

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 29 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592658

研究課題名(和文) 高浸透圧と自然免疫がドライアイに及ぼす影響と、それに基づく新たな予防・治療戦略

研究課題名(英文) Effect of Tear Hyperosmolarity on Dry eye disease

研究代表者

藤本 千明 (Fujimoto, Chiaki)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：70623924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：今回、ヒト角膜上皮細胞を用いて、in vitroで高浸透圧のレベルと曝露時間を比較し、炎症性サイトカインの産生について調べた。

高浸透圧液の24時間曝露により、浸透圧が500mOsmと低いレベルであっても細胞に傷害を起こすことが分かった。一方、短時間曝露(10分間)では、800mOsmという超高浸透圧であっても、細胞毒性はないことが分かった。次に、短時間曝露では、400mOsm以上の高浸透圧液で、浸透圧が高くなるほど、IL-6産生が多くなることを発見した。他の炎症性サイトカイン産生には変化が見られなかった。以上より、高浸透圧涙液が角膜上皮細胞からIL-6が産生される機構の一部が解明された。

研究成果の概要(英文)：To examine the effect of short-time hyperosmolarity exposure in the production of inflammatory cytokines in corneal epithelial cells, Human Corneal Cells (HCE) cells were used in vitro.

After a 24-hour culture, exposures over 500 mOsm damaged HCE cells, but 400 mOsm caused no cell damage. In contrast, after the short-time (10-minute) exposures, even when at over 800 mOsm, no cells was damaged. The significant increases in IL-6 production and mRNA expression at 700 mOsm during the short-time exposures were both dependent on the osmolarity.

Short-time hyperosmolarity exposure may activate IL-6 expression and production in Human Corneal Epithelial cells without cytotoxicity. These observations suggest that hyperosmolarity could cause inflammation on the ocular surface in dry eye disease.

研究分野：眼表面の免疫システムとドライアイ

キーワード：ドライアイ 涙液浸透圧 IL-6 高浸透圧 角膜上皮細胞 炎症

1. 研究開始当初の背景

(1) ドライアイ疾患は、眼の不快感や視機能異常を伴う慢性疾患であり、パソコンやコンタクトレンズの普及・高齢化などに伴い、我が国でも増加傾向にある。

ドライアイの診断基準については、日本では、涙液の質的および量的異常や角結膜上皮障害を点数化しているのに対し、アメリカの DEWS Report では、クリアな診断基準は存在しないとしている。しかしその報告の中で、「ドライアイには涙液の浸透圧亢進と眼表面の炎症を伴う」と明記され、涙液浸透圧について、316mOsm/L 以上を診断のカットオフ値として推奨している。

(2) 今回、涙液浸透圧とドライアイの関係を明らかにすることは、今後のドライアイの新たな治療戦略を模索するために重要と考える。

2. 研究の目的

(1) ドライアイ疾患は、眼の不快感や視機能異常を伴う慢性疾患であり、パソコンやコンタクトレンズの普及・高齢化などに伴い、我が国では潜在患者がおよそ 1000 万人とも言われる。

ドライアイのガイドラインは、日本では 2006 年にドライアイ研究会により、アメリカでは 2007 年の Dry Eye Workshop (DEWS) Report により報告されており、共に「さまざまな要因による涙液および角結膜上皮の慢性疾患であり、眼不快感や視機能異常を伴う疾患」とされている。しかし、診断基準については、日本では、涙液の質的および量的異常や角結膜上皮障害を点数化しているのに対し、アメリカの DEWS Report では、クリアな診断基準は存在しないとしている。しかし、その報告の中で注目すべきは、「ドライアイには涙液の浸透圧亢進と眼表面の炎症を伴う」と明記され、Tear Osmolarity (涙液浸透圧) について、316mOsm/L 以上を診断のカットオフ値として推奨している点である。

我が国において、ドライアイ研究は盛んに行われているが、ドライアイと浸透圧亢進の関係を調べたものは少ない。それは、ドライアイは乾燥によって生じるという概念が根強く浸透しているからである。ドライアイ発症のメカニズムは、浸透圧の上昇 上皮の炎症系細胞内シグナルの活性化 炎症系のサイトカインや MMP 活性の上昇 結膜の杯細胞やムチンの脱落 上皮細胞の損傷 アポト

ーシス 涙液の不安定性 更なる涙液の浸透圧上昇という悪循環があると考えられる。

このように、ドライアイは炎症性疾患の側面を持ち、その根本には高浸透圧という上皮ストレスがあり、そして免疫系も動いていると考えられる。

一方、Th17 細胞は、新しいサブセットとして発見された IL-17 産生を特徴とするヘルパー T 細胞であり (Langrish et al, J. Exp. Med. 2005) 数々の自己免疫疾患との関連が報告されている。近年、ドライアイ患者では、正常人よりも結膜細胞の Th17 系のサイトカイン発現が高いこと、さらにドライアイマウスモデルにおいて、IL-17 抗体の投与により角膜上皮障害が抑制されることが報告された (Pflugfelder et al, Cornea, 2008)。そこで我々は、ドライアイ - 高浸透圧 - Th17 細胞 - シクロスポリン点眼薬という軸で実験を進めていくことは大変意義があると思う。

