

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18887

研究課題名（和文）細胞膜TRPイオンチャネルを標的にした菌体成分による角膜実質炎症の抑制戦略の樹立

研究課題名（英文）Elucidation of the role of TRPA1 channel in bacterial keratitis

研究代表者

山口 雄大（Yamaguchi, Yudai）

和歌山県立医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：20816748

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：LPSを用いた細菌性角膜炎モデルマウスを作成し、TRPA1ノックアウトマウスにおいて野生型マウスと比較して角膜炎症反応が軽微であること、またTRPV4マウスと野生型では明らかな差異を認めなかったことをin vivoで確認した。LPS濃度をより高い濃度とすることで、野生型とTRPA1ノックアウトモデルで、より炎症反応の差異があることが明らかとなった。TNF- α 、MPO、IL-6、F4/80、1型コラーゲンの角膜での発現を比較し、いずれにおいてTRPA1ノックアウトマウスで抑制されていることを確認した。TRPA1の制御により細菌性角膜炎の角膜混濁をコントロール出来る可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌性角膜炎は若年患者に重篤な視力障害を残す疾患であり、社会に与える影響は大きい。視力低下を残さないためには、適切な角膜の線維瘢痕化を含んだ炎症反応のコントロールが必要である。炎症反応の抑制には一般的にステロイドが用いられるが、細菌感染におけるステロイドの使用は注意が必要である。以上のことからステロイドを用いない炎症反応の抑制治療の解明が必要である。TRPA1の制御によって細菌性角膜炎モデルマウスの角膜混濁の抑制を認めることが判明したため、さらなる研究を重ねることで角膜線維瘢痕化抑制の特効薬を開発出来る可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We created a bacterial keratitis model mouse using LPS, and found that the corneal inflammatory response was slight in TRPA1 knockout mice compared to wild-type mice, and that there was no clear difference between TRPV4 mice and wild-type mice. Higher LPS concentrations revealed a greater difference in inflammatory response between wild-type and TRPA1 knockout models. We compared the expressions of TNF- α , MPO, IL-6, F4/80, and type 1 collagen in the cornea, and confirmed that they were suppressed in TRPA1 knockout mice. Controlling TRPA1 may control corneal opacity in bacterial keratitis.

研究分野：感染症

キーワード：TRPA1 TRPV4 LPS

1. 研究開始当初の背景

炎症性角膜疾患は組織の構築及び視機能に重大な障害を引き起こす。重症では角膜の混濁、瘢痕形成、穿孔等に伴い永続的な視機能喪失を引き起こす可能性がある。アルカリ暴露に続く化学的な炎症以外に創部に細菌感染を併発すると細菌性角膜炎の病態を取り、抗菌薬による細菌の除去だけでなく適切な炎症反応の抑制による線維・瘢痕化抑制が角膜の透明性維持に必要である。細菌組織局所では一部の菌種では菌体由来の酵素による組織破壊が伴うものの、主たる組織破壊の原因は菌体成分に対する免疫反応とそれに続く炎症細胞浸潤である。適切な感受性を有する抗菌薬の使用で微生物を排除することは可能だが、感染によって引き起こされた免疫・炎症過程の収束が遅れるため、角膜実質の炎症性線維・瘢痕化が惹起される。免疫反応を制限することは、炎症と瘢痕化の抑制に有益な反面、細菌増殖を助長することで治療を妨げる可能性がある。従って良好な視機能を維持しつつ細菌性角膜炎を治療するためには細菌の除去を妨げることなく適切な抗炎症が望まれ、治療効果と安全性を両立した新規の治療戦略の確立が必要である。

リポポリサッカライド (LPS) はグラム陰性細菌の細胞壁構成成分であり、脂質及び多糖から構成される糖脂質である。グラム陰性菌感由来の LPS は免疫細胞中の主として Toll-like receptor 4 (TLR4) によって形成される蛋白質複合体に結合する。これにより炎症及び痛みを誘導し、各種炎症性サイトカインの発現を誘発する。細菌性角膜炎モデルとして LPS を角膜実質へ投与することにより効果的に角膜炎症を誘発することが報告されている。上記のように LPS によって誘発される反応は主に TLR4 に起因していると考えられていた。しかし、最近の研究では LPS が transient receptor potential (TRP) ファミリー[後述(1)で解説]のいくつかを活性化するということが報告された[他施設の報告を後述(2)する]。

