

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09814

研究課題名(和文) 眼表面の乾燥検出を調節する鍵物質アセチルコリンの役割 ドライアイとの関連性

研究課題名(英文) Novel regulatory mechanisms of corneal nerves by acetylcholine in the detection of ocular dryness

研究代表者

益岡 尚由 (MASUOKA, Takayoshi)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：80509307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、眼表面の知覚や恒常性維持に重要な役割を担う角膜感覚神経が内因性アセチルコリンによる制御を受けているかを明らかにし、さらに眼表面疾患ドライアイにおけるこの制御機構の変調が病態に関与しているかを解明する実験を実施した。モルモットの角膜において感覚神経は、特に冷感受性を示す神経線維で 4ニコチン性アセチルコリン受容体を介した興奮性制御を強く受けていた。また、アセチルコリンの合成と遊離は、主に角膜上皮細胞層基底部分の上皮細胞で行われることが判明した。さらに、ドライアイモデルモルモットでは、正常な動物と比べてニコチン受容体刺激に対する角膜神経の興奮や瞬目反応に違いがあることも示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、角膜におけるアセチルコリンを介した感覚神経の制御機構の一端を明らかにすることができた。また、角膜神経を調節する 4ニコチン性アセチルコリン受容体が、ドライアイの自覚症状を改善する治療薬の標的のひとつになり得ることを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, the regulatory system of corneal sensory nerves by endogenous acetylcholine and its relevance to dry eye were examined using guinea pigs. We found that the excitation of corneal sensory nerves, especially cold-sensitive ones, is controlled by nicotinic acetylcholine receptors containing alpha 4 subunits. Endogenous acetylcholine in the cornea is mainly synthesized and released by epithelial cells located in the basal portion of epithelium. The excitation of corneal nerves and blinking induced by stimulation of nicotinic receptor are changed in dry eye model guinea pigs.

研究分野：眼薬理学

キーワード：角膜神経 アセチルコリン ニコチン受容体 ドライアイ

1. 研究開始当初の背景

ドライアイは、涙液層の不安定化に加え、目の乾燥感・不快感、疲れ、視覚障害など様々な自覚症状を引き起こす慢性疾患であり、その自覚症状は生活の質(QOL)を著しく低下させることが知られている。したがって、治療において自覚症状を抑えることが非常に重要であるが、現在までに自覚症状を直接抑える治療薬の開発には至っておらず、その発生メカニズムの解明と治療薬の開発は喫緊の課題である。

涙液の基礎分泌や目の乾燥感・不快感は、涙液蒸発に伴う眼表面の温度低下や浸透圧上昇を検出する角膜の冷感受性感覚神経の興奮と関連している。しかし、本神経の興奮がどのような内因性物質により制御されているかについてはまだ十分に理解が進んでいない。近年、副交感神経からのアセチルコリンシグナルは近傍にある侵害受容性感覚神経を直接興奮させて片頭痛の発生に関与していることが指摘されている(Shelukhina et al., *Front Neurol*, 2017)。一方で、角膜表面にはアセチルコリン含有量が高い上皮細胞(Chernyavsky, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014)や副交感神経終末(Xue et al., *Mucosal Immunology*, 2018)が密に分布していることから、角膜冷感受性感覚神経の活動を制御する機構のひとつとして内因性アセチルコリンが関与しており、涙液分泌や乾燥感・不快感誘発の制御に関わる重要な仲介物質ではないかとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、角膜感覚神経の制御において内因性アセチルコリンに焦点を当て、(1)アセチルコリンがどこから遊離されて、(2)冷感受性神経の興奮性にいかなる影響を与えているか明らかにする。また、(3)涙液分泌の減少や眼乾燥感を伴う疾患であるドライアイにおいて本制御機構がどのように変化しているかを明らかにする。本研究を通して、生理的条件下におけるアセチルコリンを基軸にした涙液基礎分泌の調節機構ならびに眼表面の感覚制御機構を解明すると同時に、ドライアイの自覚症状との関連性を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

