

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目： 若手研究（B）  
 研究期間： 2007 年～2008 年  
 課題番号： 19791273  
 研究課題名（和文） ヒト眼表面における TLR3 の作動に関する研究

研究課題名（英文） Alteration of TLR3 Pathways may be Responsible for Immunosusceptibility of Human Corneal Epithelial Cells to viral infections.

研究代表者 原 祐子（HARA YUKO）  
 愛媛大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号： 40291504

## 研究成果の概要：

ヒト培養角膜上皮細胞（HCEs）の免疫機構に及ぼすステロイド薬の影響

培養ヒト角膜上皮細胞における TLR3 の poly I:C、および HSV 臨床分離株に対する作動が確認できた。このモデルを用いて、ステロイド薬、シクロスポリンを添加した場合の作動状況をコントロールと比べたところ、両者ともコントロール群と比較して、TLR3 の作動低下が認められ、実際に HSV を感染させると、薬剤添加群での感染性の増大を認めた。TLR3 の作動が低下することが感染性の増大と関与している可能性が考えられた。また両薬剤を比較したところ、ステロイド薬添加群で有意に TLR3 作動経路の抑制され、作用が異なることが示唆された。

## 交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
総計	3,200,000	630,000	3,830,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：角膜上皮細胞、自然免疫機構、ステロイド薬、サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

角膜感染症はウイルス、細菌、真菌など多様

な病原体により生じるが、治癒後に強い実質  
 瘢痕を残すケースは決して少なくなく、中途

失明原因においても主要な位置を占めている。中でも、単純ヘルペスウイルスの感染によって生じる角膜ヘルペスは、アシクロビル眼軟膏の登場以来軽症化しているものの、ステロイドをはじめとする免疫抑制剤投与による免疫環境変化が引き起こす再活性化の問題、耐性株による病変の遷延化の問題はいまだ未解決のままである。今後の感染症治療戦略を考える上で抗菌薬のみに頼る治療だけでなく新たな治療戦略の開発が必須である。

眼表面の免疫機構としては獲得免疫といわれるT細胞、B細胞を中心とした特異抗原を認識する機構以外に、自然免疫といわれる機構が存在する。これは下等生物から高等生物まで共通に持つマクロファージを中心とした非特異的免疫機構と言われていたが、近年Toll Like Receptor といわれる特異的に病原体を認識する機構が存在することがわかってきた。現在 Toll Like Receptor は1から11までクローニングされており、これらのレセプターは細胞膜に存在し、レセプターごとに認識する抗原が異なる。その中でTLR3はウイルス増殖の際に発生するdsRNAをTLR3が認識し、これは実際に角膜上皮細胞で作動していることが証明されている。我々も、眼表面におけるTLRの発現動態に着目し研究を進めているが、これまでに、正常ヒト角膜上皮およびヒト培養角膜上皮細胞のどちらにおいても、TLR1からTLR10までのすべてが発現していることを確認しており、眼表面の感染症発症に深く関与している可能性が考えられる。

一方、前述したステロイド薬やシクロスポリンは、免疫調整薬として使用され、各種臓器移植術後などにも必須の薬剤であると同時に、点眼薬としても頻用されている。しかし、ステロイドやシクロスポリンはその効果の高さの裏側に、易感染性という弱点を有していることも事実である。2002年の報告では、腎移植術後にステロイド、シクロスポリン内服を行った場合、13.6%にサイトメガロウイルス感染症が起こったと報告されている。さらに、腎移植後ステロイド投与を行う場合、6ヶ月間の平均感染回数は1.47回、シクロスポリンでは0.84回と、ステロイド、シクロスポリンとも感染リスクの増大が認められるものの、両群を比較すると有意にステロイドでの感染リスクが高かったという結果になり、両者の免疫作動経路の違いも示唆される結果が報告されている。

## 2. 研究の目的

我々は、ステロイドやシクロスポリンにより、眼表面のウイルス感染に重要な働きを持つと考えられるTLR3の発現や作動が変化しているのではないかと、また両薬剤間にも作動の変化があるのではないかと仮説をたてて検討した。

## 3. 研究の方法

1)我々は、TLR3の反応を、ヒト角膜培養上皮細胞(HCEs)モデルを用いて検討した。まず、HCEsをsub confluentまで培養した後Poly I:CといわれるTLR3のリガンド物質100ng/mlで刺激した。採取した細胞

より mRNA を抽出し、各種炎症性サイトカイン (IL6、IL8、IFN ) 及び TLR3 自体の発現量を real time PCR を用いて解析、培養上清中の炎症性サイトカイン蛋白量についてもあわせて検討した。