(1) TRP チャンネルとは

TRP チャンネルとは、感覚神経に特異的に発現して侵害刺激受容に関わる細胞膜イオンチャンネル型受容体の中心的存在である。TRP チャンネル群には7つのサブファミリーがある。プロトタイプの TRPV1 は、感覚神経細胞、上皮細胞などに発現され、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される。同様に TRPA1 や TRPV4 も複数の特異的リガンドや一定温度で活性化する。TRPA1 はわさびの成分(アリルイソチアシアネート)、一部の内因性プロスタグランジン、一酸化窒素などで活性化される。TRPV4 は最も TRPV1 に相同性を持ち、エンドカンナビノイド、アラキドン酸代謝産物、機械刺激、特異的温度(27~35度)、浸透圧などで活性化される。それぞれの活性化により陽イオン流入から細胞興奮を経て、細胞挙動を制御する。

申請者の所属の研究ではこれまでに今回のテーマに合致する TRPA1 と TRPV4 遺伝子欠失マウスにおいて野生型マウスに比べてアルカリ外傷後の角膜炎症が抑制されることを報告している(Okada Y et.al. Lab Invest. 2014; Okada Y et.al. Am J Pathol. 2011; Okada Y et.al. PLoS ONE. 2016)。角膜切開創の創傷治癒においても TRPV1 欠失マウスで治癒が遅延することを報告しており(Nidegawa-Saitoh Y, et.al. Cell and Tissue Res. 2018)、いずれの研究でも角膜損傷後のマクロファージや IL-6 等の炎症細胞浸潤が抑制されるということが判明している。

(2) TRP チャンネルファミリーと LPS の関係に関する過去の報告

LPS によって引き起こされる神経原性炎症は侵害受容性ニューロンにおける TRPA1 チャンネル活性化に主に依存し、TLR4 活性化とは独立して発生するということが他施設から初めて報告された。(Meseguer et.al. Nat Commun. 2014)。その後の研究で LPS によって引き起こされる神経原性炎症において、同じ研究グループによって TRPV4 などの関与も明らかにされた(Boonen et.al. Cell Calcium. 2018)。TRPV4 は気道上皮細胞で LPS によって活性化され、一酸化窒素合成酵素の誘導と一酸化窒素産生による殺菌効果や様々な即時防御応答を引き起こす。また腸上皮細胞における TRPV4 の活性化は種々の炎症性サイトカイン産生を誘導し、炎症性応答を調節している。これらの報告より TRPV4 は侵入する細菌に対する防御応答のための遺伝子座と考えられている。しかし、視力維持に脅威となる細菌性角膜炎などでの TRPV1 や TRPV4 の役割は検討されていない。

以上のことより TRPA1 または TRPV4 欠失マウスと LPS による角膜炎症の関連を検討する意義は非常に高いと考えた

2. 研究の目的

申請者の所属では角膜アルカリ外傷(重症角膜外傷)モデル、上皮欠損モデル、実質切開モデル、新生血管モデルや培養細胞を用いた研究から TRP チャンネルの遺伝子欠失マウスにおける創傷治癒における TRP チャンネルの役割について多くの研究成果を報告してきた。本研究では所属の研究結果から得られた知見を、細菌性角膜炎の病態解明や新規治療法の開発につなげることを目的とする。これまでに TRP チャンネルと他組織の感染症に関する報告はあるが、細菌性

角膜炎に関する報告はなく、無血管で神経を豊富に有する角膜を用いた研究は、他組織での同様の実験とは大きく異なるといえる。細菌性角膜炎における TRP チャンネルの役割を解明することで、TRPA1 と TRPV4 チャンネル受容体の機能調節による新たな治療法の開発の手がかりとなることを目指す。

