

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592258

研究課題名（和文）

炎症制御を主眼とした難治性角結膜疾患の器官再生的病態探索と分子治療法の開発

研究課題名（英文）

Pathophysiological analysis and development of therapeutic strategy for refractory corneal and external eye diseases

研究代表者

宮崎大 (MIYAZAKI DAI)

鳥取大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30346358

研究成果の概要（和文）：

眼アレルギー、眼表面疾患、角膜疾患、加齢性網膜疾患の分子病態をさぐるため、マウスモデル、罹患者サンプル、モデル細胞より取得したトランスクリプトーム・プロテオームをベースに病態解析を行った。その結果、いずれの疾患群も獲得免疫系、天然免疫系の制御をうけ、これらが器官再生シグナルに統合される機序が想定された。これらの制御に関わる代表的な分子群は新たな治療標的となりえる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To understand molecular pathology of ocular surface or corneal diseases, contribution of inflammatory or regenerative signals were integrally analyzed. Application of network model-based approach utilizing transcriptome or proteome of diseased tissues or models revealed intricate interactions of innate and acquired immune system in disease processes. The insight on integral regulatory pathways or contributing factors was further utilized to understand age related ocular diseases. Present findings may become basis to develop novel or more efficacious therapeutic strategy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼免疫学

1. 研究開始当初の背景

難治性眼表面疾患や角膜内皮傷害は、重篤な視力障害をきたし、社会的な重要性が高い。しかしそれらの診断、予防さらには治療をおこなっていくうえでいまだ十分な知見がえられていない。また、加齢性黄斑変性症は後眼部において後天的失明の原因となる重要

な疾患であるが、その分子病態の解明は端緒についたばかりであった。いずれの疾患群も病態は炎症的側面および再生的側面をもつもののその観点からは十分な検討が行われていない状態であった。

2. 研究の目的

重症型アレルギー性結膜炎、角膜内皮不全を含めた前眼部疾患を、炎症性側面および組織障害・再生的側面から理解し、より有効な診断および治療戦略の確立に役立てることを目的とする。炎症的側面は、天然免疫系、Th1, Th2, Th17 に分類される獲得免疫系にカテゴリー化しその寄与を検証する。そこでこれら炎症性シグナル群と再生面の関与を上記の疾患群をベースに包括的な分子病態を明らかにする。さらに、後眼部疾患を含む加齢性疾患へこの概念を拡張し、新規治療法候補経路や因子を探索する。

3. 研究の方法

アレルギー性結膜炎の解析のためには、マウスアレルギー性結膜炎モデルを用い、炎症シグナル、あるいは再生に関与する homing シグナル、さらに恒常性の維持にかかわる因子の寄与の解析を行った。

角膜上皮障害および角膜内皮傷害の病態理解のためには、ヒト培養角膜内皮細胞および上皮細胞を対象にそのトランスクリプトームを解析し炎症シグナルおよび再生シグナルの関与をネットワークモデルを用いて検討し、代表的な分子の寄与を検討した。炎症および血管新生を伴う難治性眼表面疾患として、再発翼状片の再発機序にかかわる因子をトランスクリプトーム面から解析し、代表的な炎症因子と血管新生機序の相互作用を検討した。

重篤な視力障害をきたす網膜疾患として、網膜分枝静脈閉塞および加齢性黄斑変性症を対象に、炎症および再生シグナルを担う因子群を前房水のプロテオーム面からの解析を試みた。

4. 研究成果

マウスアレルギー性結膜炎モデルにおけるトランスクリプトーム解析を用いて、獲得免疫系の刺激経路を探索し、単球や骨髄系細胞の局所への浸潤に関与すると想定される再生関連因子を探索した。その結果、炎症局所における Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) の顕著な増大を認めた。MCP-1 はそのレセプターである CCR2 を介して骨髄系細胞の局所への回帰を媒介する重要な因子である。MCP-1 の投与や阻害を試みた結果、MCP-1/CCR2 システムは、アレルギー性結膜炎における即時型反応の阻害のみならず、好酸球の浸潤に代表される遅発相の反応にも強く関与していることが判明した¹¹。

炎症組織において、細胞は、壊死をおこすと DNA を放出する。一方この DNA は、天然免疫

系に位置づけられる Toll like receptor 9 (TLR9) の刺激を介して免疫反応を刺激する。そこで、アレルギー性結膜炎モデルを用いて、TLR9 経路により、獲得免疫系がいかに制御されるかを検討した。その結果、TLR9 のリガンドである CpG オリゴヌクレオチドの刺激は、獲得免疫系を抗原特異的に制御する機能を有していることが判明した。この制御は TLR9 を発現する B 細胞を介しておこり、TLR9 刺激は調節性 B 細胞を誘導して免疫調節に関与することが判明した¹²。

