

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462729

研究課題名(和文) TGFβシグナルのTRPによる調節を標的とした眼線維化疾患の新規治療戦略の確立

研究課題名(英文) New treatment strategy for ocular fibrotic diseases by modulation of TGFβ signal with TRP cation channels

研究代表者

雑賀 司珠也 (Saika, Shizuya)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40254544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：各種TRPカチオンチャンネル(TRPV1, TRPA1, TRPV4)の遺伝子ノックアウトや阻害薬で、角膜のアルカリ暴露後の線維・瘢痕化の抑制を実現できた。培養マウス線維芽細胞で、線維化に關与するTGFβ由来シグナル(各種MAPKやSmad)の活性化を各種TRPチャンネルが制御していることが判明した。TRPV4シグナルはインターロイキン6の発現制御を介して、組織線維化にプラスに關与していることを解明できた。結膜瘢痕でも同様のメカニズムが備わっていると予想されたが、予備実験に止まった。マウス水晶体ではTRPチャンネルの上皮-間葉系移行を介した線維・瘢痕化への影響は少ないと思われた。

研究成果の概要(英文)：Tissue fibrosis induced by an alkali exposure was effectively suppressed by TRP channel (TRPA1, TRPV1, TRPV4)-signals modulation of TGFβ-MAPK/Smad signals in genetically modified mouse lines. The inhibitory effects was reproduced by specific chemical inhibitors of each channel. TRPV4 signal was also found to be related to interleukin-6 signal in tissue fibrosis. A similar mechanism might be involved in conjunctival fibrosis, although we have preliminary data. Tissue fibrosis in a mouse lens related to epithelial-mesenchymal transition did not seem to be related to TRP cation channel signals.

研究分野：眼科学

キーワード：組織瘢痕化 成長因子 TRPイオンチャンネル 角膜 眼 ノックアウトマウス 細胞培養 水晶体

1. 研究開始当初の背景

(1) TGFb による Smad シグナルは他の増殖因子刺激によって MAK キナーゼ, p38, JNK によってそのミドルリンカー領域がリン酸化され、C 末端のリン酸化による遺伝子発現をさらに正または負に調節している。申請者の平成 19 年-21 年の 3 カ年の基盤研究(C)「Smad リンカー領域リン酸化の上皮-間葉系移行と線維化での役割の研究」では、眼線維化疾患モデルでの上皮-間葉系移行に Smad ミドルリンカー領域のリン酸化がこの正の制御をしめすことを解明した。さらに、平成 22 年-24 年の基盤研究(C)「インテグリンによる Smad 系の調節を標的とした眼線維化疾患の新規治療戦略の確立」で、アルファ 9 インテグリンリガンドのマトリセラー蛋白質が TGF ベータシグナルを増強し、上皮-間葉系移行に関与することを解明した。

(2) TRP イオンチャネルスーパーファミリーとは、イオンチャネル型侵害刺激受容体の代表的分子群で感覚神経やその他の一部の組織に発現され、種々の特異的リガンドや特異的溫度に反応し、痛覚や細胞機能調節に関与する。TRP イオンチャネルの炎症への関与は、近年一部で注目されてはいるものの、主に神経ペプチド(サブスタンス P、CGRP など)を介した炎症制御の研究が世界的な動向と思われる。その上、非神経組織での研究は遅々としている。

TGFb に限らずサイトカイン・成長因子シグナルとのクロストーク(正・負)に関しては、全く研究が進んでいなかった。申請者は TRPV1 ノックアウト(KO)マウスではアルカリ外傷後の角膜の炎症と癒痕化が源弱したことを報告した。骨髄移植後のマウスでの検討から、TRPV1 欠損の角膜炎症軽減の表現型は、炎症細胞でなく、間葉系細胞での TRPV1 欠損に依存することを解明した。一方、重症のアレルギー性結膜疾患や緑内障濾過手術では過剰な結膜の癒痕化も臨床、抑制すべき病

態である。増殖硝子体網膜症でも網膜色素上皮細胞の上皮-間葉系移行による線維化は避けるべき課題である。TRP チャネル群がこれらの病態に関与している可能性が想定された。しかし、TRPA1 や TRPV4 の結膜癒痕過程での役割は解明できていなかった。