角膜感覚神経に対するアセチルコリンの作用は、角膜組織標本を用いたシングルユニット記録ならびに角膜神経初代培養細胞を用いたカルシウムイメージングならびにパッチクランプ実験で計測した。シングルユニット記録は、4週齢のHartley雄性モルモットからケタミン・キシラジン麻酔下で摘出した角膜組織標本を用いた。34の生理食塩液を灌流するチャンバー内に摘出標本を固定して、ガラス電極を角膜表面に押し当てることで感覚神経終末の発火活動を記録した。標本に冷刺激を与え発火活動の増加がみられることを確認したのち、アセチルコリン受容体リガンドを灌流して薬物の発火活動に対する効果を測定した。角膜神経初代培養細胞は、麻酔下で4週齢モルモットの角膜表面に逆行性トレーサー(FM1-43)を浸潤させて角膜に内在する神経の細胞体を蛍光標識した。4日後、モルモットをイソフルラン深麻酔下で断頭致死させて、細胞体が存在する三叉神経節を摘出し初代培養細胞を作製した。その後、培養細胞にアセチルコリン受容体リガンドを灌流して、細胞内カルシウム濃度変化を蛍光カルシウムインジケーターFura-2を用いて、膜電流をパッチクランプ法で計測した。

アセチルコリン合成酵素の発現については、ウエスタンブロッティングと免疫組織染色により分布を明らかにした。ウエスタンブロッティングには、イソフルラン吸入麻酔下で断頭致死させた4-6週齢のモルモットから摘出した組織を使用した。免疫組織学的検討では、イソフルラン吸入麻酔下のモルモットをパラホルムアルデヒドで心灌流固定し、摘出した組織をパラフィンに包埋した。スライス標本作製

後、DAB 染色法で免疫組織染色を行った。

角膜におけるアセチルコリンの合成や遊離は、 ^3H choline を用いて計測した。モルモット角膜を縁部から中心にむかって均等に 6~12 分割にした組織切片を作製した。切片を ^3H choline とインキュベーションして、 ^3H choline の取り込みと、その際に合成される ^3H acetylcholine 量を測定した。また、 ^3H acetylcholine の遊離は、超微量灌流装置を用いて電気刺激を行い、流出した ^3H 量をシンチレーションカウンターにより計測した。

ドライアイモデルは、ケタミン・キシラジン麻酔下で4週齢の Hartley 雄性モルモットから両側の眼窩内涙腺を摘出して、コンベンショナル環境下で4週間以上飼育することで作製した。

4 . 研究成果

アセチルコリン受容体リガンドを用いて、冷感受性神経の様々な刺激に対する感受性の変化を、角膜摘出標本を用いたシングルユニット記録により明らかにした。その結果、ムスカリン受容体作動薬ピロカルピンでは自発発火活動に変化は見られなかったが、ニコチン受容体作動薬ニコチンの刺激は、自発発火活動の頻度を顕著に増大させた。また、受容体拮抗薬を用いた実験により、この発火活動の増加には4サブユニットを持つニコチン受容体の刺激が関与していることも判明した。次に、三叉神経節の初代培養細胞を用いてニコチンに対する応答性を調べた。角膜に内在する三叉神経細胞は、ほかの組織に神経線維を伸ばすものと比べて、ニコチンに対して応答を示すものの割合が高かった。その中でも、冷受容器TRPM8を発現する角膜神経は、特にニコチンに反応する割合が高かった。以上のことから、角膜神経の発火活動はニコチン受容体による調節を受けることを示すことができた。

次に、角膜における内因性アセチルコリンの分泌源を探るため、免疫組織染色によりアセチルコリン合成酵素(コリンアセチルトランスフェラーゼ: ChAT)を発現する細胞と神経線維の位置を明らかにした。ChATは、角膜において上皮細胞層の基底部に局在していた。神経線維は、上皮細胞層下で神経叢を形成しており、線維終末は上皮細胞層間隙を走行していた。一方で、ChAT陽性の神経線維はほとんど見られなかった。さらに、角膜切片を ^3H cholineを含む生理食塩液に浸したところ、時間依存的に ^3H cholineは組織内に取り込まれた。また、HPLCによる計測で、取り込まれた ^3H cholineの一部は ^3H acetylcholineに変換されていることが確認できた。また電気刺激を与えると、組織から ^3H が流出した。以上の結果から、アセチルコリンは角膜上皮細胞で合成・遊離されて、角膜神経に影響を与えている可能性を示すことができた。

最後に、ドライアイモデルモルモットの角膜を摘出してChAT発現量を調べたが、正常な動物の角膜と比較して発現量に変化はなかった。ニコチンを正常な動物とモデル動物に点眼して瞬目応答を測定したところ、モデル動物でニコチンによる瞬目回数が有意に増加することを見出した。角膜組織を用いた電気生理実験で、ニコチンに対する冷感受性神経の応答はモデル動物で顕著に低下していたが、一部の神経線維で正常なものよりも低濃度で顕著に大きい応答を示すものも存在した。以上より、ドライアイモデル動物では、角膜感覚神経のニコチン受容体を介した興奮制御が変化していることが示唆された。

