

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871178

研究課題名(和文) 結膜線維芽細胞のエピジェネティック変化によるアレルギー炎症の増悪メカニズムの解明

研究課題名(英文) Critical roles of epigenetic modifications in conjunctival fibroblasts on the development of severe ocular allergic conjunctivitis

研究代表者

岡田 直子 (OKADA, NAOKO)

独立行政法人国立成育医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：50636165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：重症アレルギー性角結膜炎は結膜の強い炎症や線維化を主体とする難治性の疾患であるが、その機序は不明である。申請者はこれまでに、IFN- γ が結膜線維芽細胞のエピジェネティック変化を引き起こし、CCL11の過剰な発現亢進に繋がる機序の存在を明らかにしている。本研究では、重症アレルギー性眼疾患患者由来の線維芽細胞の表現型の変化の全容を明らかにし、エピジェネティクスが関与しているかどうかを確認した。さらに炎症局所でのエピジェネティクスを制御する可能性のある因子を同定することを試みた。

研究成果の概要(英文)：Atopic keratoconjunctivitis and vernal keratoconjunctivitis are severe, chronically relapsing, ocular inflammatory diseases that cause intense inflammation and fibrosis in conjunctiva. However, the mechanism increasing the severity of these diseases remains unknown. We previously found that IFN- γ had distinct roles that might induce epigenetic modifications in conjunctival fibroblasts which lead to an overproduction of CCL11. In this study, we attempted to clarify phenotypic characteristics of conjunctival fibroblasts derived from severe allergic conjunctivitis that was thought to accompany by epigenetic modifications, and to identify possible molecules that regulated epigenetic profile at the site of chronic inflammation in ocular allergic conjunctivitis.

研究分野：アレルギー

キーワード：アレルギー 線維芽細胞 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

重症アレルギー性角結膜炎は結膜の強い炎症や線維化を主体とし、合併症により重大な視機能障害を引き起こす眼慢性炎症疾患であるが、難治化に至る機序は不明である。

眼アレルギーの重症化に至る病態メカニズムのひとつとして、アレルギー性炎症の局所においては、微小環境中に存在する様々な因子やストレスにตอบสนองして線維芽細胞が活性化され、炎症の増悪化を引き起こす可能性が報告されている。これまでに申請者らは、ヒト角結膜線維芽細胞が IL-4 や TNF に反応して CCL11 や CCL5 などのケモカインを大量に産生することを見出し、眼局所の線維芽細胞がアレルギー性炎症の組織傷害などに重要な役割をもつ好酸球の遊走・活性化に深く関わることを明らかにしてきた (Allergol Int. 2009)。

また申請者は、重症アレルギー性眼疾患患者の涙液中で高値となるにも関わらず、その意義の不明な IFN- γ に着目し、IFN- γ がヒト結膜線維芽細胞からの遺伝子発現にどのような影響を及ぼすかを検討してきた。

線維芽細胞へ IFN- γ 刺激を行うと、短時間 (3~24 時間) では既知のとおりインターフェロン応答遺伝子などが速やかに発現誘導される。しかし興味深いことに、IFN- γ 刺激後 72 時間以上経過すると、短時間では誘導されないアレルギー炎症関連遺伝子 (CCL11 や CCL5 など) の発現が増加し、2 週間維持される。この発現はステロイドでは抑制されない。さらに IFN- γ 刺激 7 日後のヒストン修飾状態をクロマチン免疫沈降法 (ChIP) で調べたところ、CCL11 や CCL5 のプロモーター領域では転写活性の高い遺伝子座に存在する histone H3 lysine 4 のトリメチル化 (H3K4me3, 活性型) が増加し、逆に転写不活性領域に存在する histone H3 lysine 9 のトリメチル化 (H3K9me3, 不活性型) が減少していた。以上より IFN- γ には、既知のインターフェロン応答遺伝子群の発現増強効果のほかに、異なる仕組みでアレルギー関連遺伝子のエピジェネティックな発現亢進作用を有することを分子レベルで明らかにした (平成 22-23 年度学術振興会特別研究員研究助成、投稿準備中)。しかし、重症アレルギー性眼疾患患者由来の線維芽細胞が、局所の微小環境中で実際にエピジェネティック変換を受け、新たに病態形成に関与する表現型が獲得されているかどうかについては、まだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

これまでの研究結果を踏まえ、重症アレルギー性眼疾患患者由来の線維芽細胞が、眼局所微小環境中で実際にエピジェネティック変換を受け、病態形成に関与する表現型が新たに獲得されていることを検討するため、次の 2 点を実施する事で研究目標に漸近したい。

