

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792072

研究課題名(和文)「渴き」に対する新たな治療法のアプローチ

研究課題名(英文)The effective approach for treatment of Dry Syndrome

研究代表者

黒瀬 雅之(KUROSE, MASAYUKI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40397162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：顎顔面領域における“乾燥症”としてドライアイ・ドライマウス・ドライノーズが知られ、眼球表面・鼻腔粘膜・口腔粘膜は常に基礎分泌により潤うことで外部環境の変化に対応している。我々は、眼球表面の乾燥に応答する一次感覚神経が存在し、痛みではない冷刺激やメントール(TRPM8作動薬)や高浸透に応答することを明らかとし、基礎分泌を支配する神経機構の存在を報告してきた。課題期間中、基礎分泌の低下を促す脱感作に着目し、その機構の解明を目的に課題を遂行した。その結果、TRPV1の作動薬であるCapsaicinが著しい脱感作を誘発することが明らかとなり、チャンネル間での干渉が脱感作に寄与することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In oro-facial region, it is well known that Dry-Eye, Dry-nose, Dry-mouth syndrome as DRY syndrome. Three regions, the ocular surface, the intraoral cavity and the intranasal cavity, require constant secretions to provide nourishment and a protective barrier to the external environment. For Dry-Eye, cornea primary afferent neurons that respond to drying of the ocular surface have been previously characterized and found to respond to innocuous cooling, menthol and hyperosmotic stimuli. In this project, I have focused on the desensitization of primary afferent neuron which decreased the BASAL tearing and performed whole project to know this modulatory mechanisms. As a result, TRPV1 agonist, Capsaicin suppressed the corneal TRPM8-related neural activity (desensitization). It is proposed that there were some interaction between TRPM8 channel and TRPV1 channel on corneal primary afferent.

研究分野：歯科補綴学一般

科研費の分科・細目：補綴・理工系歯学

キーワード：TRPM8 TRPV1 角膜 ドライアイ ドライマウス 乾燥

1. 研究開始当初の背景

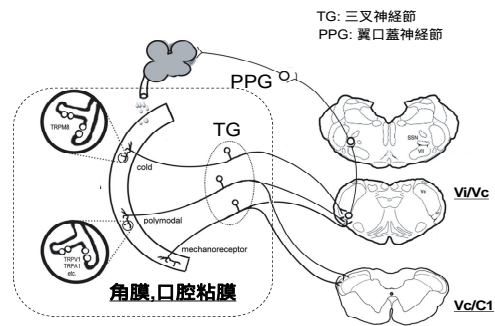
口腔乾燥症は、ストレスや唾液腺障害・食習慣・喫煙・薬剤の副作用などを原因とした口腔内の唾液の減少に起因する疾患であり、日本国内で800-900万人の罹患者がいるとされている。軽度であれば不快感や痛みが、重度であれば舌痛症や嚥下障害・構音障害・口臭やう蝕・歯周病などを併発する可能性があり、歯科疾患としても関心が高い。治療法として、過去には唾液腺ホルモンとしてパロチンの処方などもされたが、現在は人工唾液を用いる対症療法が主体である。

口腔乾燥症と同様に、“乾燥”の名称のつく代表的な三叉神経領域の疾患として角膜乾燥症 (DES) がある。DESは、コンピュータの画面を見る等による目の酷使や冷暖房による空気の乾燥化、コンタクトレンズの装着などを原因とする現代病の一種とされ、特に50歳代では約38%程度が罹患しているとされている。その症状は乾燥に関連する不快感や痛みなど、口腔乾燥症と非常に類似しており、その治療法も、電解質を主体とする成分を含む人工涙液を点眼し、目のキズの減少に伴う症状の緩和を目的とした口腔乾燥症と同様の対症療法が主体である。アメリカでは免疫抑制薬としてシクロスポリンが治療薬として処方されるが、炎症反応の軽減のみで根本的な治療法は確立されていない。