2. 研究の目的

本研究は各 TRP 群による TGFb シグナル活性化の調節機序解明と、それを標的とした眼線維化疾患の新規治療戦略の確立を目的とする。TRPA-KO マウスと TRPV4 ノックアウトマウスで眼組織の創傷治癒、線維・癒痕化を結膜の癒痕モデルで検討した。組織学、免疫組織化学で炎症、線維化のレベルを評価した。予備実験では初期計画の結膜切開による癒痕モデルで野生型と両 KO マウスの組織で癒痕化に著名な差異が観察されなかったため、より侵襲の強い結膜癒痕モデルで両 KO マウスの癒痕の程度の評価を行った。

3. 研究の方法

(1) 培養眼由来線維芽細胞の TGFb1 刺激による炎症、線維化関連遺伝子、蛋白質の発現に対する TRPA1、TRPV4 の欠損の影響を KO マウス由来の細胞で検討した。培養眼線維芽細胞を TRPA1、TRPV4 の KO マウスと野生型マウスから得て、60 ミリシャーレで無血清下に TGF ベータ 1(1.0 ng/ml)に暴露後、15 分から 5 時間までの間で各種シグナルのウエスタンブロットを行った。培養線維芽細胞での遺伝子発現解析では、60 ミリシャーレで、各 KO マウスと野生型マウス眼由来の線維芽細胞を無血清下に TGFb1(1.0 ng/ml)に 24 時間暴露させ、RNA 採取(Sigma キット), TaqMan real-time RT-PCR(Apply Biosystem)で遺伝子発現(TGFb1、IL-6、MCP-1、VEGF、アルファ平滑筋アクチン(aSMA)、I 型コラーゲン)に供した。

(2) 培養マクロファージの TGFb1 刺激による上記シグナルと炎症関連遺伝子、蛋白質の

発現に対する TRPA1 または TRPV4-KO マウス由来の細胞で検討した。TRPA1, TRPV4 の KO マウスから腹腔マクロファージを採取した。それぞれのマウスに5%グリコーゲン刺激4日後に腹腔を培養液で洗浄してマクロファージを回収した。60 ミリシャーレで、各 KO マウスと野生型マウス由来のマクロファージを無血清下に TGFβ1 に 24 時間暴露させ、RNA 抽出(Sigm), TaqMan real-time RT-PCR で遺伝子発現 (TGFβ1、IL-6、MCP-1、VEGF) に供した。

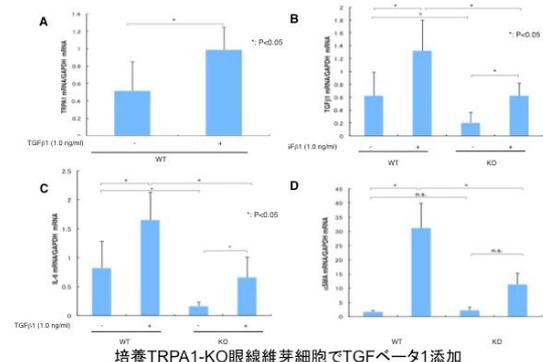
(3) TRPA1 または TRPV4 の KO マウスで結膜全周切開外傷(Yamanaka O, et al. Mol Vision 2006; IOVS 2009)を作成し、組織学、免疫組織化学を用いて、創傷治癒過程、炎症、線維・癒痕化の程度を評価したものの、野生型マウスと大きな差が出なかったため、眼表面により強い炎症を惹起するアルカリ外傷モデルでの結膜を検討した。そこで、眼表面全体(角膜、結膜を含む)を 1N 水酸化ナトリウム(3 マイクロ L) で障害するアルカリ外傷モデルで研究を行った。5、10、20 日後にパラフォームアルデヒド固定パラフィン切片による HE 染色、免疫組織化学に供した。好中球マーカー: myeloperoxidase (MPO)、マクロファージマーカー: F4/80、筋線維芽細胞マーカー: αSMA、フィブロネクチンなどの発現を検討した。

