

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 5 月 20 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791664

研究課題名（和文） アレルギー性結膜疾患における眼表面上皮バリアーの関与

研究課題名（英文） The involvement of ocular surface barrier in allergic conjunctival diseases

研究代表者

福田 憲 (FUKUDA KEN)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：70335751

研究成果の概要（和文）：アレルギー性炎症で放出される Th2 サイトカイン（IL-4, IL-5, IL-10, IL-13）のうち IL-4 および IL-13 により培養ヒト角膜上皮細胞のバリアー機能は有意に抑制された。またブタクサ花粉を用いたマウスアレルギー性結膜炎モデルにおいては、ブタクサ花粉の免疫および点眼により結膜上皮の E-cadherin の染色性が低下した。

研究成果の概要（英文）：Among Th2 cytokines, IL-4 and IL-13, but not IL-5, IL-9, or IL-10, induced a significant decrease of barrier function in cultured human corneal epithelial cells. In a mouse model of allergic conjunctivitis using ragweed pollen, allergen challenge caused a decrease in expression of the junctional protein, E-cadherin, by conjunctival epithelium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：アレルギー，上皮細胞，バリアー，サイトカイン，マウス，角膜，結膜

1. 研究開始当初の背景

重症アレルギー性結膜疾患のある春季カタルにおいては、結膜での強い炎症のみならず、遷延性角膜上皮欠損、角膜潰瘍などの角膜病変を来し、時に視力予後が不良である。

我々はこれまで Th2 サイトカインにより、角膜実質細胞が好酸球や Th2 細胞の遊走や活性化に重要である CCL11 や CCL17 などのケモカインや接着分子を発現すること、また結膜線維芽細胞は細胞外マトリックスの産生増加や蛋白分解酵素（matrix metalloproteinase）の産生抑制により、角

膜障害の発症や結膜増殖性病変に関与することを報告してきた。一方、角膜上皮細胞はこれらのケモカインや接着分子を発現せず、バリアーとして炎症の抑制因子であることを報告した。また、in vivo においても、ラットアレルギー性結膜炎モデルにおいて角膜上皮を搔爬すると結膜における好酸球浸潤が有意に増加することを明らかにした。

これらの結果より、1) 組織固有の線維芽細胞（実質細胞）の活性化が炎症の重症化や遷延化に重要な役割を果たしていること、2) 上皮バリアーの低下は、実質への炎症性メデ

イエーターの到達により炎症の増悪因子になることなどが考えられ、バリアー機能の低下のメカニズムの解明およびその薬物による制御は、アレルギー性結膜疾患の新しい治療標的になると考えられる。しかしながら、アレルギー性結膜疾患における眼表面のバリアーの役割およびその制御機構はほとんど知られていない。

2. 研究の目的

眼表面を形成する角結膜の上皮細胞はそのバリアー機能により恒常性維持、炎症反応の抑制に貢献していることが考えられる。アレルギー炎症においてこれらのバリアー機能が変化するか、また薬剤により制御可能かどうかを、1)アレルギー性結膜炎の動物モデルにおいて、角結膜上皮細胞のバリアーを構成する種々の因子の発現が変化するか、2)培養ヒト角膜および結膜上皮細胞を用いてアレルギー炎症で放出される種々のメディエーター (Th2 サイトカインなど) によりバリアー機能が低下するか、3)さらに種々の薬物によって制御可能かどうかを検討し、上皮バリアーを眼アレルギーの新しい治療標的として確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 培養ヒト角膜および結膜上皮細胞を用いた検討

結膜および角膜上皮細胞を transwell にて培養し、バリアー形成後 24 時間無血清培地で培養する。その後、種々のサイトカインを添加して一定時間 (6~48 時間) 培養後、上皮膜抵抗を測定することで電気的バリアーの変化を検討する。また免疫組織学および Western blotting 法などによりジャンクション構成因子の発現を検討する。

(2) マウスアレルギー性結膜炎モデルにおける検討

BALB/c マウスをブタクサ花粉およびアジュバントの足底への注射により感作する。2 週間後にブタクサ花粉を点眼してチャレンジし、実験的なアレルギー性結膜炎の動物モデルを作成する。対照として、ブタクサ花粉を点眼していない群を用いる。点眼後、遅発相においてマウスを CO₂ 吸入にて安楽死させ、上下眼瞼、結膜円蓋部を含めて眼球を摘出する。切片を作成し、免疫組織化学的に種々のジャンクション構成因子の染色を行い、上皮細胞における発現を検討する。

