

令和 2 年 9 月 11 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11468

研究課題名(和文) 角膜炎症におけるインフラマソーム発現 - オートファジーとの関連 -

研究課題名(英文) Role of inflammasome in corneal inflammation

研究代表者

崎元 暢 (SAKIMOTO, Tohru)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：20465272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内パターン認識受容体であるNLRP3(NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3)の活性化を引き金とするインフラマソームの発現亢進が、様々な炎症病態に関連することが最近明らかとなっている。本研究では角膜炎症とインフラマソームとの関連を明らかにすることを目的として、WTマウスおよびNLRP3ノックアウトマウスについて無菌性角膜炎症におけるNLRP3インフラマソームの役割について検討し、角膜炎症においてNLRP3インフラマソームは好中球依存性にIL-1・MMP-9発現を誘導することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

各領域の様々な慢性疾患や炎症性疾患での関与を指摘されているNLRP3インフラマソームが、無菌性角膜炎症において炎症促進に関与していることを初めて明らかにした。また、角膜におけるNLRP3は好中球依存性にIL-1・MMP-9発現を誘導し、炎症促進に関与することを示した。これらのことから、角膜における無菌性炎症である周辺部角膜潰瘍などの非感染性角膜潰瘍の病態にNLRP3インフラマソームが関与する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the role of NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome in sterile corneal inflammation caused by lipopolysaccharide (LPS) or alkali burns in C57BL6 mice or NLRP3 KO (Nlrp3<sup>-/-</sup>) mice. Various molecules related to the NLRP3 inflammasome were upregulated in C57BL6 mice after both alkali burn injury and LPS treatment. After alkali burn injury, the corneal opacity grade was significantly reduced in Nlrp3<sup>-/-</sup> mice compared with C57BL6 mice. In Nlrp3<sup>-/-</sup> mice, Gr-1 immunoreactivity and MMP-9 mRNA expression in the corneal stroma were significantly reduced by both LPS treatment and alkali burn injury. Quantitative PCR and immunohistochemistry revealed that IL-1 and MMP-9 expression in the corneal stroma were down-regulated in Nlrp3<sup>-/-</sup> mice with both alkali burn injury and LPS treatment. These findings suggest that the NLRP3 inflammasome has a proinflammatory effect in the cornea by recruiting neutrophils to sites of inflammation.

研究分野：角膜

キーワード：角膜 炎症 インフラマソーム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内パターン認識受容体である NLRP3 (NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3) の活性化を引き金とするインフラマソームの発現亢進が、様々な病態における炎症惹起に関連することが最近明らかとなった。インフラマソームは、細菌菌体成分、尿酸結晶等の微小粒子、細胞死の際に放出される DNA 等の DAMP (damage-associated molecular pattern)、紫外線と非常に多岐にわたる因子により活性化され、オートファジーによる制御を受ける。

過剰なインフラマソームによって惹起される疾患としては遺伝性炎症疾患である自己炎症性疾患、一部のサルコイドーシスやベーチェット病、慢性炎症疾患でもある動脈硬化、痛風、2 型糖尿病、アルツハイマー病など多様な病態が考えられている。

一方、角膜疾患において炎症を呈する病態として非感染性角膜潰瘍があり、Mooren 潰瘍や膠原病に伴う周辺部角膜潰瘍、フリクテン性角膜炎などが挙げられる。Mooren 潰瘍は、角膜実質中に自己抗原が存在しその抗原に向かって輪部・血管に集簇する免疫担当細胞が攻撃するものと考えられているが、その自己抗原の同定には未だ至っていない。関節リウマチなどの膠原病における周辺部角膜潰瘍では、免疫複合体が血行性に角膜輪部の毛細血管網に沈着し III 型アレルギー反応を呈し、分泌された炎症性サイトカインや matrix metalloproteinase (MMP) によって炎症や角膜の細胞外基質分解を呈すると考えられているが、自己免疫疾患である膠原病を背景とした周辺部潰瘍の原因としての免疫複合体の詳細は不明である。フリクテン性角膜炎は、眼瞼縁に存在する常在細菌叢のうち、ブドウ球菌や *Propionibacterium acnes* (P.acnes) などに対する感染アレルギーと考えられているが具体的な発症機序は不明であり、時として角膜穿孔に至る可能性がある疾患である。

