

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11490

研究課題名(和文)酸化ストレス関連分子Nrf2を介した自己免疫性ぶどう膜炎の制御

研究課題名(英文)Regulation of experimental autoimmune uveoretinitis through Nrf2 signaling

研究代表者

慶野 博(Keino, Hiroshi)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：90328211

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)：本課題では酸化ストレス分子誘導因子として知られるNrf2の関与について明らかにするため、Nrf2の活性化剤として知られるジメチルフルマル酸(DMF)、およびCDDOを用いて実験的自己免疫性ぶどう膜炎(experimental autoimmune uveoretinitis:EAU)の抑制効果、またNrf2欠損(KO)マウスにEAUを誘導し、野生型マウスと比較した。その結果、DMF、およびCDDOによるEAUに対する抗炎症効果はみられなかったものの、Nrf2KOマウスにおいて病理組織像の重症化が観察された。Nrf2を介した酸化ストレス機構がぶどう膜炎の病態に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題ではぶどう膜炎における酸化ストレスとの関連に注目し、酸化ストレス分子誘導因子として知られるNrf2の関与について明らかにするためNrf2欠損(KO)マウスにEAUを誘導し、酸化ストレスとぶどう膜炎との関連について検討を行った。その結果、野生型マウスと比較して、Nrf2KOマウスにおいて病理組織像の重症化が観察された。Nrf2を介した酸化ストレス機構の破綻が眼内の炎症病態に関与している可能性、さらに酸化ストレス機構がぶどう膜炎の新たな治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress is a major factor in the development of various ocular diseases. Nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf2) is known to be a key transcription factor in the regulation of multiple anti-oxidants including hemeoxygenase-1 (HO-1) and nicotinamide adenine dinucleotide/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADH/NADPH) quinone oxidoreductase 1 (NQO1). In the current study, we investigated the effect of Nrf2 on the development of EAU using Nrf2 knock out (KO) mouse. Pathological analysis of ocular lesion from Nrf2 KO mice with EAU revealed more severe infiltration of inflammatory cells into vitreous/retina and retinal tissue damages compared to that from wild type mice. Pathological score of EAU was higher in Nrf2 KO mice than wild type mice, although there was no significant difference between Nrf2 KO mice and wild type mice. Further study is required to determine the association between oxidative stress and the pathogenesis of autoimmune uveoretinitis.

研究分野：ぶどう膜炎

キーワード：ぶどう膜炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体は常に活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)や発癌の原因となる親電子性物質などのストレスにさらされている。過剰な酸化ストレスの蓄積は高血圧、糖尿病、発癌などの様々な疾患の原因となる。細胞は過剰な酸化ストレスを感知し、それらを消去する生体防御遺伝子の発現を誘導する分子機構が備わっている。その中で Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)によって調整される Nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2) (Nrf2-Keap1 システム)が細胞保護に作用する重要な転写因子として注目されている (Buendia et al. Pharmacol Ther. 157:84-104, 2016)。

眼科領域では糖尿病や緑内障の動物病態モデルにおいて Nrf2 が神経保護因子として作用していることが報告されている(Sasaki M et al. Diabetologia 53:971-979, 2010, Himori N et al. J Neurochem 127:669-80, 2013)。またぶどう膜炎の領域では Nrf2 遺伝子欠損マウス(Nrf2 KO マウス)を用いてリポポリサッカライド(LPS)により惹起される実験的ぶどう膜炎(endotoxin-induced uveitis:EIU)を誘導すると、虹彩・網膜において野生型マウスに比べて Nrf2 KO マウスでは抗酸化分子である HO-1 の発現が低下、一方で ROS の発現上昇、TNF- $\alpha$ や ICAM-1 などの炎症関連分子の発現も上昇し、Nrf2 が LPS によって誘導される眼内炎症反応の抑制に関与していることが示されている(Nagai et al. Free Radic Biol Med. 47:300-306, 2009)。

### 2. 研究の目的

これまで Nrf2-Keap1 について上記に示した LPS により誘導される急性の眼炎症モデル(EIU)での報告はあるものの細胞性免疫がその誘導に深く関与する実験的自己免疫性ぶどう膜炎(experimental autoimmune uveoretinitis:EAU)での報告はなされていない。本研究課題ではぶどう膜炎における Nrf2-keap1 システムの関与について明らかにするため、Nrf2 の活性化剤として知られるジメチルフルマル酸(DMF)、および 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oic acid (CDDO)を用いた EAU の抑制効果、Nrf2 遺伝子欠損(KO)マウスに EAU を誘導し、酸化ストレスと自己免疫性ぶどう膜炎の関連について検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### 1. ジメチルフルマル酸(DMF)投与によるラット EAU に対する抑制効果の検討

