

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659768

研究課題名(和文)アトピー性角結膜炎とナチュラルヘルパー細胞

研究課題名(英文)Atopic keratoconjunctivitis and natural helper cell

研究代表者

村上 晶 (Murakami, Akira)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：90157743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：B6マウスおよびIL-33 KOマウスにパパインを吸収させたコンタクトレンズをマウス眼球に装着して、自然免疫型マウスアレルギー結膜炎モデルを作成し、好酸球浸潤の程度を比較検討した。IL-33KOマウスではwild-typeと比較して、有意に好酸球の浸潤数が減少することを発見した。IL-33は自然免疫系の賦活化によって眼表面のアレルギー性炎症の成立に関与していることが示唆された。また、ヒト慢性重症アレルギー性結膜炎の治療目的で切除した巨大乳頭組織から、NH細胞の同定に成功した。この成果はヒトの慢性重症アレルギー性結膜炎においてもNH細胞が機能していることを示唆する発見である。

研究成果の概要(英文)：We made innate immune system-dependent mouse conjunctivitis model using papain-absorbed contact lens. The lens was inserted into the conjunctival sac of B6 wild and B6 Rag2-knockout (KO) and IL-33 KO mice. In this mouse models, prominent eosinophilic infiltration was observed in the conjunctival tissue. The number of infiltrated eosinophils was significantly smaller in IL-33 KO mice compared to wild-type and Rag2-KO mice. These results suggested that IL-33 expression is essential for ocular surface allergic inflammatory process through the activation of innate immune systems. In addition, we detected natural helper (NH) cells in the lacrimal gland and conjunctival tissue of the innate immune system-dependent mouse conjunctivitis model. Moreover, we identified NH cell in the giant papillae tissue obtained from severe chronic allergic conjunctivitis patients. These results suggested that NH cell may participate the pathological process of severe chronic allergic conjunctivitis.

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：アトピー性角結膜炎 ナチュラルヘルパー細胞 IL-33 自然免疫 パパイン

1. 研究開始当初の背景

アトピー性炎症は、IgE 抗原抗体反応、マスト細胞の脱顆粒、好酸球浸潤、Th2 リンパ球増生、B リンパ球による IgE 産生といった一連の免疫系の反応と考えられるが、最近の研究から慢性外傷、抗原刺激、感染に伴う結膜上皮における特徴的なサイトカイン産生 (Type2 initiating cytokines; IL-33,IL-25,TSLP)が病態に大きな役割を果たしていることがわかってきた。アトピー性角結膜炎(AKC)/春季カタル(VKC)においても、掻痒感のための眼表面慢性外傷、ダニ抗原ならびにウイルス・細菌に対する自然免疫応答が、IL-33 発現を誘導しているものと考えられ、実際に AKC/VKC の増殖性病変中の結膜上皮細胞に IL-33 が発現し、病変の形成に関与していることを我々が報告した。連携研究者の中江が作成した IL-33 ノックアウト(KO)マウスを用いた喘息モデルの研究から IL-33 は獲得免疫非依存性にダニ抗原やパピンをといったシステインプロテアーゼ刺激によって好酸球主体の炎症細胞浸潤を引き起こすことが報告された。さらに最近 IL-33 は、獲得免疫系に依存しない Th2 型炎症を引き起こす Natural Helper (NH) 細胞の維持に必須の因子であることが報告された。

2. 研究の目的

AKC/VKC は角膜癒痕化に伴う視力障害を引き起こすアレルギー性結膜炎であり、病態メカニズムの解明と発症防止が求められている。Th2 サイトカインである IL-33 は、AKC/VKC の発症に関与するとともに、獲得免疫系に依存しない Th2 型炎症を誘発する Natural Helper (NH) 細胞の維持に必須の分子である。本研究では AKC/VKC の病態における自然免疫炎症の役割を IL-33 と NH 細胞を軸にヒトおよびマウスのモデルで解析を進める。また比較検討のために同時に獲得免疫系のアレルギー性結膜炎モデルの検討も施行する。さらには IL-33 以外の Type 2

initiating cytokine の役割も同時に検討する。

それらの実験から、非特異的な免疫抑制に依存しない新規治療法の開発や免疫抑制薬の無効例に対する治療法の創出、ひいては AKC/VKC の発症予防を最終的な目標に研究を進める。

