

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689071

研究課題名(和文)マクロファージ分化による脈絡膜血管新生病の病態制御機構

研究課題名(英文)regulatory roles of macrophages in choroidal neovascular diseases

研究代表者

武田 篤信(Takeda, Atsunobu)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40560313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,400,000円、(間接経費) 5,820,000円

研究成果の概要(和文)：脈絡膜血管新生(CNV)病の病態制御とマクロファージ分化との関連についての研究である。制御性サイトカインIL-27は活性化マクロファージのVEGF発現を抑制しCNVを抑制していた。VEGF産生源としてM2マクロファージ(M2)が重要だが、IL-27はM2の分化または活性化を制御しCNVを抑制する可能性がある。次に内因性炎症因子であるHSP70がTLR2、TLR4を介し、網膜下線維癆痕化を抑制することを明らかにした。M2はTLR4を介し癌関連線維化を促進する報告があるが、HSP70による抑制はM2ではなく網膜色素上皮細胞が主で、その抑制には制御性サイトカインIL-10の産生を介していた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify regulatory mechanism of macrophages in choroidal neovascular diseases. We show that IL-27, a regulatory cytokine, inhibited VEGFA production in macrophage in vitro. IL-27 also suppressed CNV by VEGFA reduction but not macrophage recruitment in vivo. M2 macrophage (M2) is reported as a source of VEGFA in CNV, indicating that IL-27 might regulate M2 differentiation and/or activation in CNV. Next, we focused on HSP70, an endogenous ligand for Toll-like receptor (TLR) 4/TLR2. HSP70, located in the cytosol and the nucleus of various kinds of cells, is released in response to cellular stress. Although M2 promotes cancer-associated fibrosis by activation of TLR4 signaling, subretinal fibrosis was suppressed by intraocular injection of HSP70 through induction of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, via TLR4/TLR2 signaling. The induction of IL-10 was dependent on RPE, but not macrophages, suggesting that RPE is also important for the regulation.

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：若手(A)

キーワード：脈絡膜血管新生 マクロファージ 網膜色素上皮細胞 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性における脈絡膜血管新生 (CNV) にはマクロファージが重要な役割を果たしている。近年、マクロファージはその周辺組織からのサイトカイン等の刺激により、古典的活性化マクロファージ (以下 M1)、組織修復マクロファージ (以下 M2) あるいは制御性マクロファージという性質の違うマクロファージに分化することがわかってきている。M2 は血管新生を促進する働きがあることが報告されている。

2. 研究の目的

脈絡膜血管新生病である加齢黄斑変性の脈絡膜血管新生から線維瘢痕化に至るメカニズムとマクロファージとの関連について、マクロファージとの分化と絡めて解明することである。

まず、免疫制御性サイトカイン IL-27 の CNV における役割について実験的脈絡膜血管新生 (CNV) モデルを用いて、マクロファージに関連して解析した。

次にマクロファージを活性化させる因子として TLR2 と TLR4 に着目し解析した。TLR2 と TLR4 は主にマクロファージに発現する受容体で、TLR2 はグラム陽性菌の細胞壁構成成分ペプチドグリカン認識し、TLR4 はグラム陰性菌の細胞膜構成成分リポ多糖を認識する。一方、細胞の中に存在する物質が細胞死により細胞外に出ると、それらを危険信号として TLR2 と TLR4 が認識し、炎症反応を引き起こすことが判ってきている。病原体由来ではない炎症を励起する内因性物質は Danger associated molecular patterns と総称され、その1つとして Heat shock protein 70 (HSP70) 等がある。これらを用いてマクロファージにおける網膜線維瘢痕化への役割をわれわれのグループで開発したマウス網膜下線維瘢痕化モデルを用いて解析した。マウス実験的網膜下線維瘢痕化モデルとは、後述の脈絡膜血管新生モデルで CNV を誘導時に網膜下に腹腔内マクロファージを移入することにより網膜下線維瘢痕化を強く誘導するモデルである。

