

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16896

研究課題名（和文）上皮バリア低下による眼表面炎症の増悪メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigation of the exacerbation mechanism of ocular surface inflammation caused by ocular surface epithelial barrier failure

研究代表者

岸本 達真（Kishimoto, Tatsuma）

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：60783751

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：眼表面のバリアは角結膜の上皮細胞の上皮間結合とムチンや涙液からなる。バリアが低下する眼表面疾患には、ドライアイやアレルギー性結膜炎などがある。MUC16などの膜結合型ムチンは、眼表面の炎症を制御する可能性がある。本研究では、MUC16がアレルギーおよびLPS角膜炎による眼表面の炎症に影響するか検討した。その結果、MUC16欠損マウスでは、ブタクサ花粉によりアレルギー性結膜炎を誘導すると、アレルギーの臨床所見および引っかき行動が野生型と比較し増悪することがわかった。また、LPS角膜炎を惹起することでMUC16欠損により、好中球遊走が促進され、炎症性サイトカインの発現が上昇した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドライアイと結膜アレルギーは相互に影響を与えることは臨床研究では報告されてきた。眼表面のバリアと眼表面炎症には密接な関係性があると考えられているが、詳細な機序に関する研究はなされていない。これまでに知られていない機序について明らかになれば、学術的意義があると考えられる。疫学調査からそれぞれの疾患に罹患している患者数は2000万人以上と想定され、これらの疾患は社会活動・労働生産性を大いに妨げている。本研究から眼表面のバリア機能、炎症の両者を制御できる治療法を組み立てることができれば、社会的に大きな意義があり、その機序に即した治療法を開発し臨床応用をするための基盤になりうる重要な基礎研究である。

研究成果の概要（英文）：The barrier of the ocular surface is composed of epithelial junctions of corneal and conjunctival epithelial cells, as well as mucins and tear fluid. Diseases that compromise this barrier include dry eye disease and allergic conjunctivitis. Membrane-associated mucins, such as MUC16, may have the potential to regulate inflammation on the ocular surface. This study investigated whether MUC16 influences ocular surface inflammation caused by allergies and lipopolysaccharide (LPS) keratitis. The results showed that in MUC16-deficient mice, induction of allergic conjunctivitis by ragweed pollen led to exacerbation of clinical signs of allergy and increased scratching behavior compared to wild-type mice. Additionally, when LPS keratitis was induced, MUC16 deficiency promoted neutrophil infiltration and elevated the expression of inflammatory cytokines.

研究分野：眼科学

キーワード：アレルギー性結膜炎 MUC16 ブタクサ花粉 LPS角膜炎 マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

眼表面のバリアは角結膜の上皮細胞の上皮間結合とムチンや涙液からなる。上皮細胞のバリアとして tight junction が主に機能しているが、これは炎症性サイトカインだけで無く膜型ムチンによってもその発現が制御されることが報告されている。培養角膜上皮細胞を用いた研究において、膜型ムチンである MUC1 と MUC16 を shRNA でノックダウンする事で、tight junction の構成因子である zonula occludens-1(ZO-1)の発現を低下させ、バリア機能が低下する事が報告されており、MUC16 が tight junction の維持に重要であることが明らかとなった (PLoS ONE. 9:e100393, 2014.)。MUC16KO マウスでは結膜において IL-6 の発現が促進しており、膜型ムチンが上皮バリアのみならず眼表面の炎症の抑制にも関与している事が示唆されている (Invest Ophthalmol Vis Sci. 55:3626-3637, 2014.)。

バリアが低下する眼表面疾患として、ドライアイやアレルギー性結膜疾患などがある。角結膜におけるムチンは、眼表面を滑らかにし、病原体に対するバリア機能に関与する MUC1、MUC4、MUC16 などの膜結合型ムチンと、抗原や病原体を捕らえて粘膜組織から排除する MUC5AC などの分泌型ムチンが存在する。膜結合型ムチンは、結膜において炎症を制御している可能性がある (Invest Ophthalmol Vis Sci. 55:3626-3637, 2014.)。

アレルギー性結膜疾患は、I 型アレルギーが関与する結膜の炎症性疾患であり、隣接する角膜にも炎症を認める。また、春季カタルでは、ヒスタミン H1、H4 受容体が高発現しており、ヒスタミン受容体を発現している杯細胞からのムチン産生を促進することにより、眼表面のバリア機能に影響している可能性が示唆されている (Invest Ophthalmol Vis Sci. 17:53:2993-3003, 2012.)。このように、アレルギー性炎症により、眼表面の環境が変化し、眼表面のバリア機能を障害する可能性が考えられる。