申請者は、口腔乾燥症と角膜乾燥症の症状の類似性や両者を併発する患者が多いことから、両者は基礎分泌に関して、非常に類似した神経機構によって管理されているという仮説を立てた。そこで、基礎分泌の調節を司る神経機構を知るための予備実験として、角膜に化学物質を与えることで一過性の反射性分泌だけでなく、基礎分泌に関連する涙の分泌量が増加することを申請者は明らかにし、角膜などに分布する一次感覚神経が基礎分泌の調節に関与していることを示唆してきた。次に、三叉神経節からの一次感覚神経の細胞外記録を行い、角膜への温冷刺激や機械刺激に反応する神経細胞は、口腔粘膜だけでなく鼻腔への刺激にも同様に反応する、すなわち複数の受容野を有していることを確認した。しかしながら、口腔粘膜は、*vivo*の実験系では目視が困難であり、さらに条件刺激として用いる温度刺激装置の挿入出来ないことから、最もアプローチの容易な角膜に焦点を絞った計画を立案した。

基礎分泌調節を司る神経機構を明らかにする次段階として、一次感覚神経が中継する三叉神経脊髄路核に着目し、角膜への化学刺激による Fos-like immunoreactivity から、脊髄路核のうち中間亜核と尾側亜核の中間部分 (Vi/Vc) が主立った中継箇所であることを明らかにしてきた。また、この先にある外分泌腺を支配する上唾液核を電気刺激すると、涙・鼻水・唾液が同時に分泌されることが報告されている。これらの結果から、現段階での想定される基礎分泌の調節回路

を下図に示す。申請する研究計画は下図内破線で囲った部分、一次感覚神経内における制御に関してである。



角膜には、A-delta や C 線維の自由神経終末が高密度に分布しており、これらの神経細胞は、機械・化学・温度といった複数の質の刺激に反応することが知られている。反応の特性から 機械刺激・侵害性の熱刺激・化学刺激に反応する多感覚特性侵害受容器 熱や化学刺激には反応せずに機械刺激にのみ反応する機械受容器 侵害ではない領域の低温に反応する “Cold Cell” に分類されている。共同研究者である Dr Ian Meng は、Cold Cell の同定に成功し、Cold Cell が角膜の乾燥に強く反応することを報告している。また、申請者は、Cold Cell の特性をより詳細に検討し、乾燥だけでなく高浸透圧に対しても強く反応することから、乾燥状態を活動電位に変換する1つの指標を報告している。また、近年その存在が注目される Transient receptor pontential (TRP) channel のうち TRPM8 channel が Cold Cell に多く分布していることを、さらにその TRPM8 channel が乾燥に対して強く反応することが報告されてきた。申請者も、Cold Cell が TRPM8 の作動薬である Menthol に反応することを確認しており、TRPM8 の特性を Cold cell を用いて検討することが、有用であると考えられる。

2. 研究の目的

【要約】三叉神経領域における“乾燥”を愁訴とする疾患である口腔乾燥症・角膜乾燥症・乾燥性鼻炎は、十分に粘膜や上皮細胞を水分によって保護できないことからくる乾燥・不快感・炎症と灼熱痛といった痛みが知られている。これに対する治療法も水分の補充という非常に限定された対症療法が主体である。そこで、新たな強力でありなおかつオルタナティブな治療のオプションとして、外分泌腺の“基礎分泌”に着目し、痛みを伴わず、基礎分泌を支配する神経回路を活性化させられる手法の確立を目的とし、本研究計画を立案した。

レーシック手術後に DES が頻発することや、角膜の感受性が低下するということから、申請者は外分泌腺の組織学位的な変性だけでなく、角膜上皮の受容器レベルでの変化が

DES を引き起こすことに注目し、**抑制された神経回路を活性化させられる手法の確立**を最終目的に本研究計画を立案した。手法の確立を行うための前段階として、対象となりうる神経回路とそのターゲットチャネルは明確にすることが出来たので、次のステップとして DES は TRPM8 Channel が活動電位を伝達しない脱感作の状態であると仮説を立て、脱感作を誘発するリン酸化を解除することが DES の改善に繋がると考えた。そこで、まず本研究期間内に、**人為的に TRPM8 Channel の脱感作を起こす実験系の確立並びに、Channel の脱感作を誘発する機構の解明**を目的とする。

申請者は予備実験の段階で、TRPM8 channel と TRPV1 channel の交互作用に着目し、TRPV1 channel の作動薬である Capsaicin を角膜に投与した後、冷刺激を与えると、Vehicle を与えた後の冷刺激に対する応答と比較すると、その神経活動は大きく抑制されることを明らかにしている。まずは、このモデルを用いて、Capsaicin の濃度の調節や薬剤の効果時間などを検討し、モデルとして成熟させた後に、リン酸化を引き起こすであろうと考えられるホスホリパーゼ C やプロテインキナーゼ C などの Activator や Inhibitor を使い、TRPM8 channel 由来の活動の脱感作に及ぼす影響を検討することとする。また、Cold Cell に発現が確認されている TRPA1 に対しても同様に検討を行う。

