

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791869

研究課題名(和文) TRPチャンネル制御における難治性神経麻痺性角膜上皮障害の新規治療法の開発

研究課題名(英文) The development of new treatments for intractable neuroparalytic corneal epithelial disorder in TRP channel control.

研究代表者

住岡 孝吉 (SUMIOKA, TAKAYOSHI)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40433362

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)：ラット角膜上皮欠損器官培養モデルではTRPV1受容体アゴニスト添加で上皮欠損の閉鎖は促進し、TRPV1アンタゴニスト添加では遅延した。TRPV1欠失マウス(KO)では細胞遊走および増殖の両方を抑制することにより、野生種(WT)と比較し角膜上皮欠損の閉鎖が遅延した。またKOではWTに比べSPとIL6の発現量が低下していた。TRPV1シグナルは、マウスでのIL-6およびサブスタンスPのアップレギュレーションや角膜上皮欠損の治癒のために必要であった。

研究成果の概要(英文)：TRPV1 was detected mainly in the basal layer of mouse or rat corneal epithelium. Adding a TRPV1 receptor agonist to the culture medium enhanced epithelial healing in the rat cornea, and a TRPV1 antagonist retarded it in organ culture. The loss of TRPV1 did not affect the histology of the mouse cornea. In vivo analysis showed the loss of TRPV1-impaired re-epithelialization of the debrided area of the corneal epithelium by the suppression of both cell migration and proliferation. The lack of TRPV1 suppressed the expression of IL-6 and substance P but not of TGF- $\beta$ 1 in response to epithelial debridement in mice. TRPV1 signal is required for the upregulation of IL-6 and substance P and the healing of debrided corneal epithelium in mice.

研究分野：角膜創傷治癒

キーワード：TRPV1 角膜上皮創傷治癒

#### 1. 研究開始当初の背景

角膜は視機能維持に必須の透明な組織であり、その形状から適切な屈折力を有している。角膜は外界に直接面しているため、上皮障害を受けやすい。正常の角膜では、外界からの侵襲に対し極めて速やかに反応し、上皮障害は短時間で修復される。しかし、中枢または末梢での三叉神経障害に起因する神経麻痺性角膜症では上皮の修復は遅延し、重篤な角膜混濁や穿孔による視力低下をきたす。現在、多くの研究者がこの難治性の神経麻痺性角膜症に著効する薬剤の開発のために研究に取り組んでいる。難治疾患であるがゆえに、本疾患の病態メカニズムをさらに解明する必要がある。

#### 2. 研究の目的

中枢または末梢での三叉神経障害に起因する神経麻痺性角膜症は、難治で角膜上皮の創傷治癒が遅延するため、重篤な視力障害の原因となる。治療法には、神経伝達物質であるサブスタンス P と insulin-like growth factor-1 (IGF-1) の投与が有効であるといった報告がある。TRPV1 は感覚神経終末などに発現しているイオンチャンネルの一つであるが、TRPV1 のシグナルが、サブスタンス P や他の神経終末からの液性因子の発現に重要な役割を担っている事が、他臓器での実験研究から明らかにされている。そのため TRPV1 は角膜上皮の創傷治癒に大きく貢献していることが予想される。TRPV1 をはじめその他の痛みに関与する TRP チャンネルシグナルを調節することで難治性の角膜上皮疾患の治療につながることを期待できる。

#### 3. 研究の方法

(1) マウス角膜上皮欠損モデルでの TRPV1 の影響の評価

野生種マウス (WT) で TRPV1 の角膜での発生部位を確認した。マウス角膜上皮欠損モデルを作成し、TRPV1 欠失マウス (KO) と WT とで角膜上皮の創傷治癒を比較検討した。また、各種免疫染色および real-time RT-PCR を施行し WT と KO で比較検討した。

(2) ラット角膜上皮欠損器官培養モデルでの TRPV1 の影響の評価

ラット角膜上皮欠損モデルを作成後、眼球摘出し器官培養施行。TRPV1 アゴニストとアンタゴニストを添加し 36 時間器官培養し、上皮欠損の閉鎖具合を比較検討した。

(3) マウス角膜全層切開モデルにおける角膜実質への TRPV1 の影響の評価

マウス角膜全層切開モデルを作成し、TRPV1 欠失マウス (KO) と野生種 (WT) とで角膜実質の創傷治癒を比較検討した。また、各種免疫染色および real-time RT-PCR を施行し WT と KO で比較検討した。

(4) 角膜電熱焼灼モデルでのテネイシン X の影響の評価

角膜中央部に電熱焼灼し、角膜周辺部の血管新生モデルを作成。野生種マウス (WT) とテネイシン X 欠失マウス (KO) で角膜新生血管の伸展具合を比較検討した。また、各種免疫染色および real-time RT-PCR を施行し WT と KO で比較検討した。

