

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670734

研究課題名(和文) 角膜内皮と線維柱帯は、免疫ネットワーク制御をうけるのか：戦略的病態解明と治療開発

研究課題名(英文) Role of immune networks of corneal endothelium and trabecular meshwork

研究代表者

宮崎 大 (Miyazaki, Dai)

鳥取大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30346358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：角膜内皮炎を始めとした種々の角膜内皮障害は、眼圧上昇や水疱性角膜症の発症の誘因になり不可逆性の視力障害を来し得る。そこで眼圧上昇や角膜内皮炎の臨床的関連性からこれらがいかにネットワークを形成しえるかに着目し、そのコンセプトに関わる機序を明らかにした。とくに角膜内皮は、ウイルス感染に際して自然免疫系に加えて獲得免疫系の賦活化の機能をもつことが判明した。一方、角膜内皮は、ウイルス感染や炎症により頑強な自然免疫応答を誘導したが、これにより誘導されえるメディエータは、二次性緑内障の特徴的所見と関連し、線維柱帯リモデリングを介して二次性緑内障に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Corneal endotheliitis and anterior chamber inflammation cause bullous keratopathy or secondary glaucoma leading to significant visual morbidity. Clinical findings on etiology of diseases strongly suggested strong association with endothelial inflammation and intraocular pressure elevation (IOP). Upon inflammatory stimulus including viral infection, corneal endothelial cells provoke strong innate immune response as well as activation of acquired immune arm. Analysis of the mediators released by innate immune response showed significant association with clinical parameters of secondary glaucoma. Analysis of trabecular meshwork cells upon these stimuli suggested their roll on remodeling of trabecular meshwork.

研究分野：眼科学

キーワード：角膜内皮

1. 研究開始当初の背景

角膜内皮

角膜内皮炎を始めとした種々の角膜内皮障害は、眼圧上昇や水疱性角膜症の発症の誘因になり不可逆性の視力障害を来し得る。角膜内皮障害の原因として、角膜内皮炎や偽落屑症候群や Fuchs 虹彩異色性虹彩毛様体炎を始めとする二次性緑内障に加え、角膜内皮炎がよく知られている。角膜内皮炎は、特徴的な角膜内皮障害に加えて眼圧上昇への寄与が特徴である。とくにサイトメガロウイルス (CMV) を始めとするウイルス感染による角膜内皮炎は、慢性かつ持続性の内皮障害にくわえて高度の眼圧上昇をきたすが、その病態の詳細は明らかではなかった。さらにその病態を理解する上で、角膜内皮に CMV が感染しえるのか、さらに感染すれば角膜内皮がいったいどんな防御反応をきたすのかも不明であった。一方、角膜内皮炎や角膜内皮障害をきたす病態と、二次性緑内障との病態との比較から、共通の障害経路が示唆されていたが、そうしたメカニズムが存在しえるのかも不明であった。そこでいわゆる inflammatory ocular hypertension syndrome と角膜内皮障害を包括する概念を想定した。まず、角膜内皮の障害機序を免疫学的な観点から解析を試み、線維柱帯障害へいかに寄与し得るかの解析を試みた。

2. 研究の目的

一般に角膜内皮炎は、ウイルス感染といった免疫学的機序によりおこり、二次性緑内障の病態とはまったく異なる。しかし、二次性緑内障の分子病態も含め、ともに炎症という観点から制御されている可能性が想定された。たとえば、二次性緑内障の原因の一つである偽落屑症候群においては、IL-6 を始めとするサイトカインの増大を特徴とする炎症性プロフィールを呈していた。つまり、炎症というキーワードから二次性緑内障を含めた共通の病態を解明することを目的とした。そこで典型的な免疫疾患と想定される角膜内皮炎の病態モデルの詳細な解析から始めその詳細な発症メカニズムの知見をえることとした。次に、二次性緑内障との関連性を、まず臨床面から解析を試み、前房内で角膜内皮に隣接する線維柱帯とのクロストークを想定し病態解析を試みた。