4. 研究成果

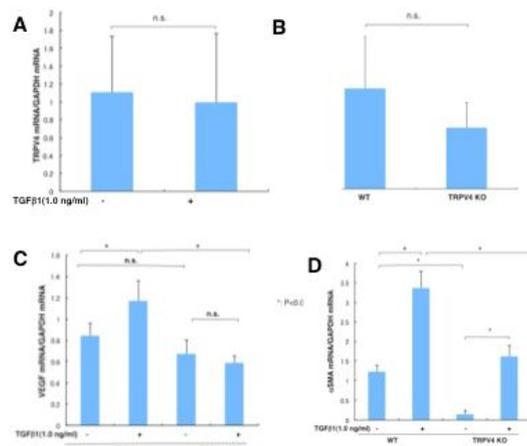
(1) TRPA1 または TRPV4 ノックアウト培養眼由来線維芽細胞では、TGFβ1 刺激による TGF βータ 1、IL-6、αSMA の発現増強をカウンターアクトした(図 1、図 2)。シグナルレベルでは、TRPA1-KO は、Smad その他、おしなべて TGFβ1 刺激によるシグナル伝達を抑制した。

(2) 培養マクロファージの TGFβ1 刺激による上記シグナルと炎症関連遺伝子、蛋白質の発現に対する TRPA1 または TRPV4-KO マウス由来の培養マクロファージで検討した。各 KO

マウスと野生型マウス由来のマクロファージを無血清下に TGFβ1 に 24 時間暴露させた結果、TRPA1 欠損はマクロファージの炎症、線維化関連遺伝子発現に影響しなかった(図 3)。一方、TRPV4 欠損はマクロファージでのこれらの遺伝子発現は抑制された(図 4)。

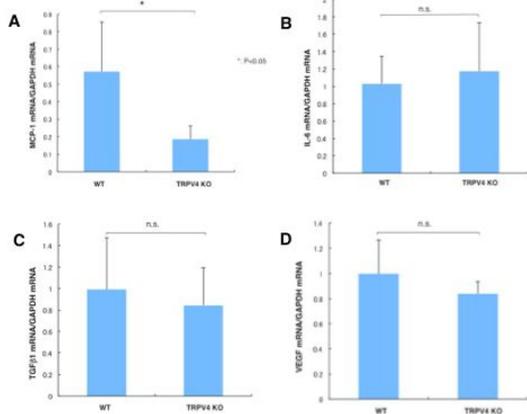


培養TRPA1-KO眼線維芽細胞でTGFβータ1添加

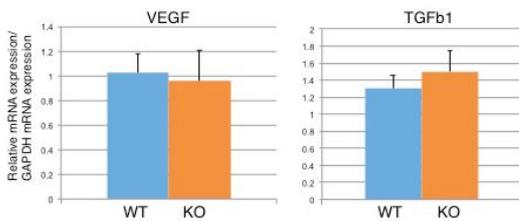


培養TRPV4-KO眼線維芽細胞でTGFβータ1添加

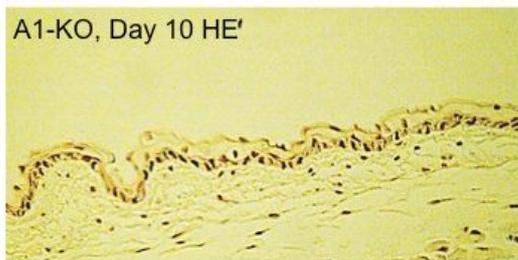
(3) 眼表面全体(角膜、結膜を含む)を 1N 水酸化ナトリウム(3 マイクロ L) で障害するアルカリ外傷モデルで研究を行った。5、10、20 日後にパラフォームアルデヒド固定パラフィン切片による HE 染色(図 5)、免疫組織化学に供した。好中球マーカー: myeloperoxidase (MPO)、マクロファージマーカー: F4/80、筋線維芽細胞マーカー: αSMA、フィブロネクチンなどの発現を検討した。経過を通じて好中球浸潤には TRPA1 欠損、TRPV4 欠損とも影響しなかったが、マクロファージ浸潤と筋線維芽細胞の出現は TRPA1 欠損または TRPV4 欠損で抑制された(図 6)。



