

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10000

研究課題名(和文) Nrf2-Keap1システムのドライアイにおける神経保護作用

研究課題名(英文) Neuroprotective function of Nrf2-Keap1 system in dry eye disease

研究代表者

小島 隆司 (Kojima, Takashi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任准教授

研究者番号：90407099

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)：Nrf2ノックアウトマウスでは、環境ストレス負荷後に涙液分泌減少、角膜神経障害を認め、角膜の痛み受容体(TRPV1)の易刺激性を獲得することが示された。また、Nrf2ノックアウトマウスでは環境ストレス負荷後は鬱状態を呈することが示された。Nrf2は、角膜の酸化ストレスを低減し、角膜における炎症細胞浸潤を抑制する事により、ドライアイ発症及びその痛みによって引き起こされる鬱症状を予防しているキーマーカーであることが示唆され、オフィスワーカーのドライアイの病態の一端が解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オフィスワーカーのドライアイは、有病率が65%と高く、労働生産性の低下が報告されている。今回我々が用いた環境ストレス負荷モデルは、オフィスワーカーのVDT作業によるストレスを模した動物モデルである。このモデルを用いて、Nrf2がドライアイ発症に大きな役割を来していることを示せたことは、今後のドライアイの治療戦略、研究の方向性に大きな変化を及ぼすことが考えられる。最終的に治療に結びつくことによって、ドライアイで悩む患者が減り、労働生産性やオフィスワーカーのQOL向上に結びつくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Nrf2 knockout mice showed decreased tear secretion and corneal nerve damage after environmental stress exposure. They also showed that they acquire irritability of pain receptors (TRPV1) in the cornea. In addition, Nrf2 knockout mice were shown to be depressed after environmental stress exposure.

This study suggests that Nrf2 is a key factor in preventing the onset of dry eye and its pain-induced depressive symptoms by reducing corneal oxidative stress and inhibiting inflammatory cell infiltration in the cornea, and thus provides insight into the pathogenesis of dry eye in office workers.

研究分野：眼科

キーワード：Nrf2 酸化ストレス 角膜神経 ドライアイ TRPV1

1. 研究開始当初の背景

生体が様々な環境からの異物や毒物および内在性の酸化ストレスに応答し、それらを解毒・排泄するメカニズム（生体防御）において転写因子 Nrf2 が生体防御機構を担う様々な酵素や蛋白質の遺伝子発現を統一的に制御する因子であることが明らかになっている。細胞質に存在する Keap1 というアクチン結合性制御タンパク質が、Nrf2 を結合して細胞質にとどめ、Nrf2 が核内で転写活性化するのを抑制している。一方、親電子性物質の添加により Nrf2 は Keap1 から解離して核へ移動し、転写を活性化し異物代謝系酵素群や酸化ストレス応答タンパク質などの標的遺伝子群の誘導的な発現が達成される。ドライアイは多因子疾患であるが、その病態に神経系の異常が関与していることが世界ドライアイワークショップでも報告されている。私は、角膜知覚神経の恒常性維持のために Nrf2 が関与している可能性を考え、Nrf2 がドライアイにおける角膜神経障害、行動にどのように影響しているのかという問いに答えるために研究を行った。研究では、野生型マウス及び Nrf2 ノックアウトマウスを用いて生体共焦点顕微鏡により経時的に角膜上皮下神経叢の変化を評価した。角膜の侵害受容体として Transient Receptor Potential (TRP) チャンネルの一つである TRPV1 および TRPA1 が角膜知覚神経に存在する。本研究では TRP 受容体の発現の変化を調査した。ドライアイによる行動異常として、うつ症状はこれまでにヒトで報告されているが、マウスにおける角膜痛覚検査及び行動解析で不安症状を評価し、角膜痛覚、角膜神経の形態学的及び TRP 受容体を含めた分子生物学的変化との関係を調査した。本研究では、我々の研究グループで開発したドライアイモデル（環境ストレスモデル）を用いた。このモデルはヒトの VDT 作業によるドライアイを模した動物モデルである。

2. 研究の目的

一般的にドライアイの症状発現のメカニズムは、涙液層の早期破綻による角膜障害、または局所的浸透圧の変化が角膜神経を刺激し症状を発現すると理解されている (Belmonte C et al. TFOS DEWS II pain and sensation report. Ocul Surf. 2017)。涙腺を摘出したドライアイモデルマウスで不安行動を示すことが報告されており (Neal Mecum et al. ARVO abstract 2017)、ドライアイによる症状の持続が不安行動及びうつ病を引き起こす可能性が示唆されている。しかし、ドライアイにおける角膜神経障害がどのように発症し、どのように症状および行動変化に影響を与えるかは、基礎研究でほとんど研究が行われていない。私は、Nrf2 の神経保護効果が減弱することにより、角膜神経障害が生じることで症状発現、行動変化に大きく影響を及ぼすと仮説を考えた。

