

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462762

研究課題名(和文)眼表面上皮細胞によるTLR3-EP3を介した炎症制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of regulation mechanisms for inflammation through TLR3-EP3 interaction

研究代表者

上田 真由美(UETA, MAYUMI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60398386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：眼表面上皮細胞による自然免疫機構を介した炎症制御機構の解明、特にTLR3-EP3を介した炎症制御機構の解明に焦点を当て研究を行った。具体的には、眼表面上皮細胞においてTLR3刺激によって、様々な遺伝子発現ならびに蛋白が誘導されること、また、それらの多くは、EP3刺激により抑制されることをあきらかとした。また、遺伝子改変マウスを用いた解析において、EP3欠損マウスで発現が上昇する遺伝子群は、EP3TLR3二重欠損マウスによって、その上昇が消失することも明らかとした。これらの結果は、TLR3誘導性の遺伝子発現をEP3が抑制していることを示している。

研究成果の概要(英文)：We elucidated the regulation mechanisms via the innate immune system in the ocular surface epithelial cells, in particular, we focused the regulation mechanisms through the TLR3-EP3 interaction. We clarified that TLR3 stimulation could induce various gene expression in ocular surface epithelial cells, and the genes expression could be reduced by EP3 stimulation. In addition, we found that the upregulation of genes which were found in EP3 KO mice were canceled in TLR3/ EP3 double KO mice, suggesting that EP3 could suppress the TLR3 inducible gene expression.

研究分野：眼表面の粘膜免疫ならびに自然免疫

キーワード：自然免疫 眼表面上皮 TLR3 EP3

1. 研究開始当初の背景

外来抗原に対する構造的・機能的なバリアを構成する上皮細胞が、炎症性疾患の病態に大きく関与することが近年報告されている。NFκB の活性化に必要な NEMO 分子を腸管上皮特異的に欠損させたマウスでは、炎症性腸疾患を発症する (Nenci; Nature 2007)。リンパ球増殖因子として同定された TSLP (Thymic stromal lymphopoeitin) は、表皮や気道上皮に発現することによりアレルギー炎症を誘導する (Ziegler; JACI 2012, Zhou; Nat Immunol 2005)。炎症に大きく関与するプロスタグランジン(PG)の受容体も上皮細胞に発現し炎症を制御している。とくに PGE₂ 受容体の一つである EP3 は、表皮や気管上皮に強く発現してアレルギー炎症を抑制している (Honda; JACI 2009, Kunikata; Nat Immunol 2005)。一方、体内の免疫機構である全身免疫と、常在細菌と接する粘膜組織の免疫機構では大きく異なることが知られている。

申請者は、粘膜独自の免疫機構に、粘膜上皮細胞が大きく貢献していることを報告してきた。眼表面上皮細胞は、病原体認識機構である Toll like receptors (TLRs) を発現するが、その局在や反応性はリンパ球などの免疫細胞とは異なり、細菌に対して容易には炎症反応を惹起しないこと、一方、ウイルス由来 2 本鎖 RNA に対しては、TLR3 を介して著明に炎症性サイトカインを産生することを報告した (Ueta; JI 2004, Ueta; BJO 2007, Ueta; BrainResBull 2010, Ueta; PRER 2012)。また、申請者は眼表面上皮細胞がアレルギー性結膜炎を制御することを示した

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、“粘膜上皮細胞による炎症制御機構の解明”にある。申請者は、TLR3 と EP3 の間に今まで全く知られていなかった新規の相互作用が存在する事を世界で初めて見出した。つまり、眼表面上皮に発現する TLR3 が炎症を促進し、その TLR3 を介した炎症を PGE₂ 受容体 EP3 が抑制する事を報告した。本研究では、眼表面上皮による自然免疫機構を介した炎症制御機構を解明する。本研究により、上皮細胞による炎症制御機構が解明されれば、既存の免疫細胞を標的とした炎症治療薬とは作用機序の異なった、上皮細胞を標的とする斬新な炎症治療薬の開発へと進展する事が予想される。申請者は、本研究期間中に、眼表面上皮細胞による自然免疫機構を介した炎症制御機構の解明、特に TLR3-EP3 を介した炎症制御機構の解明に焦点を当て研究を行う。