#### 4. 研究成果

(1) TRPV1 は野生種で角膜上皮下に確認することができた。

KO で 12、18、24、30 時間後に有意に治癒の遅延がみられ、24、36 時間後で有意に細胞の増殖抑制が確認された。また KO では免疫染色においてサブスタンス P とインターロイキン 6 の発現抑制が確認され、real-time RT-PCR で 12 時間後にサブスタンス P とインターロイキン 6 が有意に抑制されていた。

(2) TRPV1 アゴニスト添加群では 18 時間後上皮欠損の閉鎖は有意に促進されており、アンタゴニスト添加群では 24 時間後に有意に抑制されていた。

これらのことから TRPV1 は角膜上皮の創傷治癒に大きく貢献していることが考えられた。TRPV1 をはじめその他の痛みに関する TRP チャンネルシグナルを調節することで難治性の角膜上皮疾患の治療につながることを期待できる。

(3) KO では WT と比較し、創傷 5 日後では実質の癒合率が抑制され、筋線維芽細胞の出現も抑制されていたが、10 日後では癒合率に差はみられなかった。real-time RT-PCR でも創傷 5 日後 平滑筋アクチンとコラーゲン 1a1 の発現量の抑制が KO で確認された。また WT では線維芽細胞は角膜実質浅層に多く分布しているのに対して、KO では角膜深層部に多く分布していることが明らかになった。これは KO では角膜実質の治癒遅延による上皮の実質内陥入が実質深層部まで起こったことにより、線維芽細胞が角膜深層部の多く形成されたと思われる。

これらのことから TRPV1 は上皮のみならず実質での創傷治癒にも深く関与していた。角膜創傷治癒には TRPV1 は必要であるが上手に制御することで透明治癒を保てる可能性があることが示唆された。引き続き詳細なメカニズムを解明する必要がある。

(4) テネイシン X 欠失マウスでは WT と比較し、角膜新生血管の伸展は 7 日後で有意に抑制されていたが、3 日後、14 日後では差はみられなかった。角膜実質の TNX 発現は VEGF-A、B を伴い、角膜血管新生に関与していた。TNX 欠損による角膜血管新生抑制効果は一過性であった。

## 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 10 件)

Morii T, Sumioka T, Izutani-Kitano A, Takada Y, Okada Y, Kao WW, Saika S. A Case of Solitary Nonvascularized Corneal Epithelial Dysplasia. Case Rep Ophthalmol Med. Epub 2016 Mar 3. 査読:有 DOI: 10.1155/2016/5687285.

Saika S, Yamanaka O, Okada Y, Sumioka T. Modulation of Smad signaling by non-TGF components in myofibroblast generation during wound healing in corneal stroma. Exp Eye Res. Jan;142:40-48, 2016 査読:有 DOI: 10.1016/j.exer.2014.12.015.

Tomoyose K, Okada Y, Sumioka T, Miyajima M, Flanders KC, Shirai K, Morii T, Reinach PS, Yamanaka O, Saika S. Suppression of In Vivo Neovascularization by the Loss of TRPV1 in Mouse Cornea. J Ophthalmol. Epub 2015 Sep 27. 査読:有 DOI: 10.1155/2015/706404.

Okada Y, Reinach PS, Shirai K, Kitano-Izutani A, Miyajima M, Yamanaka O, Sumioka T, Saika S. Transient Receptor Potential Channels and Corneal Stromal Inflammation. Cornea34. S136-41, 2015 査読:有 DOI: 10.1097/ICO.0000000000000602.

Sumioka T, Miyamoto T, Takatsuki R, Okada Y, Yamanaka O, Saika S. Histological analysis of a cornea following experimental femtosecond laser ablation. Cornea33. S19-24, 2014 査読:有 DOI: 10.1097/ICO.0000000000000251.

Sumioka T, Okada Y, Reinach PS, Shirai K, Miyajima M, Yamanaka O, Saika S. Impairment of corneal epithelial wound healing in a TRPV1-deficient mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci. 55. 3295-3302, 2014 査読:有 DOI: 10.1167/iovs.13-13077.

Mergler S1, Valtink M, Takayoshi S, Okada Y, Miyajima M, Saika S, Reinach PS. Temperature-sensitive transient receptor potential channels in corneal tissue layers and cells. Ophthalmic Res52. 151-159, 2014 査読:有 DOI: 10.1159/000365334.

Yamanaka O, Sumioka T, Saika S. The role of extracellular matrix in corneal wound healing. Cornea32. S43-45, 2013 査読:有 DOI:10.1097/ICO.0b013e3182a4786b.

Saika S, Sumioka T, Okada Y, Yamanaka O, Kitano A, Miyamoto T, Shirai K, Kokado H. Wakayama symposium: modulation of wound healing response in the corneal stroma by osteopontin and tenascin-C. Ocul Surf11. 12-15, 2013 査読:有 DOI: 10.1016/j.jtos.2012.09.002.

Sumioka T, Kitano A, Flanders KC, Okada Y, Yamanaka O, Fujita N, Iwanishi H, Kao WW, Saika S. Impaired cornea wound healing in a tenascin C-deficient mouse model. Lab Invest93. 207-217, 2013 査読:有 DOI: 10.1038/labinvest.2012.157.

