

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792011

研究課題名(和文) Th17細胞系蛋白が前眼部慢性炎症・感染において果たす役割の解明

研究課題名(英文) Effects of Interleukin-17(IL-17) and IL-17 receptor on ocular surface inflammation

研究代表者

山田 愛 (Yamada, Ai)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：30535191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：角膜とは、眼球の正面にある透明な構造で光を眼球の奥まで通し、レンズとしての役割と、眼球内の構造を保護するバリア機能とを併せ持ちます。角膜に外傷や感染症で強い炎症や傷を生じると、角膜は混濁して視力低下がおこります。

最近、Th17細胞という、白血球の一種であるT細胞の新たな種類が発見され、関節リウマチなどの膠原病の原因となるインターロイキン17(IL-17)などの免疫、炎症に関与する細胞間情報伝達物質を分泌することが解明されました。本研究では角膜の炎症とIL-17受容体との関係に着目し、アルカリ外傷および角膜感染症モデルで角膜のIL-17受容体の発現が上昇することを明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：The cornea is the transparent window covering the front of the eye. It is a refracting surface, and also serves as a barrier of the eye. If the cornea is deeply injured or robust inflammation occurs, it leaves a scar, which leads to vision loss.

Recently, Interleukin17 (IL-17)-producing helper T cell subset Th17 has been discovered. It has reported that IL-17 is a major contributor of autoimmune inflammation such as rheumatoid arthritis. In this research, we focused on the corneal inflammation and the IL-17 receptor expression. We discovered that upon corneal alkali injury or corneal infection, the expression of IL-17 receptor in the cornea is up-regulated.

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

キーワード：IL-17レセプター 眼表面 発現制御 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

前眼部(角膜・結膜)領域における炎症性疾患には化学外傷、非感染性の角膜潰瘍、Stevens-Johnson 症候群をはじめとする角膜免疫疾患、アレルギー性角結膜疾患があり、さらに近年では Sjögren 症候群によるドライアイも炎症性疾患と捉えられるようになってきている。また、感染性角膜潰瘍はコンタクトレンズ装用がリスクファクターとなるが、コンタクトレンズの普及に伴い、その頻度は減少していない。これらの疾患では不可逆的な角膜混濁が発症する可能性があり、角膜の透明性の維持という観点から、前眼部炎症・感染の適切な制御が重要である。

角膜は、上皮・実質・内皮とそれらの基底膜からなる透明な組織であり、視覚情報の眼内への導入、透明性の維持、外界からの生体防御という役割を果たしている。角膜は無血管かつ活動的な白血球も存在しない組織であるが、病的環境下では涙液や角膜輪部からの白血球浸潤、血管侵入がおき、炎症反応や細胞外基質の融解によって角膜潰瘍を呈し、透明性の維持ができなくなる。病原体に角膜が暴露されると、暴露された角膜上皮細胞や角膜実質細胞(角膜線維芽細胞)から様々な炎症性サイトカイン・ケモカインの発現・分泌が亢進する。それらにより免疫担当細胞の病巣への走化が促進される。

T 細胞は活性化の際に、異なる分化経路をとって特殊な性質およびエフェクター機能を獲得する。ヘルパーT (Th) 細胞は従来、Th1 細胞と Th2 細胞というサブセットに分化すると考えられてきた。最近、Th1 細胞とも Th2 細胞とも異なる IL-17 産生 T (Th17) 細胞というサブセットがあることが明らかとなった。Th17 細胞から産生された IL-17 や IL-22 は、上皮細胞系を活性化し、好中球を遊走し生体防御反応を高める役割を持つ。

Lipopolysaccharide(LPS) など細菌由来の菌体外毒素は、resident cell や樹状細胞・マクロファージにおいて TLR などの非特異的レセプターを介して IL-6 や IL-23 を産生させ、未熟 CD4<sup>+</sup>T 細胞を Th17 細胞へ分化させる。Th17 細胞から産生された IL-17 は標的細胞から好中球走化因子である IL-8 や抗菌ペプチドである  $\alpha$ -defensin を産生させ、感染防御を担う。

一方、自己免疫性疾患の病態における Th17 細胞の活動亢進とそれに伴う Th17 細胞系のサイトカイン (IL-17 や IL-22) の発現亢進が報告されている。従来、自己免疫性疾患は Th1 細胞によって誘導・制御されていると考えられていたが、Th1 細胞への分化を促す IL-12 や Th1 細胞から産生される IFN- $\gamma$  をそれぞれノックアウトしたマウスでは実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)やコラーゲン誘発関節炎はむしろ悪化し、IL-17 ノックアウトマウスで EAE が改善すること、関節リウマチや多発性硬化症、炎症性腸疾患で IL-17 発現が亢進していることなどから Th17 細胞は、自己