一方、自然免疫系を活性化し炎症を惹起するために重要な役割をはたす膜タンパク質として Toll-like receptor (TLR) が挙げられる。TLR は腸管上皮や肺などの環境にさらされた組織で高度に発現する事が知られており、眼表面でも発現し、眼表面における感染や炎症の誘発に関与している。TLR のサブタイプの中で、TLR4 は LPS を認識して IL-1 β や TNF- α などの炎症性サイトカインの産生を促進する。TLR4 の発現はドライアイマウスモデルの結膜で増加し、LPS 点眼によりドライアイ未処置群と比較してより強く炎症性サイトカインの産生を促進する事が報告されている (Invest Ophthalmol Vis Sci. 1;57:2443-51, 2016.)。つまり眼表面のバリア機能の障害により、角結膜実質のより深い層において TLR4 に LPS が暴露され、より強い炎症が生じる可能性が考えられる。

このように、眼表面のバリアと眼表面炎症には密接な関係性があると考えられているが、眼炎症性疾患を膜型ムチンが及ぼす影響からその病態を明らかにする研究はこれまでほとんど見られなかった。

2. 研究の目的

本研究では、眼表面のバリア機能の低下により眼表面の炎症に関わる細胞、分子を同定し、眼表面炎症の悪化サイクルを阻止することを目的とする。眼表面のバリア機能障害をきたすマウスモデルにおいて、アレルギー性結膜炎や LPS 角膜炎による眼炎症を誘導し、増悪の有無について検討する。

眼表面のバリア機能障害は、涙腺摘出处置を行った涙液減少型ドライアイモデルと、膜結合型ムチンの MUC16 が欠損した MUC16KO マウスを用いて検討を行う。眼炎症については卵白アルブミン (Ovalbumin: OVA) によるアレルギー性結膜炎モデルと、LPS を点眼し角膜炎を惹起させるモデルを用いて検討する。

3. 研究の方法

1) バリア障害モデルの作製法(涙腺摘出したドライアイモデルおよび MUC16KO マウス)

全身麻酔をかけた C57BL/6 マウスの眼窩外涙腺を摘出する (Sci Rep. 8:1483, 2018)。涙腺を摘出した日を Day0 とし、15、21、28 に角膜上皮を 5 カ所に分け、障害程度を 0-3 のスコアでグレーディングする。その後、無麻酔下で涙液量検査用綿糸を使用し涙液量を測定する。MUC16 欠損バリア機能障害モデルは、MUC16 欠損マウスを用い対照として野生型マウスを使用する。

2) マウスアレルギー性結膜炎モデル

ドライアイ併発群は抗原の腹腔内投与開始 1 日前に涙腺摘出を行う。C57BL/6 マウスあるいは MUC16KO マウスに抗原として OVA および水酸化アルミニウムゲルを PBS に懸濁したエマルジョンを腹腔内投与し、7 日後および 14 日後に同量のエマルジョンを腹腔内投与してアレルギー反応を誘導する。20 日後から PBS、あるいは OVA を 1 日 1 回、8 日間点眼し結膜炎を誘導する。臨床スコアは、点眼開始日(20 日後)にマウスの前眼部の眼瞼腫脹、結膜充血、結膜浮腫、眼脂をそれぞれ 0-3 のスコアでグレーディングし、アレルギー反応の程度を評価する。掻痒感の評価として、点眼後 10 分間の後ろ肢でのひっかき行動を計測する。また、点眼開始 8 日後に眼

球を摘出し、結膜における好酸球浸潤数を計測する。

3) マウス LPS 角膜炎モデル

ドライアイ併発群は、アレルギー性結膜炎モデルとドライアイの誘導期間が同じ条件になるように、眼窩外涙腺摘出から 27 日後に LPS を点眼する。C57BL/6 マウスあるいは MUC16KO マウスに、LPS を 1 μ g 点眼し角膜炎を誘導する。4 時間後に結膜を摘出して RNA を抽出後、cDNA を作製して qRT-PCR を行い、IL-1 β mRNA、IL-12 mRNA、IL-6 mRNA、MIP-2 mRNA、TNF- α mRNA、MUC1 mRNA および MUC4 mRNA などについて、角膜サイトカインプロファイルを検討する。

4. 研究成果

眼表面のバリア機能障害をきたすマウスモデルの作製および臨床所見の評価を行った。その結果、野生型マウス、MUC16 欠損マウスのいずれにおいてもドライアイ誘導群ではドライアイ非誘導群と比較して Day15、21、28 で有意に角膜上皮障害が増悪した。MUC16 欠損マウスと野生型マウスでは上皮障害に差はみられなかった。その後、各群において涙液量を測定した結果、MUC16 欠損マウスと野生型マウスはいずれもドライアイ誘導群ではドライアイ非誘導群と比較して Day15、21、28 において涙液量は減少した。MUC16 欠損マウスと野生型マウスでは涙液量に差はみられなかった。既報では野生型マウスと比較し MUC16 欠損マウスで未処置の状態では角膜上皮障害に差はなく、角膜上皮損傷後の創傷治癒は MUC16 欠損マウスで促進されていた。今回の我々の結果では、誘導したドライアイによる上皮障害は軽度であるため、両群間で差が出なかったものと考えた。