3. 研究の方法

(1) LPS を用いた角膜炎マウスモデルの角膜創傷治癒検討

野生型マウス、及び TRPA1 または TRPV4 欠失マウス角膜に対して緑膿菌由来の LPS (富士フィルム和光純薬株式会社)を用いて角膜炎モデルを作成する。マウス角膜に 5 μ l のハミルトンシリンジに取り付けられた 30 ゲージ針を用いて角膜実質へと LPS を注入することで角膜炎を誘発する。LPS は 10 μ g (2 mg/ml) を生理食塩水で希釈して使用する。注入 3、7、14 日後にマウスを屠殺し、摘出した角膜のパラフィン切片で HE 染色にて角膜実質の治癒具合を観察比較し、 α 平滑筋アクチン (α SMA、筋線維芽細胞マーカー)、ミエロペルオキシダーゼ (MPO、好中球マーカー)、F4/80 (マクロファージマーカー)、各種炎症性サイトカイン、神経ペプチド (substance P、CGRP、NGF など)、MAP キナーゼなどのシグナル伝達系 (ERK、JNK、p38、NF- κ B コンポーネントのリン酸化)、各種細胞外マトリックスなどの発現を免疫染色法で検討し、炎症細胞浸潤と炎症レベルなどを評価する。また角膜のみを摘出し RNA を抽出 (Sigma 社キット) 後に所属に設置されている Applied Biosystem 社 TaqMan real-time RT-PCR (delta/delta CT 法) で、炎症性遺伝子、SMA、collagen 1 α 1、F4/80、MPO の mRNA 発現を real-time RT-PCR で評価し、Mann-Whitney U テストで統計処理を行う。全行程で岡田由香准教授、岩西宏樹講師の指導を得る。可能な限り手技は申請者で行うが、必要時最低限の範囲で研究補助員 2 名の協力を得る。これらの手技は全て所属の研究室でルーチンに稼働し、所属から原著論文に記載されている。

(2) 遺伝子欠失マウス由来の培養眼線維芽細胞及び培養マクロファージの LPS 添加による炎症性サイトカインや線維化関連遺伝子の発現と細胞内シグナル伝達の検討

所属の既報に従って野生型及び TRPA1 または TRPV4 欠失マウス生後 1 日の眼球由来の培養眼線維芽細胞を得る (Saika et al. Am J Pathol 2005; Okada et al. Am J Pathol 2011)。初期コンフルエントの状態に LPS (10 μ g/ml) を添加し、15、30 分、1、2、4、6、8 時間後に、シグナル伝達物質 (Smad3、p38、Erk、JNK、Erk) のリン酸化を Western blot 法で検討する。また、初期コンフルエントの状態で各種炎症性サイトカイン発現を上記同様に real-time RT-PCR (24 時間後) で評価する。

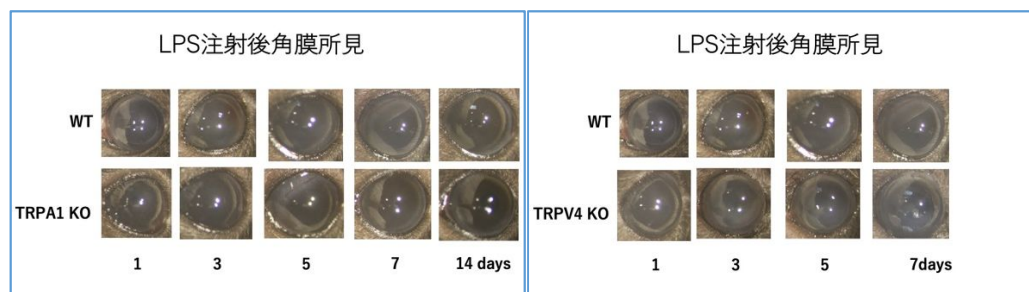
所属の既報に従って野生型及び TRPA1 または TRPV4 欠失マウスから 5% グリコーゲン刺激 4 日後の腹腔からマクロファージを得る (Saika et al. Am J Pathol 2005; Okada et al. Am J Pathol 2011)。上記同様に各種シグナル伝達のリン酸化を Western blot 法での検討と各種炎症性サイトカイン発現の real-time RT-PCR による検討を行う。各種可能な限り手技は申請者で行うが、必要時最低限の範囲で研究補助員 2 名の協力を得る。これらの手技は全て所属の研究室でルーチンに稼働し、所属から原著論文に記載されている。