### [学会発表](計 18 件)

Takayoshi Sumioka, Yuka Okada, Yuka Nidegawa, Masayasu Miyajima, Ken-ichi Matsumoto, Shizuya Saika. Loss of tenascin X impaired neovascularization in cornea in response to injury in mice. Gordon, 2016.3 Ventura, USA

Takayoshi Sumioka, Yuka Okada, Yuka Nidegawa, Masayasu Miyajima, Ken-ichi Matsumoto, Shizuya Saika. Lacking tenascin X impaired neovascularization in cornea in response to injury in mice. Keystone Symposia, 2016.2 Denver, USA

Takayoshi Sumioka, Yuka Okada, Yuka Nidegawa, Masayasu Miyajima, Ken-ichi Matsumoto, Shizuya Saika. Attenuated neovascularization in a tenascin X-null mouse in response to injury. PPCTSS, 2015. 8 ソウル, 韓国

住岡孝吉, 岡田由香, 二出川裕香, 宮嶋正康, 松本健一, 雑賀司珠也. マウス創傷角膜ではテネイシンX欠失でVEGF発現や血管新生を抑制する. 第47回日本結合組織学会, 2015.5 三重

Takayoshi Sumioka, Yuka Okada, Ken-ichi Matsumoto, Osamu Yamanaka, Masayasu Miyajima, Shizuya Saika. Loss of tenascin X suppresses expression of VEGF in macrophages and of TGF $\beta$ 1 in ocular fibroblasts in vitro; possible mechanism of inhibition of neovascularization in cornea. ARVO, 2015.5 Denver, USA

住岡孝吉, 岡田由香, 山中修, 松本健一, 宮嶋正康, 雑賀司珠也. 培養マクロファージと線維芽細胞の成長因子発現でのテネイシンXの役割. 第119回日本眼科学会総会, 2015.4 札幌

Takayoshi Sumioka, Yuka Okada, Yuka Nidegawa, Masayasu Miyajima, Ken-ichi Matsumoto, Shizuya Saika. Impaired angiogenic response in cornea by

lacking tenascin X. First International Symposium on TGFb and related signaling in Ocular Biology at Wakayama, 2015.3 和歌山

住岡孝吉. マウス角膜創傷治癒過程での角膜血管新生におけるテネイシン X の役割. 第 2 回 MatriCell フォーラム, 2014.9 東京

住岡孝吉. Retrocorneal membrane と角膜内皮細胞. 第 3 回角膜セミナー, 2014.7 大阪

住岡孝吉、岡田由香、二出川裕香、白井久美、宮嶋正康、松本健一、雑賀司珠也. 角膜創傷治癒過程での角膜血管新生におけるテネイシン X の役割. 第 118 回日本眼科学会総会, 2014.4 東京

Takayoshi Sumioka, Yuka Okada, Yuka Nidegawa, Masayasu Miyajima, Ken-ichi Matsumoto, Shizuya Saika. Lacking tenascin X suppresses VEGF expression and neovascularization in an injured cornea in mice. Keystone Symposia, 2014.3 Denver, USA

Takayoshi Sumioka, Yuka Okada, Yuka Nidegawa, Masayasu Miyajima, Ken-ichi Matsumoto, Shizuya Saika. Impaired angiogenic response in cornea by lacking tenascin X in mice. ARVO, 2014.5 Orland, USA

Takayoshi Sumioka, Yuka Okada, Shizuya Saika. Impaired angiogenic response in cornea by lacking tenascin X in mice. Cornea Wakayama Symposium, 2013.11 Wakayama, Japan

Takayoshi Sumioka, Yuka Okada, Norihito Fujita, Masayasu Miyajima, Shizuya Saika. Impaired Wound Healing In Corneal Stroma Of A Nitric Oxide Synthase Type II -deficient Mouse. ARVO, 2013.5 Seattle, USA

住岡孝吉、岡田由香、藤田識人、宮嶋正康、雑賀司珠也. マウス角膜実質創傷治癒過程における Nitric Oxide 合成酵素 Type II の役割. 第 117 回日本眼科学会総会, 2013.4 東京

住岡孝吉. 細胞外マトリックスによる炎症・組織線維化の制御. 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (招待講演), 2012.5 大阪

Takayoshi Sumioka, Yuka Okada, P.S. Reinach, Norihito Fujita, Masayasu Miyajima, Shizuya Saika. Lacking TRPV1 ion channel receptor suppresses cytokines and substance P in an epithelium-debrided cornea in mice. ARVO, 2012.5 Florida, USA

住岡孝吉、岡田由香、ピーター・ライナック、藤田識人、宮嶋正康、雑賀司珠也. 角膜上皮創傷治癒過程における TRPV1 受容体の役割. 第 116 回日本眼

科学会総会, 2012.4 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 :  
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

住岡 孝吉 (TAKAYOSI SUMIOKA)  
和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 4043362

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :