

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10869

研究課題名(和文) CYP代謝産物による眼内慢性炎症疾患の制御メカニズムの解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of a destruction mechanism and development of new treatment on intraocular chronic inflammatory diseases with CYP metabolites

研究代表者

柳井 亮二 (YANAI, Ryoji)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10346554

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)：我々はオメガ3脂肪酸が脈絡膜血管新生に対する抑制効果があることを報告し、その作用機序に免疫細胞による炎症抑制が重要であることを示した。さらに実験的自己免疫性ぶどう膜炎(EAU)モデルを用いて、オメガ3脂肪酸の経口投与によりTh1/Th17経路を介した炎症が抑制されることを報告した。オメガ3脂肪酸の一つであるEPAはチトクロームP450により代謝され、17,18-EEQが産生される。今回、17,18-EEQによる眼炎症抑制効果についてEAUモデルを用いて検討し、17,18-EEQが全身のTh1/Th17細胞産生サイトカインを介して眼炎症を抑制していることが示された。

研究成果の概要(英文)： We demonstrate that dietary supplementation of ω -3 LCPUFAs mediate choroidal neovessel regression with leukocyte recruitment and inflammatory reduction in choroidal neovascular lesions. Furthermore, we show that a diet enriched in ω -3 LCPUFAs suppressed uveitis in mice in association with inhibition of Th1 and Th17 cell function. cytochrome P450 (CYP) epoxygenases target the ω -3 double bond, resulting in an accumulation of 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid (17,18-EEQ) derived from EPA, one of major ω -3 LCPUFAs. In current study, we examined the anti-inflammatory properties of these molecules and have shown that 17,18-EEQ suppressed intraocular inflammation, as evaluated both clinically and histologically, in mice with EAU by inhibiting both systemic and retinal Th1 and Th17 cells.

研究分野：眼科学

キーワード：眼炎症 加齢黄斑変性症 ぶどう膜炎 オメガ3脂肪酸 チトクロームP

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性や後部ぶどう膜炎、糖尿病網膜症などの慢性炎症性眼疾患は、網脈絡膜に血管新生を生じ、社会的失明の主要原因として大きな社会問題となっている。抗 VEGF 抗体療法や光線力学療法により疾患予後は改善されているが、長期の視機能は未だ芳しくない。糖尿病網膜症に対する網膜光凝固術や硝子体手術は、侵襲も大きく視機能回復には限界がある。慢性炎症性眼疾患は軽微な慢性炎症が持続した後に、虚血、新生血管などを契機に晩期に発症することが特徴で、根本的な治療法はない。例えば治療が成功しても不可逆的な組織障害により視機能の回復は難しい。慢性炎症性眼疾患の治療には慢性炎症期を焦点とした革新的な治療法の開発が必要である。

従来、医療は急性炎症反応に焦点がおかれ治療法が開発されてきた。炎症はストレスや感染から生体を防御する機能である。通常、組織が修復され炎症は収束するが、何らかの原因により緩徐な炎症が持続する状態が慢性炎症である。近年、細胞内因子アラミン (alarmin) を介した自然免疫系が慢性炎症に関与することが明らかにされた。眼慢性炎症にもアラミンネットワークが関与し、下流に存在する免疫細胞調節因子を制御することで、慢性炎症を収束させることができるのではないかと考えられる。

オメガ ()-3 不飽和脂肪酸は、生体内で合成することができない必須脂肪酸の一つで、眼科領域においても ω -3 脂肪酸の摂取による加齢黄斑変性に対する有効性が知られているが (Arch Ophthalmol 127:110, 2009)、大規模臨床研究では有意な効果はみられなかった (JAMA 309:2005, 2013)。 ω -3 脂肪酸は酸化しやすく容易に不活化するため、臨床応用にあたっては薬理作用の有効成分を同定する必要がある。このような観点から、我々は ω -3 脂肪酸由来の CYP 代謝物が脈絡膜血管新生に対する抑制効果の必須成分であることを世界で初めて報告した。この研究過程で炎症抑制のキープレイヤーとされる抗炎症メディエーターではなく、 ω -3 脂肪酸由来の CYP 代謝産物によって自然免疫が制御されていたことが、今回の着想根拠となった。

さらに実験的自己免疫性ぶどう膜炎モデル (EAU) による予備実験で、 ω -3 脂肪酸によりインターフェロン (IFN)- γ およびインターロイキン (IL)-17 を介して眼内炎症が抑制された。抗 IL-17 抗体は抗 VEGF 抗体と同等の血管新生抑制効果を示し、アラミンの一つである high mobility group box 1 (HMGB1) を制御して眼内血管新生を抑制している。従って、 ω -3 脂肪酸由来の CYP 代謝産物によって自然免疫を制御し慢性炎症を抑制できる可能性があり、二つ目の着想根拠となった。

2. 研究の目的

本研究は、高度視力障害の主要原因であるのにもかかわらず有効な治療法のない慢性炎症性眼疾患の発症機序を解明し、根治的治療を開発することを目的とする。慢性炎症は糖尿病、癌、脳血管疾患などの病態に關与しているが、未だ慢性炎症に対する病態の理解は十分でなく治療法も皆無である。眼科領域でも加齢黄斑変性、糖尿病網膜症、遷延性ぶどう膜炎、網膜血管閉塞疾患など慢性炎症性眼疾患に対する病態の解明および根治的治療法の開発は急務である。 ω -3 脂肪酸は加齢黄斑変性に対する有効性が知られており、我々はその有効成分がチロクローム P450 (CYP) 代謝産物であることを明らかにした。本研究では ω -3 脂肪酸由来の CYP 代謝産物を用いて慢性炎症の免疫細胞調節因子を制御することで、慢性疾患に対する新たな治療法を確立する。最終的には動物モデルを用いて、加齢黄斑変性、遷延型ぶどう膜炎に対する慢性炎症制御療法の実効性検証を行い、臨床応用することを試みる。

3. 研究の方法

初年度は ω -3 脂肪酸由来の CYP 代謝産物による脈絡膜血管新生 (CNV)、実験的自己免疫性ぶどう膜炎モデル (EAU) の慢性炎症抑制効果を検証し、眼内炎症性細胞内 (アラミン)・細胞外因子のスクリーニングを行う。次年度は ω -3 脂肪酸由来の CYP 代謝産物を投与したマウスから回収した網膜、脈絡膜および全身のリンパ節 (EAU モデル) からマクロファージ活性化および T 細胞分化の機序を解析し、慢性炎症治療の新たな標的となる IL-17 の発現を制御する治療ターゲットとなる分子を同定する。並行して CYP 代謝産物による全身及び局所への影響の程度を血清および網膜、脈絡膜、脳などの脂肪酸プロファイルを作成し、慢性炎症の治療効果の最も高い CYP 代謝産物を決定する。最終年度は CYP 代謝産物、慢性炎症の共通項因子または同定した因子カクテルをデザインし、全身および局所の自然免疫機構の炎症バランスを制御することで、慢性炎症制御を行う新たな治療法の基盤の確立を試みる。

(1) CYP 代謝産物制御による眼慢性炎症の制御機構の解析

<実験> ω -3 脂肪酸由来 CYP 代謝産物の作用機構の解明

CYP 代謝産物： ω -3 脂肪酸由来の CYP 代謝産物 (5,6-, 8,9-, 11,12-, 14,15-, 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid [EEQ], 16,17-, 19,20-epoxydocosapentaenoic acid [EDP])、対照群として ω -6 脂肪酸由来の CYP 代謝産物 (5,6-, 8,9-, 11,12-,

14,15-epoxyeicosatrienoic acid [EET])
を用いた (Cayman Chemical Co.)

動物モデル作成方法: 上述の CYP 代謝産物を投与した C57/BL6 マウスを用いた。CNV モデル: 散瞳後に 532nm のレーザーを網膜に照射して CNV を誘導する。EAU モデル: マウス足底部皮内に網膜抗原 (IRBP) を免疫して作成した。

慢性炎症関連因子の同定: CNV モデルおよび EAU モデルに CYP 代謝物を投与して急性炎症期 (7 日目) と慢性炎症期 (28 日目) に眼球を回収する。網膜および脈絡膜から得られた抽出液を各々回収して, Bioplex システム (Bio-Rad) を用いて炎症性サイトカイン, ケモカインおよび接着分子の発現の程度をスクリーニングした。この結果から得られたデータを元に, 網膜および脈絡膜から mRNA およびタンパク質を回収し 標的となる接着分子の発現の程度を Real-time PCR およびウェスタンブロット法を用いて確認した。

摘出した眼球は OCT コンパウンドに包埋し, 凍結切片を作成した。レーザーマイクロダイセクションによって CNV 領域を切除し, RNA を抽出した。Real-time PCR を用いて IL-1b, IL-6, IL-8, TNF-a などのサイトカイン, ICAM-1, VCAM-1, Selectin ファミリーなどの接着分子および VEGF, IGF-1, FGF, PlGF などの血管新生関連因子の発現を比較検討した。