3. 研究の方法

(1)自然免疫型マウスアレルギー性結膜炎モデルおよび獲得免疫型マウスアレルギー性結膜炎モデルの作成。B6 マウスおよびリンパ球を欠く Rag-2 knockout (KO)マウスにパピンを吸収させたコンタクトレンズをマウス眼球に装着して瞼縫合することにより、自然免疫型マウスアレルギー性結膜炎モデルを作成し、IL-33 分子の動態および好酸球浸潤の程度を比較検討した。獲得免疫型マウスアレルギー性結膜炎モデルとして、ブタクサ花粉で感作したマウスの結膜にブタクサ花粉をチャレンジするモデルを作成した。IL-33 分子の機能解析には IL-33 KO マウスを使用し、同時に IL-25 KO マウスを使った解析も施行した。

(2)マウス結膜炎モデルにおける NH 細胞の同定。実際の AKC/VKC 病変では、自然免疫型反応および獲得免疫型反応の両者が病態の形成に関与しているものと予想される。多量の IL-5 および IL-13 を産生する NH 細胞が両者の橋渡しをして病態の鍵を握っている可能性も考えられるため、上述のマウス結膜炎モデルで、NH 細胞の同定を FACS 並びに免疫組織染色を用いて施行する。具体的には、結膜炎を誘導したマウス結膜組織 10 匹分から dispase/collagenase 処理によって、競るストレーナーを用いて細胞を単離、Lineage-, IL-33R+, IL-7R+, Thy-1+細胞群を NH 細胞としてフローサイトメーター (FACS)を用いて同定することを試みた。

(3)ヒト眼瞼巨大乳頭組織における NH 細胞同定。マウスでの成果をもとにヒト AKC/VKC 患者由来の巨大乳頭組織での NH 細胞の同定

を試みる。具体的には治療目的で切除した巨大乳頭組織を dispase/collagenase 処理し、細胞を単離、FACS でヒト NH 細胞のマーカーとされる Lineage-/CD161+/CRTH2+ 細胞分画を分取、形態学的な解析と ST2L(=IL-33R)発現および IL-13 産生能の確認を行う。また免疫組織染色で NH 細胞が同定できるマーカーの検索も同時に施行する。

4. 研究成果

(1) 自然免疫型マウスアレルギー性結膜炎モデルおよび獲得免疫型マウスアレルギー性結膜炎モデルの作成。B6 マウスおよびリンパ球を欠く B6 Rag-2KO マウスにパピンを吸収させたコンタクトレンズをマウス眼球に装着して瞼瞼縫合することにより、自然免疫型マウスアレルギー性結膜炎モデル(パピイン結膜炎モデル)を作成した。コンタクトレンズの装着期間は4日間とした。また、熱処理して失活させたパピイン吸着させたコンタクトレンズを利用して、陰性コントロールとした。このモデルを用いて IL-33 分子の動態および好酸球浸潤の程度を比較検討したところ、パピイン結膜炎モデルではパピイン吸着によって、有意に結膜への好酸球浸潤が増加し、また IL-33 knockout (KO)マウスでは wild-type と比較して、有意に好酸球の浸潤数が減少することを発見した。一方同時に検討した IL-25 KO マウスにおいては Wild-type と比較して有意な好酸球浸潤数の差を認めなかった。さらに、ブタクサ花粉免疫 + ブタクサ花粉点眼チャレンジによる獲得免疫型のマウスアレルギー性結膜炎モデルも作成し、自然免疫結膜炎モデルと同様に IL-33 KO マウスで好酸球浸潤数の減少を認めただのに対して IL-25KO マウスでは wild-type と比較して有意差を認めなかった。すなわち IL-33 は自然免疫、獲得免疫の両面から眼表面のアレルギー性炎症の成立に必須の分子であることが示唆された。これらの成果は学会で発表し、現在学術誌に投稿中である。ま

た、現在もう一つの Type2 initiating cytokines である TSLP のノックアウトマウスを用いた解析も施行している最中である。

(2) マウス結膜炎モデルにおける NH 細胞の同定。パピインマウス結膜炎モデルで、NH 細胞(Lineage-, IL-33R+, IL-7R+, Thy-1+)の同定を FACS 用いて施行した。NH 細胞は涙腺内に多量に存在し、結膜炎を発症したマウスの結膜組織にも存在することが明らかになった。また既報のとおり、リンパ節には NH 細胞が存在しないことも確認した。現在、この実験系をさらに発展させて、IL-33 の有無による NH 細胞活性化の差異を検討している。また涙腺から結膜炎の発症によって NH 細胞が結膜組織内に移動している可能性があるため、現在涙腺除去マウスを用いた解析を施行している。さらに、NH 細胞を欠く Rag-2 Common gamma KO マウスに NH 細胞を adoptive transfer することで、自然免疫結膜炎モデルおよび獲得免疫結膜炎モデルの発症における NH 細胞の役割を検証中である。