アトピー性皮膚炎患者の眼瞼部には多くの黄色ブドウ球菌が常在菌として存在していることが知られている。そこで、黄色ブドウ球菌自体が天然免疫系のシグナルとして認識される可能性を考え、この菌体成分が天然免疫系を介してアレルギー反応へいかなる寄与があるかを検討した。その結果、菌体成分の Staphylococcus enterotoxin B は、肥満細胞をその反応主体とする即時型反応の悪化を引き起こすことが判明した⁹。

アレルギー性炎症機序の検討するため、マウスモデルのトランスクリプトームを用いてネットワーク解析を行った。その結果、即時相反応においては、NF- κ B を中心とする炎症機序が主体となっていることが判明した。そこで、炎症制御の観点から NF- κ B 制御を試みるため、NF- κ B を活性化する I κ B Kinase (IKK) の関与を検討した。IKK は IKK1 と IKK2 が各種カスケードにおいて直接 NF- κ B を制御し、通常 IKK2 が主たる役割を示す。しかしながら即時型アレルギー反応において IKK1 が tonic な影響を強くもち、B 細胞を介する炎症を直接媒介することが B 細胞欠損マウスの結果から判明してきた (投稿中)。

眼表面の癒痕形成性炎症疾患のモデルとして、翼状片の分子病態を検索した。とくに難治例においては翼状片手術後再発し、顕著な癒痕形成をきたす。そこで、その再発機序を翼状片患者より採取したサンプルを用いて検討した⁸。そのトランスクリプトームの解析よりペリオスチンの関与をみいだした。その癒痕形成への寄与をメカニスティックに検討した結果、ペリオスチンは、Th2 型の代表的なサイトカインである IL-4 により誘導され、さらにペリオスチンが細胞の接着作用を媒介することにより癒痕形成に寄与することが判明した。ペリオスチンは、最近では、難治性網膜疾患の代表である増殖性硝子体網膜症への関与も知られるようになってきており、治療標的としての重要性が示唆された。

次に、角膜の構成成分として重要な角膜上皮

と角膜内皮の炎症応答を包括的に検討した。モデル刺激として単純ヘルペスウイルスを用いて解析した結果、角膜上皮と角膜内皮はトランスクリプトームレベルで機能、性質ともにまったく異なる反応性を示した。角膜上皮の場合、炎症性サイトカインの代表であるIL-6を中心とした分子ネットワークを呈し、IL-6は血管内皮増殖因子(VEGF)産生を介して血管新生に関与していることが示唆された⁷。一方、角膜内皮は、IL-6やNF- κ Bを中心とする炎症経路に加え、同時に強い炎症制御機構をもつことが示唆された⁴。さらなる解析により、角膜内皮は、抗原提示細胞としても機能し、このときに獲得免疫系に対して制御性の機能を発揮することが判明した。次に角膜内皮において、天然免疫系シグナル受容体のプロフィールとその機能を検索した。その結果、天然免疫系シグナル受容体の代表として、TLR9の重要性が示唆された。とくに角膜内皮においてはTLR9は、NF- κ Bを主体とする種々の炎症性サイトカインの誘導に転写プロモーターレベルで関与していた⁵。

炎症癬痕性眼表面疾患の解析より、加齢性疾患においても共通する制御機構の存在が仮定できた。そこで、代表的な加齢性網膜疾患として、網膜分枝静脈閉塞症と加齢性黄斑変性の病態を炎症機転からの解明を試みた。罹患患者より採取した患者の眼内より得られた前房水のプロテオーム解析を試みた結果、網膜分枝静脈閉塞症においては、血管新生や炎症細胞遊走に重要な役割をはたすIL-8の強い関与が認められた⁶。とくに治療に抵抗する症例においては代表的なTh1型サイトカインの一つであるIL-12が関与していることが判明した。一方、日本人における加齢性黄斑変性症の代表的なサブタイプであるポリープ状脈絡膜血管症においては、獲得免疫系のTh17やTh2にそれぞれ関与するIL-23、IL-4の増大が強いオッズ比を示しこれらが診断あるいは治療標的として利用できる可能性が示唆された¹。

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12件)

1. Sasaki S, Miyazaki D et al. Associations of IL-23 with Polypoidal Choroidal Vasculopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2012, 査読あり. doi: 10.1167/iovs.11-7913
2. Ikeda Y, Miyazaki D et al. Assessment of Real-Time Polymerase Chain Reaction Detection of Acanthamoeba and Prognosis Determinants of Acanthamoeba Keratitis.

Ophthalmology. 2012, 査読あり doi:10.1016/j.ophtha.2011.12.0236.

3. Ebihara Y, Ohashi Y, Fujishima Y, Fukushima A, Nakagawa Y, Namba K, Okamoto S, Shoji J, Takamura E, Uchio, E, Miyazaki D: Blood level of tacrolimus in patients with severe allergic conjunctivitis treated by 0.1% tacrolimus ophthalmic suspension. Allergology International 61(2):275-82 2012 査読あり. doi:10.2332/allergolint.11-0A-0349.