既報(Watanabe et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 50:2283-90, 2009)に準じ、ルイスラット 5-6 週齢に網膜抗原(interphotoreceptor retinoid binding protein:IRBP)由来合成 peptide である R14 を完全フロイントアジュバントと 1:1 で 混和した emulsion を作成し、ラット足底皮下に接種し EAU を誘導した。免疫当日から 0.6% methocel で溶解した DMF 100 mg/kg、および 30 mg/kg を 1 日 1 回、免疫当日から 21 日間内服投与した。対照群には 0.6% methocel を DMF 群と同容量で内服した。EAU の臨床的重症度の評価は既報(Watanabe et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 50:2283-90, 2009)に準じ、炎症極期である免疫後 14 日目に細隙灯顕微鏡を用いて前眼部炎症の重症度をスコア化した。

#### 2. CDDO 投与によるラット EAU に対する抑制効果の検討

既報(Watanabe et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 50:2283-90, 2009)に準じ、ルイスラット 5-6 週齢に網膜抗原(interphotoreceptor retinoid binding protein:IRBP)由来合成 peptide である R14 を完全フロイントアジュバントと 1:1 で 混和した emulsion を作成し、ラット足底皮下に接種し EAU を誘導した。CDDO は DMSO で溶解後に 7.5%PBS-tween にて 100nM と 500nM を作成、各々1.0ml/ラットの用量で 1 日 1 回、免疫当日から 21 日間腹腔内投与した。対照群には 7.5%PBS-tween を同用量で腹腔内投与、EAU の臨床的重症度の評価は上記と同様の方法を用いて前眼部炎症の重症度をスコア化した。

#### 3. CDDO 投与によるマウス EAU に対する抑制効果の検討

実験には 6-7 週齢の C57BL/6J マウスを用いた。EAU 誘導のため既報に準じて(Keino et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 52:1548-1556, 2011)、網膜抗原(IRBP)由来合成 peptide を作成し、免疫に用いた。IRBP peptide (200ug/マウス)と完全フロイントアジュバントとを 1:1 で 混和した emulsion を作成し、マウスの頸部皮下に接種、同日に免疫賦活化のため peptussis toxin を腹腔内投与した。CDDO は上記実験 2 と同様の方法で溶解、濃度調整し 100nM と 500nM を作成、各々0.1ml/マウスの用量で 1 日 1 回、免疫当日から 21 日間腹腔内投与した。対照群には 7.5%PBS-tween を同用量で腹腔内投与、EAU の重症度の評価は既報 (Keino et al. Invest

Ophthalmol Vis Sci 52:1548-1556, 2011)に基づき、免疫後9、12、15、18、21日に麻酔下にて散瞳し、眼底検査にてぶどう膜網膜炎の発症の有無について観察、臨床スコアを記録した。

#### 4. Nrf2 KO マウスを用いた EAU の重症度の評価

C57BL/6J マウス(野生型)、Nrf2KO マウス(C57BL/6 background、米国ジャクソン研究所より購入)を用いた。両群に対して上記実験3と同様の方法を用いてEAUを誘導、免疫から21日目に屠殺し、眼球を摘出、HE標本を作成しEAUの重症度について病理組織スコアを記録した。

#### 4. 研究成果

##### 1. ジメチルフルマル酸(DMF)投与によるラットEAUに対する抑制効果の検討

免疫後14日目の時点で対照群とDMF投与群で前眼部炎症スコアを比較したところ基剤投与群では $4.8 \pm 0.4$ 、DMF低用量群(30 mg/kg)では $4.8 \pm 0.3$ 、DMF高用量群(100 mg/kg)では $3.7 \pm 1.6$ であり、対照群とDMF投与群との間に有意な差はみられなかった。

##### 2. CDDO 投与によるラットEAUに対する抑制効果の検討

免疫後14日目の時点で対照群とCDDO投与群で前眼部炎症スコアを比較したところ基剤投与群では $4.8 \pm 0.4$ 、CDDO低用量群(100nM)では $4.2 \pm 0.8$ 、CDDO高用量群(500nM)では $3.7 \pm 0.6$ であり、対照群とCDDO投与群との間に有意な差はみられなかった。

##### 3. CDDO 投与によるマウスEAUに対する抑制効果の検討

免疫後18日目の時点で対照群とCDDO投与群で眼底スコアを比較したところ基剤投与群では $1.4 \pm 0.7$ 、CDDO群では $1.4 \pm 1.4$ であり、対照群とCDDO投与群との間に有意な差はみられなかった。また他の観察日でも同様の傾向を示した。

#### 4. Nrf2 KO マウスを用いた EAU の重症度の評価

免疫後21日目に眼球を摘出、Nrf2KOマウスとWTマウスの眼球からHE標本を作成し、病理組織像を検討したところ、WTマウスと比較してNrf2KOマウスにおいて網膜、硝子体中への炎症細胞の著明な浸潤、網膜層構造の高度な破壊が観察された。またEAU病理スコアでは有意な差はなかったものの、Nrf2KOマウスにおいてEAU病理スコアが高い傾向を示した(病理組織スコア WTマウス:  $1.0 \pm 0.7$ 、Nrf2KOマウス:  $2.1 \pm 1.2$ )。