野生型マウス、MUC16 欠損マウスの間でドライアイを誘導した際の角膜上皮障害に差がなかったことから、MUC16 がアレルギーに与える影響を評価するためドライアイを誘導せずにアレルギー性結膜炎を惹起し、検討を行うこととした。また用いる抗原も OVA とブタクサ花粉 (Ragweed: RW) を用いて検討を行った。その結果、引っ掻き回数、臨床所見ともに RW による免疫を行った群で野生型および OVA で免疫を行った群と比較し MUC16 欠損マウスで有意に増加したことから、RW を用いて検討を行うこととした。RW 点眼後のアレルギーの臨床スコアおよびひっかき回数は野生型と比較し、MUC16 欠損マウスで優位に増加した。Day20 から RW 抗原点眼を毎日行い、Day28 に眼球摘出し、結膜好酸球浸潤数を計測したところ、野生型と比較し、MUC16 欠損マウスで優位に好酸球浸潤数は低下した。ヒト培養角膜上皮細胞を MUC16 をノックダウンすることで、上皮のバリア機能低下をきたす報告がある。(Gipson IK, et al. PLOS ONE 9:e100393, 2014) 我々の結果では MUC16 欠損により角膜上皮のバリア機能低下は促進されなかったが、マウスでは MUC16 は角膜には存在せず結膜に存在するため、今回検討できていない結膜上皮のバリア機能低下により抗原がより侵入することでアレルギー性結膜炎の症状を増悪した可能性を考えた。

野生型マウス、MUC16 欠損マウスの間でドライアイを誘導した際の角膜上皮障害に差がなかったことから、ドライアイは誘導せず、野生型と MUC16 の欠損マウスによる LPS 角膜炎における炎症反応の増悪について比較することとした。その結果 MUC16 を欠損することで、同じ膜型ムチンである MUC1 および MUC4 の発現が低下し、炎症誘導性サイトカインである IL-1 β や MIP-2 などのサイトカインの発現が上昇していた。摘出角膜への好中球数を計測したところ、野生型マウスと比較し、MUC16 欠損マウスで有意に好中球数が増加していた。以上から、MUC16 が欠損することで、膜型ムチンの発現低下により好中球の遊走を促進し、炎症性サイトカインの発現を上昇している可能性が考えられた。マウスの角膜には MUC16 は存在しないが、結膜における MUC16 の喪失は、炎症性シグナル伝達のアップレギュレーションを通じて、角膜上皮と間質の恒常性に影響を及ぼす可能性が示されている (Invest Ophthalmol Vis Sci. 55:3626-3637, 2014.)。TLR のサブタイプの中で、TLR4 は LPS を認識して IL-1 β などの炎症性サイトカインの産生を促進する。我々の結果も MUC16 を欠損することで炎症性シグナル伝達のアップレギュレーションにより LPS 角膜炎により生じた炎症をより増強した可能性を考えられる。

研究期間全体を通じた結果として、引っ掻き回数、臨床所見ともに RW による免疫を行った群で野生型と比較し MUC16 欠損マウスで有意に増加しており、野生型と比較し、MUC16 欠損マウスで有意に好酸球浸潤数は低下した。また、MUC16 欠損により、好中球の遊走が促進され、炎症性サイトカインの発現が上昇した。本研究の終了時には不明な点も多く、今後詳細なメカニズムについてさらなる検討を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Kishimoto Tatsuma, Ishida Waka, Nakajima Isana, Taguchi Osamu, Sugioka Koji, Kusaka Shunji, Fukuda Ken	4. 巻 218
2. 論文標題 Promotion of conjunctival fibroblast-mediated collagen gel contraction by mast cells through up-regulation of matrix metalloproteinase release and activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 108980 ~ 108980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2022.108980	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukuda Ken, Ishida Waka, Kishimoto Tatsuma, Nakajima Isana, Miura Yusaku, Sumi Tamaki, Yamashiro Kenji	4. 巻 11
2. 論文標題 Role of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs/Alarmins) in Severe Ocular Allergic Diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1051 ~ 1051
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11061051	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 Kishimoto Tatsuma, Ishida Waka, Nakajima Isana, Fukuda Ken, Yamashiro Kenji	4. 巻 23
2. 論文標題 Aqueous-Deficient Dry Eye Exacerbates Signs and Symptoms of Allergic Conjunctivitis in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4918 ~ 4918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23094918	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 Ishida Waka, Kishimoto Tatsuma, Takaiwa Fumio, Fukuda Ken	4. 巻 10
2. 論文標題 Prophylactic and Therapeutic Effects of Oral Immunotherapy on Birch Pollen-Induced Allergic Conjunctivitis in Mice with a Rice-Based Edible Vaccine Expressing a Hypoallergenic Birch Pollen Allergen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3361 ~ 3361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10123361	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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岸本達真
2. 発表標題 ドライアイとアレルギー性結膜炎の相互作用の検討
3. 学会等名 角膜カンファランス2024（招待講演）
4. 発表年 2024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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------