3. 研究の方法

代表的な角膜内皮炎を来たすウイルスは、単純ヘルペスウイルス (HSV) 及び CMV であり、ヒト角膜内皮細胞を用いて、まず HSV-1 の感染における分子応答の解析を行った。次に、角膜内皮細胞に CMV 株が感染しえるかを検証した。さらに感染後の分子応答を検証するため、トランスクリプトーム及びプロテオーム解析を行い、代表的な分子ネットワー

クとその責任候補遺伝子群を同定した。さらに、無菌性炎症の各種モデルリガンドへの応答を検討した。

CMV 感染後の内皮細胞が、自然免疫系を活性化しえるかを炎症性サイトカイン及びケモカイン群の産生評価を用いて検討した。次に感染後、角膜内皮が炎症性モデレータとしてホストの獲得免疫系を刺激し得るかを検討した。この検証には MHC クラス I 拘束性 cytotoxic T lymphocyte reaction (CTL) の誘導を CMV 既感染者由来の CD8⁺ T リンパ球を用いて解析した。

二次性緑内障における臨床所見に関連する炎症性因子群の同定を試みるため、二次性緑内障患者由来の前房水のプロテオーム解析を行い一般化線形モデルによる多変量解析を行った。次に、これにより得られた因子群と角膜内皮細胞の炎症応答により産生される因子群の関連性の解析より、線維柱帯機能への影響が仮定できる因子群の同定を行った。次に線維柱帯細胞を用いて、これらの因子群への影響を解析するためそのトランスクリプトームを取得し機能解析を試みた。

4. 研究成果

角膜内皮細胞がどのように自己をウイルス感染から防御するかを検討した。まず、過去の感染の既往がない状態で、感染内皮細胞が、単独で CMV を駆逐する機構を備えているかを検討した。

また、角膜内皮に対する炎症反応がいかなる応答を發揮しえるかをウイルス感染応答、さらに無菌性炎症リガンドに対する応答の解析を行った。

まず、HSV 及び CMV 感染後の転写応答は、いずれもパターン認識型レセプター、1 型インターフェロン応答が主たるネットワークを形成した。また、その刺激によりインターフェロン、IP-10 を始め多種類の炎症性メディエータが産生されることから、自然免疫型の応答が角膜内皮では強く誘導されることが判明した。また、無菌性炎症リガンドを用いて刺激を行った場合も強い 1 型インターフェロン産生応答がみられた。つまり、角膜内皮細胞は、各種炎症刺激に対して自然免疫系、とくに 1 型インターフェロンに総括される反応を誘導することが判明した。

角膜内皮細胞がどのように自己をウイルス感染から防御するかを検討した。まず、過去の感染の既往がない状態で、感染内皮細胞が、単独で CMV を駆逐する機構を備えているかを検討した。CMV 感染後の角膜内皮は、自然免疫系として 1 型インターフェロンを介した抗ウイルス応答が発動されるが、これにより十分な抗ウイルス作用を發揮しえるかを検討するため、1 型インターフェロン誘導の主要

シグナル経路を同定した。次に、その欠損細胞株を作成して検証した。その結果、欠損細胞において内皮細胞における HSV 増殖の顕著な増大は認めなかった。

一方、I 型インターフェロンは、免疫記憶を介して獲得免疫系を増強するための必須のサイトカインである。そこで次に角膜内皮の防御が、獲得免疫系の増強に頼っている可能性を考慮しその寄与の検証を試みた。

とくに、HSV, CMV いずれの感染においても角膜内皮の主要転写ネットワークは、抗原提示機能とも関連づけられたため、抗ウイルス作用として獲得免疫系の賦活化機能を検証した。角膜内皮は、HSV, CMV いずれの感染においても、既感染ドナー由来の CD8⁺T 細胞と共培養した場合、CD8⁺T 細胞をリプライミングすることができ、これらの CD8⁺ は、抗原特異的にグランザイムを放出し、CTL 活性を有していた。このことは、感染角膜内皮は、抗ウイルス活性として獲得免疫系の賦活化機能を持ち、かつ感染内皮を障害しえることが判明した。

