

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月20日現在

機関番号：33602
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21592250
 研究課題名（和文） 眼内炎症におけるクリスタリンミューの機能解析
 研究課題名（英文） Functional analysis of mu-crystallin in intra ocular inflammation
 研究代表者
 太田 浩一（OTA KOICHI）
 松本歯科大学・歯学部・教授
 研究者番号：70262730

研究成果の概要（和文）：エンドトキシン誘発ぶどう膜炎(EIU)、実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)、レーザー誘発脈絡膜新生血管モデルの3つのマウスの眼内炎症モデルを作成した。いずれにおいてもクリスタリンミュー(CRYM)ノックアウトマウスにおいて炎症が軽症化していた。EIUモデルでは炎症の場である前房への細胞侵潤の主体となる早期炎症の好中球よりも後期炎症のマクロファージとの関連が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Three types of murin intraocular inflammation model; endotoxin-induced uveitis, experimental autoimmune uveoretinitis, and laser-induced choroidal neovascularization was established. The inflammation was mildly reduced in CRYM knock-out mice in all models. The CRYM may be associated with macrophages at second peak rather than neutrophils at first peak in anterior chamber of the eyes with EIU.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：眼細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

(1) 眼内炎症の代表的な疾患はぶどう膜炎であり、サルコイドーシス、原田病、ベーチェット病の3大疾患を始め、多種の原因がある。ベーチェット病、急性網膜壊死などは炎症が

強く、失明に至ることは決して少なくはない。多くのぶどう膜炎に対して、副腎皮質ステロイドホルモン剤が使用されるが無効症例も存在する。加えて、ステロイド白内障や緑内障の局所的副作用および胃潰瘍、糖尿病、神経

症、満月様顔貌、骨粗鬆症、感染症、ショックといった全身的副作用が生ずることがある。免疫抑制剤や抗癌剤の投与が行われるが、やはり、肝臓機能障害や腎障害の副作用がある。

(2) われわれはぶどう膜炎モデルにおいて transforming growth factor(TGF)-beta および interleukin(IL)-6 が拮抗することを明らかにした(Ohta K. *J Immunol* 164: 1185-1192, 2000, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 2591-2599, 2000)。更に眼局所での nuclear factor(NF)-kappa B やヘムオキゲナーゼ-1 の関与を明らかにするとともに、それらに対する阻害剤による抗炎症作用を確認した (Ohta K. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 744-50, 2002, *Exp Eye Res* 77:665-673, 2003)。その後、エンドトキシン誘発ぶどう膜炎における眼局所のマイクロアレイ法による網羅的な解析で炎症性サイトカインやケモカインを含めた炎症性因子の発現増加とともに内因性抗炎症因子の増加も確認しえた (*Exp Eye Res* 80:401-12, 2005)。その中で数多くの未報告の遺伝子中、ほかのクリスタリンタンパクと比べ、クリスタリンミュー遺伝子が高発現していることを発見した。

(3) クリスタリンミュー(CRYM)は水晶体の構造蛋白として発見された。その後、水晶体以外の組織 (Wistow G. *J Mol Evol.* 1991)、網膜 (Segovia L. *Mol Vis.* 1993)、内耳(Abe S. *Am J Hum Genet.* 2003)での発現が報告されている。また、細胞質甲状腺ホルモン受容体蛋白としての機能を有し、共同研究者の鈴木らにより、その解析も進んでいる(Suzuki S. *Mol Endocrinol* 21:885-94, 2007)。しかし、現在のところ、国内外において眼内組織である虹彩・毛様体におけるCRYMの発現に関する報告は全くない。従って、本研究により明らか

となる眼内炎症におけるCRYMの機能解析は世界初となりうるものである。

一方、欧米（日本でも第3位）成人中途失明原因疾患の第1位の原因疾患の加齢黄斑変性における CRYM の関与が示唆された (*FASEB J* 19:1683-1685, 2005)。特に滲出型の加齢黄斑変性の脈絡膜新生血管の形成には、補体やマクロファージ等の炎症反応が重要な役割りを果たしていることが明らかになっている。本研究によって新しい CRYM を中心とした加齢黄斑変性をふくめた炎症病理を解明することは「失明予防」のために、重要な研究に位置づけされる。

