

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09980

研究課題名(和文)慢性重症アレルギー性角結膜炎の病態と遺伝素因

研究課題名(英文) Pathophysiology and genetic predispositions of severe chronic allergic keratoconjunctivitis

研究代表者

松田 彰 (Matsuda, Akira)

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00312348

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)：ダニとブタクサ花粉抗原点眼投与を継続した結膜炎モデルを樹立し、遺伝子発現プロファイルを検討した結果、増殖型ケラチンの発現増加、杯細胞のマーカ遺伝子の発現増加を認め、ヒト重症アレルギー性結膜炎組織における病態の一部を再現することに成功した。モデルの改良を目指して、IL-25トランスジェニック(Tg)マウスを用いて研究を展開したところ、IL-25Tgマウスはホモ個体で、ヒト重症アレルギー性結膜炎に類似した結膜の増殖性変化を呈することが判明した。上述のダニ抗原+ブタクサ花粉投与をIL-25Tgマウスに実施し、より病態に近いモデルの樹立を目指した取り組みを継続中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究で、ヒトの慢性重症アレルギー性角結膜炎の病態を反映したマウスモデルの作成に成功した。このモデルは、今後慢性重症アレルギー性角結膜炎の新規治療法の開発、抗体療法をはじめとする新規治療法の評価に役立つものと期待される。また、今回のモデルの樹立には上皮由来サイトカインの働きが重要であったことから、現在喘息などの分野で開発が進んでいる上皮由来サイトカインの中和抗体を用いた治療が慢性重症アレルギー性角結膜炎の分野にも応用されることが今後期待される。

研究成果の概要(英文)：We generated mouse chronic allergic keratoconjunctivitis model using house dust mite and ragweed antigen eye drop administrations. We obtained gene expression profile of the model mouse and found increase of typical allergy-related genes including keratin16 and Muc5ac. The results suggested that the mouse model reflect the pathophysiology of human chronic allergic keratoconjunctivitis partially. To further mimic the pathophysiology of human chronic allergic keratoconjunctivitis, we generated IL-25 transgenic mouse using human keratin 14 promoter. The IL-25 transgenic mouse showed proliferative change of conjunctival tissue which is one of the characters of human chronic allergic keratoconjunctivitis. So we now try to refine mouse chronic allergic keratoconjunctivitis model by house dust mite and ragweed antigen eye drop administrations using IL-25 transgenic mouse.

研究分野：眼科学

キーワード：マウスモデル 春季カタル アトピー性角結膜炎 サイトカイン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

春季カタル(VKC)とアトピー性角結膜炎(AKC)は、慢性重症アレルギー性角結膜炎で、結膜の増殖性変化を伴い、重症例では角膜混濁や不正乱視による視覚障害を生ずる。免疫抑制薬タクロリムスの点眼療法の有効性が認められている一方、VKC/AKC患者の20%はタクロリムス治療抵抗性の難治症例である。難治性VKC/AKC症例の病態生理の解明のために、難治VKC/AKC由来組織のトランスクリプトーム解析を施行したところ、イムノグロブリン遺伝子並びに黄色ブドウ球菌に対する生体防御反応に関連する遺伝子発現の著明な亢進を認めた。この結果はVKC/AKC症例において異所性リンパ器官(TLO: tertiary lymphoid organ)の形成と結膜局所でのIgE産生が観察されるとの報告(Matsuda A et al. JACI 126;1310-12, 2010)と一致しており、VKC/AKCの病態生理を反映した結果と考えられる。VKC/AKCの病態解析や新規治療創出にはマウスモデルが有用であるが、TLOの増生や結膜の増殖性変化を伴うVKCモデルマウスは樹立されていない。本研究では、VKCの表現形を忠実に反映するVKCモデルマウスの樹立のための方法を探求したい。また、VKC/AKC患者由来ゲノムサンプルを用いたゲノムワイド患者対照相関研究(GWAS)を施行し、眼に特異的なVKC/AKC発症関連遺伝子の同定を目指す。GWAS解析の結果得られた関連遺伝子に関する情報をAKCモデルマウスの作成過程にフィードバックして、実際のヒトAKCに近いマウスモデルへの改良を目指す。

### 2. 研究の目的

ヒトの病態解析から異所性リンパ器官形成、局所IgE産生、結膜増殖性変化がVKCモデルとしての必要条件と考え、VKCマウスモデル樹立を目指して研究を推進する。VKCモデルマウスを樹立できれば、病態形成の機序を明らかにすることができるとともに、新規治療の有効性評価が可能になり、臨床応用に繋がるデータの収集に貢献できると期待される。また病態に即したVKCマウスモデルとして広く利用してもらうことで、眼アレルギー研究の進歩に貢献できる可能性が期待できる。また、VKC/AKC症例の多くはアトピー素因を有するが、アトピー素因を有するヒトが全てVKC/AKCを発症するわけではなく、アトピー素因以外のVKC/AKC発症の遺伝的因子は不明である。これまでVKC/AKCを対象にしたGWASは施行されておらず、本研究で重症慢性アレルギー性角結膜炎(VKC/AKC)発症の遺伝的要因(特に眼に特異的な遺伝的要因)を明らかにしたい。

