

平成30年6月4日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10896

研究課題名(和文) 自己免疫性ぶどう膜炎における摂食抑制ペプチドの機能解析

研究課題名(英文) Analysis of roles of neuromedin U in experimental autoimmune uveitis

研究代表者

武田 篤信 (Atsunobu, Takeda)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：40560313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス実験的ぶどう膜炎を対照及びニューロメジンU(NmU)欠損マウス(KO)に誘導すると、眼局所での炎症性サイトカインの遺伝子発現、炎症細胞浸潤がKOで増加していた。一方、所属リンパ節由来NmU欠損CD4陽性T細胞ではIRBP特異的IFN- $\gamma$ 、IL-17産生が減少していた。野生型マウス眼でのNmU受容体1は網膜色素上皮細胞(RPE)、ミュラー細胞、毛様体上皮細胞、NmU受容体2はRPE、毛様体上皮細胞に局在していた。これらの結果からNmUにはEAU抑制作用があり、RPEの関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neuromedin U (NmU)  $-/-$  and NmU $+/+$  mice were immunized with human interphotoreceptor retinoid binding protein peptide 1-20 (IRBP) to induce EAU. Histological analysis revealed a significant induction of cellular infiltration into the retina in NmU  $-/-$  mice on day 21, correlated with increased gene expression of proinflammatory cytokines, including interferon- $\gamma$  and interleukin-17. On the other hand, Th1 and Th17 cell responses were reduced in NmU  $-/-$  mice. Immunohistochemical analysis showed that NmU receptor 1 was expressed in retinal pigment epithelial (RPE) and ciliary epithelial cells, and Muller cells, whereas NmU receptor 2 in RPE and ciliary epithelial cells. These results suggested that NmU provides EAU restraint through participation of RPE in the eye.

研究分野：眼科学

キーワード：ぶどう膜炎 Tリンパ球 網膜色素上皮細胞 神経ペプチド

### 1. 研究開始当初の背景

ベーチェット病などに代表される難治性ぶどう膜炎は、繰り返す眼炎症発作から波及した神経網膜障害が依然として大きな失明原因となっている。抗 TNF- 抗体などの生物製剤の登場により失明に至る症例は減少しているが感染症や悪性腫瘍の発症、コストの問題などがあり、他の治療標的の開発が必要である。ぶどう膜炎の病態にはヒト及びその動物モデルである実験的自己免疫性ぶどう膜炎モデル (Experimental autoimmune uveoretinitis: 以下 EAU) と同様に CD4 陽性 T 細胞が Th1 や Th17 細胞に分化し炎症を惹起することが重要と考えられている。近年、脂質代謝や糖代謝、アミノ酸代謝と炎症との関連が注目されている。CD4 陽性 T 細胞や RPE は炎症促進のために糖や脂質をエネルギーとして利用するため代謝の影響を受ける。代表例としてグルコースやアミノ酸による細胞増殖、代謝に関与する細胞内情報伝達分子 mTOR (mammalian target of rapamycin) の活性化が Th1 細胞や Th17 細胞分化促進し、炎症を助起する報告がある<sup>1)</sup>。本研究で着目している摂食抑制作用をもつ神経ペプチド・ニューロメジン U (Neuromedin U: 以下 NmU) は 2 種類の受容体を持ち、NmU 受容体 2 (以下 NmUR2) を介して中枢性に摂食抑制や代謝制御作用、NmU 受容体 1 (以下 NmUR1) を介して末梢で炎症を助起する二面性がある<sup>2)</sup>。眼局所の、ぶどう膜炎における NmU の機能を解析することを通じ、代謝制御の観点に基づいた眼炎症疾患の診断、治療の可能性を提示することである。

### 2. 研究の目的

申請者はぶどう膜炎の病態制御機構について CD4 陽性 T 細胞の EAU 発症に Th1 細胞の分化が重要で、Th17 細胞の分化は EAU 後期で重要であることを見出した。また、眼内において網膜色素上皮細胞 (以下 RPE) が炎症刺激により抑制性サイトカイン IL-10 の産生を増強し炎症抑制に作用することを明らかにした。本研究では摂食抑制ペプチドであり、代謝制御作用のあるニューロメジン U による炎症制御機能とぶどう膜炎の病態との関連を明らかにし、代謝も含めた炎症制御機構によるぶどう膜炎の診断、治療への臨床応用への礎を築くことである。

