

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462698

研究課題名(和文)アトピー眼症における組織線維化とナチュラルヘルパー細胞の制御

研究課題名(英文)Regulation of tissue fibrosis and natural helper cells in ocular atopy

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：涙腺に多量に存在するナチュラルヘルパー(NH)細胞がアトピー性炎症の発症時に涙液(導管)経由で、またはリンパ管、血管経由で移動するのかを明らかにするため、涙腺を除去したマウスにブタクサ花粉結膜炎を発症させ、NH細胞除去の影響を検証した。その結果、涙腺除去は好酸球浸潤数には影響しない一方、涙腺除去マウス(特にIL-33欠損涙腺除去マウス)において強い角膜炎を認めた。この結果はNH細胞が角膜の恒常性維持に貢献している可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：In previous study we found abundant distribution of natural helper cell (NH cell) in lacrimal gland. We investigated the roles of NH cells for the ocular surface pathology by removing extra orbital lacrimal gland tissue in mouse, and then made ragweed induced experimental allergic conjunctivitis. We found that lacrimal gland excision did not affect the number of infiltrated eosinophils. On the other hand lacrimal gland excision did induced strong corneal inflammation especially in IL-33 knockout mice. Our results suggested that NH cells and IL-33 may contribute to the homeostasis of ocular surface.

研究分野：眼科学

キーワード：ナチュラルヘルパー細胞 涙腺 アレルギー性結膜炎

1. 研究開始当初の背景

先進国において多くの罹患者があるアトピー性疾患は過剰な 2 型免疫反応が病態の根本にある。重症のアトピー性皮膚炎に合併するアトピー眼症(角結膜炎、網膜剥離、白内障、緑内障)においては、組織線維化による視機能の低下が問題となる。これまでの臨床研究の結果から(1)アトピー角結膜炎(AKC)においては角膜の癒痕化、(2)アトピー網膜剥離においては網膜硝子体の線維性増殖を伴う増殖性網膜硝子体症の発症、(3)アトピー白内障においては、水晶体上皮細胞の筋線維芽細胞への転化をともなう前嚢下白内障の出現、(4)アトピー皮膚炎にともなう緑内障(アトピー緑内障)では、前房水の流出路の線維化による眼圧上昇と結膜組織の癒痕化による緑内障手術の成績不良といったアトピー眼症に伴う問題点がわかってきた。申請者はアトピー白内障において、アトピー眼症に伴う組織線維化の研究を進めてきた。アトピー白内障の病理像では、水晶体上皮細胞が筋線維芽細胞に転換する現象(epithelial mesenchymal transition: EMT)が観察され、TGF β およびプロテアーゼインヒビターである plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)の発現が EMT に関連していることを報告した。また、アトピー緑内障においては房水流出路に 10-30nm 径の異常微細線維が沈着していることを発見し、組織の線維化が病態に関連していることを発見した。これらの研究をきっかけに、2 型免疫反応とアトピー眼症における組織線維化に焦点を絞った研究を着想するに至った。元来寄生虫に対する防御機構として発達した 2 型免疫反応は、寄生虫が細菌と比較すると物理的に大きいため、マクロファージによる貪食ではなく、好酸球等から放出されるケミカルメディエーターによって寄生虫を弱らせ、その虫体を細胞外マトリックスの被膜で包んで排除する分子機構であり、組織の線維線維化を促進させる性質を有している。また最近、2 型免疫反応のトリガーとして、獲得免疫系に依存せずにアレルゲンや外傷等の直接的な細胞障害によって、上皮細胞からアラミン分子として放出される 2 型免疫誘導サイトカイン IL-33 と IL-33 刺激を受けて活性化する natural helper(NH)細胞が多量の IL-13 や IL-5 を産生することで、組織線維化を誘導するメカニズムが近年注目されている。申請者はこれまでにヒト重症アトピー性角結膜炎(AKC)の組織において IL-33 が高発現していること、また Lineage-CD25⁺CRTH2⁺CD127⁺の NH 細胞が存在することを報告してきた(第 117 回日本眼科学会総会)。また、NH 細胞の存在が実験的アレルギー性結膜炎の発症および重症化に重要であることを発見した。実際、IL-33 刺激をうけて活性化された NH 細胞が組織線維化に必須の役割を果たしていることが、肝臓、皮膚および肺の系で報告されて