3. 研究の方法

研究計画は、**TRPM8 Channel の脱感作モデルの確立と Channel の脱感作を誘発する機構の解明**の2つに分類して行う。

(1) : TRPM8 channel の脱感作は、冷刺激に対する応答から評価を行うこととする。予備実験の段階から Channel の脱感作を引き起こす因子として TRPV1 Channel の作動薬である Capsaicin の可能性に着目しており、その濃度や効果時間を詳細に検討しモデル作成に繋げる。また、Cold cell には TRPA1 Channel の発現も確認されており、その作動薬である AITC も同様に検討する。また、TRPM8 Channel 作動薬の Menthol が自身に与える影響も同様に検討する。

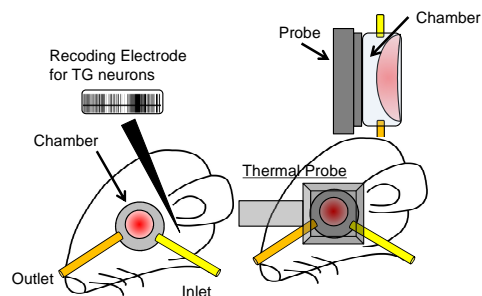
(2) : モデルが確立された後は、ホスホリパーゼ C に代表される加水分解酵素、プロテインキナーゼ C に代表されるリン酸化酵素などの Activator や inhibitor を脱感作前後で投与し、その影響から TRPM8 channel のリン酸化を誘発する上流の因子の検討を行い最終目的の薬剤の開発に繋げる。

【共通する手法】

Cold Cell の同定には、乾燥並びに冷刺激を用い、両者に対する応答があれば Cold Cell とする。

研究代表者がアメリカ・ニューイングランド大学に滞在時に試作し、現在は FST 社 (ME, USA) が作成する Chamber をラットの角膜

(眼球) に装着する。概要は下図に示す。



温度刺激用のプローブを Chamber 越しにセットし、Chamber 内を人工涙で満たして 35 に保つ。

条件刺激となる冷刺激は、ステップ刺激 (31, 27, 23, 19, 15 の 5 段階) と持続的な刺激 (20 の 150 秒間) を行うこととする。ステップ刺激から、冷刺激に対して Cold Cell が活動を開始する閾値と最大活動量を、持続刺激から、Channel の脱感作の程度を知る。

人工涙と TRPM8 作動薬 Menthol、TRPV1 作動薬 Capsaicin (30nM-30uM)、TRPA1 作動薬 AITC (0.001%-0.01%) を順次交換し、その都度冷刺激を行い、薬剤の冷刺激に与える影響を記録する。

薬剤投与により冷刺激が抑制され、Vehicle による洗浄後もその抑制が持続する (Control に回復しない) 場合は、他の薬剤の投与は行わず、その細胞に対する実験は終了とする。

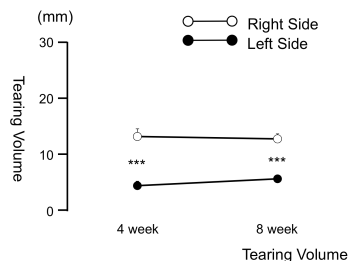
一連の実験の中で、再現性に優れ、可逆的な TRPM8 channel の脱感作を誘発する薬剤並びにその濃度を見つけ、実験モデルの確立に繋げる。

4. 研究成果

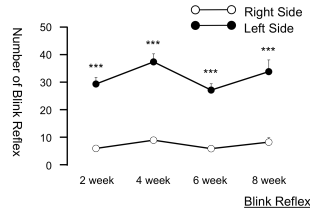
TRPM8 Channel の脱感作モデルの確立と並行して、DES が脱感作状態であることを立証するために、実験的にラットの涙腺を外科的に摘出し、4-6 週間飼育を行った慢性乾燥症モデルを作製し、冷刺激や Menthol などの各種溶液の及ぼす影響を検討した。

(1): 実験的な乾燥症モデル動物の作製

ラットの眼窩外涙腺と眼窩内涙腺の両者を麻酔下で外科的に摘出した。その後、飼育ゲージ内で 6 週間飼育し、その間、瞬目反射数と自発的な涙の分泌量を測定しその経時的な変化を記録した。自発的な涙の分泌量の経時の変化を左図に示す。摘出側 (Left Side) は非摘出側 (Right Side) と比較して有意な涙の分泌量の低下が観察された。

