

ドライアイにおける侵害受容性疼痛の機序の解明にむけた
マウス三叉神経節細胞初代培養モデル確立(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系眼科学専攻

洲之内 千尋

2022 年

指導教員 山上 聡

【緒言】

角膜知覚を司るのは三叉神経第1枝の一部である角膜神経 (無髄神経)である。知覚神経には機械的刺激を知覚するポリモーダル侵害受容体 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1; TRPV1)、冷覚を知覚する冷覚侵害受容体 (Transient Receptor Potential Melastatin 8; TRPM8)がある。膜の再生医療や角膜血管新生の研究に比べ、角膜神経 (知覚神経、三叉神経)の研究は大きく立ち遅れているが、その理由の一つとして適切な疾患・実験的検討モデルの不足が挙げられる。眼科領域においてマウスの三叉神経節細胞を用いた研究は、眼部の炎症やそれに伴うサイトカイン、糖尿病による角膜神経に着目した報告が多くなされているものの、侵害受容性疼痛に関してはこれまで報告されていない。

涙液の量的・質的異常を呈するプライマリーな疾患であるドライアイには、角膜上皮障害や炎症所見がほとんどみられないにも関わらず強い異物感を呈するタイプのドライアイ (BUT 短縮型ドライアイ)も存在する。このようなドライアイ症状には侵害受容性疼痛または神経障害性 (神経因性)疼痛のいずれかが関与していると考えられている。角膜における侵害受容性疼痛については TRP ファミリーの一員である TRPV1 の関与が示唆されているもののほぼ未解明であり、神経障害性疼痛についても明らかになっていない。

そこで今回我々はまず分散法によって神経細胞のみを単離し三叉神経節初代培養細胞の成熟神経細胞培養の確立を試みた。さらにこの確立した培養細胞系を用いて、細胞内 Ca^{2+} イメージングを行い神経興奮を測定することで、各種ドライアイ治療薬の持つ神経興奮抑制効果の有無を検討した。具体的には、TRPV1 アゴニスト (カプサイシン)で惹起した神経興奮 (TRPV1 刺激による疼痛シグナル)について、シクロスポリン・ジクアホソル・レバミピドがもつ神経興奮抑制効果 (疼痛シグナル抑制効果)の有無を検討した。

【方法】

野生型の生後7日の幼若マウスから三叉神経節を摘出し、分散法で初代培養を行った。培養1週後の培養細胞に対して神経細胞マーカーの NeuN 抗体、さらにポリモーダル侵害受容体 (Transient receptor potential Vanilloid 1; TRPV1)抗体を用いて免疫細胞化学的検討を行った。また培養2週後で細胞内カルシウム動態をモニタリングする蛍光プローブである Fura2-AM を培養細胞に導入した後、TRPV1 アゴニストであるカプサイシン (10 μ M)で刺激を行い細胞興奮をマイクロプレートリーダー法で測定した。薬剤を添加せずにカプサイシン刺激のみの群を無添加群とした。またマウス三叉神経節の初代培養に対し、TRPV1 アンタゴニストである AMG9810、ドライアイ治療薬であるジクアホソル、シクロスポリン、レバミピドを添加した後にカプサイシン刺激を行った場合の細胞

興奮をマイクロプレートリーダー法で測定した。また、カプサイシン刺激前までの 340nm/380nm 比の平均を baseline とし、cycle48 (=赤矢印以降)のカプサイシン刺激後の 340nm/380nm の MAX 値を調べて、その差を Δ 340nm/380nm と定義した。

サンプル数の異なる群間比較となるため、一元配置分散分析の Brown-Forsythe 検定を用いた解析後、Dunnett 多重比較を行った。

【結果】

① 幼若マウスからの三叉神経節細胞の初代培養確立

マウス三叉神経節細胞は培養開始から 1-2 日で細胞は培養皿の底面に接着した。接着した細胞が分裂・増殖することなく、細胞が培養皿に接着したのち、樹状突起、軸索を延伸していった。播種から約 1-2 週間経過すると網目のように樹状突起が張り巡らされていた。約 2 週間で 1 本の長い軸索と多数の短い樹状突起を持つ多数の成熟神経様細胞とが確認可能であった。これら細胞は、蛍光抗体法により核に神経特異的な NeuN 抗体陽性像が認められ、培養した細胞が神経細胞であることが確認された。またこれらの細胞の一部には侵害受容体の一つである Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1)の発現を認めることも免疫染色より確認された。