(1) 重症アレルギー性眼疾患患者由来線維芽細胞における「表現型」を解析し、エピジェネティクスが関与していることを検証すること

(2) 結膜線維芽細胞においてエピジェネティック変換を誘導可能な「候補因子」を解析すること

3. 研究の方法

(1) 重症アレルギー性眼疾患患者由来結膜線維芽細胞における「表現型」の解析

重症アレルギー性眼疾患患者の炎症局所組織由来の結膜線維芽細胞と正常結膜線維芽細胞をそれぞれ同一条件で培養する。マイクロアレイを用い、未刺激の状態での遺伝子発現について正常組織由来線維芽細胞と比較検討し、重症アレルギー結膜疾患患者線維芽細胞において無刺激状態においても遺伝子発現が高い「アレルギー重症化遺伝子」を抽出する。さらにこれらの遺伝子について、mRNA およびたんぱく発現を定量 PCR、ELISA で測定し、再現性を確認する。

さらにこの時に、コンタミネーションする可能性の高い上皮系の細胞や筋線維芽細胞 (myofibroblast) との異同を形態学的に調べるために、 α -SMA, pan-cytokeratin および vimentin 免疫染色を蛍光抗体法により行い、蛍光顕微鏡下で観察する。

(2) 結膜線維芽細胞においてエピジェネティック変換を誘導できる「候補因子」の解析

正常結膜線維芽細胞を培養し、重症アレルギー眼疾患の涙液中あるいは組織中に存在することが既知である「候補因子」により刺激を行い、(1) で同定した「アレルギー重症化遺伝子」の発現変動 (mRNA, たんぱく) について定量 PCR および ELISA を用いて比較検討する。今回は 2 型サイトカイン (IL-4, IL-13)、1 型サイトカイン (IFN- γ)、炎症性サイトカイン (TNF, IL-1, IL-6)、線維化誘導因子 (TGF- β)、上皮由来アレルギー誘導サイトカイン (TSLP, IL25, IL33)、Th17 サイトカイン (IL-17)、ウイルスおよび細菌感染の mimic として TLR ligand (polyI:C, LPS) について検討を行う。これらの「候補因子」がエピジェネティック変換を誘導していることを検証するために、まず「候補因子」処理から 7 日目までの経時的な遺伝子発現変動を観察する。長期に遺伝子発現が確認された因子については、さらに刺激後に一度 wash out を行い、一定期間細胞増殖させた後の遺伝子発現への影響も確認する。また、この際には長期刺激による細胞毒性や各種ストレスマーカー (cellular aging, apoptosis) の発現がないことを確認し、系を確立させる。「アレルギー重症化遺伝子」の発現を誘導した「候補因子」については、さらにサイトカイン刺激後、2 次的なアレルギー刺激 (IL-4, IL-13 など) との相互作用についても、定量 PCR および ELISA で検討

を行う。

(3) 重症アレルギー由来細胞における「アレルギー重症化遺伝子」プロモーターのヒストン修飾の解析

(1) で同定した「アレルギー重症化遺伝子」が重症アレルギー炎症組織中でエピジェネティック変換を誘導されていることを確認するため、重症アレルギー性眼疾患由来結膜線維芽細胞について、無刺激の状態での抗ヒストン抗体を用いて「アレルギー重症化遺伝子」のプロモーター領域のクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行い、定量 PCR を用いて、正常結膜線維芽細胞と比較する。ChIP 抗体は、histone H3 のメチル化抗体 (K4me3, K9me3, K27me3) histone H4 のアセチル化抗体、histone H3 のアセチル化抗体 (acetyl K9, acetyl K14) を用いた。

4. 研究成果

(1) 重症アレルギー性眼疾患患者由来結膜線維芽細胞における「表現型」の解析

まず、無刺激の状態の重症アレルギー性結膜炎由来結膜線維芽細胞において、正常結膜線維芽細胞と比べて高発現する遺伝子をマイクロアレイで解析した。その結果、すでに申請者らで検証済である CCL11 の他、細胞外マトリックスたんぱく質であるペリオスチンや CCL26 などのケモカイン、コラーゲン (COL10A1, COL13A1)、細胞外マトリックス分解酵素 (MMP3, MMP12)、細胞増殖因子 (EREG, AREG, HBEGF) など、アレルギー性炎症における関与が報告されているいくつかの遺伝子群が発現増強されていることがわかった。さらに、ペリオスチンと CCL26 については、定量 PCR および ELISA で検討を行い、再現性を確認した。今回検討に用いた培養結膜線維芽細胞は、組織より培養を開始してから 3 回から 5 回の継代培養 (約 6~8 週間) を実施しており、ほぼ完全に線維芽細胞として純化されていることを vimentin および pan-cytokeratin 染色により検証した。さらに、 α -SMA 染色を実施し、重症アレルギー性角結膜炎由来と正常由来の結膜線維芽細胞において、筋線維芽細胞 (myofibroblasts) へ形質転換した細胞の存在比率には差がないことを確認した。