おり、眼においても IL-33 と NH 細胞が組織線維化に重要な役割を果たしていることが予想される。また、アトピー性角結膜炎のみならず、アトピー白内障やアトピー網膜剥離でも搔痒感のために慢性的に眼球を叩打することが病態に関連していることが報告されており、慢性的な外傷によって IL 恒常的に放出されている IL-33 とそれによって活性化された NH 細胞がアトピー眼症においても組織線維化を誘導している可能性が考えられる

2. 研究の目的

本研究ではアトピー眼症に共通する 2 型免疫反応による眼組織の線維化において、IL-33 および NH 細胞が果たす役割に焦点を当て、そのメカニズムの探求と制御をおこなう。具体的には遺伝子改変マウス(IL-33 ノックアウトマウス、NH 細胞を欠く Rag2/common ノックアウトマウス)を用いて、眼における 2 型炎症に伴う組織線維化モデルを作成し、2 型免疫誘導サイトカイン IL-33 と NH 細胞がアトピー眼症における組織線維化に果たす役割を評価する。さらに IL-33 中和抗体とデコイ受容体を用いて組織線維化の抑制を試みる。同時にアトピー眼症のヒト臨床サンプルを駆使して、実際のヒトの病態との関連も検証する。

3. 研究の方法

(1)NH 細胞を *in vivo* で観察するためのマウスモデル系を構築：NH 細胞は IL-13 を高発現しており、リンパ球を欠く Rag2(-/-)IL-13-YFP-Tg レポーターマウスは、YFP 陽性 IL-13 発現細胞の多くが NH 細胞であることから、NH 細胞の *in vivo* 観察モデルとして有用と考えられる。同マウスの YFP 陽性細胞の性質を FACS で検証し、NH 細胞の *in vivo* 観察モデルを樹立する。

(2)眼球への NH 細胞の流入経路の検討：申請者は、マウス涙腺の導管近傍に多量の NH 細胞が存在することを発見している。NH 細胞がアトピー性炎症の発症時に涙液(導管)経路で、またはリンパ管、血管経路で移動するのかを明らかにするため、Rag2(-/-)IL-13-YFP-Tg マウスにパパイン浸漬ソフトコンタクトレンズを装着させることで好酸球浸潤を伴う結膜炎を発症させた上で眼窩外涙腺を露出し、蛍光実体顕微鏡を用いて *in vivo* で NH 細胞の動態を確認する。さらに脈絡膜、眼球周囲の脂肪組織等における NH 細胞の分布を確認する。これらのデータは以後の実験遂行のための基礎データとなる。

(3)アトピー網膜剥離、アトピー白内障、アトピー緑内障における組織線維化と IL-33・NH 細胞の関連：アトピー網膜剥離、アトピー白内障、アトピー緑内障の手術中に得た前房水、網膜下液、水晶体前嚢、線維柱帯組織における IL-33 タンパク発現を定量す

る。対照としてアトピー合併のない網膜剥離、白内障、緑内障の臨床サンプルを用いる。また組織線維化の程度を示す alpha-smooth muscle actin(α -SMA)発現量と IL-33 発現量の相関を検証する。さらに網膜下液および線維柱帯組織における NH 細胞の存在を確認するために網膜下液の細胞成分を収集しフローサイトメトリーによる NH 細胞の同定 (Lineage⁻CD25⁺CRTH2⁺CD127⁺) ならびにカウントを施行し、線維柱帯組織では免疫組織染色 (Lineage⁻CRTH2⁺CD127⁺) によって NH 細胞を同定、ヒトサンプルで仮説を検証する。

(4) アトピー白内障モデルマウス作成：Ovalbmin(OVA) で感作した Rag2(-/-)IL-13-YFP-Tg マウスの前房内に OVA と 2 型炎症のアジュバントして作用することが報告されているチタン粒子を注入し(Mishra P et al. J Immunol. 2011)、白内障モデルを作成する。血中および眼球内の OVA 特異的 IgE ならびに IL-33 濃度を測定するとともに、眼球への好酸球、マスト細胞、M2 マクロファージ、NH 細胞の浸潤程度を評価する。

(5) アトピー網膜剥離、アトピー緑内障手術モデルの作成：Ovalbmin(OVA)で感作した Rag2(-/-)IL-13-YFP-Tg マウスを使用し、) 神経網膜を部分切除することで網膜剥離モデルを、) 前房水をシリコンチューブによって結膜下に濾過する緑内障手術モデルを作成する。同時に OVA+チタン粒子を硝子体内または前房内に投与することで 2 型炎症を惹起し、OVA 特異的 IgE、IL-33 の発現ならびに NH 細胞の局在を確認する。