また、既存の治療とは違う治療標的として NmU 以外にも G 蛋白結合受容体 P2RX7 に着目し、EAU を用いて新たなぶどう膜炎の治療標的としての可能性について調べた。

さらに、可溶性サイトカイン受容体及びそのサイトカインに着目し内因性ぶどう膜炎 (EU 群)、眼内悪性リンパ腫 (IOL 群)、対照患者 (C 群) の眼内液中の濃度を測定した。特に IOL について臨床像と可溶性サイトカ

イン受容体の濃度との相関を調べ、IOL の病態を解析し、新たな検査や治療マーカー発見への道筋をつけることである。

### 3. 研究の方法

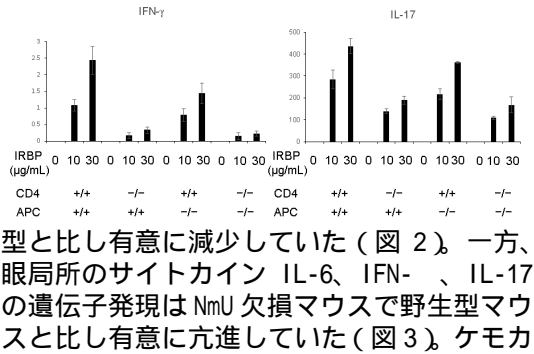
NmU 欠損マウス及びコントロールマウス (野生型) にヒト IRBP ペプチドで免疫して EAU を誘導した。各群の EAU 臨床スコア及び H&E 染色網膜病理組織を用いて組織スコアを調べた。EAU 誘導後 16 日目の所属リンパ節より CD4 陽性 T 細胞を抽出し、サイトカイン IFN- $\gamma$ 、IL-17 の IRBP 抗原特異的産生を ELISA 法にて測定した。また、EAU 誘導後 21 日目の眼局所のサイトカイン IL-6、IFN- $\gamma$ 、IL-17、ケモカイン ccl2、IP-10、RANTES 遺伝子発現について比較した。野生型マウスマウスにおける NmU 受容体 1 と NmU 受容体 2 の局在について免疫染色法で調べた。さらにヒト・サルコイドーシスぶどう膜炎患者及び対照患者の眼内液及び末梢血中の NmU の濃度を ELISA 法で比較した。

P2RX7 欠損マウス及び野生型マウスにヒト IRBP ペプチドで免疫して EAU を誘導した。各群の EAU 臨床スコア及び H&E 染色網膜病理組織を用いて組織スコアを調べた。EAU 誘導後 16 日目の所属リンパ節より CD4 陽性 T 細胞を抽出し、サイトカイン IFN- $\gamma$ 、IL-17 の IRBP 抗原特異的産生を ELISA 法にて測定した。CD4 + CD25 + Foxp3 + 制御性 T 細胞分画をフローサイトメトリーにて解析した。また、活性化 T 細胞のマーカーである CD25、CD44、CD69 の発現についてフローサイトメトリーにて解析した。さらに P2RX7 特異的阻害剤 brilliant Blue G (BBG) と基剤をそれぞれ野生型マウスに投与し、BBG の EAU に対する効果について臨床スコア及び組織スコア、IRBP 抗原特異的 IFN- $\gamma$ 、IL-17 の IRBP 抗原特異的産生能への効果について調べた。

