

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：33303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22987

研究課題名（和文）眼表面の知覚制御機構の解明を目指したin vitro実験系の開発

研究課題名（英文）A novel in vitro experimental system for assessment of ocular surface sensation

研究代表者

何 強 (HE, Qiang)

金沢医科大学・医学部・研究員

研究者番号：30881065

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、物理的に3つに分画されたチャンバー（Campenot chamber）を利用して、角膜-三叉神経節の構造を細胞培養系で再構築し、眼表面知覚を容易に解析・評価できる新たな実験系を作製することを試みた。角膜上皮細胞、三叉神経細胞の培養条件を調整することで、三叉神経節細胞の細胞体から隣接するコンパートメントに神経線維を伸ばすことに成功した。さらにその後、神経線維のみ存在するコンパートメントに上皮細胞を共培養することで、角膜-三叉神経節の構造をin vitroで再構築することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

角膜には三叉神経第一枝が角膜神経として分布している。この神経の興奮制御機構を明らかにすることが、眼表面疾患や点眼薬による眼痛や不快感の発生機構を解明する上で非常に重要である。本計画では、Campenot chamberを利用して角膜-三叉神経節の構造を細胞培養系で再構築し、物理的に分画されたチャンバーを利用して上皮細胞による三叉神経の興奮制御機構を容易に再現・解析できる実験系の構築を試みた。本実験系が完成すれば、精度の高いin vitro角膜知覚評価系となる可能性が高く、眼表面痛に対する新規点眼薬開発や、既存の点眼薬の差し心地改善に結び付く化合物の探索など創薬分野に応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：To assess ocular surface sensation, this study aimed to make a novel culture system resembling the structure of cornea-trigeminal ganglion, with Campenot chamber that consists of three compartments. Trigeminal ganglion neurons cultured in a compartment could be controlled so that the extended fibers from some of the neurons intrude into a neighboring compartment. Thereafter, by adding corneal epithelial cells in the compartment where growth fibers are located, we reconstructed the structure of cornea-trigeminal ganglion in in vitro culture system.

研究分野：眼科

キーワード：三叉神経節細胞 角膜上皮細胞 培養細胞

1. 研究開始当初の背景

角結膜炎やドライアイなどの眼表面疾患において生じる眼表面の異物感、乾燥感や痛みは、様々な感覚情報を受容する角膜神経の興奮と関連していることが明らかにされている。したがって、角膜神経の興奮制御を理解することが、これら自覚症状に対する治療薬の開発において重要である。刺激に対する角膜神経の細胞応答の解析は、これまで角膜組織標本を用いた神経線維の発火活動の計測や、角膜神経初代培養細胞を用いた電気生理ならびに蛍光イメージング実験により行われてきた。一方で、組織標本と初代培養細胞を用いた実験結果の間にはしばしば乖離が見られることから、刺激による角膜神経の興奮は、神経線維上に発現する受容器への直接作用だけではなく、周囲に存在する上皮細胞や間質細胞の興奮により遊離される生理活性物質によって巧妙に制御されていることが予想されている。しかしながら、これら細胞による角膜神経の活動調節を簡便かつ明確に解析できる実験系はなく、その調節機構の詳細を解明するためには新たな実験系の開発が必要である。

2. 研究の目的

Campanot chamber を利用して角膜 - 三叉神経節の構造を細胞培養系で再構築し、物理的に分画されたチャンバーを利用して上皮細胞 三叉神経間および間質細胞 三叉神経間の興奮制御機構を容易に解明できる新たな実験系を作製する研究計画を立ち上げた。

3. 研究の方法

Campanot chamber を用いた三叉神経 角膜構成細胞共培養系を確立するために、以下のステップで研究を進めた。

(1) 細胞系の作製

三叉神経節や角膜上皮細胞の初代培養細胞の作製を行った。培養条件を変えて、最も良い培養条件(培養ディッシュ、三叉神経細胞の培養期間や共培養開始のタイミングなど)を決めた。

(2) Campanot chamber における培養条件の決定

次に三叉神経細胞を Campanot chamber 内で培養を行い、隣接するコンパートメントに神経線維が伸長する条件を明らかにした。さらに上皮細胞を加えて、共培養した。

(3) 上皮細胞非存在下、存在下で神経細胞応答との比較

三叉神経節細胞の線維や上皮細胞を刺激した際の神経細胞応答を確認するため、上皮細胞 神経線維の共培養画分に、眼表面が暴露されうる刺激(眼の乾燥に関連した浸透圧上昇や温度低下、炎症性物質、侵害受容器に対する作動薬など)を与えて、三叉神経細胞の細胞応答を蛍光カルシウムイメージング実験により測定した。

4. 研究成果

本研究でははじめに、三叉神経節細胞と角膜上皮細胞の初代培養細胞の培養条件を検討した。三叉神経節細胞はグリア細胞の増殖を抑える薬剤を添加し、一週間以上培養することで神経線維が伸長することを確認した。また、角膜上皮細胞は培養後一週間までであれば、線維芽細胞がほとんどない状態で培養できた。

