

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 22 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659817

研究課題名(和文)細胞質内ウイルス認識機構 RIG-Iファミリーによる眼表面感染防御機構の解明

研究課題名(英文)A study of RIG-I family dependent ocular surface inflammation

研究代表者

木下 茂 (KINOSHITA, SHIGERU)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30116024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、細胞外病原体認識機構の一つであるTLR3が眼表面上皮細胞に強く発現しそのリガンドであるウイルス由来二本鎖RNAに対して、タイプIインターフェロンを強く誘導する事を解明してきた。一方、近年、RIG-Iファミリーなどの細胞内病原体認識機構が存在し機能していることが明らかとなった。RIG-Iファミリーとは、RIG-I、MDA5で構成され、ウイルス感染細胞内においてウイルス由来RNAを検知し、抗ウイルス性サイトカインの産生シグナルを伝達する分子群である。本研究では、眼表面上皮においてTLR3だけではなくこれらのRIG-I、MDA5も強く発現し細胞内病原体認識機構として機能していた。

研究成果の概要(英文)：Ocular surface epithelium expressed TLR3 and its ligand, polyI:C, stimulation induced the secretion of inflammatory cytokines and type I IFN. It was recently reported that RIG-I and MDA5 also recognize viral dsRNA mimicking polyI:C. In this study, we investigated whether RIG-I and/or MDA5 contribute to polyI:C-inducible responses in conjunctival epithelium. Human conjunctival epithelial cells also expressed RIG-I, MDA-5 and TLR3 mRNA and protein. The expression of RIG-I and MDA-5, but not of TLR3, was markedly up-regulated upon polyI:C stimulation. We also examined the function of IPS-1 and TLR3 in conjunctival epithelium using IPS-1 KO and TLR3 KO mice. Cxcl10, Mx1, Ifi44, Ifi203, Iigp2 and Rtp4 were dominantly regulated by IPS-1, Ccl5 by TLR3, and Rsad2, Mx2 and Cmpk2 were regulated by TLR3 and IPS-1. Our results showed that conjunctival epithelial cells express RIG-I and MDA5, which contributes to polyI:C-inducible cytokine production in conjunctival epithelial cells.

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：眼免疫学

1. 研究開始当初の背景

1997年、細胞外やエンドゾーム内において病原体構成成分を検知する Toll like receptor (TLR)が同定され、その機能解析が大きく進んでいる。研究代表者は、角・結膜上皮細胞に各種 TLRs が発現していることを報告してきた。また、TLRs のうち、特に TLR3 については、角・結膜上皮細胞で強く発現しそのリガンドであるウイルス由来二本鎖 RNA に対して、IFN- β や IL-6、IL-8 を強く誘導する事を解明した。TLR3 をはじめとする TLRs は、細胞膜あるいは、細胞膜で構成されるエンドゾームに発現して、細胞外に存在する細菌やウイルスなどの病原体を認識し免疫反応を惹起する。しかし、ウイルスは細胞内にも侵入する。この細胞内に侵入したウイルスに対する防御機構については、長い間、謎に包まれていた。そして、近年、RIG-I ファミリーなどの細胞内病原体認識機構が存在し機能していることが明らかとなった (*Kawai Int Immunol 2009*)。RIG-I ファミリーとは、RIG-I、MDA5 で構成され、ウイルス感染細胞内においてウイルス由来 RNA を検知し、抗ウイルス性サイトカインの産生シグナルを伝達する分子群である。また、RIG-I と MDA5 は、よく似た構造をしており、共にアダプター因子 IPS-1 を介する。研究代表者が、ヒト培養角・結膜上皮細胞に、ウイルス由来二本鎖 RNA を加え、網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、抗ウイルス分子やアレルギー関連分子の発現が上昇するとともに、RIG-I や MDA-5 の遺伝子発現も著明に上昇する事が判明した。この結果は、眼表面上皮細胞では、ウイルスに対する感染防御機構として TLR3 だけではなく、細胞内病原体認識機構である RIG-I や MDA-5 が大きく関与している可能性を示している。

