

令和 4 年 6 月 20 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：18K16931

研究課題名(和文) TRPV1, TRPA1制御における難治性角膜穿孔疾患の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatments for refractory corneal stroma incision injury in TRPV1 and TRPA1 control

研究代表者

二出川 裕香 (Nidegawa, Yuka)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：50727807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：角膜全層切開モデルのTRPV1KOマウス角膜では、角膜実質の癒合治癒が遅延していた。免疫組織学的にはKOマウス角膜で筋線維芽細胞の出現が抑制され、治癒過程で活性型TGF- β 1がKOマウス角膜で遅れて発現し、KOマウス角膜ではTGF- β 1の発現が遅れ筋線維芽細胞の抑制と創傷治癒の遅延をおこす可能性が考えられた。透過型電子顕微鏡で角膜組織を観察すると、KO角膜では小胞体が拡張していた。TRPV1KOマウス角膜では、角膜実質治癒過程でのTGF- β 1発現の抑制により筋線維芽細胞やコラーゲンの発現が抑制されることが考えられ、TRPV1は角膜実質での創傷治癒促進・線維癒痕化に関わる因子である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

角膜では外傷後の治癒過程での線維・癒痕化は透明性と形状異常を惹起し、視機能を低下させる。速やかな創傷治癒による炎症軽減と線維癒痕化抑制が透明性と形状の維持に必須であるが、一方で治癒後の強度維持も担保される必要がある。本研究により、TRPV1KOマウス角膜では、角膜実質治癒過程でのTGF- β 1発現の抑制により、筋線維芽細胞やコラーゲンの発現が抑制されることが考えられ、TRPV1は角膜実質での創傷治癒促進・線維癒痕化に関わる因子である可能性が示唆され、新たな角膜創傷治癒の治療方法にTRPV1をコントロールする治療薬という選択肢が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The loss of Trpv1 gene delayed closure of corneal stromal incision with hindered myofibroblast transdifferentiation along with declines in the expression of collagen Ia1 and TGF- β 1. Inflammatory cell infiltration was not affected by the loss of TRPV1. Ultrastructurally endoplasmic reticulum of TRPV1-null keratocytes was more extensively dilated as compared with WT keratocytes, suggesting an impairment of protein secretion by TRPV1-gene knockout. These results indicate that injury-related TRPV1 signal is involved in healing of stromal incision injury in a mouse cornea by selectively stimulating TGF- β -induced granulation tissue formation.

研究分野：角膜

キーワード：角膜実質 創傷治癒 TRPチャンネル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

眼球の屈折力の約70%を担う角膜の透明性と形状は視機能維持に必須である。角膜は外界に直接面しているため、しばしば外傷による障害を受け、その後の創傷治癒過程での過剰な線維・瘢痕化による混濁や瘢痕収縮による形状不正が原因となり、視機能が低下する。角膜実質の線維・瘢痕化による混濁と瘢痕収縮はともに実質細胞が転換した筋線維芽細胞によるところが大きい。筋線維芽細胞は過剰な細胞外マトリックス産生と平滑筋アクチン(SMA)を中心とした発達した細胞骨格の収縮作用で組織を過剰に収縮させる。この作用は速やかな、かつ強固な組織治癒には有益であると考えられるが、角膜では上記のごとく、視機能維持には好ましくないと考えられる。

角膜実質細胞の筋線維芽細胞への転換にはトランスフォーミング成長因子(TGF β)/Smadシグナルが中心的な役割を演じる。申請者の所属はこのTGF β /Smadシグナルに焦点を当てて、各眼組織の創傷治癒過程での線維・瘢痕化予防の戦略を提唱してきた。おしなべてSmadシグナルの阻害は線維・瘢痕化を減弱させる。

