

令和 3 年 6 月 17 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 31 年

受付番号 201960036

氏名 竹屋 友佳子

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：ボストン（国名：アメリカ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

ドライアイ疾患での制御性 T 細胞機能不全におけるサブスタンス P の役割の解明3. 派遣期間：平成 31 年 4 月 1 日 ~ 令和 3 年 5 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名：Schepens Eye Research institute of Mass Eye and Ear部局名：Immunology Lab5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

背景：

サブスタンス P(以下 SP)は 1931 年に見つかった 11 残基からなる神経伝達物質で、刺激に応じて三叉神経節・迷走神経節状神経節などの一次知覚ニューロンから放出され、その主な作用受容体はニューロキニン 1 受容体(NK-1R)である。痛覚伝達および不安、恐怖などの情動反応に関与し、末梢では細動脈の拡張、浮腫、顆粒球の浸潤などを含む、神経原性炎症を惹起する。近年、上皮細胞や抗原提示細胞(単球・マクロファージ・樹上細胞など)も SP により活性化され、炎症反応や搔痒感を引き起こすことが明らかになってきた。

しかしながら、眼表面における SP の作用は、未だ不明な点が多い。角膜表面は三叉神経が密に分布し、恒常的に SP が産生されている。角膜において、SP は、抑制性サイトカインである IL-10 の産生を低下させ、炎症性サイトカインである IL-23 や IFN の産生を促進する⁴。しかしながら、免疫細胞の一種である制御性 T 細胞(Treg)へ及ぼす影響はまだ知られていない。ドライアイは眼表面の慢性炎症疾患の一つであり、Treg の機能低下が観察される。本研究ではドライアイを対象に SP/NK-1R と Treg の相互作用を検討していく。

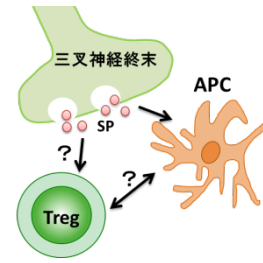
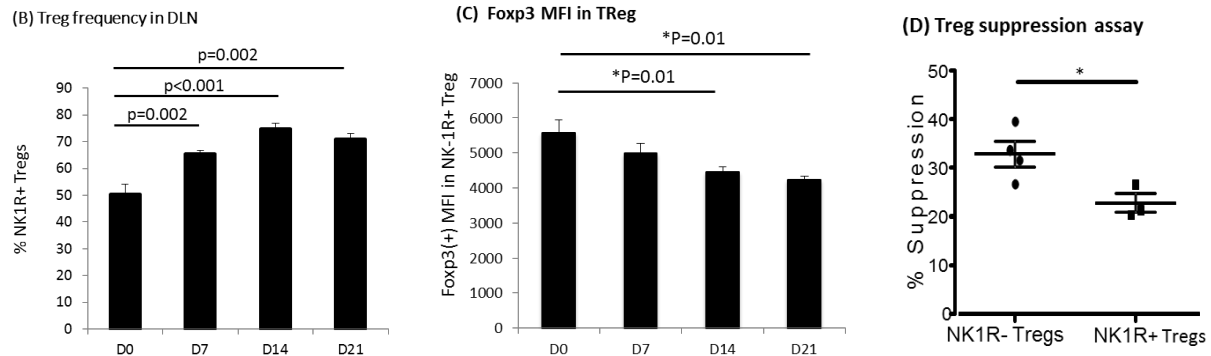


図 5. SP と免疫細胞の相互作用(仮説)

研究結果：

眼表面の SP の産生を明らかにするために、まず、角膜上皮および実質がそれぞれ SP を産生するかどうかを RT-qPCR (Taqman)で確認した。

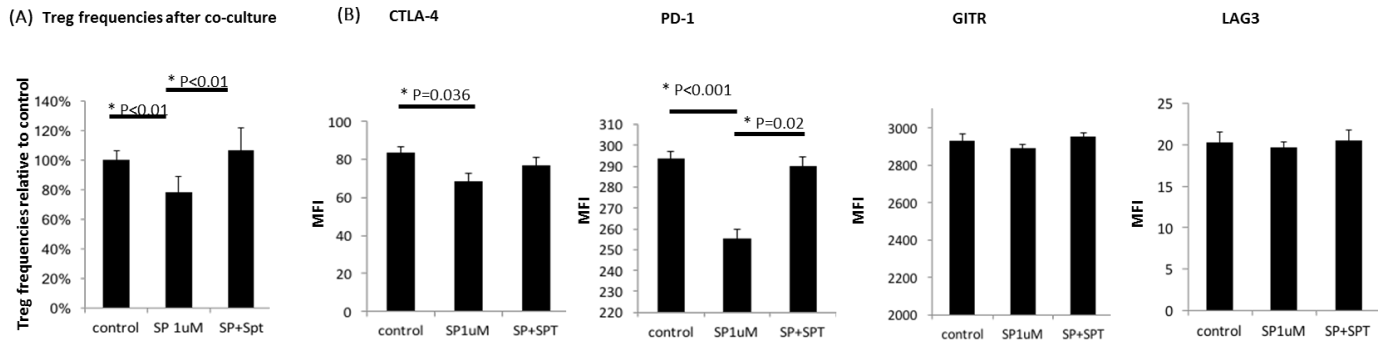
次に、Dry Eye Disease (DED)マウスにおける SP の発現量とその受容体(NK-1R)と Treg の関係を検討した。正常マウスに比べて角膜・結膜・所属リンパ節(頸部リンパ節)で SP の産生量が増加する。また、ドライアイに患っている期間が長くなるほど、Treg でNK-1Rを発現量する Treg の割合が増加する。さらに、NK-1R(+)の Treg はNK-1R(-)よりも suppressive function が弱くなる。



