

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25年5月10日現在

機関番号：34310
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591971
 研究課題名（和文） プロスタグランジン受容体を介した眼表面上皮細胞による炎症制御機構の解明
 研究課題名（英文） Analysis of mechanisms of the inflammation regulated by receptors of prostaglandins in ocular surface epithelial cells
 研究代表者
 上田 真由美 (UETA MAYUMI)
 同志社大学・生命医科学部・准教授
 研究者番号：60398386

研究成果の概要（和文）：

本研究により PG 受容体サブタイプ EP3 が眼表面上皮に優位に発現しており、炎症抑制に働くことにより、眼表面の恒常性維持に大きく貢献していることが、マウスアレルギー性結膜炎モデルの解析で明らかとなった。また、ヒトにおいても、EP3 が眼表面上皮に優位に発現していること、ならびに、Stevens-Johnson 症候群や眼類天疱瘡などのヒト眼表面炎症性疾患において EP3 発現が著明に減少していることも明らかとした。これらの結果は、眼表面炎症性疾患の病態に PG 受容体が大きく関与していることを示している。

研究成果の概要（英文）：

In this study, using experimental allergic conjunctivitis mouse model, we have showed that EP3, a subtype of PGE2 receptors, was dominantly expressed in ocular surface epithelium, and that it could suppress the ocular surface inflammation and might contribute the homeostasis of ocular surface. Moreover, we have also showed that EP3 was dominantly expressed in human ocular surface epithelium, and that in the conjunctival epithelium of human ocular surface inflammatory disease such as Stevens-Johnson syndrome and cicatricial ocular pemphigoid, the expression of EP3 were remarkably down-regulated. Our findings suggest that PG receptors might contribute in human ocular surface diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、眼表面上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は、外来抗原に対する構造的・機能的なバリアを構成する。しかし、近年、この上皮細胞が炎症性疾患の病態に大きく関与することがマウスモデルをもちいて報告され

ている。NFκB の活性化に必要な NEMO 分子を腸管上皮特異的に欠損させたマウスでは、炎症性腸疾患を発症する (Nenci A, et al. Nature 2007)。また、リンパ球増殖因子として同定された TSLP (Thymic stromal

lymphopoietin) は、表皮に発現することによりアトピー性皮膚炎を発症させ (Yoo J, et al. *J Exp Med* 2005)、気管上皮に発現することにより気管支喘息を発症させる (Zhou B, et al. *Nat Immunol* 2005)。

さらに、炎症に大きく関与するプロスタグランジン(PG)の受容体も上皮細胞に発現し、炎症を制御している。PGとは、種々の細胞によって合成される生理活性物質であり、PGD₂、PGE₂、PGF_{2α}、PGI₂があり、炎症ならびに様々な疾患に関与する。また、それぞれに対する特異的な受容体として、DP、EP (EP1, EP2, EP3, EP4)、FP、IPが存在する。中でも、DPは、抗原感作により気管上皮に強く発現し、アレルギー炎症を促進する(Matsuoka T, et al. *Science* 2000)。一方、EP3は、気管上皮に強く発現していて、アレルギー炎症を抑制する(Kunikata T, et al. *Nat Immunol* 2005)。このように、上皮細胞による炎症制御機構が、現在大きく着目されつつある。

研究代表者もまた、アレルギー性結膜炎マウスモデルを用いて、眼表面炎症におけるEP3の役割を解析した。EP3欠損マウスにアレルギー性結膜炎を誘発したところ、抗原点眼24時間後の結膜好酸球浸潤が野生型マウスと比較して有意に増加していた。また、抗原点眼6時間後の眼瞼エオタキシンmRNA発現量もEP3欠損マウスでは野生型マウスと比較して有意に増加した(図b)。続いて、EP3を欠損させ代わりにβ-gal遺伝子をノックインしたマウスを用いて、眼におけるEP3の局在を調べたところ、眼表面上皮に限局して存在し、特に結膜上皮細胞に強く発現していた。また、免疫染色にても結膜上皮細胞におけるEP3の強い発現が確認された。これらのことから、眼表面上皮細胞に発現しているEP3が眼表面炎症を抑制していることは明かである。また、アレルギー性結膜炎を誘導するとEP3のリガンドであるPGE₂ならびにその合成酵素の産生・発現が眼瞼中で上昇していた。このことは、EP3を介したアレルギー炎症抑制作用が生理状態下でも作用していることを示している。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、“眼表面粘膜上皮細胞による眼表面炎症制御機構の解明”にある。炎症反応は、リンパ球をはじめとする免疫担当細胞がその病態の主体である。現在の炎症性疾患に対する治療薬は、免疫担当細胞を標的としたステロイド薬、免疫抑制薬そして非ステロイド系消炎薬が主である。本研究は、眼表面炎症病態に、免疫担当細胞だけでなく、眼表面上皮細胞も大きく関与することを証

