

令和元年6月19日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16985

研究課題名(和文) 角膜細菌感染症における組織常在型マクロファージの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of tissue-resident macrophages in bacterial keratitis

研究代表者

成松 明知 (Akitomo, Narimatsu)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：20617625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、マクロファージの様々な機能に注目が集まっている。本研究では、細菌性角膜炎において、角膜血管新生およびリンパ管新生に組織常在型マクロファージがどのように関連するかを明らかにすることを目的とした。本研究により、細菌性角膜炎では感染後期の単球性M₁がリンパ管新生に重要であり、組織常在性マクロファージは関与していないことが判明した。また、進展した角膜リンパ管は炎症の消退に関与していることが明らかになった。今回の結果では、組織常在性マクロファージの役割が血管新生リンパ管新生に直接的に関与していないことが判明したが、今後は角膜神経との関連について検討を続けていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、細菌性角膜炎では感染後期の単球性M₁がリンパ管新生に重要であり、組織常在型マクロファージは関与していないことが判明した。また、進展した角膜リンパ管は炎症の消退に関与していることが明らかになった。組織常在型マクロファージの機能は明らかにならなかったが、細菌性角膜炎のリンパ管新生のメカニズムおよび役割を明らかにすることが出来た。本研究結果は今後細菌性角膜炎の角膜混濁を抑制する新しい治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have focused on the various functions of macrophages. In this study, we investigated that the involvement of tissue-resident macrophages and corneal angiogenesis (lymphangiogenesis) in bacterial keratitis. As a result, we demonstrated that monocyte-derived macrophages were involved with corneal lymphangiogenesis. Moreover, corneal lymphangiogenesis reduced clinical manifestation in the late stage of bacterial keratitis. We are continuing to study more precise of mechanism of tissue-resident macrophages.

研究分野：眼科学

キーワード：角膜 感染症 マクロファージ 血管新生 リンパ管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

角膜は眼球の最表面に位置し、光学体として眼の機能を維持するために生体内で最も透明な組織であることと同時に、他の体表面組織と同様に病原体が体内への侵入することを防いでいる。この2つの機能を維持するために、角膜は絶妙なバランスで免疫機構の舵取りを行っている。正常角膜には血管やリンパ管などの脈管系組織は存在せず、わずかな数の免疫担当細胞しか存在しない。しかし、ひとたび角膜内に病原体が侵入すれば、病原体の防御目的に角膜上皮から炎症性サイトカインを放出し、マクロファージをはじめとした抗原提示細胞が活性化されることによって病原体への攻撃が開始され、角膜内への炎症性細胞浸潤、血管、リンパ管新生が引き起こされる。緑膿菌に代表されるグラム陰性菌は、コンタクトレンズ装用者に起こる感染性角膜潰瘍の代表的な原因菌であり、これらの細菌に対して有効な抗菌薬の局所投与(点眼)と全身投与にて治療を行うが、場合によっては角膜穿孔や、強い角膜混濁を残して癒痕治療し、重度の視力障害をきたすこともある。このように角膜における理想的な治療とは透明性を保つことであり、そのためには炎症性細胞浸潤、血管、リンパ管新生のメカニズムをより深く解明し、感染終息時に混濁を角膜内に残さない治療法の開発が望まれる。

マクロファージは、その貪食作用にて自然免疫の最初の砦となっており、抗原提示細胞として適応免疫応答も担っている。活性化マクロファージは古典的活性経路にて炎症を惹起するM1マクロファージと副経路にて抗炎症性に機能するM2マクロファージに分類されることが知られているが、近年、炎症性マクロファージ、創傷治癒マクロファージ、制御性マクロファージの3種類、さらには、複数の機能を持った中間状態のマクロファージが存在することが明らかになってきており、従来の分類に当てはまらないマクロファージの機能の多様性が注目されている。また、角膜内ではマクロファージが炎症時に血管ならびにリンパ管に重要な役割を果たしていることが明らかになってきているが、角膜内の組織常在型のマクロファージが感染にどのような働きをしているかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、細菌性角膜炎において、角膜血管新生およびリンパ管新生に組織常在型マクロファージがどのように関連するかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6マウスに27ゲージ注射針で3本擦過創を作成し、一般的な緑膿菌株としてよく用いられるPAO-1株を 2.5×10^5 CFU/2.5ul滴下し接種させ、ソフトコンタクトレンズを装着することで角膜炎モデルを作成した。角膜穿孔をきたしているものは除外した。対照は擦過創を作成し、PBSのみを滴下した群とし、血管およびリンパ管新生の経時的変化を検討した。

(2) マクロファージをクロドロン酸リポソーム投与することにより除去し、感染のみの群と比較することにより、マクロファージとリンパ管新生の関連を明らかにした。

(3) マクロファージを除去することで細菌性角膜炎における角膜リンパ管新生抑制モデルを作成し、リンパ管新生(抗LYVE-1抗体による免疫染色)、角膜炎の程度(クリニカルスコア)、角膜浮腫の程度について細菌性角膜炎モデルと比較することで、細菌性角膜炎におけるリンパ管の役割を検討した。

