

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09743

研究課題名(和文) 知覚神経を介した眼特異的ゲートウェイ反射の解明と神経伝達物質による炎症再燃の抑制

研究課題名(英文) Ocular gateway reflex, which is mediated by sensory nerve, and relapsing control by neurotransmitter

研究代表者

柳井 亮二 (Yanai, Ryoji)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10346554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ぶどう膜炎は眼内炎症を引き起こし、視力喪失の原因となる。現在、免疫抑制療法で急性炎症を抑制できるが、慢性炎症や再燃の抑制方法はない。中枢神経系で見られる免疫細胞ゲートが眼内にも存在し、神経伝達物質がその形成に関与している可能性がある。本研究では神経伝達物質サブスタンスPが眼内炎症の制御に関与しているかを検証し、その治療標的としての有効性を調査した。サブスタンスPの減少により眼内の炎症関連サイトカイン・ケモカインが変化し、免疫細胞の遊走が抑制されることが示唆された。この研究により神経伝達物質が慢性炎症の制御に関与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、眼内の慢性炎症の制御に神経系を介した新たなアプローチを提供する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Uveitis causes intraocular inflammation, which leads to vision loss. Currently, immunosuppressive therapy can control acute inflammation, but there is no way to control chronic inflammation or flare-ups. The immune cell gates found in the central nervous system are also present in the eye, and neurotransmitters may be involved in their formation. In this study, we tested whether the neurotransmitter substance P is involved in the regulation of intraocular inflammation and investigated its efficacy as a therapeutic target. The results suggest that a decrease in substance P alters inflammation-related cytokines and chemokines in the eye and suppresses immune cell migration. This study indicates that neurotransmitters may be involved in the regulation of chronic inflammation.

研究分野：眼炎症

キーワード：ぶどう膜炎 免疫細胞ゲート ゲートウェイ反射 サブスタンスP サイトカイン ケモカイン 慢性炎症

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

眼には「免疫特権」があるため、炎症を抑制する自己防御機構が備わるが、ぶどう膜炎では血液眼関門が破壊され、多量の炎症細胞が眼内に侵入する。その結果、慢性炎症が持続する難治性ぶどう膜炎は、炎症再燃をくり返し徐々に視機能を喪失する。

ぶどう膜炎は、自己免疫疾患や感染が契機となって眼内炎症を生じる眼疾患で、ステロイド剤を中心とした免疫抑制療法により急性炎症を沈静化することができる。しかしながら、ステロイドには炎症再燃を抑制する効果はなく、慢性炎症や炎症の再燃を制御するような治療法は皆無である。このような背景からぶどう膜炎の炎症再燃を抑制できる治療法の開発が急務である。

中枢神経系の血管には血液脳関門が存在し、免疫細胞や高分子の侵入を制限しているが、近年、免疫細胞の特異的な侵入口(免疫細胞ゲート)が証明された。その形成機構であるゲートウェイ反射では、血管内皮細胞のケモカイン大量発現が分子基盤となっている。この炎症回路の誘導は重力、神経や電気からの刺激がトリガーとなる。

サブスタンス P は眼内炎症により神経終末から分泌され神経炎症を引き起こす神経伝達物質である。眼内炎症が生じると神経伝達物質サブスタンス P の特異的な受容体 NK-1R の発現増加がみられることが報告されている。我々は三叉神経切除による眼内サブスタンス P 欠如モデルでは眼内の免疫細胞が増加しゲートウェイ反射が抑制されていることを見出し、さらに、ぶどう膜炎モデルの臨床スコアが抑制されることを確認した。

2. 研究の目的

眼球の炎症再燃を抑制するには、血液眼関門に免疫細胞が侵入することを制限することが重要で、中枢神経系で発見されたゲートウェイ反射が眼球においても存在するのかを証明し、血液眼関門の制御に神経伝達物質が有効であるかどうかを検証することが必要となる。我々はサブスタンス P が眼内の慢性炎症のキーファクターではないかの仮説を立案し、サブスタンス P の関与と慢性炎症制御の治療標的としての有効性について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1: 神経伝達物質サブスタンス P による免疫細胞ゲートの形成と局在への影響