3. 研究の方法

(1) ドライアイモデルにおける角膜知覚神経の変化

8 週齢野生型 C57BL/6 及び Nrf2 ノックアウトマウス 10 匹を用いて、ドライアイストレス負荷前後で角膜上皮下神経叢の形態学的変化を経時的に観察する。検査項目としては、涙液分泌量測定、眼表面障害の検査（生体染色スコア）、生体共焦点顕微鏡による角膜神経の観察を行う。生体共焦点顕微鏡画像は、NeuronJ を用いて神経密度、屈曲のスコア化、樹状細胞密度、Microneuroma の有無を評価する。マウスは安楽死させた後、角膜を摘出し片眼は TRPV1 及び TRPA1 の免疫染色を行う。もう片眼は TRPV1 及び TRPA1 の mRNA 定量を RTPCR 法にて行う。

(2) 角膜 whole mount 免疫染色を用いた TRP チャンネル発現の評価

摘出した眼球を FF(1x PBS+1%Formaldehyde+2mM MgCl2+5mM EGTA+0.02% NP40+water) に浸漬し 4℃で 1 時間 15 分固定後、PBS-NP40(1%PBS+0.02% NP40) に浸漬し室温、15 分を 2 回繰り返して洗浄した。その後、-20℃に precool した MetOH-DMSO(-20℃MetOH: DMSO=4:1) で 4℃、2 時間固定した。固定後、虹彩を取り除いてレンズの端 4 箇所にて切れ目を入れ、75% MetOH / 25% Triton、50% MetOH / 50% Triton、25% MetOH / 75% Triton の順番に 15 分ずつゆっくり振とうさせながら室温にて浸漬した。PBS で 30 分間洗浄を 3 回繰り返して、1 次抗体 (TRPA1:Funakoshi NB110-40763SS NOV、TRPV1:アロモネ Labs ACC-030) にて、4℃で 1 晩ゆっくり振とうさせながら浸漬した。1 次抗体はそれぞれ 50 倍希釈して使用した。PBS-0.02% Tween20 溶液でゆっくり振とうさせながら 1 時間ずつ 5 回洗浄し、室温でゆっくり振とうさせながらブロッキングバッファー (PBS 100ml+ BSA 1g) と 2 時間反応させた。2 次抗体 (FITC anti-rabbit) は、4℃で 1 晩ゆっくり振とうさせながら浸漬した。2 次抗体は 100 倍希釈して使用した。PBS-0.02% Tween20 溶液でゆっくり振とうさせながら 1 時間ずつ 5 回洗浄し、2000 倍希釈した DAPI と反応させた後、PBS で 5 分間 3 回ゆっくり振とうさせながら洗浄し、Aqua-Poly/Mount (Funakoshi) を使用し、封入した。

(3) 環境ストレス負荷が角膜知覚及び痛覚に与える影響

8 週齢野生型 C57BL/6 及び Nrf2 ノックアウトマウス 10 匹を用いて、環境ストレス負荷前後で角膜知覚及び角膜痛覚を下記方法にて測定する。

(4) ドライアイモデルマウスにおける不安行動と角膜知覚の関係の調査

8 週齢 C57BL/6 マウス及び Nrf2 ノックアウトマウス 10 匹をもちいて、環境ストレス負荷前後で下記行動解析試験を行う。また環境ストレス負荷前後で角膜痛覚を測定する。次にドライアイの治療薬を用いて行動変化や痛覚変化がどのように影響がでるか調査した。

(5) 搔痒試験

TRPV1 チャネルのアゴニストであるカプサイシンで角膜を刺激し、その影響をドライアイ負荷前後で検討した。カプサイシン(WAKO)をエタノールで溶解し、1mmol 溶液にした。1mmol 溶液 1 μ L にエタノール 999 μ L を加え、最終濃度 1 μ mol のカプサイシン溶液を点眼用とした。カプサイシン 1 μ mol 溶液を右眼に 1 μ L 点眼し、5 分間観察して搔痒回数を測定した。Control には生理食塩水 999 μ L にエタノール 1 μ L を溶解した溶液を使用した。