培養TRPV4-KO マクロファージの遺伝子発現

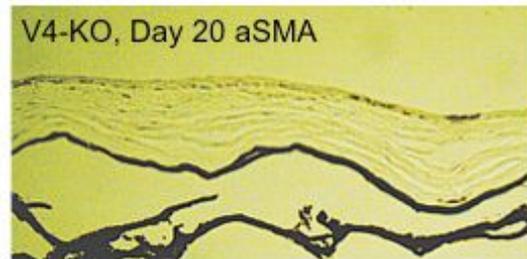
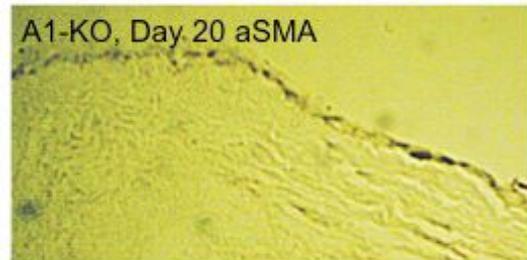
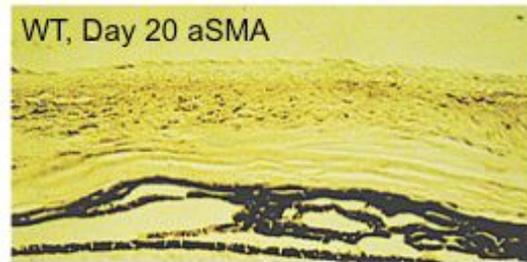


培養TRPA1-KO マクロファージの遺伝子発現



(4) TGFβシグナルは、炎症、組織修復、線維・癒痕化で中心的役割を演じる成長因子であるので、各 TRP チャンネルの制御による TGFβ1 シグナル調節の全容解明と、それを応用した in vivo 線維・癒痕化と炎症の制御の戦略は、国際的にも独創・画期的かつ有効な治療法の開発につながると確信する。今回の研究では、増殖硝子体網膜症モデルでの研究を完遂で来なかったが、結果から TGFβ/TRP イオンチャンネルのクロストークを標的とした新たな眼組織の線維・癒痕化治療(結膜

だけではなく他の眼組織も含めて)の戦略を確立し、世界をリードできると考える。



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 16 件)

The murine lens: A model to investigate in vivo epithelial-mesenchymal transition.

Shirai K, Tanaka S, Lovicu FJ, Saika S. Dev Dyn. 2017 May 8. (in press)

Impaired Healing of a Cutaneous Wound in an Inducible Nitric Oxide

Synthase-Knockout Mouse. Kitano T, Yamada H, Kida M, Okada Y, Saika S, Yoshida M. Dermatol Res Pract. 2017;2017:2184040. doi: 10.1155/2017/2184040.

Ocular surface alkali injury damages meibomian glands in mice. Mizoguchi S, Iwanishi H, Kokado M, Sumioka T, Parfitt GJ, Xie Y, Arita R, Shirakawa R, Yamanaka O, Okada Y, Jester JV, Saika S. Ocul Surf. 2017 Apr 22. pii: S1542-0124(16)30131-8. doi: 10.1016/j.jtos.2017.04.003.

Bacteriology of the conjunctiva in pre-cataract surgery patients with

occluded nasolacrimal ducts and the operation outcomes in Japanese patients. Hayashi Y, Miyamoto T, Fujita S, Tomoyose K, Ishikawa N, Kokado M, Sumioka T, Okada Y, Saika S. *BMC Ophthalmol*. 2017 Feb 20;17(1):15. doi: 10.1186/s12886-017-0410-x.

Loss of TRPV4 Function Suppresses Inflammatory Fibrosis Induced by Alkali-Burning Mouse Corneas. Okada Y, Shirai K, Miyajima M, Reinach PS, Yamanaka O, Sumioka T, Kokado M, Tomoyose K, Saika S. *PLoS One*. 2016 Dec 28;11(12):e0167200. doi: 10.1371/journal.pone.0167200. eCollection 2016.

Effects of epiplakin-knockdown in cultured corneal epithelial cells. Kokado M, Okada Y, Miyamoto T, Yamanaka O, Saika S. *BMC Res Notes*. 2016 May 20;9:278. doi: 10.1186/s13104-016-2082-7.

A Case of Solitary Nonvascularized Corneal Epithelial Dysplasia. Morii T, Sumioka T, Izutani-Kitano A, Takada Y, Okada Y, Kao WW, Saika S. *Case Rep Ophthalmol Med*. 2016;2016:5687285. doi: 10.1155/2016/5687285.

Inhibition of development of laser-induced choroidal neovascularization with suppression of infiltration of macrophages in Smad3-null mice. Iwanishi H, Fujita N, Tomoyose K, Okada Y, Yamanaka O, Flanders KC, Saika S. *Lab Invest*. 2016 Jun;96(6):641-51. doi: 10.1038/labinvest.2016.30.

