

令和 5 年 10 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16946

研究課題名(和文)メカノセンサーによる眼圧制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanism of intraocular pressure control by mechanosensors

研究代表者

木村 麗子(山岸麗子)(Kimura-Yamagishi, Reiko)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：80704642

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): ヒト線維柱帯細胞(HTM)を用い、PIEZO1およびTRPV4の作用について検討した結果、伸展刺激やTRPV4およびPiezo1 agonistによる[Ca²⁺]流入やアラキドン酸およびPGE2産生にはPiezo1やTRPV4を介していることが明らかになった。さらにTRPV4 KOマウス(TRPV4 KO)の眼圧は、野生型マウス(WT)より眼圧が高く、WTにTRPV4 agonistを投与した場合、眼圧が低値を示した。房水流出量についてもTRPV4KOの房水流出量はWTに比べて低下していることもわかった。これらのことから、Piezo1およびTRPV4は眼圧調節に関与す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

未だ不明な点が多い眼圧制御メカニズムを解明することは、緑内障により失明してしまう患者を救うために必須である。本研究で着目したメカノセンサーであるTRPV4やPiezo1は圧力、伸展、温度など物理的的刺激に対して反応することが知られている。そして眼圧という圧力と緑内障は深く関わることが知られているが、眼圧をどのように制御し、眼圧をどのように感知し機能的変化を及ぼすかについてはよくわかっていない。本研究により、TRPV4やPiezo1が物理的的刺激を受けた際、アラキドン酸やPGE2産生を介して、眼圧を下げる方向へ働くことが明らかにされた。このことは、眼圧制御メカニズム解明の大きな一歩なると考えている。

研究成果の概要(英文): We investigated the effects of PIEZO1 and TRPV4 against intraocular pressure (IOP) by human trabecular meshwork cells (HTM). In this study, we revealed that PIEZO1 and TRPV4 were involved in [Ca²⁺] influx and arachidonic acid and PGE2 production by stretch stimulation, TRPV4 or Piezo1 agonist treatment. In addition, we measured IOP in TRPV4 KO and wild-type (WT) mice, the IOP of TRPV4 KO mice was higher than that of WT mice. Furthermore, TRPV4 agonist was lowered IOP in WT mice. On the other hand, the outflow facility of TRPV4 KO mice was lowered than that of WT mice. These findings suggest that Piezo1 and TRPV4 may be involved in IOP regulation.

研究分野：眼科 緑内障

キーワード：メカノセンサー 緑内障 眼圧 ヒト線維柱帯細胞

1. 研究開始当初の背景

緑内障は本邦の失明原因の第一位であり、眼圧下降治療は緑内障による視野欠損の進行スピードを遅らせることができる唯一のエビデンスのある治療である。眼圧は変動するものであり、日内や季節で変動すること知られているが、非常に個人差が大きく、また、正常眼圧と言われる範囲も個々で異なる可能性が示唆されている。眼圧下降治療には絶対値を下げるだけでなく、本邦に多い正常眼圧緑内障でも重要な進行のリスクファクターである眼圧変動を抑制することが重要である。

眼圧は眼内を循環する房水の流出抵抗、特に線維柱帯流出路の抵抗が高まることで上昇するとされているが、眼圧を制御するメカニズムは全く分かっていない。一般的に緑内障眼における眼圧上昇は、線維柱帯流出路における抵抗によって生じ、様々な因子が流出抵抗増大に関与していることが示唆されているが、それらは眼圧上昇機序にのみ関わり、眼圧の恒常性維持に関与していない可能性が高い。つまり、現在臨床使用されている眼圧下降剤は、基本的には何らかの刺激やシグナル亢進のために眼圧が上昇している場合にのみ眼圧を下げる方向へ働くことが多いが、眼圧下降のターゲットとなる因子は眼圧の恒常性維持には関わっていない。

今回注目した TRPV4 は膀胱、腎臓、血管、骨などでの発現が確認されており、近年線維柱帯でもその発現することや TRPV4 が線維柱帯でメカノセンサーとして働くことは示唆されてきたが、眼圧制御への関与の詳細は明らかにされていない。さらに Piezo1 は TRPV4 とは独立した因子であるが、TRPV4 と重複して働くメカノセンサーであることが膀胱や軟骨細胞で明らかにされているものの、眼での発現の解析やその作用についての報告は未だない。