2. 研究の目的

近年、ウイルスに対する新たな生体防御機構として、細胞内ウイルス認識機構である RIG-I ファミリーが着目されている。RIG-I ファミリーとは、RNA ヘリカーゼ (RNA の構造をほどく酵素) である RIG-I、MDA5 で構成され、ウイルス感染細胞内においてウイルス由来二本鎖 RNA を検知し、インターフェロン (IFN) 等の抗ウイルス性サイトカインの産生を誘導する分子群である。研究代表者は、ヒト培養角・結膜上皮細胞にウイルス由来二本鎖 RNA を添加すると、

RIG-I ならびに MDA5 が強く誘導されることを解明している。この結果は、眼表面のウイルス感染防御機構に、RIG-I ファミリーが大きく関与している可能性を示している。本研究では、細胞内ウイルス認識機構 RIG-I ファミリーを介した眼表面の感染防御機構に焦点を当て、その機能ならびに作用機序を解明する。

2. 研究の方法

A. ヒト眼表面上皮細胞を用いた解析として以下を行った。

in vivo 健常ヒト結膜上皮細胞の遺伝子発現解析。

健常ボランティアから brush cytology を用いて採取したヒト正常結膜上皮における RIG-I ファミリー関連遺伝子 (RIG-I, MDA5 等) の発現を RT-PCR にて解析した。

培養ヒト結膜上皮細胞を用いた遺伝子発現、タンパク発現解析。

初代培養ヒト結膜上皮細胞にウイルス由来二本鎖 RNA (polyI:C) を添加し、RIG-I ファミリーの発現変化を mRNA レベルならびにタンパクレベルで解析した。

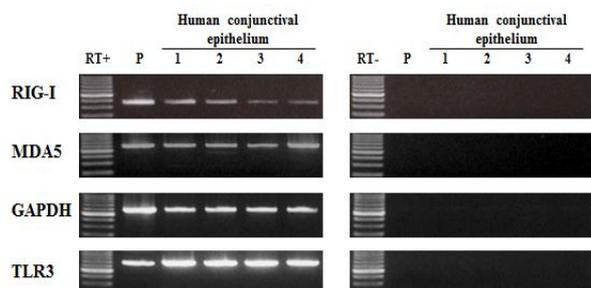
B. IPS-1 欠損マウスを用いた解析

細胞内病原体認識機構である RIG-I や MDA-5 の共通のアダプター因子である IPS-1 を欠損したマウスを用いて、これらの機能を解析した。具体的には、IPS-1 欠損マウスの眼部にウイルス由来二本鎖 RNA を点眼ならびに結膜下注射し、6 時間後に眼部組織を採取、disperse にて結膜上皮のみを分離回収し、RNA 抽出定量 PCR を行い、野生型マウスとその遺伝子発現を比較解析した。

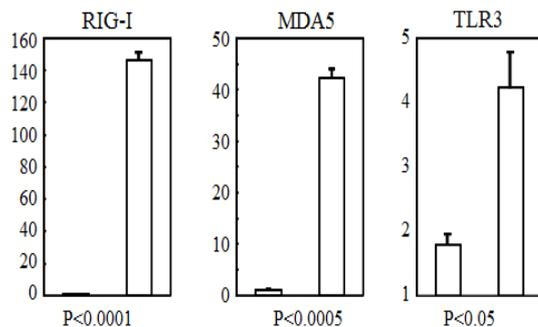
3. 研究成果

A. ヒト眼表面上皮細胞を用いた解

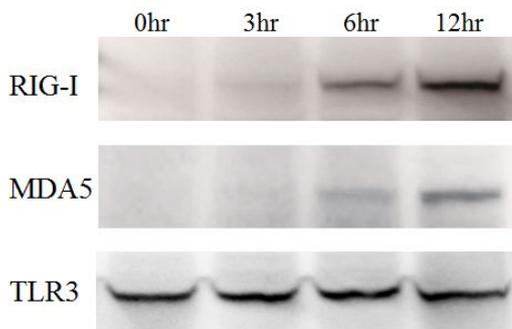
In vivo 健常ヒト結膜上皮細胞の遺伝子発現解析では、in vivo ヒト結膜上皮に RIG-I mRNA ならびに MDA5 mRNA が、発現していることが明らかとなった。