免疫性疾患における組織傷害の誘導でも重大な役割を果たすことが示されている。

Th17 細胞から産生された IL-17 は、炎症機転では、上皮系細胞や線維芽細胞、マクロファージに作用し、IL-6 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカイン、IL-8 や CCL20 などのケモカイン、MMP-3 や MMP-9 などのプロテアーゼを産生させる。このうち、CCL20 は、IL-17 刺激によって標的細胞から産生され、Th17 細胞を局所組織へ誘導する能力を持つ。一方、末梢血中の Th17 細胞は CCL20 のレセプターである CCR6 のみを発現しているが、炎症局所に浸潤している Th17 細胞は CCR6 だけでなく、CCL20 も発現している。すなわち、局所まで浸潤してきた Th17 細胞自身が CCL20 を発現することでさらに Th17 細胞を浸潤させ局所の慢性炎症を遷延化させるメカニズムが示唆されている。

前眼部領域においては、Th17 細胞系蛋白と感染や炎症という病態に着目した報告は少ないのが現状である。本研究では、Th17 細胞から分泌される IL-17 や IL-22、標的細胞における IL-17 レセプター (IL-17R) および IL-17 によって標的細胞から分泌される様々な蛋白が非特異的および感染による前眼部炎症の重要な因子の一つであるとの仮説を立てた。ドライアイモデルマウスの眼表面で樹状細胞を介した Th17 細胞への分化が促進されたとの報告 (文献 Zheng X, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010) があり、本研究の仮説と矛盾しないものである。

## 2. 研究の目的

本研究では、炎症と感染という広範な病態においてその作用を発揮する Th17 に関連する蛋白、すなわち Th17 細胞から分泌される IL-17 や IL-22、標的細胞における IL-17 レセプター (IL-17R) および IL-17 によって標的細胞から分泌される様々な蛋白 {炎症性サイトカイン、ケモカイン (CCL20, IL-8)} について動物モデルと培養角膜細胞を用いて前眼部におけるその役割を明らかにする。

なお、IL-17 ファミリーは IL-17A ~ IL-17F までの 6 つ遺伝子から構成され、その受容体も IL-17RA ~ IL-17RE までの 5 つの分子により構成される。本研究では、それらの中で主要なメンバーである IL-17A と IL-17RA に焦点をあてて検討した。

・研究 1 非特異的前眼部炎症における Th17 細胞系蛋白の役割

本研究では、前眼部炎症における Th17 に関連する蛋白の検討を角膜炎症モデルマウス、培養角膜細胞を用いて行う。角膜炎症モデルとして、角膜にアルカリを浸漬した濾紙を暴露させることで作成したアルカリ外傷眼で急性炎症期から外傷後 1 ヶ月までのマウス角膜を用いる。このモデルの角膜における IL-17A, IL-17RA 発現を検討する。培養角膜細胞では、IL-17A および TNF- $\alpha$  刺激による産生蛋白の検討を行う。

・研究 2 前眼部感染における Th17 細胞系蛋

## 白の役割

本研究では、培養上清へ ExotoxinA(ExA)、LPS などの緑膿菌菌体外毒素を添加して培養角膜上皮細胞および実質細胞を刺激し、それぞれの細胞における IL-17A, IL-17RA, その他 Th17 細胞系蛋白の mRNA 発現の変化を検討する。

### 3. 研究の方法

#### 研究1 前眼部炎症における Th17 細胞系蛋白の役割

前眼部炎症モデルには、マウスアルカリ外傷モデルを用いた。8 週齢の雄 C57BL/6 マウスに腹腔内麻酔後、左眼角膜に 1N NaOH に浸漬した直径 1.5mm の濾紙を 60 秒間暴露し作成した。処置後 1,2,5,7,28 日目にマウスの左眼を摘出し、IL-17RA, IL-17A の角膜における mRNA 発現を real-time RT-PCR を用いて検討した。無処置マウスをコントロール群とし、Mann-Whitney U 検定で統計を行った。本研究は日本大学医学部動物実験委員会により承認を得て行われた。PCR プローブは、下記を使用した。

IL-17RA: Mm00434214\_m1

IL-17A: Mm00439618\_m1

actin: Mm00607939\_s1

培養角膜細胞の刺激実験では、角膜上皮、実質細胞で、IL-17A 100ng/ml および TNF-50ng/ml で 2 時間刺激後の IL-17RA、ケモカイン(IL-8, CCL20)の発現を real time RT-PCR で測定した。無刺激の細胞をコントロールとし、t 検定で統計を行った。PCR プローブは、下記を使用した。