これまで、多数あるメカノセンサーのヒト初代培養 TM (TM)細胞における mRNA の発現を網羅的に調べた結果、TRPV4 および Piezo1 が発現していることを複数のヒト検体サンプルで確認してきたため、TM 細胞に存在する TRPV4 および Piezo1 の眼圧制御への関与について、遺伝子操作した TM 細胞やマウスを用いて *in vitro* および *in vivo* の両面から機能解析を行い、眼圧制御メカニズムの解明やそれに対する新規治療薬の開発へ繋がりたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究は緑内障の最大のリスクファクターである眼圧を制御する因子の一つとして、機械受容 (mechanosensitive; MS) チャンネルの関与を探索し、新規治療法の開発を目指すものである。眼圧制御の主要組織である線維柱帯 (Trabecular meshwork; TM) から単離した細胞 (TM 細胞) およびノックアウトマウスを用いて、メカノセンサーのひとつとして知られる TRPV4 およびそれと重複的に働く Piezo1 の役割を中心に解明することを目的としている

3. 研究の方法

siRNAを用いたTRPV4およびPiezo1をノックダウンさせたTM細胞の作製

TM 細胞を用い、TRPV4 および Piezo1 siRNA の至適条件を検討するため、リアルタイム PCR 法を用いて TRPV4 および Piezo1 の mRNA 発現を比較し、さらに Fluo-8 で標識した細胞内 $[Ca^{2+}]$ 変化について蛍光イメージング法を用いて行うことで、遺伝子および機能的に TRPV4 および Piezo1 が siRNA によって抑制されているかを確認した。

siRNA処置済みのTM細胞とsiRNA無処置のTM細胞で、伸展刺激時の細胞内Ca²⁺変化を比較

正常 TM 細胞および TRPV4 あるいは Piezo1 を ノックダウンさせた細胞（それぞれ TRPV4 KD および Piezo1 KD）に伸展刺激を施し、生じた細胞内 $[Ca^{2+}]$ 濃度変化について、 Ca^{2+} 蛍光プローブである Fluo-8 を用いたライブセル蛍光イメージング法にて測定し、それぞれ比較した。

siRNA 処置済みの TM 細胞と siRNA 無処置の TM 細胞で、伸展刺激時および各 agonist 処置時に産生される脂質メディエーターの解析

で得られた結果を元に、TM 細胞の伸展刺激あるいは各 agonist (TRPV4 agonist; GSK1016790A, Piezo1 agonist; Yoda-1) 処置後の培養上清を継時的に回収し、LC-MS/MS 法を用いた脂質メディエーターの一斉定量解析を行った。

野生型マウスと TRPV4 knockout マウスの眼圧を比較

TRPV4 の眼圧に及ぼす作用について検討するため、TRPV4 ノックアウト (TRPV4 KO) マウスの野生型である C57BL6 マウス (WT) と TRPV4KO マウスに麻酔を施し、マイクロニードル法を用いて眼圧を測定し比較した。さらに、WT マウスに TRPV4 agonist を腹腔内投与し、一定時間後に眼圧測定を行い、TRPV4 が正常眼圧を変化させるかについて検討した。

TRPV4 knockout マウスを用いた房水流出量測定

の結果を踏まえ、野生型マウスと TRPV4 KO マウスについて、圧力に依存した房水流出量を測定できる two-level constant pressure perfusion 法を用いて房水流出量を測定した。

高眼圧モデルにおける、TRPV4 や Piezo1 の発現変化

マウスの眼圧をチューブに接続したガラスニードルを刺入し、チューブの高さを変動させることで眼内の圧力を人工的に変動させる一過性高眼圧モデルや、前房内へマイクロビーズを投与することで眼圧を上昇させるモデルを用い、一定時間の高眼圧状態に曝露した後、摘出した眼球の切片を作製し、免疫染色法にて TRPV4 および Piezo1 の発現を確認した。