培養ヒト結膜上皮細胞を用いた遺伝子発現、タンパク発現解析では、初代培養ヒト結膜上皮細胞において、ウイルス由来二本鎖RNAによりRIG-I mRNAならびにMDA5 mRNAの発現が、刺激後6時間で著明に上昇した。



また、タンパク発現も刺激後12時間で著明に上昇することが明らかとなった。



これらの結果は、眼表面上皮に発現しているRIG-Iファミリー、特にRIG-IならびにMDA5が眼表面の感染防御機構に重要な働きをしていることを示唆するものである。

B. IPS-1 欠損マウスを用いた解析
細胞内病原体認識機構である RIG-I や MDA-5 の共通のアダプター因子である IPS-1 を欠損したマウスを用いて、これらの機能を解析した。その結果、ウイルス由来二本鎖 RNA を点眼した IPS-1 欠損したマウスの結膜上皮では、ウイルス由来二本鎖 RNA を点眼した野生型マウスを比較して、Rsad2, Mx2, Cmpk2, Iigp2, Ifi44, Cxcl10, Mx1, If9203, Rtp4 などの遺伝子発現が有意に低下していた。

これは、ウイルス感染における眼表面上皮の生体防御に RIG-I や MDA-5 が貢献していることを示している。

さらに、TLR3 がプロスタグランジンと相互作用があるのと同様に、RIG-I や MDA-5 についてもプロスタグランジンと相互作用を示すことが示唆される研究成果も得ている。

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10件)

1. Ueta M, Mizushima K, Naito Y, Narumiya S, Shinomiya K, Kinoshita S: Suppression of polyI:C-inducible gene expression by EP3 in murine conjunctival epithelium. Immunol Lett. 2013 Sep 12. pii: S0165-2478(13)00121-1 (査読有).
2. Ueta M, Sotozono C, Yokoi N, Kinoshita S: Rebamipide Suppresses PolyI:C-Stimulated Cytokine Production in Human Conjunctival Epithelial Cells. J Ocul Pharmacol Ther. 2013 Sep;29(7):688-93 (査読有).
3. Ueta M, Tokunaga K, Sotozono C, Sawai H, Tamiya G, Inatomi T, Kinoshita S: HLA-A*0206 with TLR3 Polymorphisms Exerts More than Additive Effects in Stevens-Johnson Syndrome with Severe Ocular Surface Complications. PLoS One. 2012; 7(8):e43650 (査読有).
4. Ueta M, Kinoshita S: Ocular surface inflammation is regulated by innate immunity. Prog Retin Eye Res. 2012; 31(6): 551-575 (査読有).
5. Ueta M, Matsuoka T, Sotozono C, Kinoshita S: Prostaglandin E2 Suppresses Poly I: C-Stimulated Cytokine Production Via EP2 and EP3 in Immortalized Human Corneal Epithelial Cells. Cornea. 2012; 31(11): 1294-1298 (査読有).
6. Ueta M, Tamiya G, Tokunaga K, Sotozono C, Ueki M, Sawai H, Inatomi T, Matsuoka T, Akira S, Narumiya S, Tashiro K, Kinoshita S: Epistatic interaction between Toll-like receptor 3 (TLR3) and prostaglandin E receptor 3 (PTGER3) genes. J Allergy Clin Immunol. 2012; 129(5): 1413-1416.e11 (査読有).
7. Ueta M, Yokoi N, Kinoshita S: Endothelin-1 production upon polyI:C stimulation of human conjunctival epithelium. Br J Ophthalmol. 2011; 95(12):1760-1761 (査読有).
8. Ueta M, Matsuoka T, Yokoi N, Kinoshita S: Prostaglandin E2