4. 研究成果

(1) 細菌性角膜炎における血管およびリンパ管新生の経時的変化を観察した結果、血管が先に進展し、リンパ管新生は感染の後期に血管新生より遅れて生じることが判明した。

また real-timePCR による検討ではリンパ管新生がリンパ管新生が感染後期に進展するのに一致して VEGF-C、VEGFR-3 が上昇していた。

(2) M 除去の検討では、感染群と比較して後期にマクロファージを除去した群のみが感染

14 日後のリンパ管が有意に抑制された。すなわち、感染後期のマクロファージがリンパ管新生に
関与していることが推察された。また、クロドロン酸を結膜に局所投与した群と腹腔内投与
した群を比較すると腹腔内投与した群のみリンパ管が抑制された。すなわち、角膜リンパ管に
は組織常在性マクロファージではなく全身から遊走された単球性マクロファージが関連してい
る可能性が示唆された。

(3) マクロファージを除去することで角膜リンパ管新生抑制モデルを用いて細菌性角膜炎に
おけるリンパ管の役割を検討した結果、角膜内の生菌数はリンパ管の有無による差はなかつた
が臨床スコアと角膜浮腫は、リンパ管を抑制した群が感染のみの群と比較し、優に悪化してい
た。すなわち、細菌性角膜炎において角膜リンパ管は感染後期の浮腫および炎症を消退させる
可能性が示唆された。

以上の結果より、細菌性角膜炎では感染後期の単球性 M がリンパ管新生に重要であり、組織
常在性マクロファージは関与していないことが判明した。また、進展した角膜リンパ管は炎症
の消退に関与していることが明らかになった。今回の結果では、組織常在型マクロファージの
役割が血管新生リンパ管新生に直接的に関与していないことが判明したが、今後は角膜神経と
の関連について検討を続けていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Narimatsu A, Hattori T, Koike N, Tajima K, Nakagawa H, Yamakawa N, Usui Y, Kumakura S, Matsumoto T, Goto H. Corneal lymphangiogenesis ameliorates corneal inflammation and edema in late stage of bacterial keratitis. Scientific reports. 9:2984, 2019. (査読あり)
2. Tajima K, Hattori T, Takahashi H, Katahira H, Narimatsu A, Kumakura S, Goto H. Rebamipide suppresses TNF- production and macrophage infiltration in the conjunctiva. Veterinary ophthalmology. 21:347-352, 2018 (査読あり)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Corneal lymphangiogenesis ameliorates corneal inflammation and edema in bacterial keratitis
Akitomo Narimatsu, Takaaki Hattori, Naohito Koike, Kazuki Tajima, Hayate Nakagawa, Naoyuki Yamakawa, Yoshihiko Usui, Shigeto Kumakura, Tetsuya Matsumoto and Hiroshi Goto
The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2019年5月
2. 角膜緑膿菌感染における角膜リンパ管新生の機序と役割
成松明知、服部貴明、山川直之、田島一樹、小池直人、熊倉重人、松本哲哉、後藤 浩
日本眼科学会総会 2019年4月
3. 角膜緑膿菌感染における血管およびリンパ管新生と VEGF の経時的変化
成松明知、服部貴明、山川直之、田島一樹、小池直人、熊倉重人、松本哲哉、後藤 浩
角膜カンファランス 2019年2月
4. 角膜緑膿菌感染におけるリンパ管の役割およびマクロファージとの関与の検討
成松 明知 眼科分子生物学研究会 2019年1月
5. The role of corneal lymphangiogenesis in a murine bacterial keratitis model
Akitomo Narimatsu, Takaaki Hattori, Naoto Koike, Kazuki Tajima, Hayate Nakagawa, Marina Ogawa, Takao Hirose, Shigeto Kumakura, Tetsuya Matsumoto and Hiroshi Goto
The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2018年5月
6. 角膜緑膿菌感染におけるリンパ管新生とマクロファージの関与
成松明知、服部貴明、田島一樹、小池直人、中川 迅、小川麻里奈、廣瀬尊朗、熊倉重人、松本哲哉、後藤 浩

日本眼科学会総会 2018年4月

7. 角膜緑膿菌感染におけるリンパ管の役割の検討

成松明知、服部貴明、田島一樹、小池直人、中川 迅、小川麻里奈、廣瀬尊郎、熊倉重人、松本哲哉、後藤 浩

角膜カンファランス 2018年2月

8. Involvement of Corneal Lymphangiogenesis and Macrophages in a Murine Bacterial Keratitis Model

Akitomo Narimatsu, Takaaki Hattori, Naoto Koike, Kazuki Tajima, Hayate Nakagawa, Haruki Katahira, Teruumi Minezaki, Shigeto Kumakura, Tetsuya Matsumoto and Hiroshi Goto

The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2017年5月

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 服部 貴明

ローマ字氏名: Hattori Takaaki

研究協力者氏名: 中川 迅

ローマ字氏名: Nakagawa Hayate

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。