また同様に可溶性抗原である卵白アルブミン (OVA) とアジュバントを用いて感作後、OVA を点眼するモデルにおいても検討する。対照として、感作前に OVA を経口

投与して免疫寛容を誘導したマウスに OVA を点眼する群を用いる。

4. 研究成果

(1) ヒト培養上皮細胞を用いたバリアー機能の検討

SV40 で不死化した角膜上皮細胞を transwell にて培養し、バリアーを形成したことが確認できた後、24 時間無血清培地で培養した。その後、アレルギー炎症で発現が上昇している Th2 サイトカインを添加して一定時間 (6~72 時間) 培養後、上皮膜抵抗を測定することで電気的バリアーの変化を検討した。

Th2 サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) のうち、IL-4 と IL-13 が濃度依存的に角膜上皮細胞の上皮膜抵抗 (TER) を減弱させた。IL-4 は 0.01ng/ml から、IL-13 は 0.1ng/ml から有意な作用を示し、共に 10ng/ml でピークに達した。またこれらの作用はサイトカイン添加後、12 時間から認められた。

角膜上皮細胞の IL-4/IL-13 受容体複合体の蛋白および mRNA の発現について、flowcytometry 法および RT-PCR 法を用いて検討したところ、IL-4R α 、IL-13R α 1 を発現していた。IL-4 および IL-13 の共通の受容体である IL-4R α の中和抗体をサイトカイン添加前に細胞に作用させると、IL-4 および IL-13 で認められ TER の減弱が抑制され、これらの作用は IL-4/13 受容体を介した作用であると考えられた。

IL-4/IL-13 のバリアー低下作用のメカニズムを調べるために、バリアーの形成・維持に重要な因子であるタイトジャンクションの構成因子 ZO-1 および occludin の発現を検討した。それぞれの特異抗体を用いた染色により、角膜上皮細胞は細胞間に ZO-1 および occludin を均一に発現していたが、IL-4 および IL-13 を添加するとその発現が低下する部分が認められた。従って、IL-4 と IL-13 は角膜上皮細胞に受容体を介して作用し、タイトジャンクションを構成する ZO-1 や occludin の発現の低下を介して、バリアー機能を低下させることが明らかとなった。さらに、副腎皮質ステロイド剤であるデキサメサゾン添加すると、IL-4 および IL-13 によるバリアー機能の抑制が回復した。

またその他のサイトカインについて培養ヒト角膜上皮細胞のバリアー構成蛋白の発現について、免疫染色法について検討した。その結果、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF) $-\alpha$ 、IL-1 β を添加して培養すると角膜上皮細胞の zonula occludens (ZO)-1 の細胞境界における発現が部分的に抑制された。さらに近年アレルギー

ギー炎症において重要な役割を果たしていることが報告されている IL-17 および IL-33 も同様に ZO-1 の発現を部分的に抑制した。

(2) マウスアレルギー性結膜炎モデルにおける検討

マウスアレルギー性結膜炎モデルにおいても結膜上皮および角膜上皮のバリアー構成蛋白の発現を免疫染色法にて検討した。ブタクサ花粉をアジュバントを能動免疫した後に、ブタクサ花粉を点眼した群としない群で検討したところ、結膜上皮の E-cadherin の染色性が低下していた。ブタクサ花粉は不溶性抗原であることや花粉抗原自体に蛋白分解活性がある可能性を考え、さらに可溶性の抗原である卵白アルブミン (OVA) を用いたモデルにて同様の検討を行った。対照として、OVA を経口投与して免疫寛容を誘導した後に感作、点眼を行ったマウスを用いた。OVA で感作・点眼したマウスの結膜および角膜上皮では、経口免疫寛容により炎症が生じていない群に比して E-cadherin の染色性が低下していた。

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 13 件)

- ① Fukuda K, Kuo CH, Morohoshi K, Liu FT, Ono SJ. The murine CCR3 receptor regulates both eosinophilia and hyperresponsiveness in IgE-mediated allergic conjunctivitis. *Br J Ophthalmol*. 査読有 (印刷中)
- ② Matsushita E, Fukuda K, Nakahira A, Kishi S, Fukushima A. Resolution of photoreceptor outer segment damage in a patient with unilateral acute idiopathic maculopathy observed using spectral-domain optical coherence tomography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 査読有 2012;250(5):765-8.
- ③ Kondo Y, Fukuda K, Suzuki K, Nishida T. Chronic noninfectious uveitis associated with Vogt-Koyanagi-Harada disease treated with low-dose weekly systemic methotrexate. *Jpn J Ophthalmol*. 査読有 2012;56(1):104-6.
- ④ Ishida W, Fukuda K, Kajisako M, Sumi T, Matsuda H, Yagita H, Fukushima A. B and T lymphocyte attenuator regulates the development of antigen-induced experimental conjunctivitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 査読有 2012;250(2):289-95.
- ⑤ Ishida W, Fukuda K, Sakamoto S, Koyama N, Koyanagi A, Yagita H, Fukushima A. Regulation of experimental autoimmune uveoretinitis by anti-delta-like ligand 4 monoclonal antibody. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 査読有 2011;52(11):8224-30.
- ⑥ Fukuda K, Chikama T, Takahashi M, Nishida T. Long-term follow-up after lamellar keratoplasty in a patient with bilateral idiopathic corneal keloid. *Cornea*. 査読有 2011;30(12):1491-4.
- ⑦ Fukuda K, Nishida T, Fukushima A. Synergistic induction of eotaxin and VCAM-1 expression in human corneal fibroblasts by staphylococcal peptidoglycan and either IL-4 or IL-13. *Allergol Int*. 査読有 2011;60(3):355-63.
- ⑧ Ishida W, Fukuda K, Sumi T, Ebihara N, Kajisako M, Matsuda H, Yagita H, Fukushima A. Adjuvants determine the contribution of basophils to antigen sensitization in vivo. *Immunol Lett*. 査読有 2011;136(1):49-54.
- ⑨ Ishida W, Fukuda K, Higuchi T, Kajisako M, Sakamoto S, Fukushima A. Dynamic changes of microRNAs in the eye during the development of experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 査読有 2011;52(1):611-7.
- ⑩ Ishida W, Fukuda K, Kajisako M, Takahashi A, Sumi T, van Rooijen N, Fukushima A. Conjunctival macrophages act as antigen-presenting cells in the conjunctiva during the development of experimental allergic conjunctivitis. *Mol Vis*. 査読有 2010;16:1280-5.
- ⑪ Fukuda K, Yamada N, Nishida T. Case report of restoration of the corneal epithelium in a patient with atopic keratoconjunctivitis resulting in amelioration of ocular allergic inflammation. *Allergol Int*. 査読有 2010;59(3):309-12
- ⑫ Adachi T, Fukuda K, Kondo Y, Nishida T. Inhibition by tranilast of the cytokine-induced expression of chemokines and the adhesion molecule VCAM-1 in human corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 査読有 2010;51(8):3954-60.
- ⑬ Fukuda K, Kumagai N, Nishida T. Levels

of soluble CD14 and lipopolysaccharide-binding protein in human basal tears. Jpn J Ophthalmol. 査読有 2010;54(3):241-2.

〔学会発表〕(計7件)

- ① Ken Fukuda. Immunomodulation in severe allergic conjunctivitis. World Ophthalmology Congress 2012 (シンポジウム). 2012年2月19日. The Abu Dhabi National Exhibition center. (Abu Dhabi, U. A. E.)
- ② 福田憲. 抗原特異的免疫療法による眼アレルギー治療の可能性. 角膜カンファレンス2012 (シンポジウム). 2012年2月23日. ホテルニューオータニ (東京都)
- ③ 福田憲他. 緑膿菌臨床分離株に対するバクテリオファージKPP12の溶菌効果の検討. 角膜カンファレンス2012. 2012年2月24日. ホテルニューオータニ (東京都)
- ④ 福田憲, 足立格郁, 近藤由樹子, 西田輝夫, 福島敦樹. トラニラストによる角膜線維芽細胞からのサイトカイン産生抑制作用. 第115回日本眼科学会総会. 2011年5月12日. 東京国際フォーラム (東京都)
- ⑤ 福田憲, 石田わか, 角環, 森田珠恵, 内山淳平, 松崎茂展, 大畑雅典, 福島敦樹. バクテリオファージによるマウス緑膿菌角膜炎の抑制効果. 第48回日本眼感染症学会. 2011年7月8日. 国立京都国際会館 (京都府)
- ⑥ 福田憲. 肥満細胞再構築マウスを用いたアレルギー性結膜疾患の研究. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 (シンポジウム). 2011年11月10日. グランドプリンスホテル新高輪 (東京都)
- ⑦ Ken Fukuda. Immunomodulatory treatment of severe ocular allergies. The 11th International Ocular Inflammation Society Congress (シンポジウム). 2011年11月14日. Hotel Taj Exotica (Goa, India)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 憲 (FUKUDA KEN)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号: 70335751