明し、その炎症制御機構を解明する。本研究により、眼表面上皮細胞による眼表面炎症制御機構が解明されれば、既存の抗炎症薬とは全く異なったタイプの上皮細胞を標的とした新しい治療法の開発を促進させることができ、炎症性疾患の治療法の大きな転機につながる。申請者は、本研究期間に、眼表面上皮細胞による眼表面炎症制御機構のうち、特に、眼表面上皮細胞に発現するプロスタグランジン(PG)受容体に焦点を絞って解析する。

さらに申請者は、ヒト結膜上皮細胞にも、このEP3が発現していることを、RT-PCRならびに免疫染色で確認している。大変興味深いことに、非炎症性眼表面疾患である結膜弛緩症や翼状片の結膜上皮細胞にはEP3が発現しているのとは対照的に、炎症性の眼表面疾患であるStevens-Johnson症候群や眼類天疱瘡の結膜上皮細胞ではその発現が消失していた。さらに、EP3の遺伝子多型が関与する炎症性眼表面疾患が存在することを確認している。これらの知見は、ヒトの眼表面炎症の制御に、結膜上皮細胞に発現しているEP3が大きく関与している可能性を示している。

3. 研究の方法

研究代表者はPG受容体サブタイプEP2, EP3とEP4を介した眼表面上皮細胞による眼表面炎症制御機構の解明を目的として、以下を行った。

- ① 培養ヒト結膜上皮を用いてEP2, EP3, EP4アゴニストによる炎症性サイトカイン抑制効果を、ELISAならびに定量PCRで解析した。
- ② 培養ヒト角膜上皮を用いてEP2, EP3, EP4アゴニストによる炎症性サイトカイン抑制効果を、ELISAならびに定量PCRで解析した。
- ③ ヒト眼表面炎症病態患者から眼表面再建手術時に摘出される組織を用いてPG受容体EP3, EP4の免疫染色を行い、ヒト疾患におけるPG受容体の関与を証明した。
- ④ 重症眼表面炎症性疾患であるStevens-Johnson症候群患者の遺伝子多型解析を通じて、ヒト疾患におけるPG受容体の関与を検討した。

4. 研究成果

- ① polyI:C刺激培養ヒト結膜上皮による炎症性サイトカインCXCL10, CXCL11, CCL5, MCP-1, IL-6をEP2, EP3アゴニストは有意に抑制した。このことは、眼表面においてEP2, EP3受容体が炎症抑制には垂らしていることを示している。
- ② もう一つの眼表面上皮である角膜上皮を培養してpolyI:Cで刺激したところ、結膜

上皮と同様に様々なサイトカインが誘導される。これに、EP2, EP3 アゴニスを添加するとこれらの多くは有意に抑制された。このことは、眼表面において EP2, EP3 受容体が炎症抑制には垂らしていることを示している。

- ③ ヒト眼表面炎症病態患者から眼表面再建手術時に摘出される組織を用いて PG 受容体 EP3, EP4 の免疫染色を行ったところ、EP3, EP4 ともに、Stevens-Johnson 症候群や眼類天疱瘡などの重症眼表面炎症性疾患においてその発現が著明に減弱していた。このことは、これらの重症眼表面炎症性疾患の病態に、PG 受容体が関与していることを示している。
- ④ 重症眼表面炎症性疾患である Stevens-Johnson 症候群患者の遺伝子多型解析において、EP3 の遺伝子多型が有意に相関を示した。このことは、これらの重症眼表面炎症性疾患である Stevens-Johnson 症候群の病態に、PG 受容体が関与していることを示している。