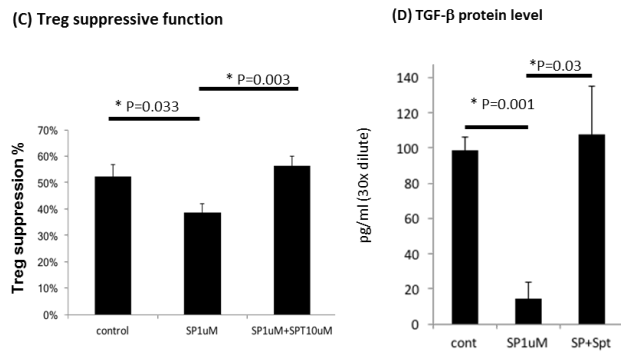
Treg に対する SP の直接的な影響を in vitro co-culture で検討した。

Naïve mice から抽出した Tregs と SP および NK-1R 拮抗薬である Spantide I と 48 時間共培養したのち、Treg の頻度(培養細胞全体に占める Foxp3(+)細胞の%)と抑制性膜分子である CTLA-4・PD-1・GITR・LAG3 の発現量(Median Fluorescence Intensities)を用いて定量した。

SP1uM との共培養によって Tregs 頻度が低下し、CTLA-4 と PD-1 の発現が低下した。しかし GITR と LAG3 の発現量は SP および Spantide I による影響を受けなかった。



また、Tregs の suppressive function を調べるために、Suppression assay を行ったところ、SP によって機能が減弱し、Spantide I が SP の効果を打ち消すことができることが判明した。同時に、培養後の上清の TGF- β の濃度を ELISA で定量したところ、SP により産生量が優位に減少することが認められた。



以上の結果は下記の論文として報告した

Restoration of Regulatory T-Cell Function in Dry Eye Disease by Antagonizing Substance P/Neurokinin-1 Receptor

Yukako Taketani, Anna Marmalidou, Thomas H. Dohlman, Rohan Bir Singh, Afsaneh Amouzegar, Sunil K. Chauhan, Yihe Chen, Reza Dana. The American Journal of Pathology. Volume 190 Issue 9 Pages 1859-1866 (September 2020).

次に Substance P が痛覚を伝達するがよく知られており、ドライアイ患者でも眼の不快感・痛みを訴えることが多いため、我々のドライアイモデルでも Substance P による痛覚の知覚異常が生じているかどうかを検討した。

まず、マウスが痛みをどれくらい感じるかを検討するために、Eye Wiping Test を実施した。

2M の生理食塩水をマウスに点眼し、30 秒の間に何回目をこする行動をするかカウントした。正常のマウスでは平均 12 回前後出会ったのに対し、乾燥ストレスに晒されたマウスは、ドライチャンパーに移行した4日目に最も痛み刺激への反応が強くなり、徐々に反応が弱くなるが、14日後でも正常環境にいるマウスに比べて、痛み刺激への反応が強くなった。

