

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791671

研究課題名（和文） 熱ショック蛋白による眼内炎症抑制機構の解明

研究課題名（英文） Role of heat-shock proteins in the ocular immune privilege

研究代表者

高瀬 博 (TAKASE HIROSHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：20451940

研究成果の概要（和文）：

本研究は、眼内液中に分泌型の熱ショック蛋白が存在し、その中には炎症性眼内浸潤細胞に対して抗原性を示すもの、逆に免疫抑制活性を有するものがあると仮説を立て、それを検証するために行った。まず、白内障およびぶどう膜炎患者から採取した前房水における各種熱ショック蛋白の存在の有無について検索を行った。その結果、前房水中における HSP27 の発現が検出された。一方、HSP10、HSP60、HSP70 は検出限界以下であった。次に、眼内液中に検出された HSP27 のリコンビナント蛋白を、ぶどう膜炎患者眼局所より樹立した T 細胞クローンと共生培養し、HSP27 が T 細胞の増殖能やサイトカイン産生能に与える影響を解析した。その結果、HSP27 はぶどう膜炎患者眼局所浸潤細胞由来の T 細胞クローンの持つインターフェロン γ 産生能を亢進させる事が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The present study was aimed at investigating the role of heat-shock proteins (HSPs) in the immune regulation in the eye. We hypothesized that the intraocular fluids contain secreted form of HSPs, and that the HSPs act as antigens targeted by ocular infiltrating cells, or as immune suppressive agents. We first tested if aqueous humor from patients with cataract contain HSPs. We detected HSP27 in the aqueous humor, whereas HSP10, HSP60, or HSP70 were not detected. We then co-cultured recombinant HSP27 with T cell clones (TCCs) and tested if HSP27 has effects on the proliferation or cytokine production of TCCs. As a result, HSP27 up-regulated interferon-gamma production by TCCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：免疫学、眼科、炎症

1. 研究開始当初の背景

1) 眼局所免疫防御機構についてのこれまでの研究

眼内への細胞浸潤を伴う炎症性疾患は、ぶどう膜炎と総称される。その原因は多岐に渡り、ヘルペスウイルスや寄生虫等の病原微生物の感染性ぶどう膜炎と、ベーチェット病、サルコイドーシス、Vogt-小柳-原田病等の非感染性ぶどう膜炎に大別される。一般に炎症性疾患は、炎症細胞による組織破壊による瘢痕を伴い終息するが、眼内における炎症性瘢痕は、視力の維持に重要な眼内組織の不可逆性変化、すなわち角膜や水晶体等の透明組織の混濁、眼房水の流出路障害による緑内障の発生、網膜や視神経等の神経組織障害を来し、炎症は終息してもその後視力障害を残す。このような眼内炎症による不可逆的な視覚障害からを回避するために、眼は炎症に対して抑制的に作用する独自の免疫防御機構を持つ事が知られている。このような、眼が自然に備える免疫防御機構の詳細を明らかにする事は、炎症性疾患に対するあらたな抑制治療分子の開発に繋がる重要な研究と言える。

我々はこれまでに、Vogt-小柳-原田病、サルコイドーシス、ベーチェット病などの代表的な各種ぶどう膜炎患者の眼局所から採取した眼内浸潤細胞からT細胞クローンを樹立し、これを標的細胞として眼内の免疫調節分子の活性や (Takase H, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:2691-2696.) 病気特異的抗原の解析を行った。(Sugita S, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:2547-2554) その結果、前房水や硝子体液などの眼内液は、炎症性眼内浸潤細胞に対する抑制作用、すなわち浸潤細胞のサイトカイン産生抑制作用と細胞死 (アポトーシス) 誘導能を持つ事、そしてその活性を担う分子の候補として、眼内液中に TGF- β や VIP、 α -MSH、可溶性 CD95 (Fas) リガンドの存在を明らかにしてきた。しかし眼内液の持つ免疫抑制活性はこれらの分子のみでは十分に説明出来ず、未だ同定されていない免疫活性分子の存在が推定されている。

2) 眼内における熱ショック蛋白の発現

近年、Missotten らは HSP27 や HSP70 などの熱ショック蛋白がヒトの眼内組織 (虹彩毛様体上皮、水晶体上皮、神経網膜など) に構成的に発現している事を報告した。(Missotten GS, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:3059-3065.) また眼内組織の多くの容積を占める水晶体は低分子熱ショック蛋白である α クリスタリンを多く含む事が知られている。眼内組織は、眼内を満たす前房水や硝子体などの眼内液成分に接しているため、これらの熱ショック蛋白は