また、in vivo の実験だけでなく、in vitro の実験として網膜色素上皮細胞 (RPE) 及び腹腔マクロファージを用いて検討した。

3. 研究の方法

(1) 脈絡膜血管新生関連

サイトカイン IL-27 に着目してマウス実験的脈絡膜血管新生 (CNV) モデル解析した。マウス実験的 CNV モデルとは網膜光凝固 (条件で 0.1s, 200mW, 75mm) を1眼につき4発行い、CNV を誘導するモデルである。

マウス実験的脈絡膜血管新生モデルにおける IL-27 の遺伝子発現について real-time PCR 法にて網膜にレーザー照射後 0、6、12、24、48、72、144 時間で経時的に検討した。

さらにレーザー照射後 48 時間後に脈絡膜フラットマウントを作製し、抗 IL-27 抗体と isolection B4 で CNV を染色し、IL-27 の発現の局在について検討した。

マウス実験的脈絡膜血管新生モデルにおける IL-27 の CNV に対する効果について C57BL/6J マウス (野生型マウス、以下 WT) 網膜にレーザー照射後に基剤または IL-27 をそれぞれ 1 または 10 ng、抗 IL-27 中和抗体 1 または 10 µg を眼内投与し、照射後 7 日目に脈絡膜フラットマウントを作製し、isolection B4 で CNV を染色し CNV の面積を評価した。次に IL-10 欠損マウス (IL-10 KO) に CNV を誘導し、基剤または IL-27 眼内投与を行い、IL-27 の効果が IL-10 依存性かどうかを検討した。さらに WT と IL-27 欠損マウス (EBI3 KO) にそれぞれ CNV 誘導後 7 日目の CNV 面積を比較した。

IL-27 のマクロファージ (F4/80⁺CD45⁺) の眼内への浸潤への影響について、WT または EBI3 KO を用いてレーザー照射後 3 日目にフローサイトメトリー法を用いて検討した。

in vitro において、WT 由来腹腔内マクロファージを用いて、IL-27 による VEGFA の遺伝子発現への効果について基剤または IL-27 10 ng で刺激し、real-time PCR 法で検討した。さらに WT と EBI3 KO 由来の腹腔内マクロファージについても比較検討した。

(2) 網膜下線維瘢痕化関連

マウス実験的網膜下線維瘢痕化モデルにおいて WT と TLR2 または TLR4 欠損マウス (TLR2 KO または TLR4 KO) に網膜下線維瘢痕化を誘導した。さらに、WT に基剤、抗 TLR2 または抗 TLR4 中和抗体を網膜下線維瘢痕化誘導時に投与した。誘導後 7 日目に脈絡膜フラットマウントを作製し、抗 GFAP 抗体にて染色し網膜下線維瘢痕化の面積を比較検討した。

WT に網膜下線維瘢痕化を誘導した後の HSP70 の遺伝子発現を real-time PCR 法で検討した。

WT に線維瘢痕化を誘導し、基剤と HSP70 をそれぞれ眼内に投与し、HSP70 による網膜下線維瘢痕化への効果を検討した。さらに TLR2 または TLR4 KO に基剤または HSP70 を投与し、その効果について検討した。

WT に線維瘢痕化を誘導し、基剤と HSP70 をそれぞれ眼内に投与し、HSP70 による IL-10 の発現誘導を real-time PCR または ELISA 法で検討した。

WT に線維瘢痕化を誘導し、基剤と IL-10 または抗 IL-10 中和抗体をそれぞれ眼内に投与し、網膜下線維瘢痕化への効果を検討した。

in vitro で網膜色素上皮細胞 (RPE) を培養し、基剤または HSP70 で刺激し、IL-10 の発現を real-time PCR または ELISA 法で検討した。さらに腹腔内マクロファージに

においても同様に検討した。

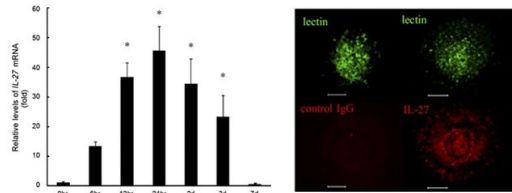
in vitro で培養 RPE とマクロファージを共培養し、基剤、HSP70、または IL-10 でそれぞれ刺激し、 α -smooth muscle actin (α -SMA)の発現を免疫染色法で検討した。