4. Miyazaki D et al. Herpes simplex virus type 1-induced transcriptional networks of corneal endothelial cells indicate antigen presentation function. Invest Ophthalmol Vis Sci 52. 2011. 4282-4293 査読あり doi: 10.1167/iovs.10-6911

5. Takeda S, Miyazaki D et al. Roles played by toll-like receptor-9 in corneal endothelial cells after herpes simplex virus type 1 infection. Invest Ophthalmol Vis Sci 52. 2011. 6729-6736 査読あり doi: 10.1167/iovs.11-7805

6. Kaneda S, Miyazaki D, Sasaki S, Yakura K, Terasaka Y, Miyake K, Ikeda Y, Funakoshi T, Baba T, Yamasaki A, & Inoue Y: Multivariate analysis of inflammatory cytokines in eyes with branch retinal vein occlusion: Relationships to bevacizumab treatment. Invest Ophthalmol Vis Sci 52:2982-2988, 2011. 査読あり. doi: 10.1167/iovs.10-6299

7. Terasaka Y, Miyazaki D, Yakura K, Haruki T, & Inoue Y: Induction of IL-6 in transcriptional networks in corneal epithelial cells after herpes simplex virus type 1 infection. Invest Ophthalmol Vis Sci 51:2441-2449, 2010. 査読あり. doi: 10.1167/iovs.09-4624

8. Kuo C-H, Miyazaki D, Yakura K, Araki-Sasaki K, & Inoue Y: Role of periostin and interleukin-4 in recurrence of pterygia. Invest Ophthalmol Vis Sci 51:139-143, 2010. 査読あり. DOI:10.1167/iovs.09-4022

9. Miyazaki D, Ishida W, Tominaga T, Sumi T, Fukushima A: Aggravation of conjunctival early-phase reaction by Staphylococcus enterotoxin B via augmentation of IgE production. Jpn J Ophthalmol. 54(5):476-80. 2010. 査読あり.

10. 宮崎大: ゲノムからみたアレルギー疾患とアレルギー性結膜炎. 日本眼科学会雑誌 114 巻 9 号. 783-790. 2010 査読あり

11. Tominaga T, Miyazaki D, Sasaki S, Mihara S, Komatsu N, Yakura K & Inoue Y: Blocking mast cell-mediated type 1 hypersensitivity in experimental allergic conjunctivitis by monocyte chemoattractant protein-1/CCR2. Invest Ophthalmol Vis Sci 50:5181-5188, 2009. 査読あり doi:10.1167/iovs.09-3637

12. Miyazaki D, Kuo C-H, Tominaga T, Inoue Y & Ono SJ: Regulatory function of CpG-activated B cells in late phase experimental allergic conjunctivitis. Invest Ophthalmol 50:1626-1635, 2009. 査読あり. doi: 10.1167/iovs.08-2701

[学会発表] (計 7 件)

1. 春木智子、宮崎大 ほか. Indoleamine 2,3-deoxygenase による角膜内皮の免疫制御作用. 角膜カンファレンス 2012(第 36 回日本角膜学会総会・第 28 回日本角膜移植学会. 2012/2/23-2/25. ホテルニューオータニ (東京)

2. 宮崎大. 炎症性側面からみた眼アレルギーと加齢性網膜疾患. 第 61 回日本アレルギー学会 秋期 学術大会 シンポジウム 2011/11/10-11/12. 東京

3. Miyazaki D, Sasaki, S, Mihara S, Tominaga T, Yakura K, Inoue Y. Pharmacological inhibition of I κ B kinase aggravates ocular allergic reactions Pharmacological inhibition of I κ B kinase aggravates ocular allergic reactions. 2010/5/2-5/6

4. 宮崎大. 結膜アレルギーにおける NF κ B 経路の役割. 第 63 回臨床眼科学会 オキュラーサーフェス研究会 2009/10/9. 福岡

5. 宮崎大. ケモカインを標的にした肥満細胞制御とアレルギー性結膜炎の病態第 63 回臨床アレルギー研究会 における NF κ B 経路の役割. 第 63 回臨床眼科学会 オキュラーサーフェス研究会 2009/6/20 東京

6. 宮崎大. アレルギー性結膜炎治療の新たな展開と免疫抑制剤. 第 8 回 Symposium of Ocular Surface and Infection. 2009/5/23 大阪

7. Miyazaki D. The immunological mechanism on allergic ocular surface diseases. Asia Pacific Academy of Ophthalmology Meeting. 2009/5/16-5/19, Bali, Indonesia

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 大 (MIYAZAKI DAI)

鳥取大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30346358

(2) 研究分担者

井上 幸次 (INOUE YOSHITSUGU)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：10213183

(3) 研究分担者

馬場 高志 (BABA TAKASHI)

鳥取大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40304216

(4) 研究分担者

池田 欣史 (IKEDA YOSHIFUMI)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：10444639