### 3. 研究の方法

(1) 既存のマウスアレルギー性結膜炎モデルは急性炎症モデルであり、血中の抗原特異的IgEの発現上昇は伴うものの、VKC/AKCに見られるような、結膜の増殖性変化、シールド潰瘍形成、異所性リンパ器官増生および局所でのIgE産生は見られない。我々のトランスクリプトーム研究の結果から、イムノグロブリン産生誘導とブドウ球菌に対する生体反応を惹起させることでVKCモデルマウスの樹立を試みる。具体的には、アレルギー性鼻炎モデルにおける鼻ポリープ形成に成功したとの報告(Shin HW et al. J Allergy Clin Immunol 135:1476-85, 2015)を参考に、抗原感作(ダニ抗原とブタクサ花粉抗原)後、3ヶ月間繰り返し抗原点眼投与を継続し、同時に黄色ぶどう球菌由来毒素(T細胞を活性化するスーパー抗原、TLO形成に重要との報告あり:Gould H et al. Trend Immunol 27:446-452,2006)を投与して、結膜増殖性変化とTLO形成、結膜局所IgE産生を指標として、VKCモデルマウスのプロトタイプ確立を目指す。

(2) アレルギー性鼻炎モデルにおける鼻ポリープ形成に成功したとの報告の中で、上皮由来 2 型炎症起始サイトカインの 1 つである IL-25 の発現がポリープ様病変(組織増殖性変化)の形成に必須であったとの記載があるため、VKC モデルの樹立における IL-25 の役割を明らかにするために IL-25 遺伝子欠損マウスと IL-25 トランスジェニックマウスを用いて VKC モデルの形成に与える役割を評価した。

(3) VKC モデルマウスを用いて、VKC に対する新規治療法の有効性評価を行う。これまでの病態研究から現段階で想定している新規治療法は、2 型炎症起始サイトカイン(IL-33)の活性阻害である。VKC モデルマウスの完成と同時に治療効果の評価を進める。

(4) 大阪大学・岡田随象教授との共同研究で、VKC/AKC ゲノムサンプルの GWAS 解析をイルミナ社製のアジア人用 SNP アレイを用いて施行した。

#### 4. 研究成果

(1) 抗原感作(ダニ抗原とブタクサ花粉抗原)後、49 日間にわたって抗原点眼投与を継続したモデルを樹立し、マイクロアレイを用いて結膜組織における遺伝子発現プロファイルを検討した。その結果、増殖型ケラチン(Krt6/Krt16)の発現増加、杯細胞のマーカージェン(Gp2/Muc5ac)の発現増加を認め、ヒト VKC 組織における結膜の増殖反応や杯細胞の増生といった病態の一部を再現することに成功した。一方で、当初目標にしていた異所性のリンパ器官形成に関しては、関連する遺伝子(Cxcl13/Ccl21)の発現増加は見られたものの、形態学的に結膜における異所性のリンパ器官形成は確認されず、さらなるモデルの改良を目指して、IL-25 トランスジェニックマウスを用いたヒト VKC モデルの樹立を目指した研究を展開することになった。

(2) ヒトケラチン 14 プロモーターを利用した IL-25 トランスジェニックマウス(IL-25Tg マウス)を樹立し、よりヒトの VKC 病態に近いマウスモデルの樹立を目指した。IL-25Tg マウスは C57/BL6 背景の個体において無刺激の状態でも顔面にアトピー性皮膚炎に似た表現型を呈することが判明し、現在その成果を学術誌に投稿するための準備を進めている。また BALB/c 背景の IL-25Tg マウスはホモ個体で、ヒト VKC に類似した結膜の増殖性変化を呈することが判明し、こちらも合わせて現在学術雑誌への投稿を準備している。これらのマウスを利用して、上述のダニ抗原+ブタクサ花粉投与に慢性マウス角結膜炎モデルを加味することで、より VKC の病態に近いモデルの樹立を目指した取り組みを継続中である。

(3) 治療につながる試みとして、マウス IL-33 に対する中和抗体を自作し、ブタクサ花粉モデル、IL-25TG-ダニ抗原+ブタクサ花粉モデルを作成し、その効果を評価中である。ブタクサ花粉誘発マウスアレルギー性結膜炎モデルを用いたプレリミナリー経過では、マウスの腹腔内に感染前と点眼チャレンジ前に抗 IL-33 抗体を投与すると結膜への好酸球浸潤が抑制されることが判明した。また *in vitro* の実験で抗 IL-33 抗体がマウス肥満細胞における IL-33 刺激を中和し、IL-33 誘導性の IL-13 産生を抑制することを確認した。

(4) 難治性 AKC ゲノムサンプルの GWAS 解析を施行した。イルミナ社製のアジア人用 SNP アレイを用いた解析を施行した。現在のところ、ゲノムワイド関連解析の有意水準を満たすバリエーションは検出されていないが、HLA バリエーションの imputation ツールを用いた解析から、HLA-DQB 遺伝子領域のバリエーションに強い関連を示すことを発見し、現在その機能的な意義を検証するための準備を進めるとともに、サンプル数を増やして、他の領域でゲノムワイド関連解析の有意水準を