このような長期にわたる培養の後でも、重症アレルギー性眼疾患患者由来の線維芽細胞では、無刺激の状態にもかかわらず持続して高発現が維持されていることから、よってこれらを新たな「アレルギー重症化遺伝子」の候補とした。

(2) 結膜線維芽細胞においてエピジェネティック変換を誘導できる「候補因子」の解析

重症アレルギー性角結膜炎患者の涙液中で高発現しているサイトカインあるいは重症アレルギー性眼疾患に重要な作用を持つことが既知の因子のうち、IL-4, IL-13, IFN-

TGF- 1, TSLP, IL25, IL33, IL-17, polyI:C, LPS を用いて正常結膜線維芽細胞に刺激を行った。その際、刺激開始から 3 時間~7 日目までの経時的な遺伝子発現変動を調べた。対象とする遺伝子には、(1) で同定された候補遺伝子のうち、今回はペリオスチンおよび CCL26 について標的を絞り検証を行った。その結果、IL-4, IL-13 および TGF- 1 は比較的短時間 (3 時間~72 時間) におけるペリオスチンの遺伝子およびたんぱく発現の誘導だけでなく、その後 7 日目までの持続的な発現誘導にも関与することがわかった。さらに wash out 後にも、若干低下傾向が認められるものの持続的な発現が観察された。また、TGF- 1 で 7 日間刺激した後、IL-13 で再刺激を行った場合には、ペリオスチンだけでなく CCL26 の遺伝子発現を相乗的に増加させることを明らかにした。よって、IL-4, IL-13 および TGF- 1 は重症アレルギー性眼疾患由来線維芽細胞における遺伝子発現増強に関与している可能性が示唆された。一方、CCL11 のエピジェネティックな発現誘導に関連性がある IFN- は、長期的に細胞に作用させることで、むしろペリオスチンや CCL26 の遺伝子発現を減弱させることがわかった。また、IL17, IL25, TSLP, IL33 は単独刺激条件においては、上記の遺伝子発現にほとんど影響しなかった。

(3) 重症アレルギー由来細胞における「アレルギー重症化遺伝子」プロモーターのヒストン修飾の解析

(1) で選ばれた候補遺伝子のうち、ペリオスチンおよび CCL26 について、プロモーター領域におけるエピジェネティック変化のうち、ヒストンの修飾状態を ChIP assay により検討した。結果、各遺伝子のプロモーター領域 (今回は転写開始点より~600bp 下流の範囲を検討) における H3K4me3、H3K9me3、Acetyl H4、Acetyl H3K9、Acetyl H3K14 のヒストン修飾には有意な変化が確認できなかった。一方、CCL11 のプロモーター領域においては H3K4me3 が増加し、H3K9me3 が減少することを確認した。よって、ペリオスチン、CCL26 は、これまでに申請者が明らかにしてきた CCL11 のエピジェネティック変化とは異なる機序で、重症アレルギー性結膜炎由来結膜線維芽細胞で発現制御されていることがわかった。今後は、ペリオスチンおよび CCL26 のエピジェネティック変化について、CCL11 との制御メカニズムの異同を中心とし、さらに解析範囲を広げて慎重に検討を行う予定である。

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)

〔学会発表〕(計 3 件)

Naoko Okada, Hiroshi Fujishima, Kazumi Fukagawa, Akio Matsuda, Hirohisa Saito, Kenji Matsumoto. “Cytokine secretion profiles in the tears of patients with chronic allergic conjunctivitis” The American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (AAAAI), 2014年2月28日～3月4日, San Diego

Naoko Okada, Hiroshi Fujishima, Kazumi Fukagawa, Akio Matsuda, Hirohisa Saito, Kenji Matsumoto. “Cytokine secretion profiles in the tears of patients with chronic allergic conjunctivitis” 30th SYMPOSIUM OF THE COLLEGIUM INTERNATIONALE ALLERGOLOGICUM, 2014年9月13日～9月18日, Petersburg, Germany

岡田直子、藤島浩、深川和己、松田明生、齋藤博久、松本健治 “重症アレルギー性眼疾患患者の涙液におけるサイトカインプロファイル解析” 第26回日本アレルギー学会、2014年5月9日～5月11日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田直子 (OKADA NAOKO)

独立行政法人国立成育医療研究センター
研究所・免疫アレルギー研究部・研究員
研究者番号：50636165