(6) 環境ストレスモデル

筆者らの施設で開発された Visual Display Terminal (VDT) モデルとして作成された環境ストレスモデルを急性ドライアイモデルとして用いた。このモデルではマウスを小さなコンパートメントに拘束し、正面から連続的に風を当てることで VDT 作業における緊張と空調による眼表面乾燥を再現しており、野生型及び遺伝子改変マウスで涙液分泌障害が起こることが分かっている (Simsek C., Kojima T. et al. IOVS, 2018)。

(7) 行動試験 尾懸垂試験 (Tail suspension test, TST)

実験前に 1 時間以上ホワイトノイズを聴かせた。梁上テープを縦 12cm、横 2.5cm に切り、上 1cm、下 1cm の部分をそれぞれ折りたたんで上 1cm 部分にはパンチで 1 カ所穴をあけた。マウスの尻尾の先が若干出る程度の位置に尻尾を挟んでテープを接着させた。尻尾をつたって登ってこないよう、15mL チューブを数センチに切ったものを尻尾と胴体の間に通し、マウスをひっかけた。6 分間の間の無動時間を測定し、動きが激しく揺れが止まらないものや、壁つたいが激しいものはカウントしないこととした。

(8) ドライアイモデルマウスにおける炎症サイトカインの検討

炎症性サイトカイン、メディエーターの発現解析には、LUNARIS (ベリタス) を用いた。涙液は、cotton thread にて 10mm 濡れる長さ分を集めて解析した。

4. 研究成果

・ Nrf2 のドライアイ発症への関与

Nrf2 ノックアウトマウスと野生型マウスでは無刺激時においては涙液分泌量に差は認めなかったが、環境ストレス負荷 (ドライアイストレス) 後に、Nrf2 ノックアウトマウスは野生型よりも有意に涙液分泌量が低下した。

・ ドライアイ負荷による Nrf2 ノックアウトマウス及び野生型マウスにおける角膜神経の評価
野生型と Nrf2 ノックアウトマウスでの角膜神経の形態及び機能の比較を行った。角膜神経の形態評価には生体共焦点顕微鏡を用いて、環境ストレス負荷前後の角膜上皮神経叢の変化を評価した。その結果、野生型及び Nrf2 ノックアウトマウス両群ともに、ストレス負荷によって神経密度の低下を認めたが、野生型と Nrf2 ノックアウトマウスでは、角膜上皮下の神経密度の変化に差は認めなかった。しかし、Nrf2 ノックアウトマウスでは、環境ストレス負荷後の角膜上皮神経の屈曲スコア及び角膜上皮下神経下の浸潤細胞密度が野生型より有意に高かった。

・ 角膜における TRP チャネル発現の変化

免疫染色の結果、Nrf2 ノックアウトマウスでは環境ストレス負荷後に TRPV1 及び TRPA1 の発現増強を認めた。RT-PCR を用いた mRNA 解析の結果、Nrf2 ノックアウトマウスのみで角膜の TRPV1 及び TRPA1 の発現が有意に上昇した。

・ 角膜知覚測定

野生型マウスでは環境ストレス負荷前後の差を認めなかったが、Nrf2 ノックアウトマウスでは有意に知覚の閾値が下がっており、知覚過敏の状態が確認された。

・ 搔痒試験

Nrf2 ノックアウトマウスでは、環境ストレス負荷後にカプサイシン刺激による搔痒行動が有意に増加した。野生型ではそのような効果は認められなかった。

・ Nrf2 ノックアウトマウス及び野生型マウスにおける酸化ストレスの眼表面への蓄積

Nrf2 ノックアウトマウス、野生型マウスで、環境ストレス負荷前後の酸化ストレスの蓄積を免疫染色を用いて検討した。用いた酸化ストレスマーカーは、脂質酸化ストレスマーカーである 4-HNE (4-hydroxy-2-nonenal) 及び DNA 酸化ストレスマーカーである 8-OHdG (8-hydroxy-2'-

deoxyguanosine)を用いた。10週齢マウスにおける環境ストレス負荷前の酸化ストレスの蓄積は、角膜上皮細胞、角膜実質、角膜内皮細胞、結膜上皮細胞で認めたが、二群間で差は認めなかった。しかし、環境ストレス負荷後は、Nrf2 ノックアウトマウスではコントロールの野生型に比べて強い角膜上皮細胞、角膜実質、結膜上皮細胞において著明な4-HNE及び8-OHdGの蓄積を認めた。