2. 研究の目的

(1) マイクロアレイによって得られたラット虹彩・毛様体におけるCRYM遺伝子発現を遺伝子レベルおよび蛋白レベルでマウスの2つのぶどう膜炎モデルで確認する。また、炎症が関与するレーザー誘発脈絡膜新生血管を惹起させ、網脈絡膜でのCRYM発現を検討する。

(2) 機能解析のため、CRYM ノックアウトマウスを用いて、3つのモデルにおいてワイルドタイプと炎症度の比較を行い、CRYM がこれらの障害の発症過程に関与しているかを確認する。CRYM の関与が明確となった障害モデルについて分子生物学や免疫学的手法を用いて詳細な解析を行い、その発症過程に関する分子機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 眼内炎症モデルの確立

① エンドトキシン誘発ぶどう膜炎モデル (E IU) : 6-8週齢のマウスの足底にlipopolysaccharide (LPS)を皮下注射し、24時間後に眼球摘出を行い、4%パラフォルムアルデヒドによる灌流固定後、パラフィン包埋、ヘマトキシリン・エオジン染色にて組織学的検討をする。

② 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎モデル (EAU) : 6-8週齢のマウスに ヒトinterphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)由来の 20アミノ酸からなるペプチドをcomplete Freund's adjuvantと混和し、皮下注射し、自己免疫性ぶどう膜炎モデルを作成する。炎症度の確認は皮下注射後10日頃より眼底検査を行う。14日か21日に眼球摘出をし、エンドトキシン誘発ぶどう膜炎モデルと同様に組織学的な検討を行う。

③ レーザー誘発脈絡膜新生血管モデル : 8-12週齢のマウスの眼底 (視神経乳頭周囲の網脈絡膜) に半導体レーザーで照射を行い、2週間後に眼球摘出を行い、組織学的に新生血管の発生を確認する。眼球摘出前にフルオレセイン低分子デキストランを静脈注射し、眼球摘出直後に伸展標本を作成する。脈絡膜新生血管板を共焦点レーザー顕微鏡装置で1 μ m ずつの面積を計測し、総和して体積とする。

(2) クリスタリンミューの発現確認

① エンドトキシン誘発ぶどう膜炎の虹彩・毛様体および実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎とレーザー誘発脈絡膜新生血管を有する網膜からRNAを抽出し、クリスタリンミュー遺伝子の経時的発現をリアルタイムRT-PCR法 (TaqMan probe, ABI system)にて確認する。

② クリスタリンミュータンパクの発現確認 : 各モデルの眼組織よりタンパクを抽出し、ウェスタンブロットによるタンパクの発現確認を行う。

(3) クリスタリンミューノックアウトマウスでの検討: クリスタリンミューの遺伝子およびタンパク発現が確認できたぶどう膜炎モデル (EIUとEAU) においてクリスタリンミューノックアウトマウスとワイルドタイプでの炎症度を組織学的に比較する。

(4) クリスタリンミューと炎症関連因子の機序の探索: 組織学的に炎症の明らかな程度差は浸潤細胞の差であり、各炎症細胞を眼局所に誘導する主因子であるケモカイン・接着分子について、リアルタイムRT-PCRおよびタンパク定量を行う。

4. 研究成果

(1) マウスにおけるぶどう膜炎モデルは EIU であれば C3H/HeN、EAU では B10.A などが容易に炎症が生ずる。今回、我々は CRYM ノックアウトマウスを用いた解析を目標としたため、その Wild type である C57BL/6J マウスを用い、EIU と EAU を惹起させることが可能であった。

① マウスの EIU は炎症が軽微であったが、LPS 投与 24 時間めに好中球を主体とする炎症が前房中心に生じていた。また、これまであまり着目されていなかった LPS 投与 5 日めにマクロファージが主体のより強い炎症が生じることを発見した。また、硝子体内にも軽微ながら炎症細胞を認めた。