(6) IL-33 ならびに NH 細胞が 2 型免疫反応において眼組織癒痕化に果たす役割：前年度のアトピー眼症マウスモデルの実験を IL-33 ノックアウトマウスならびに NH 細胞を欠く Rag2(-/-)common- γ (-/-)マウスと対照マウスとの間で再現し、アトピー白内障、アトピー網膜剥離モデルおよびアトピー緑内障手術モデルにおける組織癒痕化の程度を組織癒痕化マーカー (α -SMA、collagen type1/type3)発現量と免疫組織学的な解析法 (炎症細胞の浸潤、マクロファージの活性化状態)を用いて評価することで、2 型炎症に伴う眼組織の癒痕化における IL-33 および NH 細胞の役割を評価する。また、マウスモデルにおける網羅的遺伝子発現解析を施行し、IL-33 や NH 細胞の有無によって影響を受けるマーカーを同定し、臨床マーカーとなりうる分子の候補をリストアップする。また、必要に応じて Rag2(-/-)common- γ (-/-)マウスを使ったモデルにおいて wild type マウス涙腺由来の NH 細胞を adoptive transfer することで、実験結果を検証し、データの整合性を確認する。

(7) NH 細胞活性化阻止実験：NH 細胞活性化因子である IL-33 のデコイ受容体(可溶性 ST2)を投与して、2 型眼炎症に伴う組織癒

痕化モデルにおける NH 細胞の活性の抑制を試みる。NH 細胞活性化の指標として、NH 細胞数、IL-13 発現量、好酸球浸潤、組織癒痕化マーカーの発現量を用いる。

(8) NH 細胞遊走阻止実験：NH 細胞の遊走に關与する可能性が示唆されている各種のケモカイン受容体阻害剤を用いて NH 細胞のマウス涙腺から眼球への遊走阻止を試みる。以上(7)と(8)は NH 細胞の制御による眼組織線維化防止の試みである。

(9)ステロイドならびに免疫抑制剤が IL-33 発現ならびに NH 細胞の浸潤・活性化に与える影響：現在アトピー眼症の治療にはデキサメサゾン等のグルココルチコイドとタクロリムス等の免疫抑制剤が使用されている。アトピー眼症モデルマウスの作成時にデキサメサゾンもしくはタクロリムスを投与し、IL-33 発現ならびに NH 細胞活性化への影響を評価する。同時にデキサメサゾン並びにタクロリムスの投与方法も評価 (全身または局所投与、両者併用が有効か否か、投与の時期および量)を行い、臨床への還元への足がかりとする。

4. 研究成果

(1) NH 細胞の in vivo 観察モデルとして、Jackson 研究所から IL-13-YFP-Tg マウスを購入し、Rag2(-/-) と交配、Rag2(-/-)IL-13-YFP-Tg レポーターマウスを作成した。問題点として生体イメージングの目的には YFP 蛍光が弱く、当初の目的には適さないことが判明した。

(2) 涙腺に多量に存在する NH 細胞がアトピー性炎症の発症時に涙液 (導管) 経由で、またはリンパ管、血管経由で移動するのかを明らかにするため、涙腺を除去したマウスにブタクサ花粉誘発結膜炎を発症させ、NH 細胞除去の影響を検証した。その結果、涙腺除去は好酸球浸潤数には影響しない一方、涙腺除去マウス (特に IL-33 欠損涙腺除去マウス) において強い角膜炎を認めた。この結果は NH 細胞が角膜の恒常性維持に貢献している可能性を示唆するものである。

(3) 網膜下液および線維柱帯組織における NH 細胞の存在を確認するために網膜下液の細胞成分を収集しフローサイトメトリーによる NH 細胞の同定を試みたが、同部位に NH 細胞は検出されなかった。

(4) アトピー白内障モデルマウス作成に関しては、プレリミナリーな実験を試みたが、白内障の表現型は得られなかった。

(5) アトピー緑内障手術モデルの作成：ブタクサ花粉で感作した BALB/c マウスを使用し、) 前房水を 33G 針によって結膜下に濾過する緑内障手術モデルを作成した。同時にブタクサ花粉を点眼投与することで 2 型炎症を惹起し、濾過胞の形成に与える影響を評価したところ、MHC class II 細胞の浸潤が増加し、組織線維化に關連する遺伝子の発現量が増加した。(特に *Col1a1*)