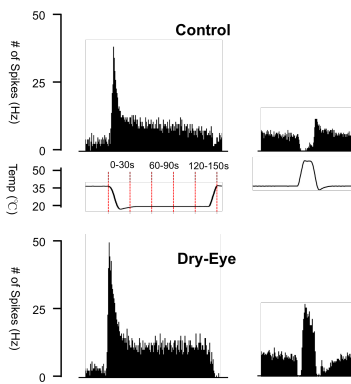


また、DES の患者の多くがその回数が増加するとされる瞬目反射の経時的变化を左図に示す。瞬目反射は、涙腺摘出 2 週間後から有意な増加が認められた (Right Side: 非摘出側、Left Side: 摘出側)。以上のことから、外科的に涙腺を摘出する手法は、乾燥症モデルの作製に有用であることが示唆された。



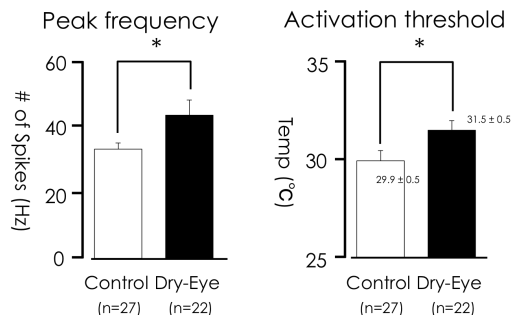
(2): 摘出群と非摘出群への冷・温刺激

次にこのモデルを用いて、Cold Cell の活動記録を行った。下図に非摘出群における冷刺激並びに温刺激を行った際の活動の一例 (Control) と、摘出群における冷刺激並びに温刺激を行った際の Cold Cell の活動の一例 (Dry-Eye) を示す。非摘出群では、冷刺激は



35 から 20 までの温度の降下期に高い頻度の活動が見られ、20 の温度持続期には降下期と比較すると小さいものの安定した活動が見られた。これに対して、52 の温刺激

時には、持続性の活動が抑制された。摘出群動物 (Dry-Eye) への冷温刺激を与えた結果、冷刺激に対する応答は、35 から 20 までの温度の降下期に摘出群と比較して高い頻度の活動が記録された。これに対して、52 の温刺激時には、非摘出群では持続性の活動が抑制されたにも拘わらず、持続性のある高い頻度の活動が記録された。下図左に最大活動量の比較を、下図右に活動を開始する温度の比較並びに統計処理の結果を示す。

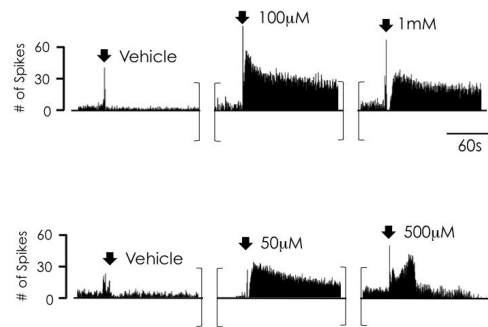


摘出群は非摘出群と比較して、冷刺激に対する神経活動の最大活動量は有意に大きく、活動を開始する温度は有意に高いことが明らかとなった。このことは、**長期間の乾燥に晒された Cold Cell が、冷刺激に対して強く感**

作されていることを示唆している。

(3): 摘出群と非摘出群への溶液刺激

非摘出群と摘出群の角膜表面に、TRPM8 の作動薬である Menthol を塗布した結果、非摘出群 (下図上段) では、100 uM の Menthol で持続性のある神経活動が誘発され、10 倍の濃度の 1 mM Menthol では 100uM と比較して小さいものの持続性のある神経活動が記録された。これに対して、摘出群 (下図下段) では、非摘出群と比較して、低い濃度 (50 uM) の Menthol の塗布により持続性のある神経活動が誘発された。非摘出群では、持続性の活動を誘発する濃度 (500 uM) の Menthol の塗布により、塗布直後は強い活動が見られるもののその活動が持続せず、その後抑制する一過性の活動が記録された。