IL-17RA: Hs01064648\_m1

IL-8: Hs99999034\_m1

CCL20: Hs00355476\_m1

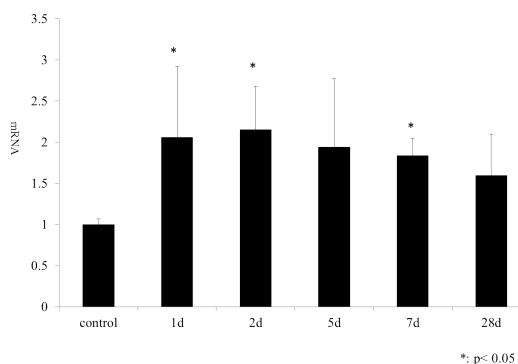
GAPDH: Hs99999905\_m1

#### 研究2 前眼部感染における Th17 細胞系蛋白の役割

前眼部の感染性疾患と IL-17 関連タンパクについて培養角膜上皮および実質細胞を用いて検討した。方法は、緑膿菌から分泌されるポリペプチドである ExA および緑膿菌の細胞壁成分である LPS で培養角膜上皮、実質細胞を 6 時間および 24 時間刺激し、Th17 細胞系蛋白の mRNA 発現を real time RT-PCR で測定した。無刺激の細胞をコントロールとし、t 検定で統計を行った。

### 4. 研究成果

前眼部炎症における Th17 細胞系蛋白の役割についての研究では、マウスアルカリ外傷モデルの実験でアルカリ群は無処置群と比較して処置後 1, 2, 7 日目で角膜における IL-17RA の発現が有意に( $p < 0.05$ )上昇した(右図)。一方、角膜サンプルにおいてコントロール群、アルカリ外傷群ともに IL-17A の発現は認められなかった。



培養角膜細胞の刺激実験では、角膜上皮、実質細胞で、IL-17RA 発現は TNF- 刺激で有意に( $p < 0.05$ )上昇した。上皮、実質細胞での IL-8 発現は、TNF- 刺激、IL-17 刺激でそれぞれ有意に( $p < 0.01$ )上昇した。CCL20 は、IL-17、TNF- 刺激により培養角膜上皮・実質細胞での発現が有意に( $p < 0.01$ )上昇した。

アルカリ外傷による非特異的な眼表面炎症において IL-17RA は発現上昇した。一方、培養角膜上皮細胞、実質細胞において IL-17 は好中球遊走作用を有する IL-8、T 細胞に働くケモカインである CCL20 の発現を亢進したことから、Th17 細胞系蛋白は非特異的な角膜炎症に関与している可能性が示唆された。

次に、前眼部感染における Th17 細胞系蛋白の役割に関する結果を示す。培養上清へ ExA を添加して培養角膜上皮および実質細胞を刺激した実験では、マウスアルカリ外傷モデルの実験と同様に、角膜上皮、実質細胞で ExA 刺激による IL-17A 発現の上昇はみられず、一方 IL-17RA の発現は角膜上皮、実質細胞でそれぞれ  $1.65 \pm 0.1$  (平均値  $\pm$  標準偏差)、 $1.91 \pm 0.26$  倍に有意に増加した。他に、ExA 刺激による IL-17RB, IL17-RE, IL-23A, IL-23R, CCL20 の有意な発現上昇が角膜上皮、実質細胞で認められた。

さらに IL-17RA の mRNA 発現について LPS で角膜上皮、実質細胞を 24 時間刺激して検討した。上皮細胞では発現が有意に増加したが、実質細胞では変化がなかった。また、IL-17RA の感染早期の変化を検討するため ExA 刺激後 6 時間を比較したところ、実質細胞のみで有意な mRNA 発現上昇がみられた。

角膜細胞で IL-17 RA の発現が緑膿菌毒素、細胞壁成分の刺激により上昇したことから、角膜の感染性炎症においても Th17 細胞系蛋白が関与していることが示唆された。また、角膜上皮と実質で刺激の種類と時間により異なった反応を示すことが明らかとなった。

角膜の非特異的および感染性炎症両者において角膜での IL-17R をはじめとした Th17 細胞系蛋白の発現が上昇した。角膜炎症の成立に外的刺激後早期から角膜の Th17 細胞系蛋白が関与していることが示唆された。

今後の研究の展開は、角膜での IL-17RA 発

現上昇の機序につきさらに検討を進めていく予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

山田 愛、崎元 暢、石森秋子、大西貴子：角膜炎症における IL-17、IL-17R の検討. 第 54 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 東京, 9.27, 2013

Yamada A, Sakimoto T, Ishimori A, Ohnishi T, Sugaya S, Sawa M: Effects of Interleukin-17(IL-17) and IL-17 receptor on ocular surface inflammation. 2013 The Association for Research in Vision and Ophthalmology(ARVO) Annual Meeting, Seattle, USA, 5.6, 2013

山田 愛、崎元 暢、石森秋子、大西貴子、菅谷哲史、澤 充：前眼部炎症と Th17 細胞系蛋白. 第 37 回日本角膜学会総会、和歌山、2. 15, 2013

〔図書〕(計 0 件)

〔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

山田 愛 ( YAMADA, Ai )

日本大学・医学部・助教

研究者番号：30535191

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：