② 細胞内カルシウムイオン測定試薬である Fura2-AM を用いた検討

今回の研究で使用した Fura2 は 2 種類の励起波長 (340nm、380nm)、蛍光波長は 510nm で測定する Ca^{2+} プローブである。380nm は Fura2 単体を示し、340nm は Fura2+ Ca^{2+} を示している。そのためこの 2 つの励起波長の比を見ることで細胞興奮を確認することができる。培養三叉神経節細胞に 340nm と 380nm の 2 種類の励起波長で測定した蛍光強度の比から経時的にカプサイシン刺激による変化があるか観察したところ、カプサイシン刺激によって 340nm/380nm の比が上昇した。このことは TRPV1 アゴニストのカプサイシンにより神経細胞の興奮が起こり、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇したことを示していた。次に各々の薬剤の添加による神経興奮の程度を評価した。TRPV1 アンタゴニストの AMG9810 1 μM 添加では、無添加群の細胞興奮ほぼ同等であったが、AMG9810 10 μM 、100 μM 添加により細胞興奮は抑制されていた。340nm/380nm の MAX 値から算出した差である Δ 340nm/380nm は無添加群と比較して、AMG9810 1 μM では細胞興奮に影響は無かったが、AMG9810 10 μM 、100 μM 添加群では有意に細胞興奮を抑制していた。次に臨床でドライアイ治療薬として用いられている薬剤であるジクアホソル、シクロスポリン、レバミピドについて三叉神経節由来細胞に対する細胞興奮への影響を検討した。まずジクアホソル 1 μM 添加では、無添加群と比較して、 Δ 340nm/380nm は細胞興奮に影響は無かった

が、ジクアホソルの濃度を 10 μ M、100 μ M と上げることで無添加群より細胞興奮は抑制されていた。 Δ 340nm/380nm は、ジクアホソル 10 μ M、100 μ M で無添加群と比較して有意に抑制されていた。シクロスポリンに関しては、シクロスポリン 10 μ M、100 μ M のみで検討を行ったところ、その添加により抑制効果があり、無添加群と比較してシクロスポリン 10 μ M、100 μ M 添加により有意に抑制されていた。最後にレバミピドの添加にカプサイシン刺激を行った。カプサイシン刺激前の結果に差があったが、 Δ 340nm/380nm は、10 μ M、100 μ M とともに無添加群と比べて有意な変化は認められなかった。

【考察】

ドライアイにおける疼痛には侵害受容性疼痛または神経障害性疼痛のいずれかが関与すると考えられている。侵害受容性疼痛については TRPV1 の関与が考えられているが、詳細は不明である。ドライアイの角膜知覚について臨床例での検討報告はあるものの、実験的検討は適切な動物、培養モデルの欠如からほとんどなされていない。眼科領域での三叉神経節細胞初代培養の実験は、侵害受容性疼痛というよりは、眼部の炎症が絡む神経因性疼痛やそれに伴うサイトカイン、糖尿病による角膜神経にフォーカスを当てた報告が多くなされている。そこで今回は角膜知覚のうち、侵害受容性疼痛に関わる TRPV1 に焦点を当てて研究を行った。

今回初代培養に成功したマウス三叉神経細胞は、NeuN 抗体陽性であることから成熟神経細胞であることは示され、培養三叉神経節細胞においてポリマーダル侵害受容体の TRPV1 陽性細胞が存在していた。またカプサイシン刺激で細胞興奮が起こり、TRPV1 アンタゴニストである AMG9810 により細胞興奮が抑制されているなど、今回の細胞が間違いなく幼若マウス由来の培養三叉神経節細胞であると考えられた。

本研究ではマウス三叉神経節細胞の神経興奮とジクアホソルとシクロスポリンにおける神経興奮に対する抑制効果を *in vitro* で蛍光強度の比の変化から示すことは可能であった。しかし今回のような抑制効果を示した厳密なメカニズムは不明である。更に *in vivo* において本研究で得られた神経興奮や抑制効果が再現可能か否かも明らかではなく、今後の機序解明が期待されるであろう。

【結論】

今回、幼若マウス由来三叉神経細胞を用いて角膜・三叉神経節における侵害受容性疼痛と神経障害性疼痛に関わる因子の薬剤スクリーニングを可能にする *in vitro* 三叉神経節細胞の初代培養モデルを確立した。侵害受容体のアゴニス

トによって神経興奮が認められ、臨床使用されている薬剤の効果判定が可能であったことから、本モデルは今後の角膜知覚研究に有用であることが示唆された。