3. 研究の方法

TLR3 リガンドを局所投与した野生型マウスならびに EP3 欠損遺伝子改変マウスと TLR3/EP3 二重欠損遺伝子改変マウスを用いて、in vivo 結膜上皮細胞を対象にマイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。また更に、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析にて変化の認められた遺伝子群は、定量 RT-PCR を用いてその遺伝子発現を確認した。

EP3 ならびに TLR3 は、眼表面上皮細胞に優位に発現していることから上皮細胞と樹状細胞との双方向的相互作用について生体 4 D イメージング “intravital imaging” 手法を用いて解析した。

ヒト培養結膜上皮細胞を用いて EP3 の細胞内シグナルについて解析した。

各種免疫細胞蛍光標識マウス (樹状細胞蛍光標識マウス (CD11c-YFP マウス)、マクロファージ蛍光標識マウス (CX3CR1-eGFP マウス)、好中球蛍光標識マウス (LysM-eGFP マウス)) を用いて TLR3 のリガンドである polyI:C の点眼に対する角膜内各種免疫細胞の変化を解析した。PGE₂ の産生を抑制することが報告されている rebamipide を用いて、ヒト培養結膜上皮において TLR3 誘導性炎症性サイトカインが抑制されるかどうかを検証した。rebamipide 点眼によりマウスにおいて TLR3 誘導性のアレルギー性結膜炎が抑制されることを報告していること、さらにこの rebamipide 点眼は、ドライアイ疾患に対する治療薬として認可されている。そのため、TLR3 が関係すると考えられるヒトアレルギー性角結膜疾患患者でドライアイを有する患者を対象に、rebamipide 点眼を処方し、眼表面の所見ならびに、涙液中のサイトカインの変化を解析した。

4. 研究成果

マウス in vivo 結膜上皮細胞の解析をおこなった結果、マイクロアレイでは、結膜の polyI:C 刺激を行った野生型マウスの結膜上皮で、非刺激状態と比較して polyI:C 刺激後に 10 倍以上発現が上昇する遺伝子が 31 遺伝子検出された。さらに、定量 PCR で解析したところ、このうちの 21 遺伝子 (Cxc10, Rsad2, Ifi205, Mx1, Cmpk2, Iigp1, Mx2, Iigp2, Ifit3, Gbp5, Cxc111, H28, SIfn8, Plscr2,

Slfn4, Usp18, Sectm1a, Oas2, Dhx58, Ccl5, Isg15)について3倍以上の遺伝子発現の上昇が確認できた。これらの遺伝子発現制御におけるEP3の役割を解析する目的で、野生型マウスとEP3欠損マウスにおけるこれらの遺伝子発現を比較したところ、これらの21遺伝子すべてが、野生型マウスと比較してEP3欠損マウスのpolyI:Cで刺激した結膜上皮で有意に発現が上昇していた。さらに、EP3欠損マウスとTLR3/EP3二重欠損マウスのpolyI:C刺激結膜上皮を比較したところ、これらの21遺伝子すべてが、TLR3/EP3二重欠損マウスで有意に減少した。このことは、TLR3によって発現が誘導されるこれらの遺伝子が、EP3によって抑制されていることを示している。

上皮細胞と樹状細胞との双方向的相互作用について生体4Dイメージング“intravital imaging”手法を用いて解析した結果、TLR3は、樹状細胞の動態に影響を及ぼすが、EP3ではその影響は明らかでないことが判明した。

ヒト培養結膜上皮細胞を用いてEP3の細胞内シグナルについて解析した結果、PGE₂の刺激によりGαqが上昇していることを明らかとした。

各種免疫細胞蛍光標識マウスにTLR3のリガンドであるpolyI:Cを1ug/ulの濃度で10ul点眼したところ、角膜内の樹状細胞は、その数をまし中心部に浸潤するのが観察された、その一方、マクロファージや好中球には明らかな変化は認められなかった。また、TLR4のリガンドでありグラム陰性菌の細胞壁成分であるLPSを1ug/ulの濃度で10ul点眼しても角膜内の樹状細胞に変化は認められなかった。これは、角膜上皮細胞が、TLR3のリガンドであるpolyI:Cには、反応して各種サイトカインを産生するが、TLR4のリガンドであるLPSに対しては炎症性サイトカインを産生しない以前の報告と一致していた。