これらの結果よりNrf2活性化剤によるEAUに対する抗炎症効果はみられなかったものの、Nrf2KOマウスにおいて病理組織像の重症化が観察されたことからNrf2を介した抗酸化ストレス機構がぶどう膜炎の病態に関与している可能性が示唆された。今後はNrf2により誘導される抗酸化分子(HO-1、NQO-1、SODなど)の眼局所やリンパ節での発現の違い、Th1およびTh17細胞関連免疫反応(サイトカイン測定)の評価、また酸化ストレスマーカーとして知られる8-OHdG(8-hydroxy-2-deoxyguanosine)をELISA法、免疫組織染色で評価することでEAUの病態における酸化ストレス分子の関与についてさらに検討を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Keino H, Horie S, Sugita S.	4. 巻 2018
2. 論文標題 Immune Privilege and Eye-Derived T-Regulatory Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Immunol Res.	6. 最初と最後の頁 ID 1679197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2018/1679197.	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 -
1. 著者名 Watanabe T, Keino H, Nakayama K, Taki W, Echizen N, Okada AA.	4. 巻 103
2. 論文標題 Clinical features of patients with diabetic anterior uveitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Br J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 78-82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bjophthalmol-2017-311453.	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 Nakayama M, Keino H, Watanabe T, Okada AA.	4. 巻 103
2. 論文標題 Clinical features and visual outcomes of 111 patients with new-onset acute Vogt-Koyanagi-Harada disease treated with pulse intravenous corticosteroids.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Br J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 274-278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bjophthalmol-2017-311691.	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 Higashi K, Meguro A, Takeuchi M, Yamane T, Kitaichi N, Horie Y, Namba K, Ohno S, Nakao K, Sakamoto T, Sakai T, Tsuneoka H, Keino H, Okada AA, Takeda A, Fukuhara T, Mashimo H, Ohguro N, Oono S, Enaida H, Okinami S, Mizuki N.	4. 巻 38
2. 論文標題 Investigation of the association between IL10 gene polymorphisms and Vogt-Koyanagi-Harada disease in a Japanese population.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Ophthalmic Genet.	6. 最初と最後の頁 187-189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3109/13816810.2016.1145698.	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 Sugita S, Shimizu J, Makabe K, Keino H, Watanabe T, Takahashi M.	4. 巻 19
2. 論文標題 Inhibition of T cell-mediated inflammation in uveitis by a novel anti-CD3 antibody.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Arthritis Res Ther.	6. 最初と最後の頁 176-176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-017-1379-9.	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 Fukuhara D, Takiura T, Keino H, Okada AA, Yan K.	4. 巻 139
2. 論文標題 Iatrogenic Cushing's Syndrome Due to Topical Ocular Glucocorticoid Treatment.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pediatrics.	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1542/peds.2016-1233.	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 津田麻祐子、慶野博、中山真紀子、倉井大輔、高橋あずさ、渡辺交世、岡田アナベルあやめ
2. 発表標題 CMV網膜炎を発症したGood症候群の1例.
3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安藤良将、慶野博、宮東昭彦、梅澤一夫、平形明人、岡田アナベルあやめ
2. 発表標題 網膜色素上皮細胞株に対するNF- $\kappa$ B阻害剤DHMEQの抗炎症効果の検討その2.
3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山真紀子、慶野博、安藤良将、渡辺交世、岡田アナベルあやめ
2. 発表標題 超広角眼底撮影による原田病急性期の眼底造影所見の検討.
3. 学会等名 第72回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mayuko Tsuda, Hiroshi Keino, Makiko Nakayama, Takayo Watanabe, and Annabelle A Okada
2. 発表標題 Compromised optic nerve head blood flow in cytomegalovirus retinitis.
3. 学会等名 Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安藤良将, 慶野博, 宮東昭彦, 梅澤一夫、岡田アナベルあやめ
2. 発表標題 エンドトキシン誘導ぶどう膜炎に対するNF-kB阻害剤DHMEQの抗炎症効果の検討
3. 学会等名 第121回日本眼科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中山真紀子, 慶野博, 安藤良将、渡辺交世, 岡田アナベルあやめ
2. 発表標題 超広角眼底撮影による原田病急性期の眼底造影所見の検討
3. 学会等名 第51回日本眼炎症学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安藤良将、慶野博、中山真紀子、安藤良将、渡辺交世、岡田アナベルあやめ
2. 発表標題 杏林アイセンターにおける後部強膜炎の臨床像の検討
3. 学会等名 第51回日本眼炎症学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中山真紀子、慶野博、高橋あずさ、津田麻祐子、渡辺交世、岡田アナベルあやめ
2. 発表標題 サイトメガロウイルス網膜炎における視神経乳頭部血流の評価
3. 学会等名 第71回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroshi Keino, Takayo Watanabe, Makiko Nakayama, Tomoko Nakamura, Annabelle A Okada
2. 発表標題 Imaging Prognostic Factors in Vogt-Koyanagi-Harada disease
3. 学会等名 The 14th Congress of the International Ocular Inflammation Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 慶野博	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 5
3. 書名 生物学的製剤の使い方.ぶどう膜炎・強膜炎. 7年前の常識は現在の非常識!眼科診療の最新標準.	

1. 著者名 慶野博	4. 発行年 2018年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 7
3. 書名 前房内炎症. 所見からみた診断の進め方 主訴と所見からみた眼科common disease.	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----