(6) アトピー眼症マウスモデルの実験を IL-33 ノックアウトマウスと対照マウスとの間で再現し、アトピー緑内障手術モデルにおける組織癒着の程度を組織癒着マーカー(α-SMA, collagen type1/type3)発現量と免疫組織学的な解析法(炎症細胞の浸潤、マクロファージの活性化状態)を用いて評価した。その結果、IL-33 欠損マウスでは慢性期において炎症細胞浸潤数が増加することを発見した。組織癒着化に与える影響については現在詳細な解析中である。

(7) NH 細胞活性化因子である IL-33 のデコイ受容体(可溶性 ST2)を投与して、2 型眼炎症に伴う組織癒着モデルにおける NH 細胞の活性の抑制を試みる。自治医科大学の富永教授、早川先生との共同研究でマウスの可溶性 ST2 分子の産生、精製に成功した。現在投与実験を準備している。

(8) NH 細胞遊走阻止実験：(7)の実験と同時に NH 細胞の遊走状態も解析する準備中である。

(9) ステロイドならびに免疫抑制剤が IL-33 発現ならびに NH 細胞の浸潤・活性化に与える影響：ステロイド投与では NH 細胞の活性に影響が出ないことを涙腺除去マウスの実験系で確認した。免疫抑制剤については今後検討予定である。

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 15 件)

1. Nakama T, Yoshida S, Ishikawa K, Kubo Y, Kobayashi Y, Zhou Y, Nakao S, Hisatomi T, Ikeda Y, Takao K, Yoshikawa K, Matsuda A, Ono J, Ohta S, Izuhara K, Kudo A, Sonoda KH, and Ishibashi T. Therapeutic effect of novel single-stranded RNA interference agent targeting periostin in eyes with retinal neovascularization. **Molecular Therapy - Nucleic Acids** (in Press)
2. Kobayashi Y, Yoshida S, Zhou Y, Nakama T, Ishikawa K, Kubo Y, Arima M, Nakao S, Hisatomi T, Ikeda Y, Matsuda A, Sonoda K-H, Ishibashi T. Tenascin-C secreted by transdifferentiated retinal pigment epithelial cells promotes choroidal neovascularization via integrin αV. **Lab Invest.** 96:1178-1188, 2016
3. Kobayashi Y, Yoshida S, Zhou Y, Nakama T, Ishikawa K, Arima M, Nakao S, Sassa Y, Takeda A, Hisatomi T, Ikeda Y, Matsuda A, Sonoda KH, Ishibashi T. Tenascin-C promotes angiogenesis in fibrovascular

membranes in eyes with proliferative diabetic retinopathy. **Mol Vis.** 22:436-45, 2016.

4. Kamijo S, Suzuki M, Hara M, Shimura S, Ochi H, Maruyama N, Matsuda A, Saito H, Nakae S, Suto H, Ichikawa S, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K, Takai T. Subcutaneous allergic sensitization to protease allergen is dependent on mast cells but not IL-33: Distinct mechanisms between subcutaneous and intranasal routes. **J Immunol** 196:3559-69, 2016.
5. Shimura S, Takai T, Iida H, Maruyama N, Ochi H, Kamijo S, Nishioka I, Hara M, Matsuda A, Saito H, Nakae S, Ogawa H, Okumura K, Ikeda S. Epicutaneous Allergic Sensitization by Cooperation between Allergen Protease Activity and Mechanical Skin Barrier Damage in Mice. **J Invest Dermatol.** 136:1408-1417, 2016.
6. Hamanaka T, Matsuda A, Sakurai T, Kumasaka T. Morphological Abnormalities of the Schlemm's Canal in Primary Open-Angle Glaucoma from the Aspect of Aging. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 57:692-706, 2016.
7. Morita H, Arae K, Unno H, Miyauchi K, Toyama S, Nambu A, Oboki K, Ohno T, Motomura K, Matsuda A, Yamaguchi S, Narushima S, Kajiwarana N, Iikura M, Suto H, McKenzie A, Takahashi T, Karasuyama H, Okumura K, Azuma M, Moro K, Akdis CA, Galli SJ, Koyasu S, Kubo M, Sudo K, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. An Interleukin-33-Mast Cell-Interleukin-2 Axis Suppresses Papain-Induced Allergic Inflammation by Promoting Regulatory T Cell Numbers. **Immunity** 43:175-186, 2015.
8. Asada Y, Nakae S, Ishida W, Hori K, Sugita J, Sudo K, Fukuda K, Fukushima A, Suto H, Murakami A, Saito H, Ebihara N, Matsuda A. The roles of epithelial cell-derived type 2 initiating cytokines in experimental allergic conjunctivitis. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 56:5194-5202, 2015.
9. Matsuda A, Asada Y, Takakuwa K, Sugita J, Murakami A, Ebihara N.