4. 研究成果

- (1) CYP の中で EPA 由来の 17, 18-EEQ により, EAU 誘導 17 日目のマウスぶどう膜炎の臨床学的および組織学的スコアが有意に低下した。17, 18-EEQ は全身投与により眼内炎症を抑制することが示された。
- (2) 17, 18-EEQ は EAU モデルマウスの眼内の炎症性サイトカイン・ケモカインおよび, Th1/Th17 関連のサイトカイン, 転写因子を有意に抑制した。
- (3) 眼内液の IL-2 産生が有意に減少していた。
- (4) 単離 CD4+T 細胞の IRBP 再刺激培養上清では IFN-gamma および IL-17 の産生が有意に低下していた。

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 10 件)

Yanai R, Harada D, Uchi SH, Yamashiro C, Orita T, Sonoda KH, Kimura K: Poor prognosis of elderly individuals >80 years of age with acute retinal necrosis. Am J Ophthalmol Case Rep 7: 107-112, 2017. 査読有
DOI: 10.1016/j.ajoc.2017.06.014

Hasegawa E, Inafuku S, Mulki L, Okunuki Y, Yanai R, Smith KE, Kim CB, Kl okman G, Bielenberg DR, Puli N, Falck JR, Husain D, Miller JW, Edin ML, Zeldin DC, Lee KSS, Hammock BD, Schunck WH, Connor KM: Cytochrome P450 monooxygenase lipid metabolites are significant second messengers in the resolution of choroidal neovascularization. Proc Natl Acad Sci USA 114(36): E7545-E7553, 2017. 査読有
DOI: 10.1073/pnas.1620898114

Othman K, Tajudin A, Liza-Sharmini L, Ibrahim M, Tharakan J, Yanai R, Zuna ina E: Severe panuveitis in neuro-Behçet's disease in Malaysia: a case series. International Medical Case Reports Journal 10: 35-40, 2017. 査読有
DOI: 10.2147/IMCRJ.S121863

Sakoda Y, Nagai T, Murata S, Mizuno Y, Kurosawa H, Shoda H, Morishige N, Yanai R, Sonoda KH, Tamada K: Pathogenic Function of Herpesvirus Entry Mediator in Experimental Autoimmune Uveitis by Induction of Th1- and Th17-Type T Cell Responses. J Immunol 196(7): 2947-2954, 2016. 査読有
DOI: 10.4049/jimmunol.1501742

柳井 亮二: 梅毒性ぶどう膜炎. OCULISTA 37: 49-55, 2016. 査読有

内 翔平, 折田 朋子, 湧田 真紀子, 柳井 亮二, 木村 和博, 園田 康平: 14 年間で 4 回の発症を繰り返した急性網膜壊死の 1 例. 眼科 57(12):1599-1604, 2015. 査読有

Yanai R, Nishida T, Chikama T, Morishige N, Yamada N, Sonoda KH: Potential New Modes of Treatment of Neurotrophic Keratopathy. Cornea 34(11):S121-S127, 2015. 査読有
DOI: 10.1097/ICO.0000000000000587

Shoda H, Yanai R, Yoshimura T, Nagai T, Kimura K, Sobrin L, Connor KM, Sakoda Y, Tamada K, Ikeda T, Sonoda KH: Dietary Omega-3 Fatty Acids Suppress Experimental Autoimmune Uveitis in Association with Inhibition of Th1 and Th17 Cell Function. PLoS One 10(9): e138241, 2015. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0138241

Kimura K, Orita T, Liu Y, Yang Y, Tokuda K, Kurakazu T, Noda T, Yanai R, Morishige N, Takeda A, Ishibashi T, Sonoda KH: Attenuation of EMT in RPE cells and subretinal fibrosis by an RAR-agonist. J Mol Med (Berl) 93(7):749-758, 2015. 査読有
DOI: 10.1007/s00109-015-1289-8

Yanai R, Sonoda KH, Connor KM: Cytochrome P450-Generated Metabolites of

-3 Fatty Acids Ameliorate Choroidal Neovascularization. The Bulletin of the Yamaguchi Medical School 62: 29-36, 2015. 査読有
<http://www.lib.yamaguchi-u.ac.jp/yunoca/handle/A050062000302>

[学会発表](計 19 件)

柳井 亮二:ぶどう膜炎の診かた、考え方.自己免疫疾患研究会,岡山県(岡山赤十字病院),2018/02/21

柳井 亮二,内 翔平,波多野 誠,木村 和博,福田 信二:免疫調整薬内服中に発症した全身性エリテマトーデス網膜症の一例.第54回山口県リウマチ・膠原病(YRC)研究会,山口県(ANAクラウンプラザホテル宇部),2017/12/07

Yanai R: Differential Diagnosis of Retinal Vasculitis. EXTERNAL EXAMINERS TALK & FEEDBACK TO CANDIDATES, Malaysia(Kuala Lumpur), 2017/11/16

Yanai R: Fitting Contact Lenses for Keratoconus. the 118th Annual Meeting of the Korean Ophthalmological Society, Korea (Seoul), 2017/11/05