研究代表者はこれまでに非感染性角膜潰瘍症例では組織中・涙液中 MMP、さらに涙液中炎症性サイトカイン・可溶性サイトカイン受容体の亢進がみられることを明らかにしてきた (Sakimoto T, et al. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2014. Sakimoto T, et al. Cornea 2012. Sakimoto T, et al. Jpn J Ophthalmol 2003.)。これらの研究のなかで、非感染性角膜潰瘍のなかでも、Mooren 潰瘍と膠原病に伴う周辺部角膜潰瘍とでは発現する MMP やサイトカインの種類や発現量に大きな相違がないという結果があった。そこから、非感染性角膜潰瘍の病態にはある共通の誘因・機序・pathway があるのではないかという仮説を立て、インフラマソームに着目した。

### 2. 研究の目的

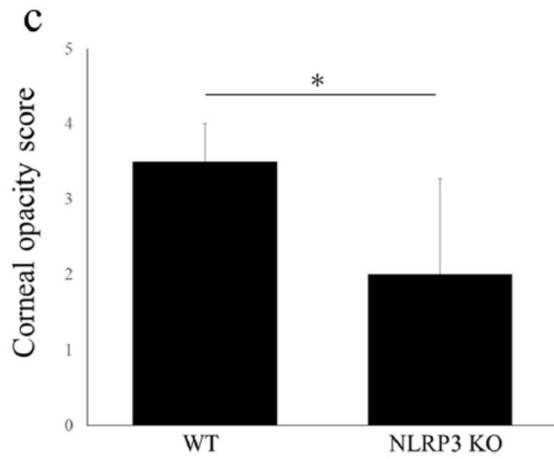
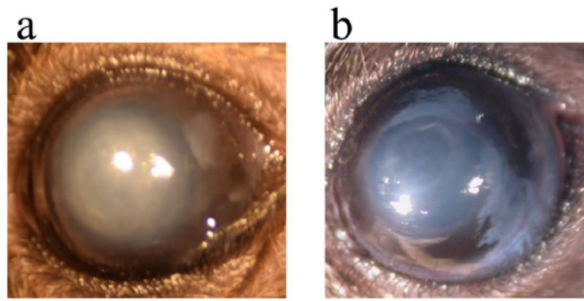
本研究では、いまだ原因がはっきりしないこれら非感染性角膜潰瘍 (= 角膜炎症疾患) において炎症誘導因子は違えどもインフラマソームによって炎症を生じているとの仮説を立てた。そこで NLRP3 ノックアウトマウスを用いた実験的角膜炎症 (無菌性角膜炎症) モデルにおけるインフラマソーム関連分子の発現を検討するとともに、無菌性角膜炎症に関連するマクロファージ・好中球の挙動、そして炎症関連分子の発現も検討することで、インフラマソーム依存性の無菌性角膜炎症に関連する分子・細胞の関与を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