・動物モデル: 三叉神経切除によるサブスタンス P 欠乏群、網膜光凝固によるサブスタンス P 過剰発現群を作成後、自己免疫性ぶどう膜炎を誘導して時系列で眼球を回収する。

・免疫細胞ゲート形成の評価: 回収した眼球から組織切片を作成し、HE および免疫染色 (CD4+, CD8+, CD11c+) により自己反応性 CD4+T 細胞や抗原提示細胞、マクロファージの細胞数をカウントすることで免疫細胞ゲート形成へのサブスタンス P の影響を確認する。

2: 免疫細胞ゲート形成の分子機構の解明

・タンパクレベル: 眼球内容液を回収し、Bioplex アッセイシステム (Bio-Rad) でサブスタンス P および免疫細胞の遊走に重要なケモカイン (CCL20, CXCL1) を測定する。

・遺伝子レベル: 上述の組織切片で免疫細胞が集積している部位を標的として、レーザーキャプチャーマイクロコピーを用いて RNA を回収し、ケモカイン (CCL20, CXCL1 など) 遺伝子発現を測定する。以上の結果を総合的に解析し、免疫細胞ゲート形成の分子機構を検討する。

3: サブスタンス P フラグメントを用いた免疫細胞ゲートの制御

・サブスタンス P 全長、サブスタンス P (1-7)、サブスタンス P (8-11) ペプチドを静脈注射し、眼免疫細胞ゲートから侵入する細胞を抑制できる必須ペプチドを同定する。

・本実験により治療標的となるサブスタンス P フラグメントを決定し治療応用を試みる。

4. 研究成果

研究成果の中で公表可能な慢性炎症に直接関連する眼内のサイトカイン、ケモカインの動態に対する研究成果について開示する。

三叉神経切除によるサブスタンス P 欠乏モデルに自己免疫性ぶどう膜炎を誘導して時系列で眼球を回収し、眼球内容液を抽出して Bioplex アッセイシステム (Bio-Rad) でサブスタンス P および免疫細胞の遊走に重要なケモカインを測定した。

網膜に発現しているサイトカイン・ケモカインでは IL-1a、IL-3、IL-10、IL-12(p40)、MIP-1a がサブスタンス P 欠乏により減少していたが、Eotaxin は増加していた (図 1)。一方、脈絡膜に発現しているサイトカイン・ケモカインでは、IL-3、IL-12、IL-17、KC、MIP-1a、MIP-1b がサブスタンス P 欠乏により減少しており、増加した因子はみられなかった (図 2)。

以上の結果より三叉神経切除モデルでは眼内の神経伝達物質の減少により、サイトカイン・ケモカインの減少が引き起こされ、免疫細胞の遊走が抑制されていることが示唆された。免疫細胞の遊走が、三叉神経切除モデルにおけるぶどう膜炎モデルの臨床スコアが抑制されるメカニズムの一つであると推察される。

今後、サブスタンス P 刺激モデルにおいて同様の解析を行い、神経伝達物質による局所の慢性炎症の制御機構についてさらに検討を行う予定である。

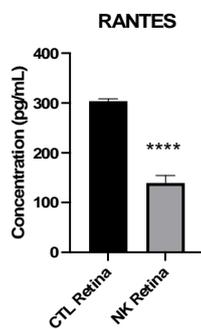
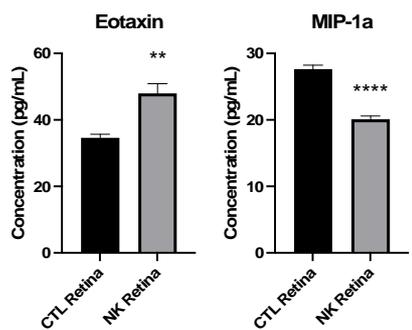
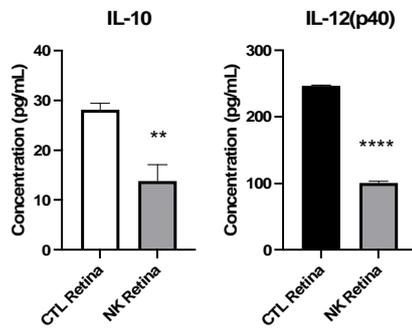
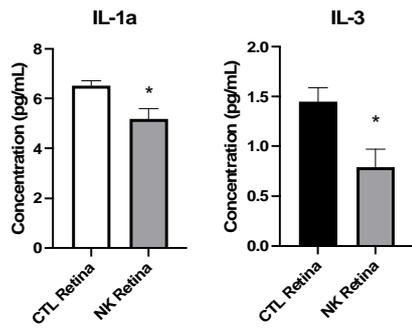