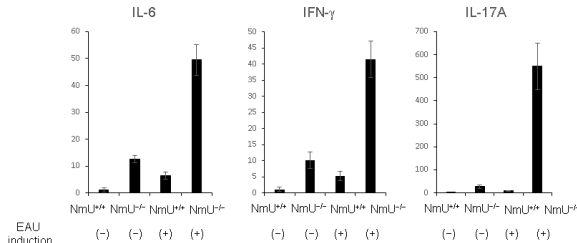
2008 年 1 月 ~ 2015 年 6 月に九州大学病院眼科で硝子体手術を施行した IOL 群 21 眼、EU 群 20 眼、対照 (C) 群 21 眼の、手術時に採取した眼内液中 sCD30、sIL-1R1、sIL-1R2、sIL-2R、sIL-4R、sIL-6R、sgp130、sRAGE、sTNFR1、sTNFR2、sVEGFR1、sVEGFR2、sVEGFR3 の濃度を Human Soluble Cytokine Receptor panel (Millipore) で測定した。IOL 群では網膜下浸潤病変の有無、原発部位 (中枢神経系と非中枢神経系) など、可溶性サイトカイン受容体と臨床像との関連を調べた。さらに硝子体セルブロック由来薄切免疫染色標本での眼内浸潤細胞における CD3 陽性細胞数の割合と可溶性サイトカイン受容体との相関についても調べた。

### 4. 研究成果

NmU 欠損マウスの EAU 臨床スコア及び組織スコアが野生型マウスと比し有意に高かった (図1) 所属リンパ節由来 NmU 欠損 CD4 陽性 T 細胞では IRBP 特異的 IFN-、IL-17 の産生が野生



型と比し有意に減少していた (図2)。一方、眼局所のサイトカイン IL-6、IFN-、IL-17 の遺伝子発現は NmU 欠損マウスで野生型マウスと比し有意に亢進していた (図3)。ケモカ

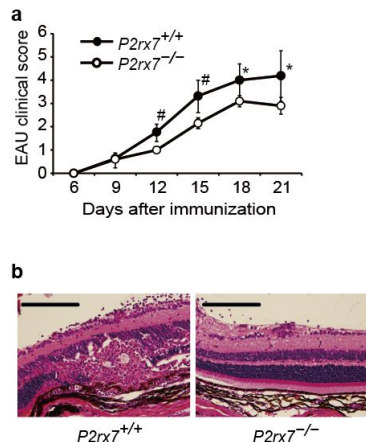


イン cc12、IP-10、RANTES 遺伝子発現も更新していた。これらの結果から、NmU には眼内に炎症細胞の集簇を抑制させる働きがあることが示唆された。野生型マウス眼における NmU 受容体の免疫染色により NmU 受容体 1 は網膜色素上皮細胞、ミュラー細胞、毛様体上皮細胞、NmU 受容体 2 は網膜色素上皮細胞、毛様体上皮細胞に局在にしていることがわかった。網膜色素上皮細胞は眼炎症を抑制する働きがあることが報告されている。

これらの結果から、NmU はぶどう膜炎において網膜色素上皮細胞を介して眼局所で炎症を抑制する作用を有することが考えられた。

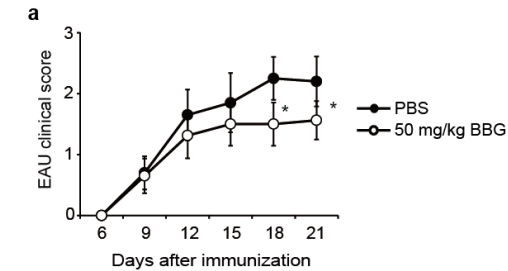
P2RX7 欠損マウスの EAU 臨床スコア及び組織スコアが野生型マウスと比し有意に低かった (図4)。

P2RX7 欠損マウス由来 CD4 陽性 T 細胞では IRBP 特異的 IFN-、IL-17 の産生が減少していた (図5)。しかし、Foxp3 陽性制御性 T 細胞の分画には差がなかった。活性化 T 細胞マ



ーカー CD25、CD44、CD69 の発現が野生型マウスで T 細胞受容体刺激により上昇していたが、P2RX7 欠損マウスではその発現上昇がみられなかった。さらに BBG 投与群では基

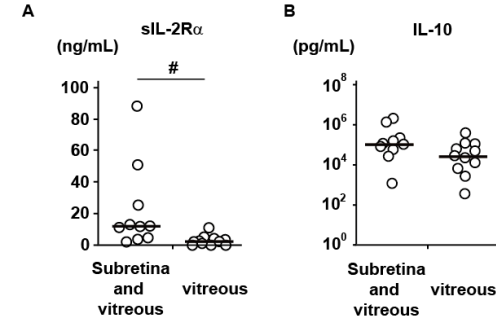
剤投与群と比し EAU 臨床及び組織スコアが有意に低下していた (図6)。抗原特異的 IFN-、IL-17 の産生が BBG 投与群で抑制されていた。



