群では有意差はなく、トラボプロストを点眼したC57BL6マウス群とTRPV4欠失マウス群でも有意差はなかった。また、PBSを点眼したTRPV4欠失マウス群に比してトラボプロストを点眼したC57BL6マウス群では有意に高値であった。(図2左)

PBSを点眼したC57BL6マウス群、トラボプロストを点眼したC57BL6マウス群、PBSを点眼したTRPV4欠失マウス群、トラボプロストを点眼したTRPV4欠失マウス群のコシュボネ角膜知覚計の圧迫値は各々 $1.78 \pm 0.21 \text{g/mm}^3$ 、 $2.56 \pm 0.16 \text{g/mm}^3$ 、 $1.76 \pm 0.20 \text{g/mm}^3$ 、 $2.42 \pm 0.35 \text{g/mm}^3$ であった。C57BL6マウスおよびTRPV4欠失マウスともにPBS点眼群に比してトラボプロスト点眼群で有意に高値であった。しかし、PBSを点眼したC57BL6マウス群とTRPV4欠失マウス群では有意差はなく、トラボプロストを点眼したC57BL6マウス群とTRPV4欠失マウス群でも有意差はなかった。また、PBSを点眼したTRPV4欠失マウス群に比してトラボプロストを点眼したC57BL6マウス群では有意に高値であり、PBSを点眼したC57BL6マウス群と比してトラボプロストを点眼したTRPV4欠失マウス群では有意に高値であった。(図2右)

以上から、トラボプロストの点眼で角膜神経の形態的变化は確認できず、トラボプロスト点眼群でC57BL6マウスおよびTRPV4欠失マウスともに角膜知覚の低下はみとめるも、TRPV4の制御は角膜知覚に影響がないことが示唆された。

図1:免疫組織化学染色法(TuJ1)



PBS点眼

トラボプロスト点眼 (1週間)

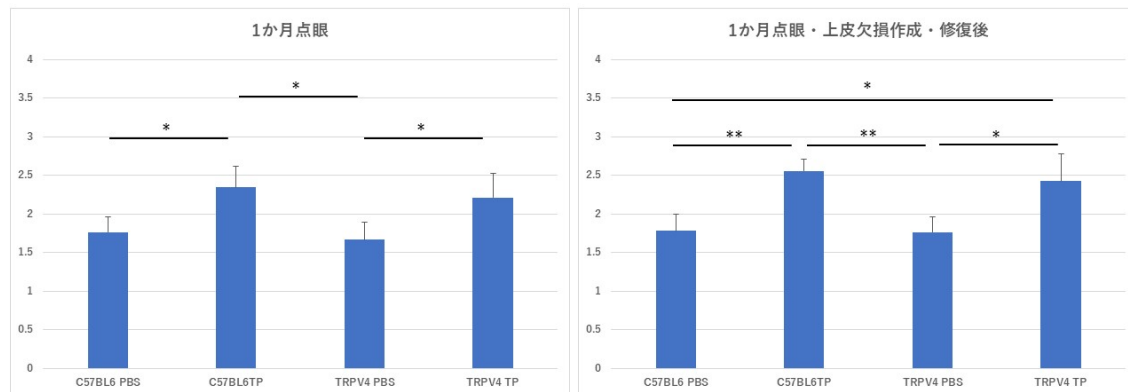
トラボプロスト点眼 (1か月)

図 2：角膜知覚（コシュボネ角膜知覚計）

C57BL6 PBS:PBS を点眼した C57BL6 マウス群、C57BL6 TP: トラボプロストを点眼した C57BL6 マウス群、TRPV4 PBS:PBS を点眼した TRPV4 欠失マウス群、TRPV4 TP: トラボプロストを点眼した TRPV4 欠失マウス群。多重比較検定（Turkey-Kramer 法）。*: $p<0.05$, **: $p<0.01$

左図：トラボプロストあるいは PBS を 1 日 1 回、1 か月点眼後にコシュボネ角膜知覚計を用いて角膜知覚を測定。

右図：トラボプロストあるいは PBS を 1 日 1 回、1 か月点眼した後に直径 2.0 大の角膜上皮欠損作成し、角膜上皮欠損の修復後にコシュボネ角膜知覚計を用いて角膜知覚を測定



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------