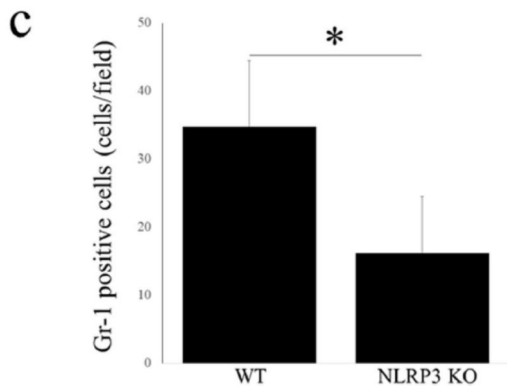
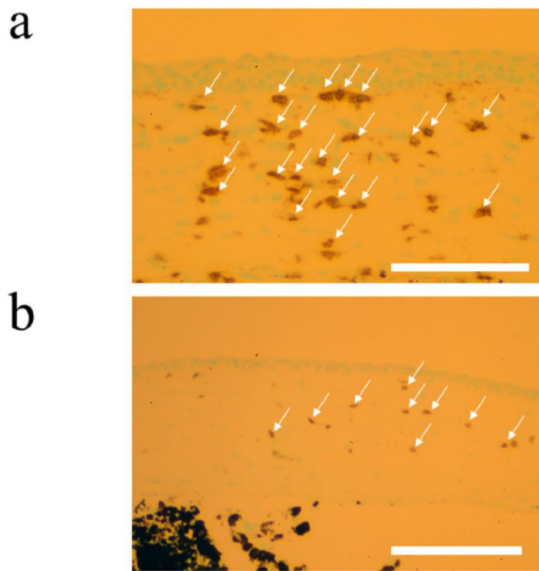
Wild type (WT) マウスおよび NLRP3 ノックアウト (NLRP3 KO) マウスを用いた。無菌性角膜炎症モデルとして、LPS 点眼モデルとアルカリ外傷角膜モデルを採用した。LPS 点眼モデルは、マイクロブレードで角膜びらんを作製後に LPS を既報通りに点眼し、経時的に眼球を摘出して検討に供した。アルカリ外傷角膜モデルは、1N 水酸化ナトリウムに浸漬した濾紙をマウス角膜に留置し洗眼後、経時的に前眼部写真を撮影するとともに眼球を摘出して検討に供した。摘出した眼球は包埋後に抗 Gr-1 抗体 (好中球マーカー)、抗 IL-1 $\beta$  抗体、抗 MMP-9 抗体を用いた免疫組織化学的検討を行い、陽性細胞数を比較検討した。さらに Laser capture microdissection (LCM) 法で角膜実質中の mRNA を単離したのち、PCR アレイ法を用いてインフラマソーム関連または炎症関連の遺伝子発現を網羅的に検討した。

### 4. 研究成果

LPS 点眼モデル、アルカリ外傷モデルの双方において、NLRP3 KO マウスでの角膜中 IL-1 $\beta$ ・MMP-9 陽性細胞の抑制、さらに IL-1 $\beta$ ・MMP-9 の遺伝子発現抑制を LCM 法・リアルタイム RT-PCR を用いてそれぞれ示した。また、アルカリ外傷モデルにおいて NLRP3 KO マウスにおける角膜混濁の抑制を角膜混濁スコアで、角膜実質中の好中球走化性のケモカインの網羅的な発現抑制を PCR アレイでそれぞれ示した。すなわち、角膜炎症において NLRP3 インフラマソームは好中球依存性に IL-1 $\beta$ ・MMP-9 発現を誘導することで炎症促進に作用することを示した。



アルカリ外傷後 7 日のマウス前眼部写真。a : WT マウス b : NLRP3 KO マウス c : 角膜混濁スコア NLRP3 KO マウスにおいてアルカリ外傷による角膜混濁が有意に減少していた。



アルカリ外傷後 7 日の抗 Gr-1 抗体 (好中球マーカー) を用いた免疫組織化学的検討。a : WT マウス b : NLRP3 KO マウス c : Gr-1 陽性細胞カウントの比較。NLRP3 KO マウスにおいて好中球浸潤が有意に減少していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tohru Sakimoto	4. 巻 37
2. 論文標題 Implications of Inflammasomes in Human Diseases: NLRP3 Inflammasome and Animal Models	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cornea	6. 最初と最後の頁 S86-S90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/IC0.0000000000001717	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Hiroaki, Sakimoto Tohru, Yamagami Satoru	4. 巻 9
2. 論文標題 Pro-inflammatory role of NLRP3 inflammasome in experimental sterile corneal inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9596
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-46116-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水洋明、崎元 暢、山上 聡
2. 発表標題 実験的角膜炎症におけるインフラマソーム発現についての検討
3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山上 聡 (YAMAGAMI Satoru) (10220245)	日本大学・医学部・教授  (32665)	