図1 三叉神経切除により発現量が変化した網膜のサイトカイン・ケモカイン

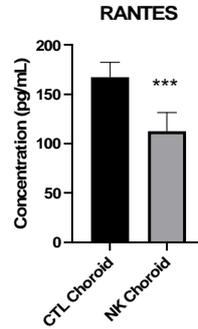
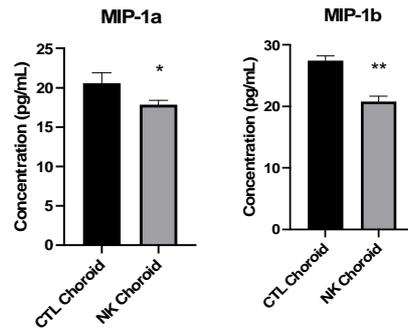
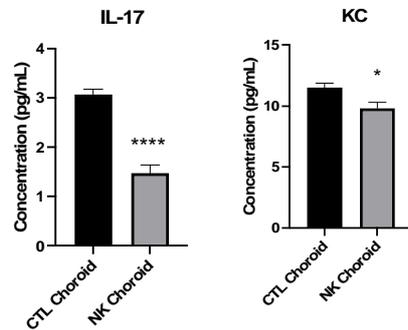
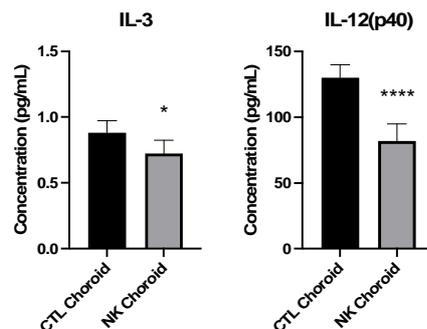


