

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659760

研究課題名(和文) TLR経路による角膜内皮機能抑制機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory roles of Toll like receptor signaling in corneal endothelial cells

研究代表者

石倉 涼子 (Ryoko, ISHIKURA)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：0033530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：角膜内皮感染における代表的な病原体である単純ヘルペスウイルス(HSV)感染後の角膜内皮のトランスクリプトームは、インターフェロン応答、感染に対するパターン認識レセプター応答を主体とし、TLR9刺激は、Indoleamine 2,3-deoxygenase 1(IDO1)を介した調節性T細胞の誘導機能により、感染内皮を破壊から保護する役割をもつことが示唆された。また、障害物質応答にかかわる重要候補レセプターとしてRAGEも発現し、RAGEも内皮における微生物認識機構に寄与していることが判明しつつある。

研究成果の概要(英文)：Transcriptome of human corneal endothelial cells after HSV-1 infection was characterized by interferon response and pattern recognition receptor response. TLR9 stimulated by CpG DNA or viral infection induced Indoleamine 2,3-deoxygenase 1 (IDO1), which contribute to activation of regulatory T cells, which dampens inflammatory responses of acquired immune system for protection of corneal endothelial cells. Receptor of Advanced glycosylation end products was also induced by viral infection, and was suggested to be involved in recognition of damage associated molecule by TLR9.

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：角膜内皮

1. 研究開始当初の背景

水疱性角膜症は、角膜疾患による失明あるいは視力低下の重要な原因である。とくに水疱性角膜症を引き起こす疾患として角膜内皮傷害があげられ、角膜内皮炎はその原因の中でも重要な地位をしめる。近年、角膜内皮炎の報告が散見されるようになり、角膜内皮が角膜感染症の主座となる病態も報告されるようになってきた。多くは、単純ヘルペスウイルス(HSV)やサイトメガロウイルス(CMV)などのウイルス感染に関連するものとされているが、その病態の詳細は明らかではない。また、水疱性角膜症の原因疾患としては、白内障手術につづき、レーザー虹彩切開術に起因するものも多いがその発症機序は明らかではない。最近、角膜内皮は、獲得免疫系にも関与することが認識されつつある。たとえば、角膜内皮は免疫制御機構の一員としてPDL1を介したT細胞のアポトーシスを誘導することも報告された。しかしながら、角膜内皮自体の active な炎症の modulator としての位置づけに基づく報告はまだ少なく、角膜内皮炎あるいは角膜内皮傷害との関連性も不明であった。

2. 研究の目的

角膜内皮傷害の病因にウイルス感染を含めたTh1あるいはTLR刺激が関与していることが推察されてきている。そこで、より効果的な内皮細胞の恒常性の維持をはかることを主眼に、角膜内皮自体が炎症刺激に応じて誘導する炎症調節機構を明らかにし、これらを効果的に制御する手法さらに維持に必要な制御法の開発につなげていくことをめざす。とくに、本研究は炎症を制御する内皮機能の全貌を明らかにし、内皮機能の維持および炎症応答制御をはかる方法を模索することを目的とする。

3. 研究の方法

角膜内皮におけるToll like-receptorを含めたパターン認識レセプターの関与およびその下流誘導因子の役割を解析するため、FACS、マイクロアレイによる発現あるいは転写解析を用いてプロファイリングを行う。さらにそのレセプター及び下流機能因子の阻害、ある

いは過剰発現系を用いてその寄与を検討する。免疫調節機能の解析には、単純ヘルペスウイルス既感染ドナー由来Tリンパ球を用いてその相互作用あるいは調節能を検証する。

4. 研究成果

角膜内皮が、炎症刺激に対していかなる分子応答を示すかを検討するため、炎症応答性レセプターを介した応答性を検討した。炎症応答機序は、感染性病原体に対する応答、さらに内因性の炎症性物質に対する応答に大別され、それぞれのリガンドは、Pathogen associated molecular pattern (PAMP)および、Damage associated molecular pattern (DAMP)に大別される。とくにPAMPに対する応答を検証した場合、角膜内皮はToll like receptor (TLR)のリガンドに対してIL-6やインターフェロン応答を誘導した。TLRの中では、角膜内皮は恒常的にTLR9を強く発現しており、各種細菌やウイルスに含まれる非メチル化DNAを認識する。また、DAMPにかかわる重要候補レセプターとしてRAGEがある。これまでRAGEはAdvanced glycosylation end productsのレセプターとして知られてきたが、RAGEも内皮における微生物認識機構に寄与していることが判明しつつある。