4. 研究成果

TM 細胞に 20nM TRPV4 あるいは Piezo1 の siRNA 処理により、各遺伝子に対していずれも 30-40%程度まで mRNA レベルが有意に低下しており、TRPV4 および Piezo1 遺伝子は再現よくノックダウンされていることがわかった。また、それらの細胞を用いた蛍光イメージング法にて細胞内 $[Ca^{2+}]$ を観察した結果、各 agonist 処置後の細胞内 $[Ca^{2+}]$ 上昇は、TRPV4 および Piezo1 KD で有意に減少しており、機能的にもノックダウンされていることが明らかとなった。

正常 TM 細胞に 30%伸展刺激を与えた結果、細胞内 $[Ca^{2+}]$ 上昇が認められた。それに対し TRPV4 あるいは Piezo1 KD では伸展刺激で生じた細胞内 $[Ca^{2+}]$ 上昇が有意に抑制された。(図 1)

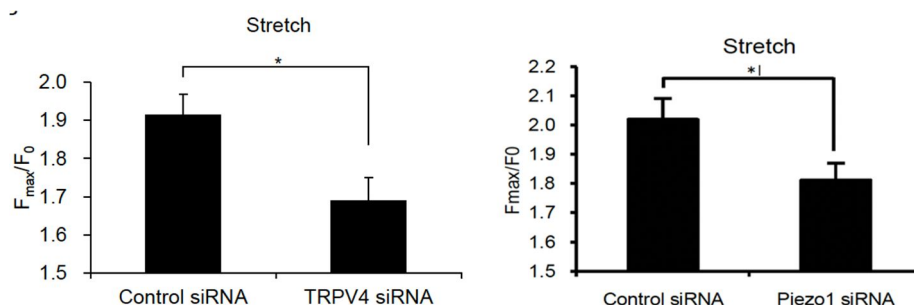


図 1 30%伸展刺激時の細胞内 $[Ca^{2+}]$ 上昇に対する TRPV4 および Piezo1 の作用

このことから、伸展刺激で起こる細胞内 $[Ca^{2+}]$ 上昇に TRPV4 および Piezo1 が関与することが明らかとなった。

LC-MS/MS 法による脂質メディエーター一斉定量解析の結果、正常 TM 細胞と TRPV4 あるいは

Piezo1 KD にそれぞれ 30% 伸展刺激を与えた後の培地上清中では、TRPV4 あるいは Piezo1 KD でアラキドン酸および PGE2 濃度が正常 TM 細胞に比べて低値を示した。また、正常 TM 細胞に GSK1016790A および Yoda-1 を添加した場合、処置 10 分後から培地中のアラキドン酸、PGE2 および PGD2 の増加が認められた。このことから、伸展刺激や各 agonist 投与により TRPV4 や Piezo1 が刺激され活性化されると、アラキドン酸および PGE2 の産生が亢進されることが明らかとなった。このことから、TRPV4 および Piezo1 は一部の脂質メディエーターの産生に關与する可能性が高いことが明らかとなった。

WT と TRPV4 KO マウスの通常眼圧を測定した結果、TRPV4 KO マウスは WT マウスに比べて有意に高値を示した。また、WT マウスにおける GSK1016790A の腹腔内投与 1.5 時間後の眼圧は、非投与に比べて有意に低値を示した。このことから、TRPV4 はマウス眼において、通常状態の眼圧を低く保つ働きを担う可能性があり、また、得られた結果と併せて考えると、TRPV4 刺激により産生された PGE2 が眼圧を下降させる可能性が示唆された結果となった。

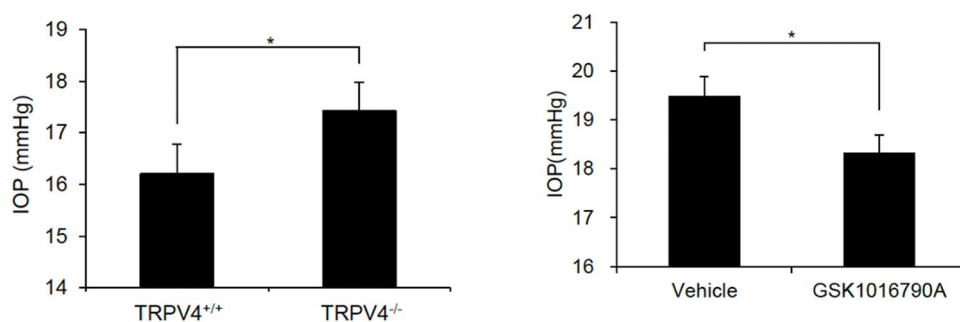


図 2 野生型マウスと TRPV4 欠損マウスとの通常眼圧の比較および野生型マウスに対する TRPV4 agonist の作用

two-level constant pressure perfusion 法にて WT および TRPV4 KO マウスの房水流出量を測定した結果、TRPV4 KO マウスで有意に低値を示した。このことから、TRPV4 刺激で起こる眼圧低下は房水流出促進による可能性が高いことが明らかとなった。