しかしながら、角膜内皮が感染後、抗ウイルス作用をもつ CTL を活性化するなら内皮細胞自身が障害され、ひいては、水疱性角膜症をきたす可能性がある。また、角膜内皮は、前房関連性免疫偏倚の一端を担うことが知られているため、内皮自体が同時に獲得免疫系抑制機能をそなえている可能性を想定した。そこで、既感染者由来のドナーヘルパー CD4⁺T 細胞が HSV 感染内皮により抗原提示を受け刺激されるか検討した。その結果 ウイルス特異的 CD4⁺T 細胞はリプライミングされるが同時に調節性 T リンパ球が誘導されることが判明し、このサブセットが炎症抑制に寄与している可能性が想定された。

そこで、その該当候補因子を探索するため、HSV 及び CMV 感染後内皮のトランスクリプトーム解析を行った。その結果候補因子として indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) の強発現を認めた。さらなる解析より調節性 T 細胞(Treg)誘導アッセイ系において、角膜内皮自体により誘導される因子の寄与が想定された。そこで、IDO1 が Treg 誘導に寄与し、炎症抑制に関与するかを検討した。その結果、角膜内皮において IDO1 の阻害、及び強制発現により IDO1 が内皮における Treg 誘導に寄与することが判明した。

CMV 感染症において角膜内皮が障害をうける機序は、ウイルス感染自体による障害に加え、活性化 CTL による障害の二つの機序が存在することが明らかになった。CMV 感染自体の障害は、感染 CMV 株に大きく依存し、感染後の productive なウイルス量も異なっていた。一方、CMV ウイルスタンパクの発現をみた場合

Immediate early protein(IE1)や pp65 の顕著な発現を認めた。獲得免疫系を感染内皮が刺激する場合、これらウイルスタンパクのエピトープが寄与している可能性を想定して解析を行った。その結果、IE1, pp65 のエピトープのいずれもが角膜内皮による CMV 特異的メモリー T 細胞のリプライミングに寄与し、CTL 活性を発動させた。以上の結果から、これらの主要エピトープが、角膜内皮障害を防ぐ上で重要である可能性が示唆された。

次に、ウイルス感染を始めとして炎症性眼圧上昇の機序を探るため、解放隅角緑内障、新生血管緑内障の患者の前房水のプロテオーム解析を行った。その結果、前房内の IL-15、MCP-1 上昇が病態に寄与する可能性が示唆された。

一方、角膜内皮の炎症刺激により誘導されるサイトカインのプロテオーム解析の結果とあわせて検証すると MCP-1 は、HSV や CMV 感染後、角膜内皮によっても多量に分泌されていることが判明した。このため、MCP-1 や関連炎症性サイトカインが実際 inflammatory ocular hypertension syndrome としての病態のメディエータである可能性がうかがわれた。そこで、次に培養線維柱帯細胞の MCP-1 反応性トランスクリプトームを検証した。その結果、インテグリンを始めとする細胞骨格制御への寄与が示唆され、これら炎症性サイトカインが二次性緑内障の重要なモデレータである可能性が示唆され、さらなる検証を進めつつある。

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 6 件)

Noriko Koizumi, Dai Miyazaki, Tomoyuki Inoue, Fumie Ohtani, Michiko Kandori-Inoue, Tsutomu Inatomi, Chie Sotozono, Hiroko Nakagawa, Tomoko Horikiri, Mayumi Ueta, Takahiro Nakamura, Yoshitsugu Inoue, Yuichi Ohashi, Shigeru Kinoshita. The effect of topical application of 0.15% ganciclovir gel on cytomegalovirus corneal endotheliitis. Br J Ophthalmol 査読あり 2016
doi:10.1136/bjophthalmol-2015-308238

宮崎大、魚谷竜、神鳥美智子、井上幸次、山上聡、錫谷達夫、細貝真弓、磯村寛樹. 角膜内皮はサイトメガロウイルス特異的抗ウイルス応答を制御する. 日眼会誌 査読なし 2016 102 巻 6 号

Noriko Koizumi, Tsutomu Inatomi, Takashi Suzuki, Atsushi Shiraishi, Yuichi Ohashi, Michiko Kandori, Dai Miyazaki,