(3) 薬剤による TRP チャンネル制御タイミングと角膜創傷治癒反応の關係の検討

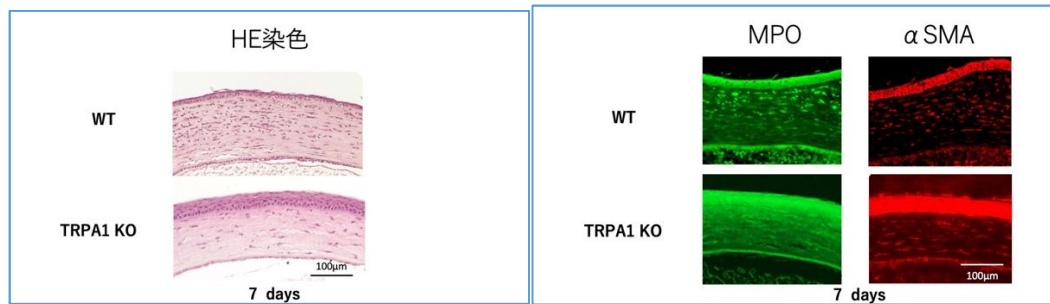
LPS 炎症のどのステージでの TRPA1 または TRPV4 の阻害が透明治癒の観点から最も治療効果を発揮するかを検討する。野生型マウスに LPS 角膜炎モデルを作成し、以下の投与開始時期で TRPA1 アンタゴニスト [HC-030031 (100 mg/kg) または TRPV4 アンタゴニスト [HC-067047 (10mg/kg)] またはコントロール (LPS 接種当日から) として基剤のみを毎日全身 (腹腔) 投与 (1 回 / 日) する。具体的には LPS 接種後、3 日、6 日、10 日の 3 通りのアンタゴニスト投与開始日を設定する。それぞれの投与開始日のグループでコントロール群と、LPS 接種から 14 日目でマウスを屠殺し、(1) と同様の評価を行う。

4. 研究成果

LPS を用いた角膜炎マウスモデルを用いて、野生型と比較して TRPA1 欠失マウス、TRPV4 欠失マウスではいずれも角膜線維癭痕化や炎症反応が抑制されていることを確認した。角膜混濁については特に TRPA1 欠失マウスにおいて最も抑制されていた。



以上の結果より、TRPA1 欠失マウスの角膜切片を用いて組織学的に細胞浸潤を評価した。



TRPA1 欠失マウスでは HE 染色でも、免疫染色においても明らかに角膜実質への細胞浸潤が抑制されていることを確認した。その後は real time RT-PCR を行い統計学的に炎症性サイトカインについて評価予定であるが、角膜炎マウス誘発手技の困難さから未だ検査のための十分量の角膜 RNA を得られていない。明らかに TRPA1 欠失マウスにおいて LPS に対する炎症反応の抑制が得られることは確認できたため、今後は角膜実質内への LPS 直接注射ではなく、角膜切開を加えた上で LPS 点眼等のモデルへと変更した上での実験継続を検討している。また、角膜炎モデルだけでなく細菌性眼内炎モデルにおいても、同様に TRPA1 欠失マウスでは炎症反応の抑制が得られることが想像されるため細菌性眼内炎モデルマウスについても同様の実験を行う予定としている。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 山口雄大
2．発表標題 細菌性角膜炎におけるTRPイオンチャネルの役割解明とそれに着目した治療戦略の確立
3．学会等名 第126回日本眼科学会
4．発表年 2022年

1．発表者名 山口雄大
2．発表標題 細菌性角膜炎におけるTRPイオンチャネルの役割
3．学会等名 第54回日本結合組織学会
4．発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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