・環境ストレス負荷前後の行動試験

野生型マウスでは、環境ストレス負荷後に有意に無動時間が短くなった。2群間の比較では、環境ストレス負荷前は差は無かったが、Nrf2 ノックアウトマウスでは野生型マウスよりも、環境ストレス負荷後の無動時間が有意に長かった。

・Nrf2 ノックアウトマウス及び野生型マウスにおける涙液中のサイトカインの評価

環境ストレス負荷前後で、インターフェロン γ 、インターロイキン(IL)-1 β 、IL-2、IL-6、IL-17A、TNF- α の涙液中の濃度を調査した。涙液中TNF- α は、環境ストレス負荷後に、Nrf2 ノックアウトマウスで野生型より有意に高値を示した。その他のサイトカインにおいては各マウスで環境ストレス負荷前後での有意差は認めず、二群間でも環境ストレス負荷前後ともに差は認めなかった。

・環境ストレス負荷後の角膜酸化ストレス

Nrf2 ノックアウトマウスでは野生型に比較して、DNA酸化ストレスマーカーである8-OHdG、脂質酸化ストレスマーカーである4-HNEが、角膜上皮、実質、結膜上皮、涙腺腺房上皮細胞により蓄積していることが示された。

<結論>

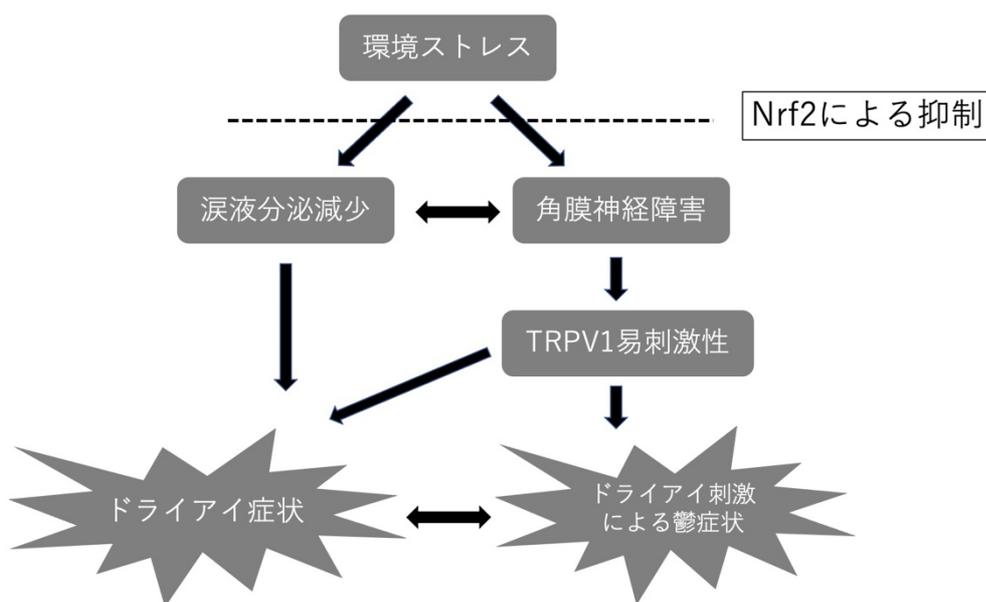
本研究で、環境ストレス負荷によるドライアイ発症にNrf2が抑制的に働いていることが証明された(図1)。環境ストレス負荷は涙液分泌減少のみでなく、生体共焦点顕微鏡による観察で角膜神経に障害を与えることが明らかになった。本研究では世界で初めて、VDT作業を模したドライアイマウスモデルで、鬱状態を示す事を示した。Nrf2 ノックアウトマウスでは、TRPV1チャネルの発現亢進、易刺激性により、ドライアイ症状をより感じる状態になっていたと推測され、環境ストレス負荷後にTST試験で無動時間の延長が認められたのは、ドライアイ刺激による疼痛によって抑うつ症状が起きている可能性が示唆された。

環境ストレス負荷による影響をNrf2が抑制しているメカニズムに関しては、酸化ストレスの軽減、角膜の上皮下神経叢の炎症抑制が考えられる。

今後Nrf2の働きをより促進させる治療が可能になれば、VDT作業などによるドライアイ症状だけでなく、ドライアイによる鬱症状を改善できる可能性が示唆された。

図1 環境ストレス負荷によって発症するドライアイの病態とNrf2の関係。

本研究によってNrf2が涙液分泌減少、角膜神経障害をきたす経路を抑制する事が明らかになった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------