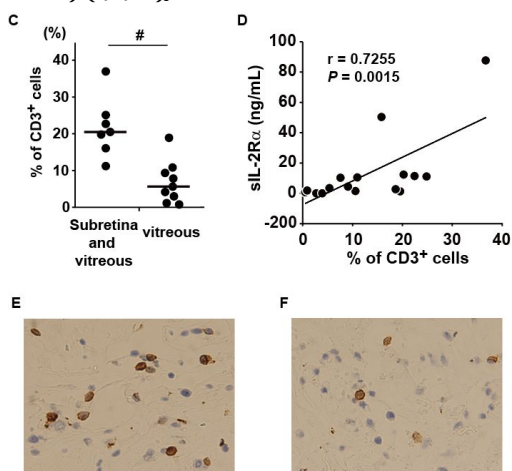
これらの結果から、EAU において、P2RX7 は Foxp3 陽性制御性 T 細胞ではなく、エフェクター細胞である Th1 及び Th17 細胞の活性化に関与し、その欠損または抑制により EAU を軽症化させることが示唆された。P2RX7 の活性化抑制がぶどう膜炎治療の標的となる可能性がある。

sIL-2R、sTNFR1、sTNFR2、sVEGFR1、sVEGFR2 が IOL 群で EU 群及び C 群よりも、sIL-1R1、sIL-1R2、sIL-4R は EU 群で IOL 群及び C 群よりも有意に高かった。IOL 群で、眼内液中 sVEGFR1 及び sVEGFR2 が非中枢神経系原発例で中枢神経系原発例よりも高かった (p < 0.01) が、IL-10 では差がなかった (図7)。

また、sIL-2R が網膜下病変を伴う群では伴わない群よりも有意に高かった (p < 0.01) (図8) が、IL-10 では差がなかった。さらに眼内液中 sIL-2R の濃度と CD3 陽性細胞数の割合に正の相関がみられた (p < 0.01) (図8) が、IL-10 では差がなかった。



0.01)( 図 9 )



これらの結果から、IOLにおいて、眼内液中 sVEGFR1 と sVEGFR2 が非中枢神経系と中枢神経系との鑑別のためのマーカーとして利用できる可能性が考えられた。また、IOL の網膜下浸潤と T リンパ球との関連が示唆され、さらなる解析を計画中である。

#### 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 7 件)

- Takeda A, Kimura K, 他. Crucial role of P2X<sub>7</sub> receptor for effector T cell activation in experimental autoimmune uveitis. *Jpn J Ophthalmol*, 査読有 Vol.62, No.3, 2018, pp.398-406.
- Ueda S, Takeda A, 他. Long-term efficacy of infliximab treatment and the predictors of treatment outcomes in patients with refractory uveitis associated with Behçet's disease. *Eur J Rheumatol*, 査読有, Vol.5, No.1, 2018, pp.9-15, 2018.
- Takeda A, 他. Epidemiology of uveitis, caused by HTLV-1, toxoplasmosis, and tuberculosis, the three leading causes of endemic infectious uveitis in Japan. *Ocul Immunol Inflamm*, 査読有, Vol.25, sup1, 2017, pp.S19-S23.
- Taki R, Takeda A, 他. Clinical features of systemic metastatic retinal lymphoma in Japanese patients. *Ocul Immunol Inflamm*, 査読有, Vol.25, No.5, 2017, pp.654-662.
- Myojin S, Takeda A, 他. Analysis of cytokines and transcriptional factors on solid component in irrigating solution after vitrectomy for eyes with macular hole or idiopathic epiretinal membrane, *PLoS One*, 査読有, Vol.11, No.10, 2016, e0164355.
- Takeda A, Kimura K, 他. Distinct

profiles of soluble cytokine receptors between B-cell vitreoretinal lymphoma and uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 査読有, Vol.56, No.12, 2015, pp.7516-7523.