近年、侵害刺激受容に関わるイオンチャンネル型受容体の機能が明らかにされつつある。その中心的な分子群がtransient receptor potential(TRP)チャンネルである。TRPチャンネルは1989年にショウジョウバエの光受容器異常異変株の原因遺伝子として同定され、その後、7つのサブファミリーに分類された。カプサイシンレセプターであるTRPV1は各種の炎症関連メディエーターの代謝型受容体と機能関連し、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。本研究ではTRPV1のシグナルの制御によって、角膜穿孔外傷後の治癒過程での治癒と透明性維持、角膜形状不正の抑制のバランスを考慮した新規治療戦略の確立を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、高度な炎症を伴う全層切開モデルでのすみやかな治癒かつ線維瘢痕化の抑制のため、TRPV1をどう制御することが望ましいかということに着目し、TRPV1-ノックアウト(KO)マウスを用いて、角膜実質切開創の創傷治癒(癒合)に及ぼすTRPV1の役割を検討した。

3. 研究の方法

(1) KOマウス及び野生型C57BL/6マウス(WT)を用い、マイクロサージカルナイフで片眼の角膜中央部に幅1.8mmの角膜全層切開モデルを作成した。5日後、10日後に眼球摘出、パラフィン切片を作成し角膜創傷治癒を組織学的、免疫組織学的(α -smooth muscle actin(SMA), myeloperoxidase(MPO), F4/80, Fibronectin, transforming growth factor 1(TGF β 1))に検討した。(出生8W, WT day5 n=26, day10 n=32, KO day5 n=26, day10 n=34)

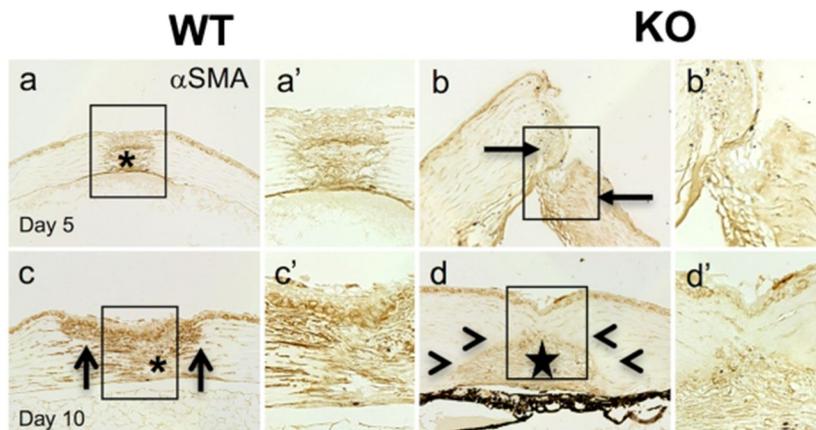
(2) 上記マウスのヘマトキシリン・エオジン(HE)染色切片を顕微鏡下で観察し、角膜実質治癒を評価、また線維芽細胞の主な出現部位(実質浅層部 or 実質深層部)をWT角膜とKO角膜で比較した。

(3) KOマウス及び野生型C57BL/6マウス(WT)を用い、角膜全層切開モデルを作成3日後に角膜摘出、RNA抽出しSMA, collagen1a1をreal-time RT-PCR法で評価した。(出生8W, WT n=120, KO n=120)