PGE₂の産生を抑制することが報告されているrebamipideを用いて、ヒト培養結膜上皮におけるTLR3誘導性炎症性サイトカインの抑制効果を解析したところ、rebamipideは、TLR3誘導性IL-6, MCP-1, CCL5, CXCL10等の炎症性サイトカインの産生ならびに発現を有意に抑制した。

TLR3が関係すると考えられるヒトアレルギー性角結膜疾患患者でドライアイを有

する患者を対象に、rebamipide点眼を処方し、眼表面の所見ならびに、涙液中のサイトカインの変化を解析した結果、rebamipide点眼により巨大乳頭の縮小、ならびに、涙液中IgE, IL-8, MCP-1等が有意に抑制されることが明らかとなった。このことは、人においてもPGE₂が眼表面上皮に優位に発現しているEP3に作用してTLR3誘導性アレルギー炎症を抑制していることを示唆するものである。

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 9件)

1. Kojima S, Inoue T, Kikuta J, Furuya M, Koga A, Fujimoto T, Ueta M, Kinoshita S, Ishii M, Tanihara H. Visualization of Intravital Immune Cell Dynamics After Conjunctival Surgery Using Multiphoton Microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 Mar 1;57(3):1207-12. doi: 10.1167/iovs.15-18507. (査読有)
2. Ueta M, Koga A, Kikuta J, Yamada K, Kojima S, Shinomiya K, Ishii M, Kinoshita S. Intravital imaging of the cellular dynamics of LysM-positive cells in a murine corneal suture model. *Br J Ophthalmol*. 2016 Mar;100(3):432-5. doi:10.1136/bjophthalmol-2015-307024. (査読有)
3. Ueta M, Tokunaga K, Sotozono C, Sawai H, Yoon KY, Kim MK, Seo KY, Joo CJ, Tashiro K & Kinoshita S. HLA-A*02:06 and *PTGER3* polymorphism exert additive effects in cold medicine-related Stevens-Johnson syndrome with severe ocular complications. *Human Genome Variation* 2, 15023 doi: 10.1038/hgv.2015.23. (査読有)
4. Ueta M, Shoji J, Sotozono C, Kinoshita K. Downregulation of IL-8, ECP, and total IgE in the tears of patients with atopic keratoconjunctivitis treated with rebamipide eyedrops. *Clinical and Translational Allergy*, 2014 Oct 30;4:40. doi: 10.1186/2045-7022-4-40. (査読有)
5. Nakamura N, Tamagawa-Mineoka R, Ueta M, Kinoshita S, Katoh N. Toll-Like Receptor 3 Increases Allergic and Irritant Contact Dermatitis. *J Invest Dermatol*.