— Kimura K, Takeda A, 他. Inhibition of the TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition in mouse retinal pigment epithelial cells as well as attenuation of subretinal fibrosis in vivo by an RAR- $\alpha$  agonist. *J Mol Med*, 査読有, Vol.93, No.7, 2015, pp.749-758.

[学会発表](計 12 件)

Takeda A. Cataract surgery in patients with uveitis. The 10<sup>th</sup> joint meeting of Japan-China-Korea ophthalmologists. Seoul, South Korea, Nov.4-5, 2017.  
Takeda A, Kimura K, 他. Distinct profiles of soluble cytokine receptors between B-cell vitreoretinal lymphoma and uveitis. The 14<sup>th</sup> International Ocular Inflammation Society Meeting. Lausanne, Switzerland, Oct.18-21, 2017.

武田 篤信, 他. 非感染性ぶどう膜炎に対するアダリムマブの使用経験. 福岡 Uveitisカンファランス, 福岡県福岡市, 2017/10/25

武田 篤信, 木村 和博, 他. 眼内悪性リンパ腫と可溶性サイトカイン受容体との関連について. 第 45 回日本臨床免疫学会総会, 東京都新宿区, 2017/09/29

武田 篤信, 他. 中枢神経ループスに合併し、両眼性に閉塞性網膜血管症を発症した SLE 網膜症の 1 例. 第 51 回日本眼炎症学会, 大阪府大阪市, 2017/07/15

武田 篤信. ぶどう膜炎の診断と治療 “手術治療の適応と進歩”. 第 121 回日本眼科学会専門医制度第 65 回講習会, 東京都千代田区, 2017/04/08

武田 篤信, 木村 和博, 他. 眼内悪性リンパ腫と可溶性 IL-2 受容体との関連について. 第 70 回 日本臨床眼科学会, 京都府京都市, 2016.11.3-6

武田 篤信. ぶどう膜炎患者への硝子体手術編. フォーサム 2016 東京, 第 50 回日本眼炎症学会, 東京都千代田区, 2016.7.1-3

武田 篤信. 実験的自己免疫性ぶどう膜炎における新しい制御性サイトカインの関与. 第 120 回日本眼科学会総会宮城現仙台市, 2016.4.7-10

武田 篤信, 他. 網膜硝子体悪性リンパ腫及び内因性ぶどう膜炎患者由来硝子体液中の可溶性サイトカイン受容体のプロファイリング. 第 173 回九州大学眼科研究会, 2016.2.20, 福岡県福岡市

Taki R, Takeda A, 他. Clinical

Features of Systemic Metastatic  
Retinal Lymphoma in Japanese Patients.  
ARVO, Seattle, USA, May 3, 2016.  
武田 篤信、他. 網膜硝子体悪性リンパ  
腫及び内因性ぶどう膜炎の可溶性サイト  
カイン受容体濃度の検討. 第119回 日  
本眼科学会総会、北海道札幌市、  
2015/04/16-19

〔図書〕(計 3 件)

武田 篤信、MEDICAL VIEW 社、ぶどう膜  
炎/内因性ぶどう膜炎 Behcet 病. 一目  
でわかる眼疾患の見分け方、ぶどう膜疾  
患、網膜・硝子体疾患下巻、2016、11  
武田 篤信、MEDICAL VIEW 社、眼科診療  
マイスターI 診療と検査 ぶどう膜炎  
細隙灯顕微鏡検査、2016、232-233  
武田 篤信、他、医学書院、臨床眼科増  
刊号 眼感染症の傾向と対策 完全マニ  
ュアル “ 疾患別：診断・治療の進め方と  
処方例 5 ぶどう膜炎・網脈絡膜疾患へ  
ルペス性虹彩毛様体炎(HSV/VZV) ”、2016、  
229-233

〔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

武田 篤信 (TAKEDA, Atsunobu)  
九州大学大学院医学研究院眼科学・共同研  
究員  
研究者番号：4 0 5 6 0 3 1 3

(2)研究分担者

木村 和博 (KIMURA, Kazuhiro)  
山口大学大学院医学研究科眼科学・教授  
研究者番号：6 0 3 3 5 2 5 5