(3) ヒト眼瞼巨大乳頭組織における NH 細胞同定。ヒト AKC/VKC 患者由来の巨大乳頭組織(2症例分)を用いて NH 細胞の同定を試みた。治療目的で切除した VKC 患者由来の巨大乳頭組織を dispase/collagenase 処理し、細胞を単離、パコーンで遠心分離した後、FACS を用いてヒト NH 細胞のマーカーである Lineage-/CD161+/CRTH2+ および ST2L(=IL-33R)陽性細胞分画を FACS で同定した。この成果はヒトの慢性重症アレルギー性結膜炎組織においても NH 細胞が存在し、慢性アトピー性角結膜炎の病態に NH 細胞が関連していることを示唆する発見である。また、ヒト眼瞼巨大乳頭を用いた研究の中で、ヒト AKC/VKC 患者由来の巨大乳頭が従来の報告にある上眼瞼結膜の他に、下眼瞼結膜にも発症することを発見し、論文として報告した。さらに、ヒト AKC/VKC 患者由来の巨大乳頭組織を用いて IL-33 の細胞内局在を免疫電顕法

を用いて検討する試みを施行したが、予備実験の段階で抗体の親和性が電顕レベルの解析に適合しないことが判明したため、断念した。現在新規に IL-33 抗原に対する親和性の高い抗体を作成中であり、引き続き IL-33 の細胞内局在の検討を施行してゆく予定である。

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2件)

Asada Y, Ebihara N, Funaki T, Norihiko Y, Murakami A, Matsuda A. Vernal keratoconjunctivitis with giant papillae on the inferior tarsal conjunctiva. *Cornea* 査読あり 33:32-34, 2014.

Iwamoto S, Asada Y, Ebihara N, Hori K, Okayama Y, Kashiwakura JI, Watanabe Y, Kawasaki S, Yokoi N, Inatomi T, Shinomiya K, Murakami A, Matsuda A. Interaction between conjunctival epithelial cells and mast cells induces CCL2 expression and piecemeal degranulation in mast cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 査読あり 2013; 54:2465-2473.

[学会発表](計4件)

The role of interleukin-33 (IL-33) in mouse experimental allergic conjunctivitis Akira Matsuda, Kanji Hori, Waka Ishida, Ken Fukuda, Nobuyuki Ebihara, Yosuke Asada, Susumu Nakae, Atsuki Fukushima, Akira Murakami.

Keystone Symposia, Type 2 Immunity: Initiation, maintenance, homeostasis and Pathology. 2013年1月 米国 サンタフェ

浅田洋輔、松田 彰、堀 寛爾、岩本 怜、海老原伸行、村上 晶、中江 進

パイン誘発結膜炎モデルマウスとナチュラルヘルパー細胞 2013年4月 日本眼科学会総会

Yosuke Asada, Akira Matsuda, Kanji Hori, Satoshi Iwamoto, Nobuyuki Ebihara, Akira Murakami, Susumu Nakae. Detection of natural helper cells in innate immune system-dependent mouse conjunctivitis model. The annual meeting for the Association of Research in Vision and Ophthalmology. 米国 シアトル 2013年4月

Yosuke Asada, Akira Matsuda, Kanji Hori, Satoshi Iwamoto, Nobuyuki Ebihara, Akira Murakami, Susumu Nakae. Interleukin(IL)-33 and Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP), but not IL-25, induced Allergic Conjunctivitis in Mouse Models Papain-Induced Conjunctivitis.

The annual meeting for the Association of Research in Vision and Ophthalmology. 米国 オーランド 2014年5月

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 晶 (MURAKAMI, Akira)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：90157743

(2)研究分担者

海老原 伸行 (EBIHARA, Nobuyuki)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：20255699

松田 彰 (MATSUDA, Akira)

順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：00312348

(3)連携研究者

中江 進 (NAKAE, Susumu)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：60450409