一過性高眼圧モデルやマイクロビーズを用いた慢性の高眼圧モデルでのタンパク発現変化について免疫染色法にて評価を行った結果、いずれの高眼圧モデルについても Piezo1 および TRPV4 のタンパク発現に変化は認めれなかった。しかしながら、1 週間にわたり高眼圧を維持したマウス眼の隅角付近に、線維化関連因子である SMA (alpha-smooth muscle actin) の発現が亢進していることが明らかとなった。(図 3) このことについて、今後は TRPV4 KO マウスを用いて同様に検討することで、高眼圧により生じる隅角付近の線維化への TRPV4 の關与について今後明らかにしていく予定である。

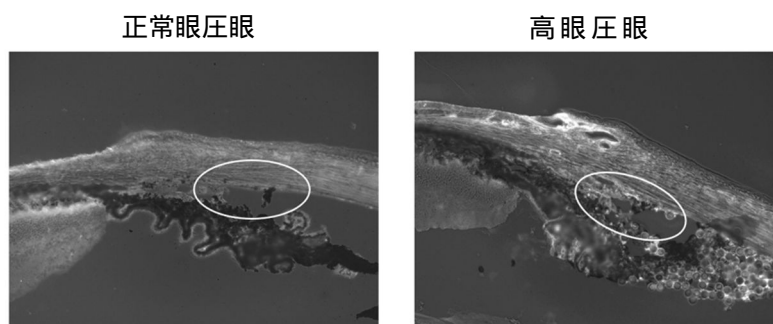


図 3 高眼圧モデルにおける SMA 発現の変化

以上のことから、メカノセンサーとして知られる Piezo1 および TRPV4 は眼圧制御を担う重要な組織である線維柱帯に存在し、眼圧上昇時に生じると考えられる組織の伸展などの物理的刺激を受けることで活性化され、細胞内 $[Ca^{2+}]$ 上昇をのみならず、PGE2 などの脂質メディエーターの産生を介して、眼圧を下降させる方向に働く可能性があることが本研究により明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Reiko Yamagishi-Kimura, Megumi Honjo, Makoto Aihara	4. 巻 8
2. 論文標題 Contribution of prostanoid FP receptor and prostaglandins in transient inflammatory ocular hypertension	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11098
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-29273-1	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 Uchida Takatoshi, Shimizu Shota, Yamagishi Reiko, Tokuoka Suzumi M., Kita Yoshihiro, Sakata Rei, Honjo Megumi, Aihara Makoto	4. 巻 16
2. 論文標題 TRPV4 is activated by mechanical stimulation to induce prostaglandins release in trabecular meshwork, lowering intraocular pressure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 258911
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0258911	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 Uchida Takatoshi, Shimizu Shota, Yamagishi Reiko, Tokuoka Suzumi M., Kita Yoshihiro, Honjo Megumi, Aihara Makoto	4. 巻 11
2. 論文標題 Mechanical stretch induces Ca ²⁺ influx and extracellular release of PGE ₂ through Piezo1 activation in trabecular meshwork cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4044
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83713-z	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Reiko Yamagishi-Kimura, Megumi Honjo, Makoto Aihara
2. 発表標題 The effect of TRPV4 against the change of fibrosis-related factors in trabecular meshwork cells under pressure stress.
3. 学会等名 the XXVth biennial meeting of the International Society of Eye Research (ISER) (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究協力者	内田 孝俊 (Uchida Takatoshi)		
研究協力者	清水 翔太 (Shimizu Shota)		
研究協力者	相原 一 (Aihara Makoto) (80222462)	東京大学・眼科・教授 (12601)	
研究協力者	本庄 恵 (Honjo Megumi) (60399350)	東京大学・眼科・准教授 (12601)	

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