(4) KOマウス及び野生型C57BL/6マウス(WT)を用い、それぞれ角膜切開創なしと角膜全層切開5日後の角膜を摘出し、透過型電子顕微鏡で角膜組織を観察した。

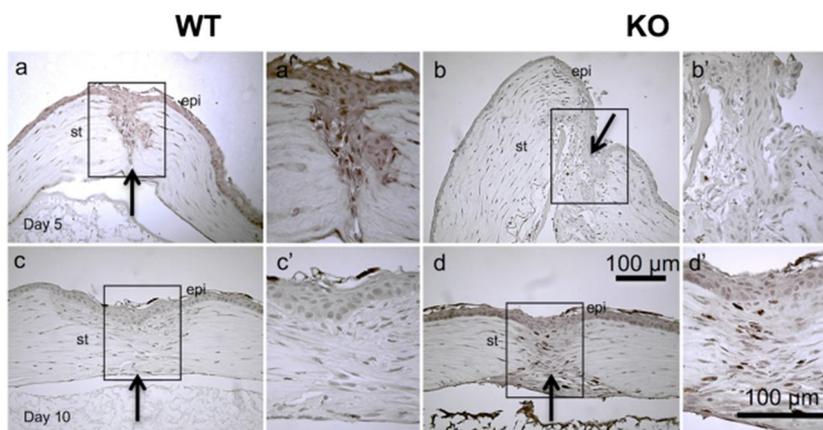
4. 研究成果

(1) KOマウスはWTマウスと比較し、5日後で角膜実質の癒合治癒が抑制されていた。免疫組織学的に5日後10日後のKO角膜で筋線維芽細胞の出現が抑制されていた。(下図)

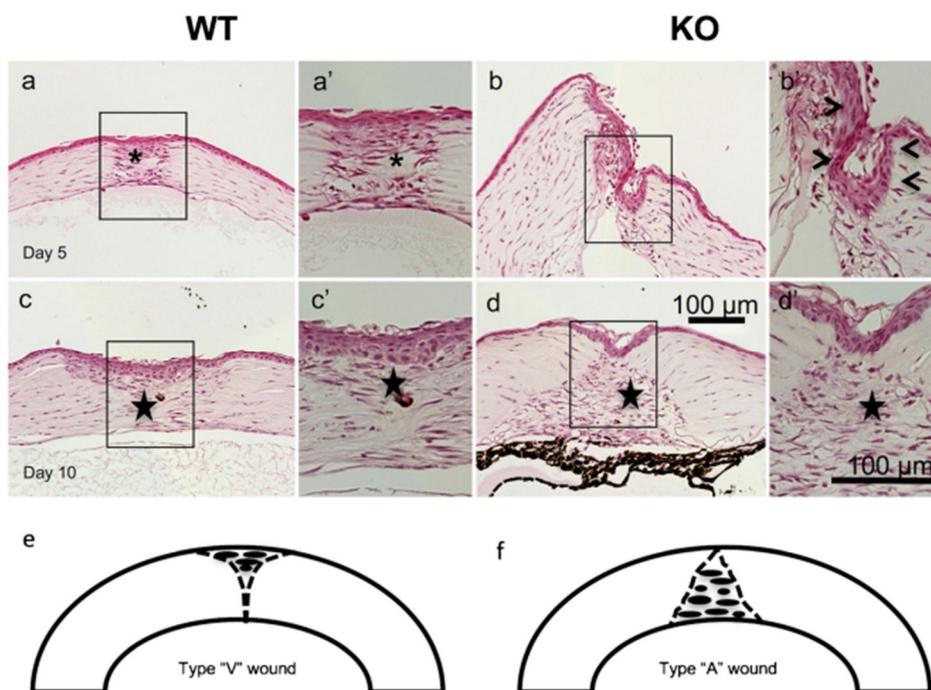


活性型 TGF β 1 発現は、5 日後の KO 角膜で抑制されていたが、10 日後では、WT 角膜より KO 角

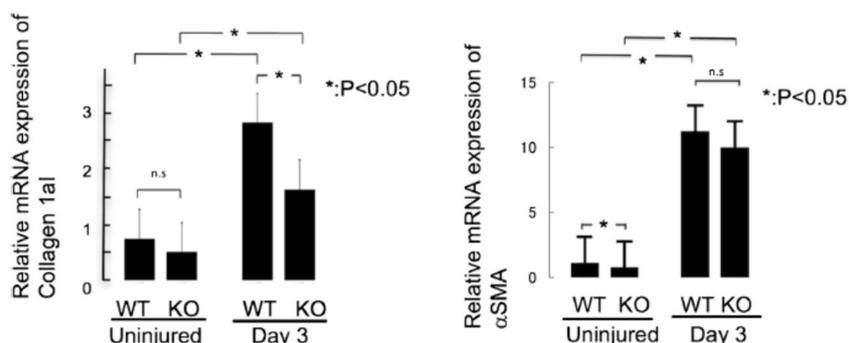
膜で発現が増強していた。(下図)