② EAU の発症頻度および炎症度も個体差はあるが、interphotoreceptor binding protein (IRBP)による免疫 10 日ころから眼底に視神経乳頭腫脹、網膜血管炎などの所見が確認できた。さら 21 日めに眼球摘出をして、組織学的に炎症度を確認した。

③ レーザー誘発新生血管モデルも作成することができた (図 1)。

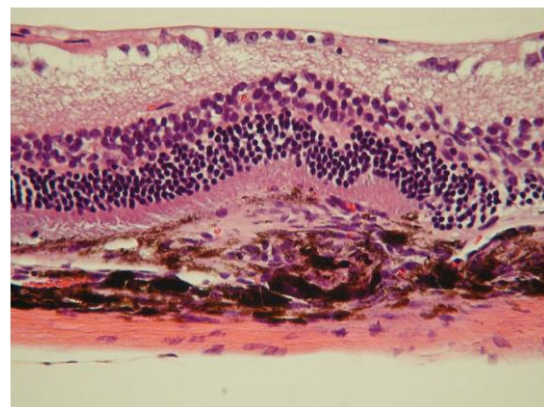


図 1(ヘマトキシリン-エオジン染色)

(2) EIU の炎症の中心部位である虹彩・毛様体組織からはリアルタイム RT-PCR にて正常眼でも CRYM 遺伝子の発現を確認した。LPS 注射後 12 時間で増加し、24 時間に正常眼と同レベルとなり、以後、2、3 日後に減少した。しかし、5 日後には正常眼と同程度に戻った。また Western blot 法では正常眼を含め、CRYM タンパクは発現しており、LPS 注射後 3 日めで増加していた。

EAU モデルにおいても確認を行い、同様の傾向が得られた。

(3)各モデルにおけるノックアウトマウスとワイルドタイプマウスの炎症の比較

① EIU では LPS 投与後 24 時間めの前房への侵潤細胞数 (ほとんどが好中球) はいずれのマウスでも有意差がなかった。しかし、5 日めではノックアウトマウスでの細胞数が有意に減少していた (図 2)。

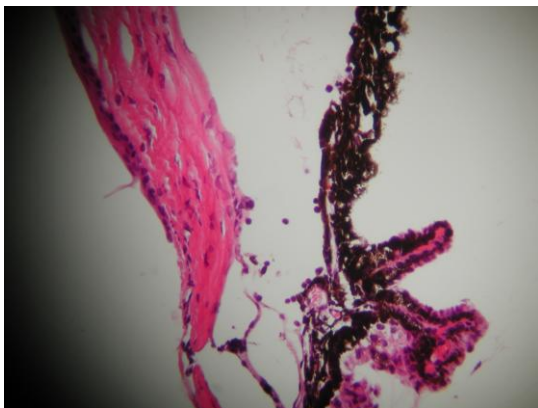


図 2A:ワイルドタイプでは前房に炎症細胞++

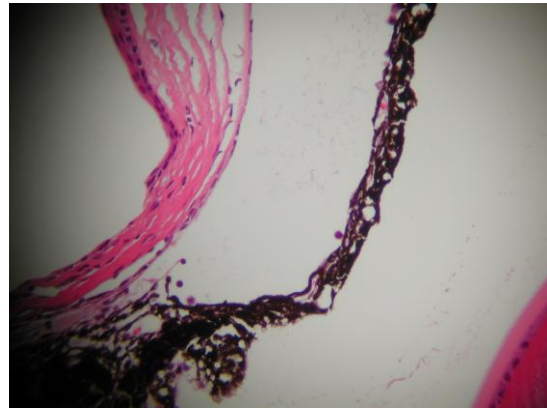


図 2B:CRYM ノックアウトマウスでは炎症+

② EAU においても炎症極期の 14 日めの眼底所見ではノックアウトマウスでの炎症所見が有意に軽度であった。また 21 日めの眼球の組織学的検討では炎症度の発生頻度 (ワイルド 57% vs. ノックアウト 37%)、炎症の重症度 (ワイルド 0.57 vs. ノックアウト 0.28) とノックアウトマウスでは有意に軽症であった (図 3)