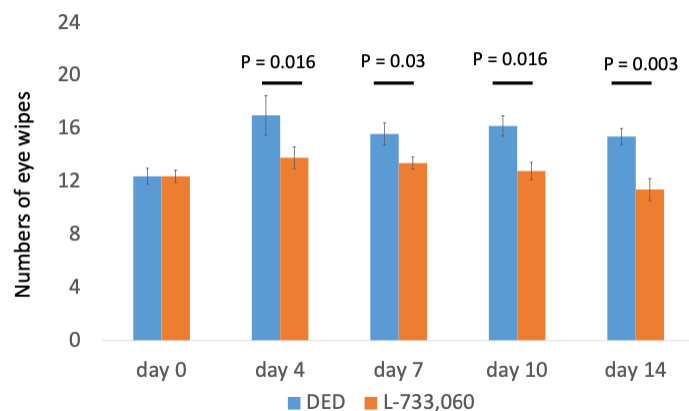
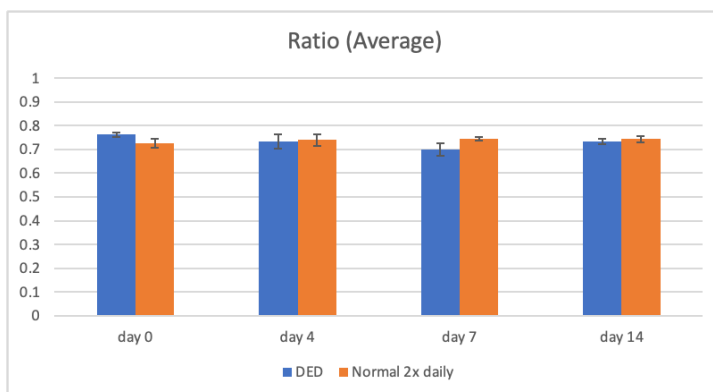
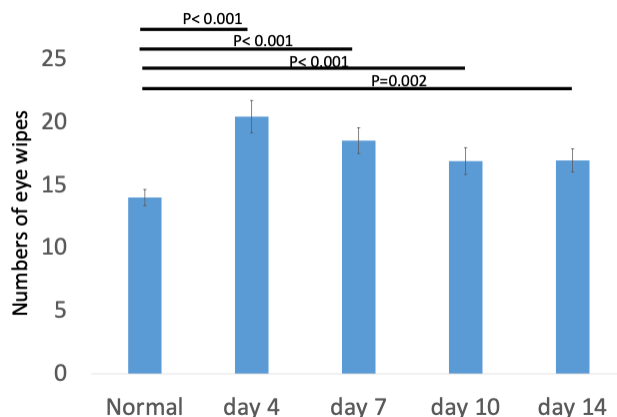
この結果をふまえ、我々が使っているドライアイモデルマウスは痛覚過敏を生じていることが確認された。

さらに、弱い痛み刺激に対して、どのような反応をするかを調べるために、0.25M NaCl を点眼したときに、どれくらい眼をつぶろうとするかを調べた。10秒間スローモーションで録画(2400フレーム/sec)し、フレーム毎に目の幅の比率をデプラーニングで検出し、正常状態マウスとドライアイモデルで比較した。両グループ間で統計的な有意差は認められなかった。

次に Substance P の拮抗薬である NK-1R antagonist である L-733,060 を投与したときにどのような効果があるかを検討した。L-733,060 はすでに我々の研究室でドライアイによる眼表面の細胞障害を抑制効果が認められている。

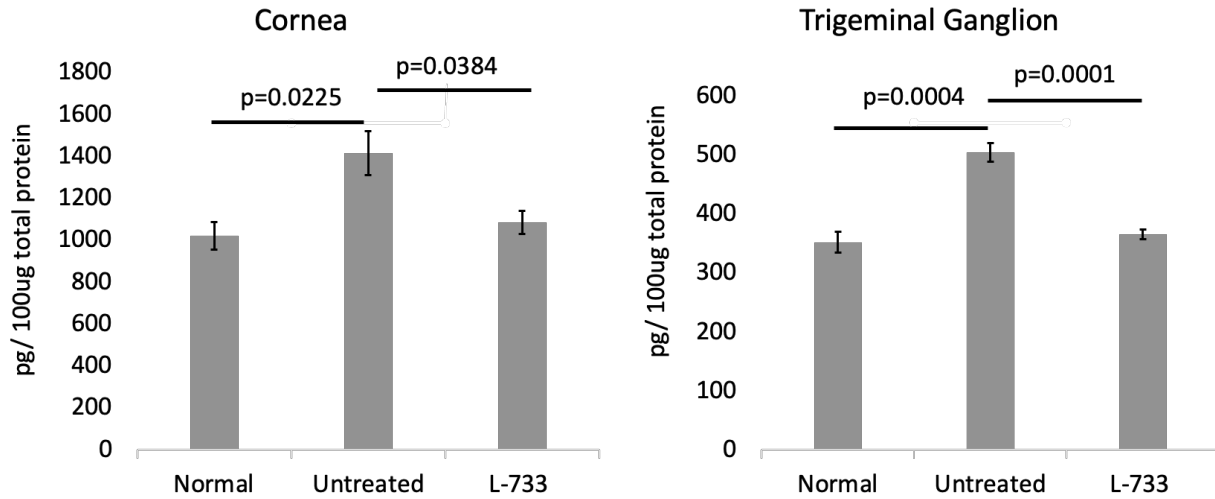
そこで、ドライアイマウスに対し、治療グループ(L-733,060 を1日2回点眼)と何も投与しない無治療グループを比較した。

Day4 から2群間の差が認められ、治療グループではほぼ正常マウスと同様の反応を示した。



痛みに対する反応が軽減された原因を調べるために、治療グループでの Substance P レベルを day 14 の時点で調べた。

角膜と三叉神経節の両方において、無治療グループに比べて L-733,060 投与群の方が Substance P 蛋白の発現レベルが低かった。



最後に L-733,060 投与により、所属リンパ節の免疫状態がどのように変化するかを観察した。これまでの結果に加え、無治療群に比べ Treg での Foxp3 の発現レベルの上昇が有意に認められた。