4. 研究成果

(1) 脈絡膜血管新生関連

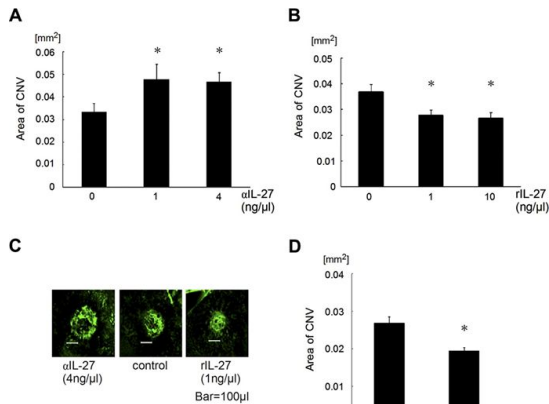
IL-27 遺伝子の発現は上昇し、レーザー照射後 24 時間がピークであった。その発現はレーザー照射部位と一致していた(図 1)。

抗 IL-27 中和抗体投与群では濃度依存性に CNV は拡大していた(図 2A)。さらに



IL-27 投与群では基剤投与群と比し、逆に濃度依存性に CNV は有意に抑制されていた(図 2B)。さらに IL-10 KO において IL-27 投与するとさらに CNV 抑制効果が増強していた(図 2D)。

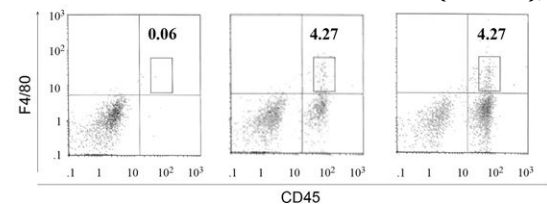
また、EBI3 KO で WT と比し有意に CNV が拡大していた(図 3)。これらの結果から



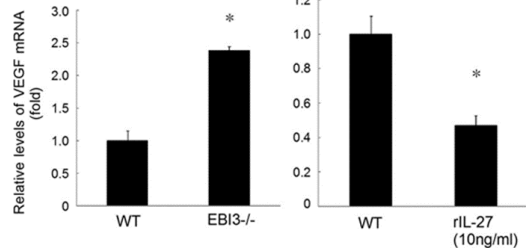
IL-27 は CNV に対し抑制的に作用すること、さらにその抑制効果は IL-10 とは無関係であることが示唆された。

WT と EBI3 KO で眼内へのマクロファージ浸潤に有意差はなかった。この結果から IL-27 は CNV モデルにおいてマクロファージの遊走には関連がないことが示唆された(図 4)。

IL-27 は腹腔内マクロファージにおける VEGFA 遺伝子発現を抑制していた(図 5B)。



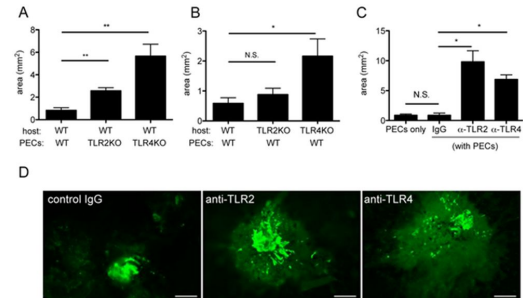
また、EBI3 KO でも VEGFA 発現は有意に低下していた(図 5A)。さらに VEGFA の発現源として RPE が考えられるが、RPE においては IL-27 による抑制効果はみられず、また WT と EBI3 KO で発現に有意差はなかった。これらの結果から CNV において IL-27 は主にマクロファージに作用してその抑制効果があることが示唆された。



VEGFA の産生源としてマクロファージの中でも M2 が重要と考えられているが、IL-27 は M2 の分化を抑制し CNV に抑制的に作用すること、さらに M2 の活性化を抑制する可能性も考えられた。