- 2015 Feb;135(2):411-7. doi:
10.1038/jid.2014.402. (査読有)
6. Yamada K, Ueta M, Sotozono C, Yokoi N, Inatomi T, Kinoshita S. Upregulation of Toll-like receptor 5 expression in the conjunctival epithelium of various human ocular surface diseases. *Br J Ophthalmol*. 2014 ;. 98(8):1116-9. doi: 10.1136/bjophthalmol-2013-304645. (査読有)
 7. Ueta M, Sotozono C, Koga A, Yokoi N, Kinoshita S. Usefulness of a New Therapy Using Rebamipide Eyedrops in Patients with VKC/AKC Refractory to Conventional Anti-Allergic Treatments. *Allergol Int*. 2014 63:75-81 doi:10.2332/allergolint.13-0A-0605. (査読有)
 8. Ueta M, Mizushima K, Naito Y, Narumiya S, Shinomiya K,¹ Kinoshita S. Suppression of polyI:C-inducible gene expression by EP3 in murine conjunctival epithelium. *Immunol Lett*. 2013 Sep 12. pii: S0165-2478(13)00121-1. doi: 10.1016/j.imlet.2013.08.010. (査読有)
 9. Ueta M, Sotozono C, Yokoi N, Kinoshita S: Rebamipide Suppresses PolyI:C-Stimulated Cytokine Production in Human Conjunctival Epithelial Cells. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2013 Sep;29(7):688-93. doi: 10.1089/jop.2012.0054. (査読有)
- [学会発表](計 24件)
1. 上田真由美、徳永勝士、外園千恵、澤井裕美、木下茂. 感冒薬関連 Stevens-Johnson 症候群発症における EP3 遺伝子多型と HLA-A*02:06 の相互作用. 第 69 回日本臨床眼科学会、愛知県、名古屋市、2015.10.25.
 2. 上田真由美、徳永勝士、外園千恵、澤井裕美、木下茂. 感冒薬関連 Stevens-Johnson 症候群発症における HLA-A*02:06 と EP3 遺伝子多型の相互作用. 日本人類遺伝学会 第 60 回大会、東京都、新宿区、2015.10.16 (poster)
 3. Ueta M, Tokunaga K, Sotozono C, Sawai H, Yoon KC, Kim MK, Seo KY, Joo CK, Kinoshita S. HLA-A*02:06 and *PTGER3* polymorphism exerts additive effects in cold medicine-related Stevens-Johnson syndrome with severe ocular complications in Japanese and Korean populations. European Association for Vision and Eye Research (*EVER*) 2015, Nice, France, 2015. 10. 7.
 4. Ueta M, Shoji J, Sotozono C, Kinoshita S: Tear Markers for Atopic Keratoconjunctivitis. Allergy School e-PAD: EAACI Practical Allergy Diagnosis, Moscow, Russia, 2015. 8.27.
 5. Ueta M, Tokunaga T, Sotozono C, Sawai H, Kinoshita S: HLA-A*02:06 and *PTGER3* polymorphism exerts additive effects in cold medicine-related Stevens-Johnson syndrome with severe ocular complications. The European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), Barcelona, Spain, 2015.6.9.
 6. Mayumi Ueta, Chie Sotozono, Hiromi Sawai, Katsushi Tokunaga, Shigeru Kinoshita. *PTGER3* SNPs associated with Cold Medicine-Related Stevens-Johnson Syndrome/Toxic Epidermal Necrolysis with Severe Ocular complications. 2015 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). Denver, CO, USA. May 5. 2015.
 7. Mayumi Ueta, Jun Shoji, Chie Sotozono, Shigeru Kinoshita. Anti-inflammatory Effects of Rebamipide Eyedrops on Allergic Conjunctival Disease. 18th ANNUAL IOSS (International Ocular Surface Society) MEETING. Denver, CO, USA. May 2. 2015.
 8. 上田真由美、羽室淳爾、篠宮克彦、石井優、木下茂. poly :C点眼による眼表面炎症細胞の変化についての解析. 第 119 回日本眼科学会総会. 北海道、札幌市、2015.4.16.<poster>
 9. Mayumi Ueta, Jun Shoji, Chie Sotozono, Shigeru Kinoshita. Downregulation of IL-8, ECP, and total IgE in the tears of patients with atopic keratoconjunctivitis treated with rebamipide eyedrops. 2015 Asia-ARVO, 神奈川県、横浜市, Feb 18, 2015.
 10. Renata Ruoco Loureiro, 上田真由美、横井則彦、木下茂. レバミピドによるエンドセリン 1 抑制作用, 角膜カンファランス 2015.高知県、高知市、2015. 2.12.
 11. Mayumi Ueta, Jun Shoji, Chie Sotozono, Norihiko Yokoi, Shigeru Kinoshita.