2 ) HCE s における TLR3 の作動がステロイド薬やシクロスポリンの添加により変化するのか検討した。HCE s を前述と同様に sub confluent まで培養した後、デキサメサゾン、シクロスポリンを 10-5M、10-6M 先行投与した。10-5M は、臨床的に使用される点眼濃度の 250 から 500 分の 1 程度の濃度である。その後 TLR3 のリガンドである polyIC で刺激し、さらに 24 時間後に各種炎症性サイトカインの発現、および TLR3 自体の発現を、mRNA を抽出し、real time PCR を用いて解析を行った。

3 ) 次に実際のウイルスを感染させるモデルを作成した。HCE s を同様に sub confluent まで培養した後、HSV 臨床分離株を感染させ、mRNA を抽出し TLR3、および、その下流に産生される炎症性サイトカイン (IL6、IL8) の mRNA 発現を real time PCR を用いて解析を行った。

4 ) このモデルを用いて、デキサメサゾン、シクロスポリンを先行投与し、HSV 臨床株の感染性の違いを検討した。HCE s にデキサメサゾン、およびシクロスポリンを先行投与し、24 時間後に HSV 臨床分離株を播種した。48 時間後にクリスタルバイオレット染色を行い、画像解析ソフトを用いてブランク面積 (HSV 感染面積) を解析した。また

培養上清中の HSV-DNA コピー数を Real time PCR を用いて測定した。

#### 4 . 研究成果

1 ) HCE s を培養した後 Poly I:C で刺激したところ、IL8、IL6、IFN の mRNA は、Poly I:C 添加によりすべて発現が増加し、培養上清中の各サイトカイン蛋白量も増加を認めた。また、Poly I:C 刺激により HCE s 自体の TLR3 の発現も増加する結果が得られ、HCE s において、TLR3 の作動が確認された。

2 ) HCE s を各条件で培養し、Poly I:C で刺激したところ、IL6、IL8 の発現はデキサメサゾン添加群、シクロスポリン添加群でコントロールに比べ有意に低下した。しかし、IFN では、ステロイドでは有意な低下を認めたものの、シクロスポリンでは変化が認められず、同様に TLR3 自体の発現もステロイドでは有意に低下するのに対し、シクロスポリンではコントロール群とほぼ差がないという結果であった。

TLR3 のシグナル伝達経路には現在 2 経路がわかっている。polyIC や dsRNA などのリガンドを認識すると、NF B を介した経路を介し IL6、IL8 などの炎症性サイトカインが産生されるが、一方 IFN は IRF3 を介した経路によりシグナル伝達が行われている。今回の結果では、ステロイドは NF B、IRF3 の両経路を抑制、一方シクロスポリンは NF B の経路のみを抑制した結果となっている。我々が臨床現場で感じている、シクロスポリン点眼時よりもステロイド点眼時にヘルペス再発が起こりやすいことに、今回の両者の差が関

与している可能性も示唆される。

3) HCE s 培養し、polyIC の代わりに HSV 臨床分離株を感染させたところ、polyIC と同様に、IL6、IL8、IFN といった炎症性サイトカイン mRNA の有意な発現増加を認めた。培養角膜上皮細胞で HSV 臨床株によって TLR3 を介した作動が起こっていることが確認された。

4) HSV 臨床分離株を用い、ステロイド、シクロスポリン添加した場合の HCE s への感染性を検討したところ、ステロイド添加群において、感染プラーク面積は増加し、また、上清中の HSV-DNA コピー数も増加しており、HSV 感染性がステロイドによって増大していることが確認された。一方シクロスポリンでは、コントロール群に比べると、やや感染性の増大はみられるものの、ステロイド薬のような有意な変化はとらえられなかった。また、各種サイトカイン、TLR3 の発現についても検討したところ、ステロイド添加群では TLR3、炎症性サイトカインの発現が低下しており、TLR3 の作動低下が HSV 感染性の増大に関与している可能性があると考えられた。

以上の結果から TLR3 の作動を増加させることにより、ウイルス感染をコントロールできる可能性が考えられる。現状、抗菌薬や抗ウイルス薬での治療が行われているが、今後は、TLR3 の変化を調整するなどの新しいコンセプトの薬剤開発にもつながる可能性

が考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Yuko Hara, Atsushi Shiraishi, Takeshi Kobayashi, Yuko Kadota, Yuji Shirakata, Koji Hashimoto, and Yuichi Ohashi : Alteration of TLR3 Pathways by Glucocorticoids may be Responsible for Immunosusceptibility of Human Corneal Epithelial Cells to viral infections. Molecular Vision, 2009, in press

査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 角膜上皮ヘルペスウイルス感染に及ぼすステロイド薬の影響  
原祐子、白石敦、小林剛、大橋裕一  
第 32 回角膜カンファランス  
平成 20 年 2 月 28 日～30 日(東京)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 祐子 (YUKO HARA)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40291504