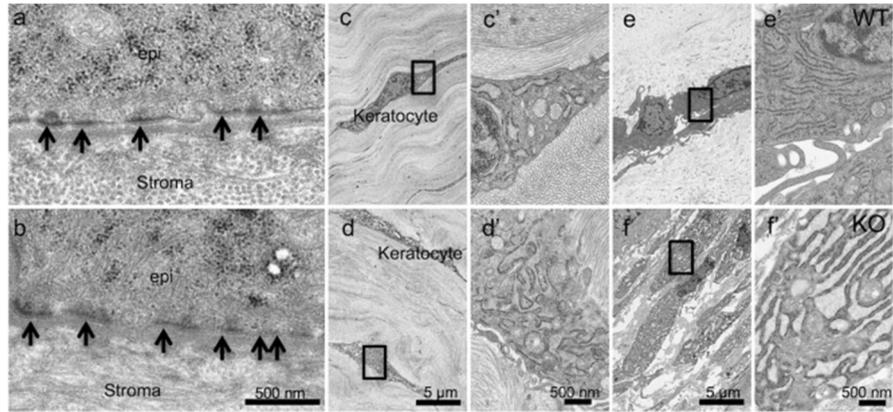
(2) KO角膜での実質の創傷治癒遅延は一過性であり、線維芽細胞の分布は、WT角膜では実質浅層部に(V型)、KO角膜では実質深層部に集積している(A型)傾向があった。(下図)



(3) 角膜全層切開3日後の角膜で real-time RT-PCR 法より SMA mRNA と collagen1a1 mRNA 発現が KO マウス角膜で抑制されていた。Collagen1A1 には有意差を認めた。(下図)



(4) 角膜切開創の有無にかかわらず、WT角膜と比較して(下図c')、KO角膜では小胞体が拡張していた。(下図d')この傾向は創傷後5日後でより顕著であった。(下図e'f')



角膜全層切開モデルの TRPV1KO マウス角膜では、角膜実質の癒合治癒が遅延していた。また免疫組織学的には KO マウス角膜で筋線維芽細胞の出現が抑制され、治癒過程で活性型 TGF- β 1 が KO マウス角膜で遅れて発現していた。このことより KO マウス角膜では、TGF- β 1 の発現が遅れ、筋線維芽細胞の抑制と創傷治癒の遅延をおこす可能性が考えられた。

線維芽細胞の分布は、WT マウス角膜では実質浅層部に、KO 角膜では実質深層部に集積している傾向があり、WT マウス角膜では上皮の治癒と実質の治癒が同時期にすすむが、KO マウス角膜では上皮の治癒が実質の治癒に先行し、実質治癒は遅延していると考えられた。

Real-time RT-PCR 法の検討では KO マウス角膜で SMA や collagen1a1 が抑制されていたことより TRPV1 は角膜全層切開モデルにおいても角膜線維癒痕化に関与すると考えられた。

TRPV1KO マウス角膜では、角膜実質治癒過程での TGF- β 1 発現の抑制により、筋線維芽細胞やコラーゲンの発現が抑制されることが考えられ、TRPV1 は角膜実質での創傷治癒促進・線維癒痕化に関わる因子である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuka Nidegawa-Saitoh, Takayoshi Sumioka, Yuka Okada, Peter S. Reinach, Kathleen C. Flanders, Chia-Yang Liu, Osamu Yamanaka, Winston Whei-Yang Kao, Shizuya Saika	4. 巻 Nov;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 329-338
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 -

〔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
---------	---------