- DNA methylation analysis of human trabecular meshwork cells during dexamethasone stimulation. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 56:3801-9, 2015
10. Nakama T, Yoshida S, Ishikawa K, Kobayashi Y, Zhou Y, Nakao S, Sassa Y, Oshima Y, Takao K, Shimahara A, Yoshikawa K, Hamasaki T, Ohgi T, Hayashi H, Matsuda A, Kudo A, Nozaki M, Ogura Y, Kuroda M, Ishibashi T. Inhibition of choroidal fibrovascular membrane formation by new class of RNA interference therapeutic agent targeting periostin. **Gene Ther.** 22:127-137, 2015.
 11. Takakuwa K, Hamanaka T, Mori K, Chin S, Shinmei Y, Funaki T, Ebihara N, Ono K, Murakami A, Matsuda A. Atopic glaucoma—clinical and pathophysiological analysis. **J Glaucoma** 24:662-668, 2015
 12. Okayama Y, Matsuda A, Kashiwakura JI, Sasaki-Sakamoto T, Nunomura S, Shimokawa T, Yamaguchi K, Takahashi S, Ra C. Highly expressed cytoplasmic Fc RI in human mast cells functions as a negative regulator of the FcR-mediated cell activation signal. **Clin Exp Allergy** 44:238-249, 2014.
 13. Asada Y, Ebihara N, Funaki T, Yokoi N, Murakami A, Matsuda A. Vernal keratoconjunctivitis with giant papillae on the inferior tarsal conjunctiva. **Cornea** 33:32-34, 2014.
 14. Nakanishi W, Yamaguchi S, Matsuda A, Suzukawa M, Shibui A, Nambu A, Suto H, Saito H, Matsumoto K, Yamasoba T, Nakae S. IL-33, but not IL-25, is crucial for the development of house dust mite antigen-induced allergic rhinitis in mice. **PLoS One** 9:e86106, 2014.
 15. Ishikawa K, Yoshida S, Nakao S, Nakama T, Kita T, Asato R, Sassa Y, Arita R, Miyazaki M, Enaida H, Oshima Y, Murakami N, Nihiro H, Ono J, Matsuda A, Goto Y, Akashi K, Izuhara K, Kudo A, Kono T, Hafezi-Moghadam A, Ishibashi T. Periostin promotes the generation of fibrous membranes in proliferative vitreoretinopathy. **FASEB J.** 28:132-142, 2014.
- 〔学会発表〕(計5件)
1. Yosuke Asada, Susumu Nakae, Nobuyuki Ebihara, Akira Murakami, Akira Matsuda. Dual roles of IL-33 in ragweed-induced mouse conjunctivitis models under lacrimal gland excision. Annual Meeting of Association of Research in Vision and Ophthalmology. 9th May 2017 Baltimore, USA.
 2. 松田 彰. アトピー性疾患の組織線維化. 第121回日本眼科学会総会、2017年4月8日、東京
 3. 浅田 洋輔、中江 進、村上 晶、海老原 伸行、松田 彰. 実験的アレルギー性結膜炎における涙腺由来の ILC2 ならびに IL-33 の役割. 第121回日本眼科学会総会、2017年4月6日、東京
 4. 浅田 洋輔、中江 進、杉田 丈夫、村上 晶、海老原 伸行、松田 彰. パパイン誘発アレルギー性結膜炎における ILC2 の役割. 第120回日本眼科学会総会、2016年4月8日、仙台
 5. 松田 彰. 眼アレルギーにおける上皮由来2型炎症起始サイトカインと ILC2. 第35回日本眼薬理学会、2015年9月5日、東京
6. 研究組織
- (1)研究代表者
村上 晶 (MURAKAMI, Akira)
順天堂大学・医学研究科・教授
研究者番号：90157743
- (2)研究分担者
松田 彰 (MATSUDA, Akira)
順天堂大学・医学研究科・准教授
研究者番号：00312348
- 堀 寛爾 (HORI, Kanji)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：30529227
- (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
- (4)研究協力者
浅田洋輔 (ASADA, Yosuke)
順天堂大学・医学部・助教
- 岩本 怜 (IWAMOTO, Satoshi)
順天堂大学・医学部・助教

杉田丈夫 (SUGITA, Jobu)
順天堂大学・医学部・助手