図2 三叉神経切除により発現量が変化した脈絡膜のサイトカイン・ケモカイン

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yanai R, Okunuki Y, Park D-H, Zunaina E	4. 巻 9
2. 論文標題 Next Therapeutic Targets in Ocular Diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Med (Lausanne)	6. 最初と最後の頁 953377
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmed.2022.953377	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hatano M, Higashijima F, Yoshimoto T, Ogata T, Ohta M, Kobayashi Y, Wakuta M, Yanai R, Kimura K	4. 巻 17
2. 論文標題 Evaluation of microaneurysms as predictors of therapeutic response to anti-VEGF therapy in patients with DME	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0277920
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0277920	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Namba K, Takase H, Nitta F, Maruyama K, Kusuvara S, Takeuchi M, Azumi A, Yanai R, Kaneko Y, Hasegawa E, Nakai K, Tsuruga H, Morita K, Kaburaki T	4. 巻 66
2. 論文標題 Multicenter, retrospective, observational study for the Treatment Pattern of systemic corticoSTERoids for relapse of non-infectious uveitis accompanying Vogt-Koyanagi-Harada disease or sarcoidosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Jpn J Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 130-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10384-021-00897-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 6件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柳井 亮二, 内 翔平, 東 良紘, 岡崎 史子, 脇口 宏之, 加藤 睦子, 園田 康平, 木村 和博
2. 発表標題 未成年の非感染性ぶどう膜に対してアダリムマブを導入した3例
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ogata T, Hatano M, Ohta M, Kobayashi Y, Wakuta M, Yanai R, Kimura K
2. 発表標題 Evaluation of microaneurysms in anti-VEGF-resistant diabetic macula edema
3. 学会等名 FUJIRETINA
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳井 亮二
2. 発表標題 アダリムマブが有効な非感染性ぶどう膜炎と治療の実際
3. 学会等名 第92回九州眼科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内 翔平, 柳井 亮二, 瀬戸口 恵理, 木村 和博
2. 発表標題 山口大学医学部附属病院で抗VEGF療法を行った炎症続発性脈絡膜新生血管の3症例
3. 学会等名 第55回日本眼炎症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 船津 法彦, 内 翔平, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 山口大学医学部附属病院で経験した眼梅毒の5症例
3. 学会等名 第55回日本眼炎症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有吉 伸顕, 内 翔平, 橘 佑亮, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 原因不明ぶどう膜炎に対する生物学的製剤導入後に非結核性抗酸菌が再燃した一例
3. 学会等名 第55回日本眼炎症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 和才 友紀, 内 翔平, 砂田 潤希, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 片眼の強膜炎寛解後に両眼視神経周囲炎を生じた多発血管炎肉芽腫症の一例
3. 学会等名 第55回日本眼炎症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳井 亮二
2. 発表標題 ウイルス性ぶどう膜炎の基礎と対策
3. 学会等名 第55回日本眼炎症学会・第393回ICD講習会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳井 亮二
2. 発表標題 初心者でも合格点をクリアするためのぶどう膜炎診療のコツ ~エピソード 1~
3. 学会等名 第76回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東島 史明, 船津 法彦, 緒方 惟彦, 太田 真実, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 当院における感染性眼内炎の治療成績
3. 学会等名 第74回山口眼科手術懇話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 緒方 惟彦, 柳井 亮二, 太田 真実, 船津 法彦, 東島 史明, 木村 和博
2. 発表標題 硝子体出血を来した黄斑下出血の3例の原因について
3. 学会等名 第74回山口眼科手術懇話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳井 亮二
2. 発表標題 ぶどう膜炎の治療の現在と今後の展望
3. 学会等名 第22回眼炎症セミナー(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yanai R, Shoda H, Uchi SH, Kobayashi M, Nagai T, Teranishi S, Wakuta M, Kimura K
2. 発表標題 Rho kinase inhibitor, ripasudil reduced intraocular pressure and Medication-score for uveitic glaucoma: two-year outcome
3. 学会等名 16th Congress of the International Ocular Inflammation Society (IOIS) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 湧田 真紀子, 能美 なな実, 太田 真実, 小林 由佳, 竹中 優嘉, 東島 史明, 緒方 惟彦, 波多野 誠, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 滲出型加齢黄斑変性の抗新生血管療法における導入期治療後の再発性に関する因子
3. 学会等名 第60回日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳井 亮二
2. 発表標題 インストラクションコース34 明日から役立つ眼炎症診療入門編：炎症の原因にこだわろう ぶどう膜炎診療について
3. 学会等名 第75回日本臨床眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳井 亮二
2. 発表標題 アダリムマブが有効なぶどう膜炎 病態と安全性
3. 学会等名 第75回日本臨床眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳井 亮二
2. 発表標題 ぶどう膜炎の診断と治療アップデート
3. 学会等名 第214回宮城県眼科医会集談会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 波多野 誠, 太田 真実, 小林 由佳, 湧田 真紀子, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 Evaluation of microaneurysms in -VEGF-resistant DME
3. 学会等名 第27回日本糖尿病眼学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳井 亮二
2. 発表標題 ぶどう膜炎の医療連携と治療の最前線について
3. 学会等名 下関ぶどう膜炎医療連携セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳井 亮二, 内 翔平, 緒方 惟彦, 波多野 誠, 小林 正明, 永井 智彦, 寺西 慎一郎, 木村 和博
2. 発表標題 ぶどう膜炎続発緑内障に対するROCK阻害薬による早期の眼圧下降効果
3. 学会等名 第54回日本眼炎症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳井 亮二
2. 発表標題 明日から役立つぶどう膜炎診療
3. 学会等名 SENJU instruction web Seminar (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村上 正晃 (Murakami Masaki) (00250514)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授 (10101)	
研究分担者	園田 康平 (Sonoda Ko-Hei) (10294943)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	湧田 真紀子 (Wakuta Makiko) (30886289)	山口大学・医学部附属病院・講師 (15501)	
研究分担者	木村 和博 (Kimura Kazuhiro) (60335255)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	
研究分担者	寺西 慎一郎 (Teranishi Shinichiro) (90649360)	山口大学・医学部附属病院・講師 (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------