- suppresses polyinosine-polycytidylic acid (polyI:C)-stimulated cytokine production via prostaglandin (EP) 2 and 3 in human conjunctival epithelial cells. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95(6): 859-863 (査読有).
9. Ueta M, Matsuoka T, Yokoi N, Kinoshita S: Prostaglandin E receptor subtype EP3 downregulates TSLP expression in human conjunctival epithelium. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95(5): 742-743 (査読有).
 10. Ueta M, Kawai T, Yokoi N, Akira S, Kinoshita S: Contribution of IPS-1 to polyI:C-induced cytokine production in conjunctival epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 404(1): 419-423 (査読有).
- [学会発表](計15件)
1. Yuriko Ban, Junko Tsujimoto, Keiko Yamada, Mayumi Ueta, Shigeru Kinoshita. The Change of the Barrier Function in hTERT Immortalized Corneal and Conjunctival Epithelia by Poly(I:C) Challenge. 2014 World Ophthalmology Congress of the International Council of Ophthalmology. Tokyo, Japan, 2 April 2014.
 2. Ueta M, Mizushima K, Naito Y, Narumiya S, Kinoshita S. Suppression of polyI:C-inducible gene expression by EP3 in murine conjunctival epithelium. ISMA International Symposium on Molecular Allergology (ISMA) 2013, Vienna, Austria, 2013.12.5.
 3. Ueta M, Narumiya S, Kinoshita S: Suppression of TLR3-Inducible Gene Expression by EP3 in Conjunctival Epithelium. 2013 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Seattle, Washington, USA, 2013.5.6.
 4. 上田真由美: 上皮細胞による眼表面炎症制御機構. 第117回日本眼科学会総会, 東京, 2013.4.4.
 5. Ueta M, Matsuoka T, Narumiya S, Akira S, Kinoshita S: EP3 Negatively Regulates TLR3 dependent eosinophilic infiltration of allergic conjunctivitis. European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2012, Geneva, Switzerland, 2012.6.17.
 6. 上田真由美, 松岡俊行, 成宮周, 審良静男, 木下茂: アレルギー性結膜炎における TLR3 と PGE₂ 受容体サブタイプ EP3 の遺伝子間相互作用. 第116回日本眼科学会総会, 東京, 2012.4.6.
 7. 上田真由美, 外園千恵, 横井則彦, 木下茂: ヒト眼表面上皮細胞における RIG-1 ならびに MDA5 の発現. 角膜カンファランス 2012 (第36回日本角膜学会総会・第28回日本角膜移植学会), 東京, 2012.2.23.
 8. 上田真由美: 結膜上皮細胞によるアレルギー炎症制御. 角膜カンファランス 2012 (第36回日本角膜学会総会. 第28回日本角膜移植学会), 東京, 2012.2.23.
 9. Ueta M, Sotozono C, Kinoshita S: Downregulation of MCP-1 expression by prostaglandin E₂ in human ocular surface epithelium. 第40回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2011.11.29.
 10. 上田真由美: 眼結膜上皮細胞の自然免疫応答とアレルギー炎症制御への関与. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会, シンポジウム11, 環境と体内物質の Th2 アジュバント作用, 東京, 2011.11.11.
 11. Ueta M: Up-regulation of RIG-I and MDA5 by polyI:C stimulation in human ocular surface epithelial cells. EAACI/GA2LEN Allergy School Clinical Impact and Mechanisms of Infections in Allergy, Edinburgh, UK, 2011.9.17.
 12. Ueta M, Yokoi N, Kinoshita S: Prostaglandin E2 suppresses polyI:C-stimulated cytokine production via EP2 and EP3 in human ocular surface epithelial cells. The European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), Istanbul, Turkey, 2011.6.12.
 13. 上田真由美, 横井則彦, 木下茂: 眼表面上皮細胞における PGE₂ のサイトカイン産生抑制作用. 第32回日本炎症・再生医学会, 京都, 2011.6.3.
 14. 上田真由美, 松岡俊行, 横井則彦, 木

下茂: 結膜上皮細胞における PGE₂ のサイトカイン産生抑制作用. 第 115 回日本眼科学会総会, 東京, 2011.5.13._

15. Ueta M, Matsuoka T, Yokoi N, Kinoshita S: Prostaglandin E₂ suppresses polyi:c-stimulated cytokine production via EP2 and EP3 in human conjunctival epithelial cells. 2011 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2011.5.3.

〔図書〕(計 1 件)

上田真由美: 眼表面の粘膜免疫機構. 角膜クリニック、医学書院 2014, in press

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

該当無

取得状況 (計 0 件)

該当無

〔その他〕

ホームページ等

該当無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 茂 (KINOSHITA Shigeru)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号: 3 0116024

(2) 研究分担者

上田 真由美 (UETA Mayumi)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号: 60398386

(3) 連携研究者

該当なし