満たすバリエーションを検出する試みを継続している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Toyoshima S, Sakamoto-Sasaki T, Kurosawa Y, Hayama K, Matsuda A, Watanabe Y, Terui Y, Gon Y, Matsumoto K, Okayama Y.	4. 巻 147
2. 論文標題 miR103a-3p in extracellular vesicles from Fc RI-aggregated human mast cells enhances IL-5 production by group 2 innate lymphoid cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 1878-1891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2021.01.002.	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 Asaoka S, Kasuga T, Matsunaga T, Hayashi Y, Asada Y, Iwamoto S, Hirakata T, Honda R, Obazawa H, Sasaki H, Ohta T, Matsuda A.	4. 巻 30
2. 論文標題 Operative complications of glaucoma drainage implant tube insertion through the sulcus for pseudophakic eye.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Glaucoma	6. 最初と最後の頁 e169-174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IJG.0000000000001783.	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 Mashimo K, Usui-Ouchi A, Ito Y, Wakasa-Arai R, Yokoi N, Kawasaki S, Murakami A, Matsuda A, Ebihara N.	4. 巻 65
2. 論文標題 Role of Oncostatin M in the Pathogenesis of Vernal Keratoconjunctivitis: Focus on tissue remodeling.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Jpn J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 144-153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-020-00791-8.	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 Matsuda A, Hirakata T, Asada Y, Nakae S	4. 巻 2223
2. 論文標題 Experimental Mouse Models of Ragweed- and Papain-Induced Allergic Conjunctivitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 133-149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1001-5_10.	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 Unno H, Arae K, Matsuda A, Ikutani M, Tamari M, Motomura K, Toyama S, Suto H, Okumura K, Matsuda A, Morita H, Sudo K, Saito H, Matsumoto K, Nakae S.	4. 巻 533
2. 論文標題 Critical role of IL-33, but not IL-25 or TSLP, in silica crystal-mediated exacerbation of allergic airway eosinophilia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 493-500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.09.046.	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 Adachi K, Asada Y, Hirakata T, Onoue M, Iwamoto S, Kasuga T, Matsuda A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Alteration of gene expression in mice after glaucoma filtration surgery.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 15036
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-72036-0.	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 Kasuga T, Asaoka S, Asada Y, Iwamoto S, Hirakata T, Honda R, Ohta T, Matsuda A.	4. 巻 29
2. 論文標題 Proline-assisted tube insertion through sulcus in Ahmed valve.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Glaucoma	6. 最初と最後の頁 e106-107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IJG.0000000000001602.	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 Honda Sari, Namekata Kazuhiko, Kimura Atsuko, Guo Xiaoli, Harada Chikako, Murakami Akira, Matsuda Akira, Harada Takayuki	4. 巻 60
2. 論文標題 Survival of Alpha and Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells in NMDA-Induced Neurotoxicity and a Mouse Model of Normal Tension Glaucoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 3696 ~ 3696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.19-27145	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 Honda Rio, Kasuga Toshimitsu, Murakami Akira, Matsuda Akira	4. 巻 44
2. 論文標題 Effects of the Numbers and the Shapes of Venting Slits on Intraocular Pressure after Baerveldt Glaucoma Drainage Implant	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Eye Research	6. 最初と最後の頁 921 ~ 924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/02713683.2019.1597892	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 Matsuda Akira, Asada Yosuke, Suita Naomasa, Iwamoto Satoshi, Hirakata Toshiaki, Yokoi Norihiko, Ohkawa Yasuyuki, Okada Yukinori, Yokomizo Takehiko, Ebihara Nobuyuki	4. 巻 143
2. 論文標題 Transcriptome profiling of refractory atopic keratoconjunctivitis by RNA sequencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1610 ~ 1614.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2018.11.007	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 Asada Yosuke, Okano Mikiko, Ishida Waka, Iwamoto Satoshi, Fukuda Ken, Hirakata Toshiaki, Tada Norihiro, Fukushima Atsuki, Ebihara Nobuyuki, Kudo Akira, Matsuda Akira	4. 巻 68
2. 論文標題 Periostin deletion suppresses late-phase response in mouse experimental allergic conjunctivitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 233 ~ 239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2018.09.007	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2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 足立 啓介、浅田 洋輔、平形 寿彬、松田 彰
2. 発表標題 抗IL-33抗体の腹腔内注射によるアレルギー性結膜炎モデルの症状抑制効果について
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田 彰
2. 発表標題 アレルギー性結膜疾患病態と新知見
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会(招待講演)
4. 発表年 2021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	岩本 怜 (Iwamoto Satoshi)  (10568207)	順天堂大学・医学部・助教  (32620)	
研究分担者	海老原 伸行 (Ebihara Nobuyuki)  (20255699)	順天堂大学・医学部・教授  (32620)	
研究分担者	浅田 洋輔 (Asada Yosuke)  (70596626)	順天堂大学・医学部・非常勤助教  (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------