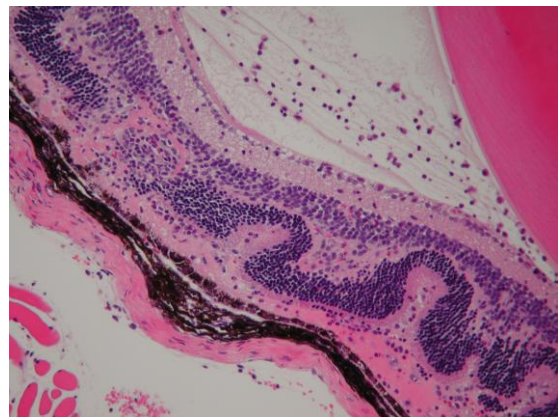


図 3A:ワイルドタイプの網膜組織障害と硝子体内細胞

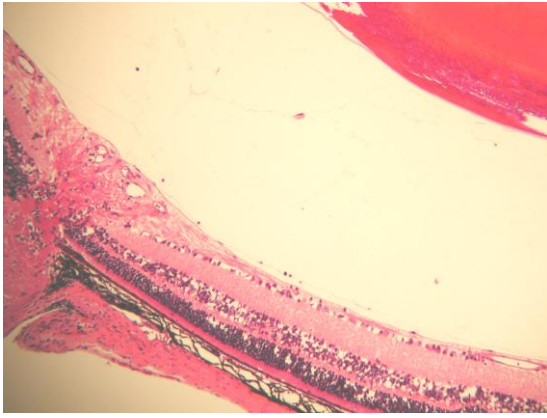


図 3B: ノックアウトマウスでは炎症ごく軽微

③ レーザー誘発新生血管モデルにおいては脈絡膜新生血管板の体積の比較においてはノックアウトマウスとワイルドタイプマウス間に有意な差は得られなかった。

(4) ぶどう膜炎の2モデルにおいて CRYM がないことで炎症が軽減していることが確認できた。つまり、ぶどう膜炎の炎症形成において CRYM は必要であることが示唆された。そのため、EIU マウスにおける炎症関連因子を検討した。今回はマイクロアレイ法など網羅的な解析までには至らなかった。

リアルタイム RT-PCR 法では、TNF-alpha や GM-CSF などは正常眼より 5 日めに増加しているもののノックアウトマウスとワイルドタイプで差がなかった。一方、IL-1alpha や IL-6 遺伝子発現はノックアウトマウスでワイルドタイプに比して、有意に減少していた。以上より、EIU における後期炎症にはマクロファージが非常に関与しており、炎症成立に必要な因子の一つが CRYM と推測した。

本研究において、CRYM が眼内炎症に関与していることが明らかとなり、全く新しい炎症関連因子として世界で初めて報告ができた (Imai et al. *IOVS*. 2010)。

今後はさらにマクロファージと CRYM と

の関連に関して免疫学および細胞生物学的な手法で研究をすすめる必要がある。また、ヒトのぶどう膜炎もしくは加齢黄斑変性患者の末梢血での CRYM 発現量の定量による疾患の活動性マーカーになる可能性についても探索する。

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 1 件)

1. Imai H, Ohta K, 他 4 名、Kikuchi T. mu-Crystallin, new candidate protein in endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 査読有 51:3554-3559, 2010.

[学会発表] (計 1 件)

2. 山本 裕香、太田 浩一、他. 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎における mu-クリスタリンの検討. 第 113 回 日本眼科学会総会、2009 年 4 月 16,17 日 東京国際フォーラム (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 浩一 (OTA KOICHI)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：70262730

(2) 研究分担者

菊池 孝信 (KIKUCHI TAKANOBU)
信州大学・ヒト環境科学研究支援センター・教授
研究者番号：5017797

鈴木 悟 (SUZUKI SATORU)
信州大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・准教授
研究者番号：50177797

(3) 連携研究者

今井 弘毅 (IMAI HIROKI)
信州大学・医学部・助教
研究者番号：50568409

