

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592638

研究課題名(和文) TRPチャネルを介した眼組織血管新生に対する新しい治療戦略の確立

研究課題名(英文) A new treatment strategy for corneal and choroidal neovascularization through TRP channel

研究代表者

岡田 由香 (Okada, Yuka)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50264891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：TRPV1 KO, TRPA1 KOおよびWTマウスの、角膜中央部をパクレンで焼灼し、角膜新生血管も出るを作成した。1, 3, 7, 14および28日後に屠殺し、凍結切片を作成し、CD31免疫染色で新生血管を染色し、そこ最長距離を測定して比較検討を行った。KOはWTに比べて角膜新生血管の伸長が抑制されていた。real time RT-PCR法で検討した結果、この現象にはVEGFとTGF β 1の発現低下が影響していた。これらKOおよびWTマウスの眼底にレーザー照射を行い、脈絡膜新生血管モデルを作成した。WTに比べ、これらKOは脈絡膜新生血管が抑制された。その機序についても検討を行っている。

研究成果の概要(英文)：Corneal stromal neovascularization from the limbal vessels was induced by cauterization of the central cornea of an eye of TRPV1 KO, TRPA1 KO or WT mice by disposable cauterization tool. We then examined the length of neovascularization from limbus toward the center of the cornea following cauterization in histological section with a monoclonal anti-CD31 antibody. mRNA expression of VEGF and TGF β 1 in a mouse cornea was suppressed by the loss of TRPV1. TRPV1 KO, TRPA1 KO, TRPV4 KO or WT were included, and one eye of each was used. Retinas received laser photocoagulation for the induction of experimental CNV under slit lamp microscope observation and laser photocoagulator. A coverslip was applied to the cornea to view the retina with sodium hyaluronate. Four lesions were produced using a power of 100 mW, a spot size of 100 μ m, and a duration of 0.2s. These TRP KO mice are suppressed CNV after photocoagulation.

研究分野：血管新生

キーワード：血管新生 角膜 脈絡膜

1. 研究開始当初の背景

眼組織では、炎症に伴う異常な血管新生は、視力維持にとって好ましくなく、この血管新生を抑制する治療法の開発は重要である。これまで、血管内皮細胞成長因子(VEGF)を標的とした治療がすでに行われているが、炎症に伴う血管新生では、炎症細胞が産生する種々の成長因子が血管新生に関与していると考えられるため、過剰な炎症の制御による血管新生の制御が必要であると考えられる。炎症の抑制には副腎皮質ステロイドが有効であるが、眼での使用では、ステロイド性の続発緑内障のリスクがつきまとう。角膜の透明性は、視力の維持に必須である。角膜が感染や外傷を受けると、治癒後に、角膜に治癒後の角膜混濁や血管新生が残存し、視力障害の大きな原因となる。また、脈絡膜の血管新生は、加齢黄斑変性症の中心病態であるが、この場合、脈絡膜から視力維持に最も重要な黄斑網膜下に血管新生が見られる。この病態にもマクロファージを中心とした炎症がその背景であることが報告されている。

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ンネル型受容体が近年明らかにされつつある。その中心的な分子群が transient receptor potential (TRP) チャンネルであり、その中の TRPV1 は、カプサイシン、熱(43度以上)など複数の侵害刺激によって活性化する。また、TRPV1 は感覚神経のみならず、角膜の神経にも発現していることは報告されている。TRPV1 は炎症関連メディエーターの代謝型受容体と機能関連して PKC によってリン酸化されて機能増強することが分かってきており、これは、炎症性疼痛発生の新しい分子機構として注目を浴びている。

TRP イオンチャンネルからのシグナルが組織の炎症を制御していることに注目し、角膜血管新生と脈絡膜血管新生を TRP イオンチ

ャネルで抑制することを目的とする。さらに角膜血管新生と脈絡膜血管新生それぞれの病態に、TRP チャンネルの関与が重要であるかを究明することで、視力障害の原因となる病的血管新生の治療につながると考える。眼組織での炎症の制御を介した血管新生を抑制する TRP チャンネルからのシグナルを標的とした新しい治療法の開発は眼科臨床でのブレイクスルーとなると期待できると考えた。