- Suppressive effects of IL-8, ECP and total IgE in the tear of atopic keratoconjunctivitis by rebamipide eye drops. The European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2014(EAACI 2014), Copenhagen, Denmark, June 10, 2014.
12. Mayumi Ueta, Ayaka Koga, Masaru Ishii, Shigeru Kinoshita. Analysis of the Cellular Dynamics of LysM-Positive Cells in a Corneal Suture Mouse Model using Intravital Imaging. Imaging Conference 2014 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Orlando, FL, USA, 2014.5.3.
 13. Mayumi Ueta, Jun Shoji, Chie Sotozono, Norihiko Yokoi, Shigeru Kinoshita. Anti-inflammatory effects of rebamipide eye drops on allergic conjunctivitis with and without giant papillae. 2014 World Ophthalmology Congress of the International Council of Ophthalmology. 東京都、千代田区、2 April 2014.
 14. Yuriko Ban, Junko Tsujimoto, Keiko Yamada, Mayumi Ueta, Shigeru Kinoshita. The Change of the Barrier Function in hTERT Immortalized Corneal and Conjunctival Epithelia by Poly(I:C) Challenge. 2014 World Ophthalmology Congress of the International Council of Ophthalmology. 東京都、千代田区、2 April 2014.
 15. 井上亮太、上田真由美、古賀彩加、篠宮克彦、石井優、小泉範子、木下茂: LPS、polyI:C 点眼における角膜内の好中球動態解析、第38回日本角膜学会総会、角膜カンファランス 2014. 沖縄県、宜野湾市、2014. 1. 31.
 16. 古賀彩加、上田真由美、井上亮太、石井優、小泉範子、木下茂: 角膜縫合ならびに抜糸による角膜好中球浸潤の動態変化の解析。第38回日本角膜学会総会、角膜カンファランス 2014. 沖縄県、宜野湾市、2014. 1. 30.
 17. Ueta M, Mizushima K, Naito Y, Narumiya S, Kinoshita S. Suppression of polyI:C-inducible gene expression by EP3 in murine conjunctival epithelium. ISMA International Symposium on Molecular Allergology (ISMA) 2013, Vienna, Austria, 2013.12.5.
 18. 上田真由美、庄司純、外園千恵、横井則彦、木下茂. アトピー性角結膜炎患者の涙液中 IL-8ならびに IgE に対するレバミピド点眼薬の効果. 第 67 回日本臨床眼科学会神奈川県、横浜、2013.11.1
 19. Ueta M, Sotozono C, Koga A, Yokoi N, Kinoshita S: Anti-inflammatory effects of rebamipide eye drops on allergic conjunctivitis. 2013 TFOS (7th International Conference on the Tear Film & Ocular Surface) Taormina, Sicily, Italy 2013.9.20
 20. 上田真由美、庄司純、外園千恵、横井則彦、木下茂: アレルギー性結膜炎患者の涙液中 IL-8 に対するレバミピド点眼薬の効果. 第 47 回日本眼炎症学会、大阪府、大阪市、2013.7.12.
 21. 古賀彩加、上田真由美、井上亮太、石井優、小泉範子、木下茂: LysM-eGFP マウスを用いた角膜縫合による角結膜への影響についての解析. 第 47 回日本眼炎症学会、大阪府、大阪市、2013.7.12.
 22. Ueta M, Sotozono C, Yokoi N, Kinoshita K. The effect of rebamipide eye drops on allergic conjunctivitis with giant papilla. The EAACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology)-WAO (World Allergy Organization) Congress 2013, Milano, Italy 2013.6.25
 23. Ueta M, Narumiya S, Kinoshita S: Suppression of TLR3-Inducible Gene Expression by EP3 in Conjunctival Epithelium. 2013 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Seattle, Washington, USA, 2013.5.6.
 24. Koga A, Ueta M, Ishii M, Minamiyama R, Koizumi N, Kinoshita S: Kinetic analysis of neutrophils in a corneal-alkali-injury mouse model. 2013 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Seattle, Washington, USA, 2013.5.6.
- 〔図書〕(計 2 件)
1. 上田真由美, 結膜アレルギーの基礎知識. あたらしい眼科. 2015.4.30, Vol.32:No.4, p519-520, メディカル葵出版社

2. 上田真由美. プロスタグランジン E2 による自然免疫性炎症の抑制. 臨床免疫・アレルギー科 2013, 60 (6): 619-627. 科学評論社.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://frontier-medueta.com/research/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 真由美 (UETA Mayumi)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60398386