Yanai R, Harada D, Uchi SH, Yamashiro C, Orita T, Sonoda KH, Kimura K: Poor Prognosis of Elderly Individuals >80 Years of Age with Acute Retinal Necrosis. The 50th Annual Retina Society Meeting, USA (Boston), 2017/10/06

Yanai R, Uchi SH, Sonoda KH, Mukai S: Assessment of macular star associated with cat scratch disease by optical coherence tomography. The 49th Annual Retina Society Meeting, USA (San Diego), 2017/09/15

柳井 亮二,内 翔平,波多野 誠,原田 大輔,藤津 揚一郎,園田 康平,木村 和博:遷延型 Vogt-小柳-原田病に対してアダリムマブが有用であった2症例.第51回日本眼炎症学会,大阪府(大阪国際会議場),2017/07/15

Yanai R, Chang C, Uchi SH, Nanri T, Kimura K: Synergistic attenuation of choroidal neovascularization by dietary intake of -3 long-chain polyunsaturated fatty acids and lutein in mice. ARVO2017, USA (Baltimore), 2017/05/08

柳井 亮二,園田 康平,後藤 浩, Roberth Landewé, James Rosenbaum, Irene Van der Horst-Bruinsma, Samir Tari, Daniel Furtner, Martina Kron, Roza Ishihara, Sophia Pathai: アダリムマブによる非感染性ぶどう膜炎の疾患活動性の抑制効果.第121回日本眼科学会総会,東京都(東京国際フォーラム),

2017/04/06

柳井 亮二: 症例提示. RVO Expert Clinical Conference, 東京都(大手町ファーストスクエアカンファレンス), 2016/11/19

柳井 亮二,内 翔平,岩本 菜奈子,西本 綾奈,森 賢一郎,波多野 誠,木村 和博:クロロキン・ヒドロキシクロロキンによる網膜症の予防スクリーニングの実際.第128回山口県眼科医会秋季総会並びに集談会,山口県(翠山荘), 2016/11/13

Yanai R, Uchi SH, Sonoda KH, Mukai S: Assessment of macular star associated with cat scratch disease by optical coherence tomography. The 49th Annual Retina Society Meeting, USA (San Diego), 2016/09/15

柳井 亮二,佐古田 幸美,永井 智彦,庄田 裕美,森重 直行,園田 康平,玉田 耕治:実験的自己免疫性ぶどう膜炎誘導における HVEM 共シグナルの免疫学的制御.第50回日本眼炎症学会,東京都(東京国際フォーラム),2016/07/01

Yanai R: CYP-generated Metabolites of Omega-3 Fatty Acids Promote Choroidal Neovessel Resolution. THE 16TH INTERNATIONAL WINTER EICOSANOID CONFERENCE, USA (Baltimore), 2016/03/15

Yanai R, Mulki L, Hasegawa E, Takeuchi K, Sweigard JH, Suzuki J, Vavvas DG, Miller JW, Connor KM, Sonoda KH: Cytochrome P450-dependent epoxy metabolites of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids ameliorate choroidal neovessel resolution. The 8th Joint Meeting of JAPAN-CHINA-KOREA Ophthalmologists, 福岡県(ヒルトン福岡シーホーク), 2015/10/17

Yanai R, Horio Y, Shoda H, Uchi SH, Hatano M, Kobayashi M, Harada D, Kimura K, Sonoda KH: Incidence of uveitis at the Ophthalmology Department of Yamaguchi University Hospital in Japan. 13th Congress of the International Ocular Inflammation Society (IOIS), USA (San Francisco), 2015/09/26

Yanai R: Innate and acquired immunity in ocular inflammation. 13th Congress of the International Ocular Inflammation Society (IOIS), USA (San Francisco), 2015/09/26

柳井 亮二,堀尾 祐太,庄田 裕美,内 翔平,波多野 誠,小林 正明,原田 大輔,木村 和博,園田 康平:山口大学眼科におけるぶどう膜炎の統計.第49回日本眼炎症学会,大阪府(コングレコンベンションセンター), 2015/07/11

柳井 亮二：あなたの知らない RGP の世界・第 58 回日本コンタクトレンズ学会総会，大阪府（コングレコンベンションセンター），2015/07/11

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳井 亮二 (YANAI, Ryoji)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10346554

(2) 研究分担者

園田 康平 (SONODA, Kohei)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：10294943

佐古田 幸美 (SAKODA, Yukimi)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究番号：30629754

折田 朋子 (ORITA, Tomoko)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究番号：50467792

木村 和博 (KIMURA, Kazuhiro)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60335255

寺西 慎一郎 (TERANISHI, Shinichiro)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90649360