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 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Muramatsu Ikunobu, Uwada Junsuke, Chihara Kazuyasu, Sada Kiyonao, Wang Mao Hsien, Yazawa Takashi, Taniguchi Takanobu, Ishibashi Takaharu, Masuoka Takayoshi	4. 巻 160
2. 論文標題 Evaluation of radiolabeled acetylcholine synthesis and release in rat striatum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 342 ~ 355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15556	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Masuoka Takayoshi, Acosta M. Carmen, Adams David J.	4. 巻 16
2. 論文標題 Editorial: Sensory Abnormalities and Primary Sensory Neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 852614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2022.852614	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 Masuoka Takayoshi, Yamashita Yuka, Yoshida Junko, Nakano Katsuya, Tawa Masashi, Nishio Matomo, Ishibashi Takaharu	4. 巻 177
2. 論文標題 Sensitization of glutamate receptor mediated pain behaviour via nerve growth factor dependent phosphorylation of transient receptor potential V1 under inflammatory conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 4223 ~ 4241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bph.15176	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masuoka Takayoshi, Yamashita Yuka, Nakano Katsuya, Takechi Kenshi, Niimura Takahiro, Tawa Masashi, He Qiang, Ishizawa Keisuke, Ishibashi Takaharu	4. 巻 14
2. 論文標題 Chronic Tear Deficiency Sensitizes Transient Receptor Potential Vanilloid 1-Mediated Responses in Corneal Sensory Nerves	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 598678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2020.598678	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 -

1. 著者名 Nakano Katsuya, Nakazawa Hitomi, He Qiang, Uwada Junsuke, Kiyoi Takeshi, Ishibashi Takaharu, Masuoka Takayoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Voluntary wheel-running activities ameliorate depressive-like behaviors in mouse dry eye models	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Behavioral Neuroscience	6. 最初と最後の頁 925128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnbeh.2022.925128	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 -

1. 著者名 Masuoka Takayoshi	4. 巻 47
2. 論文標題 Pain Regulation by Peripheral Glutamate and its Abnormalities.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 金沢医科大学雑誌	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 益岡尚由	4. 巻 58
2. 論文標題 ドライアイの自覚症状改善に向けた治療の現状と課題	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 1056-1060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 村松郁延、宇和田淳介、益岡尚由	4. 巻 103
2. 論文標題 神経伝達様式の多様化と受容体表現型.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 応用薬理	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 益岡尚由
2. 発表標題 ドライアイの感覚異常解明に向けた基礎研究
3. 学会等名 日本臨床眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 益岡尚由、何強、中野克哉、清井武志、石橋隆治
2. 発表標題 ニコチン受容体による角膜感覚神経の制御
3. 学会等名 日本眼薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 益岡尚由、橋川成美、清井武志、何強、石橋隆治
2. 発表標題 角膜におけるアセチルコリン合成酵素の分布とニコチン受容体による角膜感覚神経の制御
3. 学会等名 第140回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本亮、古山貴文、趙駿、益岡尚由、伊藤哲史、小野宗範、加藤伸郎
2. 発表標題 恐怖条件づけ中の縫線核領域DAT陽性ニューロンの活動変化
3. 学会等名 第140回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 益岡尚由、中野克哉、何強、中澤瞳、清井武志、宇和田淳介
2. 発表標題 涙腺摘出による慢性的眼乾燥状態はうつ様行動を誘発する。
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本亮、古山貴文、趙駿、益岡尚由、堀佳江、伊藤哲史、小野宗範、加藤伸郎
2. 発表標題 縫線核領域DATニューロン-拡張扁桃体投射系の特徴解析
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 益岡尚由、宇和田淳介、石橋隆治、村松郁延
2. 発表標題 細胞内アセチルコリン受容体によるシナプス伝達の制御とストレス
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田和 正志、益岡 尚由、中野 克哉、岡村 富夫、石橋 隆治
2. 発表標題 アテロームを有する冠動脈におけるNO感受性および非感受性sGCを介する血管緊張調節
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会・第20回日本NO学会合同学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田和 正志、中野 克哉、何 強、益岡 尚由、石橋 隆治
2. 発表標題 マイコプラズマ肺炎感染ブタにおける冠動脈内皮機能
3. 学会等名 第30回日本循環薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 益岡尚由、何強、清井武志、村松郁延
2. 発表標題 角膜におけるアセチルコリン遊離と感覚神経の発火制御
3. 学会等名 第42回日本眼薬理学会
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
研究 分 担 者	橋川 成美 (芳原成美) (HASHIKAWA-HOBARA Narumi) (30511159)	岡山理科大学・理学部・准教授 (35302)	

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