Yoshitsugu Inoue, Takeshi Soma, Kohji Nishida, Hiroshi Takase, Sunao Sugita, Manabu Mochizuki, Shigeru Kinoshita, for the Japan Corneal Endotheliitis Study Group. Clinical features and management of cytomegalovirus corneal endotheliitis: analysis of 106 cases from the Japan corneal endotheliitis study Br J Ophthalmol 査読あり 2015 Jan;99(1):54-8. doi:10.1136/bjophthalmol-2013-304625

Haruki T, Miyazaki D, Inata K, Sasaki S, Yamamoto Y, Kandori M, Yakura K, Noguchi Y, Touge C, Ishikura R, Touge H, Yamagami S, Inoue Y. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 in corneal endothelial cells limits herpes simplex virus type 1-induced acquired immune response. Br J Ophthalmol. 査読あり 2015 Oct;99(10):1435-42. doi: 10.1136/bjophthalmol-2015-306863

Haruki T, Miyazaki D, Matsuura K, Terasaka Y, Noguchi Y, Inoue Y, Yamagami S. Comparison of toxicities of moxifloxacin, cefuroxime, and levofloxacin to corneal endothelial cells in vitro. J Cataract Refract Surg. 査読あり 2014 Nov;40(11):1872-8. doi: 10.1016/j.jcrs.2014.08.027.

宮崎大, 神鳥美智子, 野口由美子, 矢倉慶子, 山上聡, 錫谷達夫, 井上幸次. 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. 日眼会誌. 査読なし 117 (11): 931-933, 2013

〔学会発表〕(計 10 件)

Uotani R, Miyazaki D, Inoue Y, Hosogai M, Suzutani T. Activation of cytotoxic T lymphocytes by corneal endothelial cells after infection of human cytomegalovirus ARVO, 2016/5/1 Seattle, USA

宮崎大, 蝶野郁世, 小松直樹, 武信二三枝, 永瀬大輔, 川本由紀美, 春木智子, 池田欣史, 馬場高志, 井上幸次, 血管新生緑内障の病態マーカーの探索 第 120 回日本眼科学会 2016/4/7 仙台国際センター(宮城県仙台市)

Miyazaki D, Uotani R, Kandori M, Inoue Y, Yamagami S, Suzutani T, Hosogai M, Isomura H. Acquired immune response of corneal endothelial cells after cytomegalovirus infection 第 40 回角膜カンファレンス 2016/2/20 軽井沢プリンスホテルウエスト(長野県北佐久郡軽井沢町)

魚谷 竜, 宮崎 大, 井上美智子, 野口由美子, 井上幸次, 錫谷達夫, 細貝真弓, 磯村寛樹. サイトメガロウイルス角膜内皮炎患者における角膜内皮の免疫賦活化作用 第 29 回 ヘルペスウイルス研究会 2015/6/5 長崎につしょうかん(長崎県長崎市)

D Miyazaki, Immune privileged role of Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 in corneal endothelial cells exploited by Herpes Simplex Virus Type 1. Asia ARVO 2015/2/17, パシフィコ横浜

Dai Miyazaki. Role of RAGE in interferon response of corneal endothelial cells after HSV-1 infection International herpes virus workshop 2014/7/21 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

宮崎大, HSV 感染角膜内皮と自然免疫 第 51 回眼感染症学会 2014/7/5 東京国際フォーラム(東京)

宮崎大, サイトメガロウイルスの角膜内皮感染応答 第 51 回眼感染症学会 2014/7/4 東京国際フォーラム(東京)

神鳥 美智子, 宮崎 大, 野口 由美子, 矢倉 慶子, 大谷 史江, 井上 幸次, 山上聡 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 2014/1/30 第 38 回角膜カンファレンス, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

Kandori M, Miyazaki D, Yakura K, Noguchi Y, Yamamoto Y; Inoue Y, Suzutani T. Human Cytomegalovirus-mediated inflammatory responses in corneal endothelial cells ARVO 2013/5/2 Seattle, USA

〔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

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

(2) 研究分担者

井上 幸次 (Inoue,
Yoshitsugu)
鳥取大学医学部・視覚病態学・教授
研究者番号：10213183

(3) 連携研究者

()

研究者番号：