眼内液中にも一定の濃度で分泌される事が想定される。

3) 細胞外に分泌された熱ショック蛋白の免疫シグナル作用

熱ショック蛋白 (HSP) は、熱発や外傷、酸化ストレス、ウイルス感染等の生体に加わる様々なストレスに応答して発現、分泌される蛋白質群で、その分子量に応じて異なる多くのファミリーを形成する。熱ショック蛋白は細胞内蛋白質として働き、分子シャペロンとして蛋白質の構造維持や、アポトーシスのシグナル伝達に関与している。近年、このような細胞内での働きに加え、いくつかの熱ショック蛋白 (HSP27, 60, 70, 90, 110, GRP 78, 94, 170 など) はストレスに応じて細胞外に分泌され、細胞表面受容体に結合する事で、シグナル分子として生体の免疫応答に強い作用を持つ事が明らかとなってきた。例えば、低分子熱ショック蛋白である HSP27 は抗炎症作用を持ち、逆に HSP60 は炎症促進作用を示す。(Calderwood SK, et al. *FEBS Letters.* 2007;581:3689-3694.) その他にも、熱ショック蛋白-抗原複合体の食食、抗原提示による免疫調節性 T 細胞の誘導や、腫瘍免疫の標的分子としての作用など、細胞外に分泌された熱ショック蛋白には、強い免疫応答作用があると考えられる。

4) 眼内炎症と熱ショック蛋白に関するこれまでの報告

熱ショック蛋白と眼内炎症の関わりについては、実験動物においていくつかの報告がなされている。Kitamei らは HSP70 の誘導作用を持つグラニルグラニルアセトンをマウスに経口投与する事で、眼内の HSP70 の発現が上昇し、実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (EAU) の重症度が有意に低下する事を報告した。(Kitamei H, et al. *Immunobiology.* 2007;212:11-8.) 一方 Rao らは EAU 発症直前の網膜視細胞層に低分子熱ショック蛋白の α -A クリスタリンが発現上昇する事、そして α -A クリスタリンのノックアウトマウスで EAU が早期発症する事を報告している。(Rao NA, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:1161-1171.) これらの報告から、少なくとも実験動物においては、眼内に発現、誘導された熱ショック蛋白が、眼内炎症に対して抑制的に作用していると考えられる。しかしながら、ヒトの眼内における熱ショック蛋白の免疫調節作用については、ベーチェット病患者における HSP60 の抗原性を示唆する報告が散見されるのみであり (Direskeneli H, et al. *Clin Exp Rheumatol.* 2003;21:S44-8)、その多くは未だ不明のままである。また、眼内に発現する熱ショック蛋白の、眼内浸潤細胞に対する直接的な作用に

関する研究は、国内外でも未だ行われていない。

2. 研究の目的

本研究は前房水または硝子体液などの眼内液中に分泌された熱ショック蛋白が存在し、その中に炎症性眼内浸潤細胞に対する抑制活性を有するものがあるとの仮説を立てた。それを検証するために、研究期間内に以下の実験を行う。

- ① 眼内液中の熱ショック蛋白の発現を、定性的、定量的に解析する
- ② 眼内液中に存在する熱ショック蛋白のリコンビナント蛋白を用いて、眼内浸潤細胞の細胞増殖、サイトカイン産生、アポトーシス誘導などに対する作用を解析する。

3. 研究の方法

(1) 前房水、硝子体液、虹彩の採取

学内倫理委員会の承認を得て、患者からインフォームドコンセントを得た上で、以下の検体を採取する。

老人性白内障患者から白内障手術時に、本来は吸引、破棄される前房水を収集する。また特発性黄斑円孔患者から硝子体手術時、これも本来は切除、吸引後に破棄される硝子体を収集する。それぞれの検体は -80°C で保存する。これらは、免疫学的には正常な眼内液検体と位置づけ、以後の研究に用いる。

各種ぶどう膜炎患者（ベーチェット病、Vogt-小柳-原田病、サルコイドーシス、急性網膜壊死など）の前房を少量採取する。得られた検体は遠心分離を行い、液生成分と細胞成分に分ける。液生成分は -80°C で保存する。細胞成分に対しては、次項の方法を用いてT細胞クローンを樹立する。