(2) 網膜下線維癆痕化関連

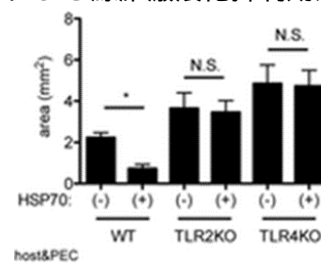
実験的マウス網膜下線維癆痕下モデルにおいて野生型マウス(WT)と TLR2 または TLR4 欠損マウス (TLR2 または TLR4 KO) にそれぞれ網膜下線維癆痕化を誘導すると WT に比し TLR2 または TLR4 KO では有意に促進された(図 6A、B)。同様に WT に抗 TLR2 または抗 TLR4 中和抗体を誘導時に投与すると基剤投与群と比し網膜下線維癆痕化が有意に促進された(図 6C)。これらの結果から TLR2 と TLR4 が網膜下線維癆痕化に抑制的に作用することが示唆された。



WT に網膜下線維癆痕下を誘導すると、HSP70 遺伝子発現が上昇していた。

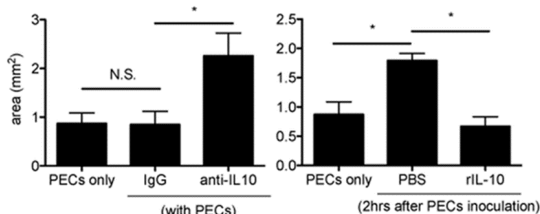
さらに WT に網膜下線維癆痕下を誘導し基剤と HSP70 をそれぞれ眼内に投与すると、HSP70 投与群では基剤投与群と比し線維癆痕化は有意に抑制され、その抑制作用は TLR2 KO 及び TLR4 KO で消失していた(図 7)。

HSP70 による線維癆痕化抑制効果は TLR2 または TLR4 を介していることが示唆された。

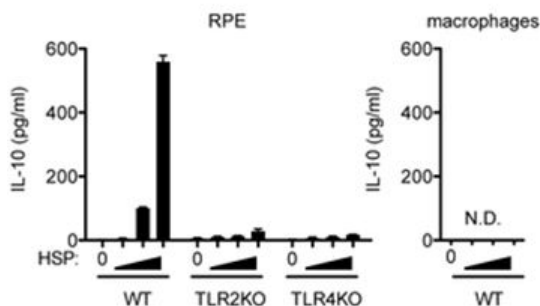


HSP70 投与群では炎症抑制性サイトカイン IL-10 の発現が遺伝子レベルでも蛋白レベルでも有意に上昇していた。

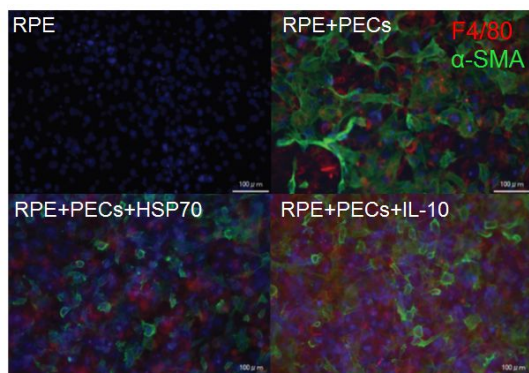
網膜下線維癆痕下誘導時に IL-10 投与すると線維癆痕下は抑制され、また抗 IL-10 中和抗体を投与すると線維癆痕下は増悪していた (図 8)。これらの結果から HSP70 の作用は TLR2 及び TLR4 を介して IL-10 を誘導することにより生じることが考えられた。



免疫染色で線維癆痕化誘導時に網膜色素上皮細胞 (RPE) で TLR2 と TLR4 の発現が増強しており IL-10 の産生源として RPE とマクロファージが考えられた。そこで in vitro で培養 RPE を HSP70 で刺激して、IL-10 の発現について ELISA 法で検討すると、IL-10 の発現が増強していた。一方、腹腔内マクロファージについても同様に HSP70 で刺激したところ、IL-10 の発現上昇はみられなかった (図 9)。



以前の我々の研究で RPE とマクロファージを共培養すると RPE において上皮間葉転換 (EMT) が生じ、線維化のマーカーである α -SMA の発現上昇がみられた。このことは RPE の EMT が網膜下線維癆痕化促進に作用する可能性が示唆される。そこで、この培養系に HSP70 または IL-10 により刺激すると α -SMA の発現が抑制された (図 11)。このことにより HSP70 が網膜下線維癆痕化に抑制的に作用し、その作用に



は RPE が重要であることが示唆された。

線維化に関連して TLR4 が M2 の分化を促進すること、また他の臓器では線維化を促進することが報告されている。本研究では他の臓器の報告と正反対の結果であった。他の臓器との違いは、RPE によるマクロファージの制御機構が関係することが考えられた。

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 11 件)

Yang Y, Takeda A, Yoshimura T, Oshima Y, Sonoda KH, Ishibashi T. IL-10 is significantly involved in HSP70-regulation of experimental subretinal fibrosis. Plos One、査読有、Vol. 8、No. 12、2013、pp. e80288

DOI: 10.1371/journal.pone.0080288.

Takeda A, Sonoda KH, Ishibashi T.

Regulation of Th1 and Th17 cell differentiation in uveitis. Inflamm Regen. 査読有、Vol. 33、No. 5、2013 pp. 261-268
www.jsir.gr.jp/journal/Vol33No5/pdf/0261-0268.pdf

Sugita S, Ogawa M, Shimizu N, Morio T, Ohguro N, Nakai K, Maruyama K, Nagata K, Takeda A, Usui Y, Sonoda KH,

Takeuchi M, Mochizuki M. Use of a comprehensive polymerase chain reaction system for diagnosis of ocular infectious diseases. Ophthalmology、査読有、Vol. 120、No. 9、2013、pp. 1761-1768
DOI: 10.1016/j.ophtha.2013.02.020.

Zhang H, Yang Y, Takeda A, Yoshimura T, Oshima Y, Sonoda KH, Ishibashi T. A novel platelet-activating factor receptor antagonist inhibits choroidal neovascularization and subretinal fibrosis. Plos One、査読有、Vol. 8、No. 6、2013、pp. e68173

DOI: 10.1371/journal.pone.0068173.

Hasegawa E, Sonoda, KH, Shichita T,

Morita R, Sekiya T, Kimura A, Oshima Y, Takeda A, Yoshimura T, Yoshida S, Ishibashi T, Yoshimura A. The pro-inflammatory cytokine IL-17 from $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells plays a critical role in intraocular neovascularization in mice. *J Immunol*, 査読有、Vol. 190、No. 4、2013、pp. 1778-1787
DOI: 10.4049/jimmunol.1202495.

Notomi S, Hisatomi T, Murakami Y, Terasaki H, Sonoda S, Asato R, Takeda A, Ikeda Y, Enaida H, Sakamoto T, Ishibashi T. Dynamic increase in extracellular ATP accelerates photoreceptor apoptosis via ligation of P2RX7 in subretinal hemorrhage. *Plos One*, 査読有、Vol. 8、No. 1、2013、pp. e53338
DOI: 1371/journal.pone.0053338.

Hasegawa E, Oshima Y, Takeda A, Saeki K, Yoshida H, Sonoda KH, Ishibashi T. IL-27 inhibits pathological ocular neovascularization due to laser burn. *J Leukoc Biol*, 査読有、Vol. 91、No. 2、2012、pp. 267-273
DOI: 10.1189/jlb.1110603.

Notomi S, Hisatomi T, Ikeda Y, Enaida H, Takeda A, Kanemaru, Kroemer G, Ishibashi T. Critical involvement of extracellular ATP acting on P2RX7 purinergic receptors in photoreceptor cell death. *Am J Pathol*, 査読有、Vol. 179、No. 6、2011、pp. 2798-2809
DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.08.035.

Jo YJ, Sonoda KH, Oshima Y, Takeda A, Kohno RI, Yamada Y, Hamuro J, Nodomi Hisatomi T, Ishibashi T. Establishment of a new animal model of focal subretinal fibrosis that resembles disciform lesion in advanced age-related macular degeneration.

Invest Ophthalmol Vis Sci, 査読有、Vol. 52、No. 9、2011、pp. 6089-6095
DOI: 10.1167/iovs.10-5189.

武田 篤信, 脈絡膜血管新生におけるケモカイン・サイトカインの役割、*日本眼炎症学会雑誌*、第14巻、2012、pp. 5-10

武田 篤信, 脈絡膜新生血管とケモカイン受容体CCR3について、*日本眼薬理学会雑誌* 2011、Vol. 25、No. 1、pp. 58-61
〔学会発表〕(計 13 件)

Takeda A, et al. Long-term efficacy of infliximab maintenance therapy in refractory uveitis of Behcet's disease at Kyushu University Hospital: a 24-month follow-up study. The 6th joint meeting of China-Japan-Korea Ophthalmologists. September 13, 2013, Xiamen, China.

Takeda A, et al. Pivotal roles of EBI3 for the initiation and maintenance of experimental autoimmune uveitis. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2013. May 5th-9th, 2013, Seattle, WA, USA

Yang Y, Takeda A, et al. Analysis of the immunomodulatory roles of HSP70 in experimental subretinal fibrosis. The Association Research in Vision and Ophthalmology. May 6-10, 2012, Fort Lauderdale, FL, USA.

Hasegawa E, Takeda A, et al. $\gamma\delta$ T cells promote experimental choroidal neovascularization via IL-23 independent manner. The Association Research in Vision and Ophthalmology. May 6-10, 2012, Fort Lauderdale, FL, USA.

Takeda A, et al. Pivotal roles of P2X7 in the induction of Th1 and Th17 responses in experimental autoimmune uveitis. World Ophthalmic Congress. February 16-20, 2012, Abu Dhabi, United Arab Emirates

楊 暘、武田 篤信、他. 実験的網膜下線維癭痕化形成モデルを用いた HSP70 の免疫制御能についての検討. 第 33 回日本炎症・再生医学会、2012 年 7 月 5 日、福岡市

長谷川 英一、武田 篤信、他. マウス脈絡膜血管新生モデルにおける $\gamma\delta$ T 細胞の IL-17 産生機構. 第 116 回日本眼科学会総会、2012 年 4 月 5-6 日、東京都

Yang Y, Takeda A, et al. HSP70 reduces subretinal fibrosis due to prognostic choroidal neovascularization via Toll-like receptor 4. The 4th Japan-China-Corea ophthalmologic meeting. November 4-6, 2011, Seoul, Korea

Hasegawa E, Takeda A, et al. The effect of IL-17 for experimental choroidal neovascularization. The Association Reearch in Vision and Ophthalmology. May 1-5, 2011, Fort Lauderdale, FL, USA

Takeda A, et al. Pivotal roles of P2X7 in the induction of Th1 and Th17 responses in experimental autoimmune uveitis. The 4th joint meeting of Korea-China-Japan Ophthalmologists, November 4-6th, 2011, Seoul, South Korea

Yang Y, Takeda A, et al. The possible role of Toll-like receptors in the formation of subretinal fibrosis. The Association Reearch in Vision and Ophthalmology. May 1-5, 2011, Fort Lauderdale, FL, USA

武田 篤信、他. 実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎における G 蛋白結合受容体 P2X7 の関与、第 45 回日本眼炎症学会、2011 年 7 月 9-11 日、京都市

武田 篤信. 脈絡膜血管新生におけるケモカイン・サイトカインの役割、第 45 回日本眼炎症学会、2011 年 7 月 9-11 日、京都市 (日本眼炎症学会学術奨励

賞受賞講演)

〔図書〕(計 5 件)

武田 篤信. 若年性特発性関節炎に伴うぶどう膜炎、眼科臨床エキスパートシリーズ、所見から考えるぶどう膜炎、2013、pp. 163-167

武田 篤信. 自然炎症症候群とぶどう膜炎について、眼科クオリフィ13「ぶどう膜炎を斬る！」、2012、pp. 273-279

武田 篤信. 急性網膜壊死、眼科クオリファイ15「メディカルオブサルモロジ- (眼科薬物療法)」、2012、pp. 209-211

中尾 新太郎、武田 篤信. 真菌性眼内炎、眼科クオリファイ15「メディカルオブサルモロジ- (眼科薬物療法)」、2012、pp. 239-242

武田 篤信. 脈絡膜新生血管病に対する治療へのアプローチ、福岡県眼科医報 2011、213: 3-6

〔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
武田 篤信 (TAKEDA, Atsunobu)

研究者番号：40560313