申請者らは、自然界が生体の免疫系に及ぼす影響についてこれまで研究してきた。ウイルス断片が CD8 リンパ球を活性化し、癌細胞の傷害性を高めること (Fujimoto et al, International Immunology, 2004)、百日咳の毒素が自己免疫性ぶどう膜炎を誘発すること (Fujimoto et al, Journal of Immunology, 2006)、免疫活性を起こすと知られている細菌 DNA (CpG) の類似体が自己免疫性ぶどう膜炎を抑制すること (Fujimoto et al, Clinical & Experimental Immunology, 2009) を報告してきた。眼表面は常に外界にさらされている場所であり、種々の自然界の病原体を感知して自然免疫が作動していると考えられる。今までの経験を活かし、特に、ウイルスや細菌などの断片を感知する Toll Like Receptor の活性化に注目し、それらがドライアイに及ぼす影響についても調べていきたいと考えている。

以上を調べることにより、Th17 系サイトカインを特異的に抑制する治療法や、浸透圧緩衝剤を用いた点眼薬の開発、あるいは、病原体に対する反応を軽減し病気を未然に防ぐための洗眼点眼液の開発など、新しい治療・予防医学への臨床応用が期待できるのではないかと考えている。

3. 研究の方法

(1) 不死化したヒト不死化角膜上皮 (HCE) 細胞株を培養する。正常浸透圧 (310mOsm) の培養液を作成する。高浸透圧溶液として、NaCl により (310 ~ 1000mOsm) に調整する。調整した

培養液を、コンフルエントにした人角膜上皮細胞の培養液と置換し、24 時間後または 10 分後に上清を回収し、凍結保存する。同時に、ヒト角膜上皮細胞を回収し、凍結保存する。(2) 高浸透圧液が HCE 細胞に及ぼす傷害性を調べるため、トリパンプルを用いて、顕微鏡下で死細胞を確認する。さらに、毒性を調べるため、回収したヒト角膜上皮細胞を LDH 法にて調べる。次に、回収した上清中の、種々の炎症性サイトカイン濃度を ELISA 法にて測定する。さらに、回収した細胞中の炎症性サイトカイン mRNA 発現を RT-PCR 法にて調べる。

4 . 研究成果

(1) 高浸透圧液の 24 時間曝露により、浸透圧が 400mOsm と低いレベルであっても細胞に傷害を起こすことが分かった。一方、短時間曝露 (10 分間) では、1000mOsm という超高レベルの浸透圧であっても、トリパンプル法による死細胞の数に有意差はなかった。同様に、LDH 法により細胞毒性を調べたが、1000mOsm でも細胞障害性は起こさないことが分かった。

(2) 次に、短時間曝露では、400mOsm 以上の高浸透圧液で IL-6 産生が多くなることを発見した。700mOsm で最も IL-6 産生が上昇し、それより高い浸透圧培養液では減少する傾向が見られた。しかし、IL-1、IL-1, IL-23, TGF-、TNF-、IL-17 などの炎症性サイトカイン産生には変化が見られなかった。

(3) 以上より、高浸透圧液が角膜上皮細胞から IL-6 が産生される機構の一部が解明された。

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 1 件)

Igarashi, Tsutomu; Fujimoto, Chiaki;
Suzuki, Hisaharu; More

Short-Time Exposure of Hyperosmolarity Triggers Interleukin-6 Expression in Corneal Epithelial Cells

Cornea. 33(12):1342-1347, December 2014.

[学会発表](計 1 件)

角膜カンファランス 2014

「短時間の超高浸透圧曝露で角膜上皮細胞からの IL-6 産生は上昇する」

小林舞香, 五十嵐勉, 藤本千明, 他

2014 年 1 月 30 日(木)~2 月 1 日(土) 沖縄コンベンションセンター

[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:
出願年月日:
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

藤本 千明 (FUJIMOTO, Chiaki)
日本医科大学大学院医学研究科・研究員
研究者番号: 70623924

(2) 研究分担者

高橋 浩 (TAKAHASHI, Hiroshi)
日本医科大学大学院医学研究科・教授
研究者番号: 00188046

五十嵐 勉 (IGARASHI, Tsutomu)
日本医科大学医学部・講師
研究者番号: 10421190

(研究協力者)

小林 舞香 (KOBAYASHI, Maika)