ぶどう膜炎等の眼内炎症性疾患の既往の無い緑内障患者の手術時に切除される虹彩を収集し、以下の方法を用いて虹彩色素上皮細胞株を樹立する。

これら眼内検体の採取については、同意が得られた患者に関しては、東京医科歯科大学附属病院眼科にて行われる全ての眼手術において各執刀医師の協力を得て全例で検体採取を行うため、短期間で多くの検体が収集される事が期待される。

(2) 眼内液中の熱ショック蛋白の発現解析

前房水および硝子体液中の熱ショック蛋白の発現を、市販のキットを用いてスクリーニング検索を行う。測定対象は、 α クリスタリン、HSP27、HSP60、HSP70、HSP90 α とし、正常（白内障、特発性黄斑円孔）、および各種ぶどう膜炎患者の眼内液（前房水、硝子体液）それぞれにおける濃度をELISA法で測定する。検出された各熱ショック蛋白の存在は、

Western-blotting法で確認し、以降の実験に用いる。

上記に挙げた以外にも、20種類以上の熱ショック蛋白に対する各種抗体が商業的に販売されているため、研究の進展に応じて適宜検索対象を拡大する可能性がある。

(3) 各種標的細胞の樹立

各種ぶどう膜炎患者眼内から採取した浸潤細胞から、限界希釈法を用いてT細胞クローンを樹立する。(Takase H, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:2691-2696.) 対照として眼内組織由来細胞を用いるため、緑内障患者から採取した虹彩を酵素処理を行い虹彩色素上皮細胞株を樹立する。(Sugita S, et al. *J Exp Med.* 2003;198:161-171.)

我々のこれまでの研究の過程で、上記細胞の多くは既に樹立、培養され、液体窒素中に凍結保存されているため、それらを用いる事も可能である。

(4) 熱ショック蛋白の、眼内浸潤T細胞クローンの増殖能およびサイトカイン産生能に対する作用

市販のリコンビナント熱ショック蛋白を、眼内浸潤T細胞クローンと共生培養し、それぞれの細胞分裂を3H Thymidine 取り込み試験で解析する。この際に培養上清を一部回収し、各種サイトカイン(IFN- γ 、IL-4、TGF- β 、IL-17)の産生変化をフローサイトメトリまたはELISA法を用いて解析する。同様な実験を、ヒト白血病由来T細胞株であるJurkat細胞、対照としてヒト虹彩色素上皮細胞株、またはヒトRPE細胞株であるARPE-19を用いて行う。抗体による中和実験が可能であれば、施行し結果を確認する。

(5) 熱ショック蛋白による、眼内浸潤T細胞クローンに対する細胞死（アポトーシス）誘導実験

眼内液には、炎症性眼内浸潤細胞にアポトーシスを誘導する一方、眼内組織に対してはその作用を持たない事が報告されている。眼内液中の熱ショック蛋白がこの作用を担うか否かを検討する。市販のリコンビナント熱ショック蛋白と上記に用いた各種標的細胞を共生培養し、早期アポトーシス細胞膜表面に発現するフォスファチジルセリンの有無をフローサイトメトリーを用いて解析する。アポトーシス誘導が確認された細胞については、RT-PCR法を用いてアポトーシス関連遺伝子の発現検索を行う。

4. 研究成果

白内障患者より得られた正常前房水に対

して ELISA 法による各種熱ショック蛋白濃度を測定した結果、正常前房水中には HSP27 が平均 6.3 ng/ml の濃度で検出された。一方、HSP10、HSP60、HSP70 は全て検出限界以下であった。HSP27 リコンビナント蛋白をぶどう膜炎患者眼局所浸潤細胞由来 T 細胞クローンと共生培養し、48 時間後に培養上清を回収した。これを ELISA 法でインターフェロン (IFN- γ) 濃度を測定した所、T 細胞クローンより産生される IFN- γ 濃度は添加した HSP27 の濃度依存的に増加していた。上記より、正常前房水には HSP27 が存在し、これが眼内浸潤 T 細胞の IFN- γ 産生を亢進させる事が明らかとなった。現在、HSP27 の眼内組織への作用、加えて眼内浸潤 T 細胞のアポトーシスに対する作用を検討中である。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高瀬 博 (TAKASE HIROSHI)

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究
科眼科学・助教

研究者番号 : 20451940

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :