

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592615

研究課題名(和文) レチノイドを用いた眼炎症疾患における視神経、神経網膜保護の試み

研究課題名(英文) Neuroprotection of experimental autoimmune optic neuritis by retinoid

研究代表者

慶野 博 (Keino, Hiroshi)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：90328211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では難治性視神経炎の動物モデルとして知られるマウス実験的自己免疫性視神経炎(EAON)を用いて、近年新たな免疫調節分子として注目されているレチノイン酸を用いてレチノイドの炎症抑制効果と作用機序について検討を行った。その結果、EAON誘導期からレチノイン酸を投与した群では、対照群(基剤投与群)に比べて病理組織学的視神経炎スコアが有意に低下し、さらに、所属リンパ節細胞の培養上精中のIFN- $\gamma$ 、IL-17などの炎症性サイトカインの産生が有意に抑制されていた。これらの結果から炎症性視神経疾患に対するレチノイン酸の炎症抑制効果が確認された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated whether all trans-retinoic acid (ATRA) can reduce the degree of experimental autoimmune optic neuritis (EAON) in mice. Optic neuritis was induced in C57BL/6 mice by immunizing them with myelin oligodendrocyte glycoprotein35-55. ATRA (350 ug/mouse/time point) was administered every other day from day 0 to day 20. ATRA treatment significantly reduced the clinical score of EAE and the severity of the optic neuritis by histopathological analysis. The production of IFN- $\gamma$  and IL-17 by draining lymph node cells was significantly reduced in ATRA-treated mice. The degree of demyelination in the optic nerve of mice with EAE was significantly reduced after ATRA treatment. These findings demonstrate that ATRA treatment was able to reduce the severity of optic neuritis in mice with EAE.

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：視神経炎 レチノイド

## 1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica; NMO) は重度の視神経炎と脊髄炎を特徴とする再発性炎症性中枢神経疾患である。最近になり NMO 患者血清中にアストロサイトの足突起に発現しているアクアポリン 4 (AQP4) に対する抗体が検出され、液性免疫を主体とした免疫学的機序がその発症に深く関与していることが明らかとなってきた。とくに抗 AQP4 抗体陽性視神経炎では従来の多発性硬化症 (MS) や特発性視神経炎と異なり、視神経炎の再発を繰り返し、ステロイドパルス療法を行っても視力予後が不良であることが報告されており、その病態解明ならびに新たな治療法の早急な開発が望まれている。

レチノイドは元来 visual cycle における必須分子として知られているが、近年レチノイドの一種であるレチノイン酸 (RA) が自己免疫疾患における免疫制御分子として作用することが報告されている。最近、我々は難治性ぶどう膜炎の動物モデルとして知られる実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) に対してレチノイン酸を全身投与することで EAU の重症度が有意に低下し、かつ所属リンパ節細胞からの IFN- $\gamma$  と IL-17 の産生が有意に低下することを見だし、レチノイン酸の難治性ぶどう膜炎への応用の可能性について報告した (Keino et al. Br J Ophthalmol. 2010 94:802-807.)。また合成レチノイド Am80 でも同様の効果を得ることを見いだした。さらに最近ではレチノイドが免疫制御作用だけでなく神経保護作用を有することが近年報告されている。これらの所見より、レチノイン酸を主体としたレチノイドが中枢性炎症性疾患の一つである自己免疫性視神経炎に対して炎症抑制作用、および神経保護作用を有することが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では難治性視神経炎のモデルとして知られる自己免疫性視神経炎 (experimental autoimmune optic neuritis: EAON) をマウスに誘導し、レチノイドの炎症抑制効果とその制御機構、さらにレチノイドと視神経保護との関連について検討することを目的に研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) レチノイン酸の全身投与による実験的視神経炎 (EAON) の抑制効果の検討。  
EAON を惹起させたマウスに対して視神経

炎の誘導期 (induction phase)、発症期 (effector phase) においてレチノイン酸を全身投与し、EAON の軽症化、抑制の有無について免疫後 22 日目に対照群、およびレチノイン酸投与群から眼球を摘出、視神経炎の重症度を病理組織学的に検討する。またレチノイン酸の全身投与により所属リンパ節細胞におけるリンパ球増殖反応、サイトカイン産生能への影響を検討する。

(2) 合成レチノイド (Am80) の全身投与による EAON の抑制効果の検討

合成レチノイド (Am80) はレチノイン酸受容体 (RAR) の中でも RAR $\alpha/\beta$  を選択的に活性化する。Am80 はレチノイン酸に比較して副作用も少なく生体内での安定性に優れており、レチノイン酸治療後の急性前骨髄性白血病 (APL) 再発例に対して本邦においてすでに臨床応用されている薬剤である。(1) と同様に EAON を惹起させたマウスに対して Am80 を全身投与し、EAON の軽症化、抑制の有無について病理組織学的に検討する。

(3) レチノイドの全身投与による視神経、神経保護因子の解析

レチノイド投与による炎症局所における神経保護作用について評価するために、EAON 誘導後にレチノイド投与群および対照群のマウスの視神経を採取、myelin basic protein (MBP) に対する抗体を用いて免疫組織染色を行い、視神経における MBP の減少率をスコア化し、レチノイン酸投与群と対照群で比較する。また両群からトータル RNA を抽出、マイクロアレイの手法を用いて神経保護分子の発現について網羅的に解析を行う。

## 4. 研究成果

(1) レチノイドによる EAON の炎症抑制効果の検討 (炎症誘導期からの投与)  
EAON 誘導期からレチノイン酸、および Am80 を投与した群では、対照群 (基剤投与群) に比べて病理組織学的視神経炎スコアの有意な低下がみられた。

(2) レチノイドによる Th1、Th17 反応の制御  
免疫後 15 日目に所属リンパ節細胞を採取、網膜抗原にて刺激したリンパ節細胞の培養上清中の IFN- $\gamma$ 、IL-17 を測定したところ、レチノイン酸投与群において両者ともに有意

な低下がみられた。

(3) レチノイドによる EAON の炎症抑制効果の検討 (炎症発症期からの投与)  
EAON 発症期からレチノイン酸の投与を開始した群では対照群と比較して病理組織スコアの有意な差は認められなかった。

(4) EAON 発症視神経組織における myelin basic protein (MBP) の免疫組織染色  
レチノイドによる視神経保護効果を評価するために免疫後 22 日目に各群の視神経を採取し、MBP に対する免疫組織染色を行ったところ、対照群に比較しレチノイン酸および Am80 投与群では MBP 減少率の有意な低下がみられた。

(5) 視神経における神経保護因子の網羅的解析  
レチノイド投与によって視神経における神経保護因子の発現に変動があるか確認するため、免疫後 22 日目に対照群、および Am80 投与群から視神経を採取、RNA を抽出した後マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、Am80 投与マウスの視神経ではラジカルスカベンジャーの一種である superoxide dismutase 1 (SOD1) の発現が対照群と比較して約 5 倍の上昇を認めた。

以上の結果からレチノイン酸、Am80 の全身投与は実験的自己免疫性視神経炎に対する炎症抑制効果を示し、その機序として IFN- $\gamma$ 、IL-17 などの炎症性サイトカインの抑制が関与していると考えられた。また視神経の病理組織学的検討からレチノイン酸、および Am80 投与群では対照群に比較して MBP が有意に多く残存していたことから、炎症性視神経疾患に対してレチノイドが神経保護的に作用することが示唆された。その機序としてラジカルスカベンジャーの一種である SOD1 の発現上昇が関与する可能性が考えられた。

## 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 16 件)

1. Keino H, Watanabe T, Sato Y, Shudo K, Kitaoka Y, Harada T, Okada AA. Retinoic acid receptor stimulation ameliorates experimental autoimmune optic neuritis. Clin Experiment Ophthalmol. 2014 Mar 10. doi: 10.1111/ceo.12308. 査読あり
2. Sugita S, Kawazoe Y, Imai A, Kawaguchi

T, Horie S, Keino H, Takahashi M, Mochizuki M. Role of IL-22- and TNF- $\alpha$ -producing Th22 cells in uveitis patients with Behcet's disease. J Immunol. 2013;190:5799-808. doi: 10.4049/jimmunol.1202677. 査読あり

3. Kaburaki T, Namba K, Sonoda KH, Kezuka T, Keino H, Fukuhara T, Kamoi K, Nakai K, Mizuki N, Ohguro N; Ocular Behcet Disease Research Group of Japan. Behcet's disease ocular attack score 24: evaluation of ocular disease activity before and after initiation of infliximab. Jpn J Ophthalmol. 2014;58:120-30. doi: 10.1007/s10384-013-0294-0. 査読あり

4. Taki W, Keino H, Watanabe T, Okada AA. Enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in recurrent unilateral posterior scleritis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2013; 251:1003-1004. doi: 10.1007/s00417-012-1972-1. 査読あり

5. Hirukawa K, Keino H, Watanabe T, Okada AA. Enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in new-onset acute posterior scleritis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2013;251:2273-2275. doi: 10.1007/s00417-013-2265-z. 査読あり

6. Nakayama M, Keino H, Hirakata A, Okada AA, Terado Y. Exudative retinal astrocytic hamartoma diagnosed and treated with pars plana vitrectomy and intravitreal bevacizumab. Eye 2012;26:1272-1273. doi:10.1038/eye.2012.124. 査読あり

〔学会発表〕(計 32 件)

1. Keino H, Sato Y, Okada AA. Retinoic acid receptor-alpha/beta-specific ligand Am80 ameliorates optic neuritis in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS) 2013年6月27日-30日 Boston USA

2. 慶野 博 難治性眼炎症疾患に対する Foxp3 陽性制御性T細胞による免疫抑制療法の可能性 第117回日本眼科学会総会 2013年4月4日-7日 東京

3. 肥留川京子、慶野 博、渡辺交世、瀧和歌子、平形明人、岡田アナベルあやめ 網膜動静脈閉塞症に対してステロイドパルス療法が奏功したSLE網膜症の1例 第46回日本眼炎症学会 2012年7月14日-16日 横浜

4. 慶野 博、渡辺交世、瀧和歌子、岡田アナベルあやめ インフリキシマブ長期投与パーチェット病患者の蛍光眼底造影の推移 第46回日本眼炎症学会 2012年7月14日-16日 横浜

5. 渡辺交世、慶野 博、瀧和歌子、越前成旭、岡田アナベルあやめ インフリキシマブ治療を導入した若年性パーチェット病ぶどう膜網膜炎の2症例 第116回日本眼科学会総会 2012年4月5日-8日 東京

6. 慶野 博 シンポジウム12 眼炎症疾患のメカニズム最前線 レチノイドによる眼炎症性疾患の制御 第116回日本眼科学会総会、2012年4月5日-8日 東京

7. Keino H Effect of infliximab on inflammation-related gene expression in Behcet ' s disease IOIS、2011年11月13日-16日 Goa India

8. 慶野 博、渡辺交世、中山真紀子、瀧和歌子、岡田アナベルあやめ. EDI-OCTを用いた原田病回復期の脈絡膜厚の評価. 第65回日本臨床眼科学会、2011年10月7日-10日 東京

9. Keino H Effect of infliximab on inflammation-related gene expression in Behcet ' s disease 第115回日本眼科学会総会、2011年5月12日-15日 東京

〔図書〕(計 8 件)

1. 慶野 博 分子標的治療薬とぶどう膜炎治療 専門医のための眼科診療クオリファイ 13 ぶどう膜炎を斬る 中山書店 p130-137 2012年発行

2. 慶野 博 リウマチから学ぶ各種TNF阻害治療薬の使い方とぶどう膜炎への応用 専門医のための眼科診療クオリファイ 13 ぶどう膜炎を斬る 中山書店 p138-142 2012年発行

3. 慶野 博 ぶどう膜炎診療の話題 Vogt-小柳-原田病の画像診断 Ophthalmic Foresight vol17 No3 2012年発行

4. 慶野 博 Monthly Book OCULISTA No.5 ぶどう膜炎 外来診療 ぶどう膜炎の眼科検査所見 p9-16 全日本病院出版会 2013年発行

5. 慶野 博 眼科疾患ビジュアルブック

Chapter 8 強膜疾患 強膜炎、上強膜炎

p145-148

Chapter 12 後眼部疾患・ぶどう膜炎

p177-191

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

慶野 博 (Keino, Hiroshi)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：90328211

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：