この条件を基にCampenot chamberを用いた共培養を作製した。三叉神経節細胞の神経線維がCampenot chamberの隣接したコンパートメントに神経線維の先端が十分到達するためには、ディッシュはこれまで使用してきたポリ-L-リジンコートでは難しいことが分かり、コート剤を変更することで達成することができた。また、神経線維が隣接したコンパートメントに到達するまで4週間以上の培養が必要であった(図1)。このようにしてできた培養細胞は、培養開始から8週まで安定して培養を継続することができた。三叉神経節細胞を4~8週間培養したものに、神経線維のみが分布するコンパートメントに上皮細胞をまくことで、神経線維終末と上皮細胞が隣接する共培養系を作製することに成功した(図2)。また、本培養細胞を用いてカルシウムイメージングを行ったところ、神経線維が存在するコンパートメントに侵害刺激を与えると、細胞体でカルシウム濃度の上昇を確認することができた。

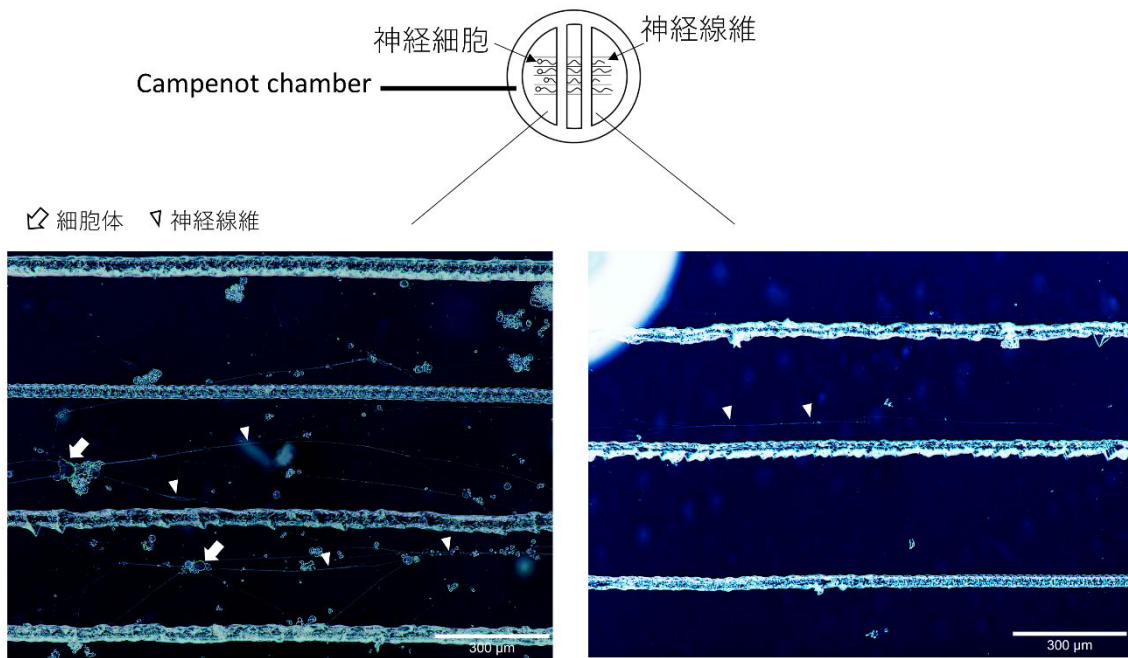


図1 Campenot chamber における三叉神経節細胞の初代培養
8週間培養すると三叉神経細胞の神経線維はチャンパーの隔壁を通過し、隣接するコンパートメントに伸長するのを確認することができた。

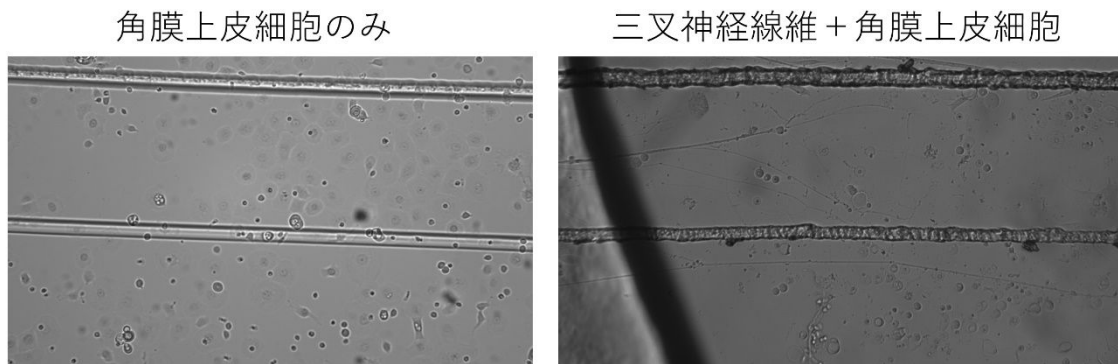


図2 Campenot chamber における上皮細胞の培養
三叉神経線維存在下(右)で、角膜上皮細胞を培養することができた。

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 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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

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 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、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

〔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
---------	---------