2. 研究の目的

眼組織では、炎症に伴う異常な血管新生は、視力維持にとって好ましくなく、血管新生を抑制する治療法の開発は重要である。角膜の血管新生や、加齢黄斑変性症の中心病態である脈絡膜の血管新生はこの病態にもマクロファージを中心とした炎症がその背景であることが報告されている。TRP イオンチャンネルからのシグナルが組織の炎症を制御していることに注目して、マウスモデルでの角膜血管新生と脈絡膜血管新生を作成し、TRP イオンチャンネルの阻害で抑制することで、これらの病態での病的血管新生を軽減させることが出来るか否かを検討することが目的である。

3. 研究の方法

(1)血管新生培養キットを用いる。培地全体に生育した皮膚線維芽細胞(NHDF)上に正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)が点在しており、培養とともに HUVEC が増殖遊走して管腔を形成する。TRP チャンネルの antagonist を添加して、新生血管を培養する。培養した新生血管を、CD31 管腔染色キットを用いて染色し、形成された管腔長を測定する。antagonist 添加群と非添加群と比較して間で管腔の形成が促進されているか検討する。

(2) TRPV1、TRPA1 ノックアウトマウス(KO)およびワイルドタイプマウス(WT)に麻醉下でパクレンを用いて角膜上皮及び角膜実質を焼灼し、角膜新生血管モデルを作成する。

血管新生の増殖については、角膜に伸展した新生血管の先端部の隅角からの距離を測定し、ノックアウトマウス群と野生種群との間で、血管新生の局在に差があるかを検討し、血管新生に対する TRP チャンネルの働きについて検討する。各種サイトカイン発現の発現について real time RT-PCR 法によって検討した。

(3) TRPV1、TRPA1、TRPV4 ノックアウトマウス(KO)およびワイルドタイプマウス(WT)を吸入麻酔で鎮静し、眼底にレーザーで網膜光凝固を行い、各々の群で脈絡膜血管新生モデルを作成する。光凝固斑に発生する新生血管を観察し、発生した新生血管の面積を測定して比較検討する。

4. 研究成果

(1) 血管新生培養キットを用いた検討で、TRPV1 の antagonist である SB366791 を添加は、VEGF によって誘導される新生血管発生には影響を及ぼさなかった。

(2) TRPV1 KO, TRPA1 KO および WT マウスの角膜中央部をパクレンで焼灼し、角膜新生血管モデルを作成し、凍結切片を作成、CD31 免疫染色で新生血管を染色し、そこ最長距離を測定して比較検討を行った結果、TRPV1 KO, TRPA1 KO は WT に比べて角膜新生血管の伸長が抑制されていた。同様の方法で角膜新生血管を誘導した角膜で、mRNA を採取し、real time RT-PCR 法で検討した結果、TRPV1 KO の角膜新生血管の抑制には VEGF と TGF β 1 の発現低下が影響していることがわかった。これらの結果は、Journal of Ophthalmology に掲載我決まっている。

(3) TRPV1 KO, TRPA1 KO, TRPV4 KO および WT マウスを吸入麻酔で鎮静し、眼底にレーザー照射(スポットサイズ 100 μ m、照射時間 0,20 秒、出力 100mV)で網膜光り凝固を行い、脈絡膜新生血管モデルを作成した。WT に比べ、これら KO は脈絡膜新生血管が抑制された。その機序についても検討を行

っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1 Katsuo Tomoyose, Yuka Okada, Takayoshi Sumioka, Masayasu Miyazima, Kathleen C. Flanders, Kumi Shirai, Tomoya Morii, Peter S. Reinach, Osamu Yamanaka, and Shizuya Saika: Suppression of in vivo neovascularization by the loss of TRPV1 in mouse cornea. Journal of Ophthalmology. 2015. In press.

[学会発表](計 2 件)

1 Tomoyose, K, Okada Y, Sumioka K, Shirai K, Saika S. Impaired angiogenesis response in cornea by lacking TRPV1. ARVO 2013.5. Seattle, WA.

2 友寄勝夫、岡田由香、住岡孝吉、藤田識人、白井久美、雑賀司珠也：マウス角膜での血管新生における TRPV1 の役割 第 117 回日本眼科学会総会 2013.4.東京

[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：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 由香 (OKADA YUKA)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：50264891

(2) 研究分担者

雑賀 司珠也 (SAIKA SHIZUYA)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：40254544

白井 久美 (SHIRAI KUMI)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：70326370

(3) 連携研究者

()

研究者番号：