角膜内皮感染における代表的な病原体である単純ヘルペスウイルス(HSV)感染後の角膜内皮のトランスクリプトームを用いて主たるカスケードを解析した結果、インターフェロン応答、感染に対するpattern recognition receptor (PRR)応答が主体であった。とくに発現上位の遺伝子においてIndoleamine 2,3-deoxygenase 1 (IDO1)が特徴的に誘導されており、以前認識された抗ウイルス作用というよりもむしろ、調節性T細胞の誘導機能を認め、その免疫調節機能は、感染内皮を破壊から保護する役割をもつことが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Fukushima A, Ohashi Y, Ebihara N, Uchio

E, Okamoto S, Kumagai N, Shoji J, Takamura E, Nakagawa Y, Namba K, Fujishima H, Miyazaki D, Therapeutic effects of 0.1% tacrolimus eye drops for refractory allergic ocular diseases with proliferative lesion or corneal involvement, Br J Ophthalmol, 査読有、掲載予定、2014

DOI:10.1136/bjophthalmol-2013-304453

Kandori M, Miyazaki D, Yakura K, Komatsu N, Touge C, Ishikura R, Inoue Y, Relationship between the number of cytomegalovirus in anterior chamber and severity of anterior segment inflammation, Jpn J Ophthalmol, 査読有、57巻、2013、497-502

DOI:10.1007/s10384-013-0268-2

Miyazaki D, Mihara S, Inata K, Sasaki S, Tominaga T, Yakura K, Ishida W, Fukushima A, Inoue Y, Pharmacologic inhibition of I B kinase activates immediate hypersensitivity reactions in mice, Am J Pathol, 査読有 183巻、2013、96-107

DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.04.006.

Sasaki S, Miyazaki D, Miyake K, Terasaka Y, Kaneda S, Ikeda Y, Funakoshi T, Baba T, Yamasaki A, Inoue Y, Associations of IL-23 with polypoidal choroidal vasculopathy, Invest Ophthalmol Vis Sci, 査読有、53巻、2012、3414-30

DOI: 10.1167/iovs.11-7913

Ikeda Y, Miyazaki D, Yakura K, Kawaguchi A, Ishikura R, Inoue Y, Mito T, Shiraishi A, Ohashi Y, Higaki S, Itahashi M, Fukuda M, Shimomura Y, Yagita K, Assessment of real-time polymerase chain reaction detection of Acanthamoeba and prognosis determinants of Acanthamoeba keratitis, Ophthalmology, 査読有、119巻、2012、1111-9

DOI:10.1016/j-j-ophtha.2011.12.023.

Epub 2012 Mar3

Ebihara N, Ohashi Y, Fujishima H, Fukushima A, Nakagawa Y, Namba K, Okamoto S, Shoji J, Takamura E, Uchio E, Miyazaki D, Blood level of tacrolimus in patients with severe allergic conjunctivitis treated by 0.1% tacrolimus ophthalmic suspension, Allergol Int, 査読有、61巻、2012、275-82
DOI: 10.2332/allergolint.11-0A-0349.
Epub 2012 Feb 25

〔学会発表〕(計7件)

神鳥美智子、角膜内皮細胞の炎症応答における RAGE (終末糖化産物受容体) の役割、第 38 回日本角膜学会総会、2014 年 1 月 30 日~2014 年 2 月 1 日、沖縄コンベンションセンター

宮崎 大、サイトメガロウイルス感染に対する角膜内皮の分子応答、第 50 回眼感染症学会、2013 年 7 月 13 日、大阪国際会議場

宮崎 大、サイトメガロウイルス感染に対する角膜内皮の分子応答、第 28 回ヘルペスウイルス研究会、2013 年 5 月 31 日、兵庫県立淡路夢舞台国際会議場

石倉涼子、アマンタジンにより角膜内皮障害を生じた 2 例、第 66 回日本臨床眼科学会、2012 年 10 月 25 日~10 月 28 日、国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都

神鳥美智子、前眼部炎症疾患における前房内サイトメガロウイルス DNA のロジスティック解析、第 66 回日本臨床眼科学会、2012 年 10 月 25 日~10 月 28 日、国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都

宮崎 大、アcantアメラ角膜炎における予後予測因子の多変量解析、第 57 回山陰眼科集談会・第 86 回鳥取大学眼科研究会、2012 年 5 月 13 日、米子全日空ホテル

宮崎 大、ヘルペスウイルス内皮感染の分子機構、第 117 回日本眼科学会総会シンポジウム、2013 年 4 月 4 日、東京国際フォーラム

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石倉 涼子 (ISHIKURA, Ryoko)
鳥取大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 00335530

(2)研究分担者

宮崎 大 (MIYAZAKI, Dai)
鳥取大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 30346358

(3) 研究分担者

井上 幸次 (INOUE Yoshitsugu)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号 : 10213183