Modulation of Smad signaling by non-TGF components in myofibroblast generation during wound healing in corneal stroma. Saika S, Yamanaka O, Okada Y, Sumioka T. *Exp Eye Res*. 2016 Jan;142:40-8. doi: 10.1016/j.exer.2014.12.015. Review

Ocular surface mucins and local inflammation--studies in genetically modified mouse lines. Shirai K, Saika S. *BMC Ophthalmol*. 2015 Dec 17;15 Suppl 1:154. doi: 10.1186/s12886-015-0137-5. Review.

Ocular transient receptor potential channel function in health and disease. Reinach PS, Mergler S, Okada Y, Saika S. *BMC Ophthalmol*. 2015 Dec 17;15 Suppl 1:153. doi: 10.1186/s12886-015-0135-7. Review.

Abnormalities in the meibomian glands in patients with oral administration of

anticancer combination drug-capsule TS-1(®): a case report. Mizoguchi S, Okada Y, Kokado M, Saika S. *BMC Cancer*. 2015 Oct 24;15:796. doi: 10.1186/s12885-015-1781-0.

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

Transient Receptor Potential Channels and Corneal Stromal Inflammation. Okada Y, Reinach PS, Shirai K, Kitano-Izutani A, Miyajima M, Yamanaka O, Sumioka T, Saika S. *Cornea*. 2015 Nov;34 Suppl 11:S136-41. doi: 10.1097/ICO.0000000000000602. Review.

Disruption of eyelid and cornea morphogenesis by epithelial -catenin gain-of-function. Mizoguchi S, Suzuki K, Zhang J, Yamanaka O, Liu CY, Okada Y, Miyajima M, Kokado M, Kao WW, Yamada G, Saika S. *Mol Vis*. 2015 Jul 31;21:793-803. eCollection 2015.

A pain-mediated neural signal induces relapse in murine autoimmune encephalomyelitis, a multiple sclerosis model. Arima Y, Kamimura D, Atsumi T, Harada M, Kawamoto T, Nishikawa N, Stofkova A, Ohki T, Higuchi K, Morimoto Y, Wieghofer P, Okada Y, Mori Y, Sakoda S, Saika S, Yoshioka Y, Komuro I, Yamashita T, Hirano T, Prinz M, Murakami M. *Elife*. 2015 Aug 11;4. doi: 10.7554/eLife.08733.

〔学会発表〕(計7件)

シンポジウム、講演など

Yamanaka O: Matricellular proteins modulate TGF /Smad signal in EMT in an injured lens. 日本眼科学会総会 International Symposium 2016. 4. 仙台.

Saika S: Loss of Osteopontin Attenuates Tissue Fibrosis in Injured Eye Tissues in Mice: Suppression of Smad Signal, Epithelial-Mesenchymal Transition and Fibroblast Activation. Keystone Symposia, 2016.2. Denver, CO

Sumioka T, Okada Y, Nidegawa Y, Miyajima M, Matsumoto K, Saika S: Attenuated neovascularization in a tenascin X-null mouse in response to injury. PPCTSS, 2015. 8. Seoul, Korea

Sumioka T, Okada Y, Matsumoto K, Yamanaka O, Miyajima M, Saika S: Loss of tenascin X suppresses expression of VEGF in macrophages and of TGF β 1 in ocular fibroblasts in vitro; possible mechanism of inhibition of neovascularization in cornea. The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, 2015.5. Denver, CO

Okada Y, Shirai K, Reinach PS, Miyajima M, Saika S. Impairment of cornea epithelium wound healing in a TRPA1-deficient mouse. The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, 2015.5. Denver, CO

Saika S: Myofibroblast generation in cornea and lens: modulation of Smad signal by extracellular matrix. ARVO, 2015.5. Denver, CO

Shirai K, Saika S: Extracellular matrix modulation of TGF β /Smad signaling in EMT. Asia ARVO, 2015.2. Yokohama, Japan

〔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

雑賀 司珠也 (SAIKA SHIZUYA)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：40254544

(2) 研究分担者

岡田 由香 (OKADA YUKA)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50264891

山中 修 (YAMANAKA OSAMU)
和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号：50254545

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()