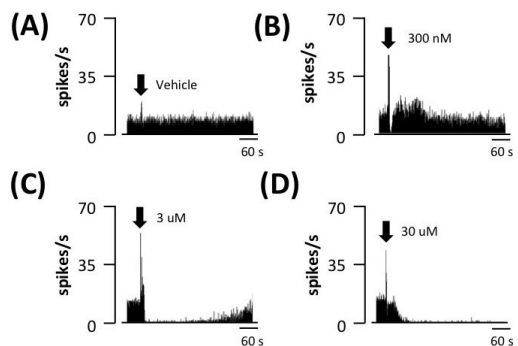
(4): 結果からの考察

これらのことから、乾燥に長期間に晒された角膜の Cold Cell は、乾燥に晒されていない群と比較して、**温度刺激に対する感度が上昇する、すなわち感作されていることが示唆されるが、その状態は容易に脱感作されやすいことが明らかとなった。**

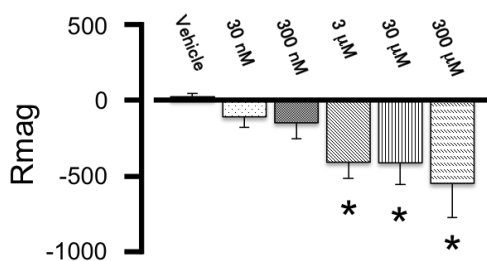
乾燥症患者に対して、点眼薬や保湿剤が処方されるが、それらの多くには爽快感を得るためのメントールが含有されていることが多い。それらを処方以上に多量に塗布することは、脱感作を招き、さらなる乾燥を招くことが示唆される知見である。

(5): 脱感作モデルの作製

実験的に涙腺を摘出する乾燥症モデル動物の結果から、乾燥症が脱感作を誘発することを明らかとした。そこで、脱感作を誘発する因子を解明することを目的に、涙腺摘出を行うことなく、Cold Cell の脱感作を誘発出



来る脱感作モデル動物の作製に着手した。予備実験の段階から、TRPV1 Channel の作動薬である Capsaicin の Cold Cell に対する作用に着目しており、角膜表面に塗布することでその及ぼす影響を検討した。上図(A: Vehicle, B: 300 nM Capsaicin, C: 3 uM Capsaicin, D: 30 uM Capsaicin) にその一例を示す。溶媒である Vehicle の投与は神経活動に影響を及ぼさないが、300 nM Capsaicin では一過性の神経活動の増加が、3 uM を超える濃度の Capsaicin の投与は、投与前から有する持続性の神経活動を減少させ、その効果は数分間持続した。30 uM を超える濃度の Capsaicin の投与では、多くの Cold Cell は、その活動は抑制され、抑制効果は回復しなかった。下図に解析結果を示す。



3 uM を超える濃度の Capsaicin の投与は、有意に溶媒と比較してその活動量を減少させた。

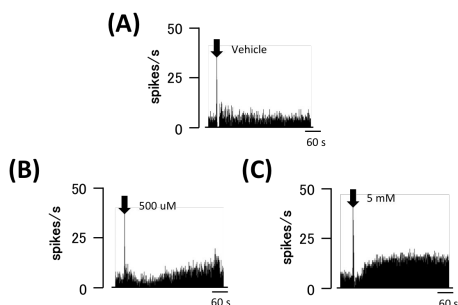
この結果から、**Cold Cell には TRPM8 channel と TRPV1 channel が共発現し、お互いに相互作用を有すること**を示唆された。その結果、TRPV1 が関与する刺激を受容することで、Cold Cell は脱感作されることが示唆され、脱感作モデルとしての有効性が示された。

(6): 他のチャネル作動薬の及ぼす影響

TRPV1 channel 作動薬の及ぼす影響と同様に TRPA1 channel 作動薬が Cold Cell の活動の及ぼす影響を検討した。TRPA1 channel の作動薬として AITC を用いた。

(A) に溶媒を角膜表面に投与した際の持続性の活動の変化を、(B) に 500 uM の AITC を投与した後の活動の変化を、(C) に 5 mM の AITC を投与した後の活動の変化を示す。

5 mM の AITC の投与により、持続性のある神経活動が誘発された。しかしながら、AITC の及ぼす影響は動物間での差が大きかった。



(7): 加水分解酵素、リン酸化酵素などの Activator や inhibitor の効果

Capsaicin 投与による脱感作モデルを用いて、加水分解酵素・リン酸化酵素の関与の程度を調べるために、各種酵素の Activator や inhibitor を投与し、その影響を検討した。しかしながら、各種酵素の脱感作に及ぼす明確な影響を確認することは出来なかった。この原因として、角膜表面への薬液の浸透の可否が考えられるため、血清アルブミンを用いた溶媒などの検討も視野に今後の研究に活かしたい。

(8): 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

乾燥症モデル動物を用いた、Cold cell の温度刺激に対する応答や溶液刺激に対する応答に長期間の乾燥が及ぼす影響に関しては、「Dry eye modifies the thermal and menthol responses in rat corneal primary afferent cool cells」のタイトルで Journal of Neurophysiol に投稿し、出版されている。同雑誌は神経科学の Field の中で高い評価を受けている国際誌である。特に、反復的なメントールを含有した点眼薬や保湿剤の過量の投与がさらなる乾燥症を誘発するという視点は、臨床家からの評価を得る知見であり、眼科領域の研究者や臨床家が集う ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) にて研究発表を海外共同研究者である Dr Ian Meng が行い、注目される研究報告となった。

また、一連の Cold Cell と乾燥症との関連性やモデルとして有効性は、「The role of corneal afferent neurons in regulating tears under normal and dry eye conditions」のタイトルで Exp Eye Res に Review の形で出版されている。

Capsaicin の投与による脱感作モデルの結果は、現在、先の Journal of Neurophysiol に投稿中である。

(9): 今後の展望

脱感作現象のメカニズムの解明は乾燥症治療に対しての興味深い知見を提供出来ることから、その解明を今後も継続したい。特に、その因子として神経栄養因子に着目しており、栄養因子の投与前後の活動性の変化からその影響を検討することを今後の研究計画に加える予定である。

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4件)

Meng ID, Kurose M: The role of corneal afferent neurons in regulating tears under normal and dry eye conditions. Exp Eye Res. 117:79-87. 2013.

DOI: 10.1016/j.exer.2013.08.011
(査読有)

Kurose M, Meng ID: Dry eye modifies the thermal and menthol responses in rat corneal primary afferent cool cells. J Neurophysiol. 110(2):495-504. 2013.

DOI: 10.1152/jn.00222.2013
(査読有)

Robbins A, Kurose M, Winterson BJ, Meng ID: Menthol activation of corneal cool cells induces TRPM8-mediated lacrimation but not nociceptive responses in rodents. Invest Ophthalmol Vis Sci. 53(11):7034-42. 2012.

DOI: 10.1167/iovs.12-10025
(査読有)

Kurose M, Meng ID: Corneal dry-responsive neurons in the spinal trigeminal nucleus respond to innocuous cooling in the rat. J Neurophysiol. 109(10):2517-22. 2013.
DOI: 10.1152/jn.00889.2012
(査読有)

[学会発表](計6件)

Kurose M, Hatta A, Wiersma J, Oda M, Yamamura K, Meng ID: The effect of Menthol, Capsaicin and AITC on the thermal response of corneal primary afferent neurons. 第91回日本生理学会大会. 鹿児島県鹿児島市, 2014/3/16-18.

八田 あずさ, 黒瀬 雅之, 藤井 規孝, 山村 健介: 乾燥による上皮細胞の乾燥は、さらなる乾燥を誘発する. 第56回歯科基礎医学会学術大会・総会. 岡山県岡山市, 2013/9/20-22.

Kurose M, Robbins A, Yamamura K, Meng ID: The property of the Corneal Dry-responsive Neurons in the Trigeminal Nucleus in the Rat. The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 東京都江東区, 2013/03/27-29.

Kurose M, Twaite A, Yamamura K, Meng ID: Dry Eye Modifies the Properties of Corneal Primary Afferent Cold Cells. International joint symposium on Human Resource Development towards Global Initiative. Cha-am, Thailand, 2013/2/16-17.

Kurose M, Twaite A, Yamamura K, Meng ID: The effect of dry eye on the properties of corneal primary afferent neurons activated by cooling and menthol. Neuroscience 2012. New Orleans, USA, 2012/10/13-17.

黒瀬 雅之, 山田 好秋, 山村 健介: 長期間の乾燥がもたらす角膜求心性線維の応答性の変化. 第54回歯科基礎医学会学術大会・総会, 福島県郡山市, 2012/9/14-16.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒瀬 雅之 (KUROSE Masayuki)

新潟大学医歯学系 助教

研究者番号: 40397162