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 18 件) (すべて査読有)

1. Ueta M: Epistatic interactions associated with stevens-johnson syndrome. *Cornea*. 2012; Suppl 1:S57-62
2. Ueta M, Sotozono C, Yamada K, Yokoi N, Inatomi T, Kinoshita S: Expression of prostaglandin E receptor subtype EP4 in conjunctival epithelium of patients with ocular surface disorders: case-control study. *BMJ Open*. 2012; 2(5): pii: e001330. doi: 10.1136/bmjopen-2012-001330. Print 2012.
3. Ueta M, Kinoshita S: Ocular surface inflammation is regulated by innate immunity. *Prog Retin Eye Res*. 2012; 31(6): 551-575.
4. Imai K, Ueta M, Mori K, Ueno M, Ikeda Y, Oga T, Yokoi N, Shinomiya K, Narumiya S, Kinoshita S: Expression of prostaglandin F receptor in scleral and subconjunctival tissue. *Br J Ophthalmol*. 2012; 96(8): 1148-1149.
5. Ueta M, Matsuoka T, Sotozono C, Kinoshita S: Prostaglandin E2 Suppresses Poly I: C-Stimulated Cytokine Production Via EP2 and EP3 in Immortalized Human Corneal Epithelial Cells. *Cornea*. 2012; 31(11): 1294-1298.
6. Ueta M, Tamiya G, Tokunaga K, Sotozono C, Ueki M, Sawai H, Inatomi T, Matsuoka T, Akira S, Narumiya S, Tashiro K, Kinoshita S: Epistatic interaction between Toll-like receptor 3 (TLR3) and prostaglandin E receptor 3 (PTGER3) genes. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 129(5): 1413-1416.e11.
7. Ueta M, Sotozono C, Yokoi N, Kinoshita S: Downregulation of monocyte chemoattractant protein 1 expression by prostaglandin e2 in human ocular surface epithelium. *Arch Ophthalmol*. 2012; 130(2): 249-251.
8. Ueta M, Yokoi N, Kinoshita S: Endothelin-1 production upon polyI:C stimulation of human conjunctival epithelium. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95(12):1760-1761.
9. Ueta M, Sotozono C, Yokoi N, Inatomi T, Kinoshita S: Prostaglandin E Receptor Subtype EP3 Expression in Human Conjunctival Epithelium and Its Changes in Various Ocular Surface Disorders. *PLoS One*. 2011; 6(9): e25209.
10. Ueta M, Sotozono C, Kinoshita S: Expression of interleukin-4 receptor α in human corneal epithelial cells. *Jpn J Ophthalmol*. 2011; 55(4): 405-410.
11. Yagi T, Sotozono C, Tanaka M, Fuwa M, Sekiyama E, Ueta M, Tashiro K, Kinoshita S: Cytokine storm arising on the ocular surface in a patient with Stevens-Johnson syndrome. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95(7): 1030-1031.
12. Ueta M, Matsuoka T, Yokoi N, Kinoshita S: Prostaglandin E2 suppresses polyinosine-polycytidylic acid (polyI:C)-stimulated cytokine production via prostaglandin (EP) 2 and 3 in human conjunctival epithelial cells. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95(6): 859-863.
13. Ueta M, Matsuoka T, Yokoi N, Kinoshita S: Prostaglandin E receptor subtype EP3 downregulates TSLP expression in human conjunctival epithelium. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95(5): 742-743.
14. Ueta M: Regulation of ocular surface inflammation by prostaglandin E receptor subtype EP3. *Cornea*. 2010; 29(11): S57-61.
15. Ueta M, Sotozono C, Nakano M, Taniguchi T, Yagi T, Tokuda Y, Fuwa M, Inatomi T, Yokoi N, Tashiro K, Kinoshita S: Association between prostaglandin E receptor 3 polymorphisms and Stevens-Johnson syndrome identified by means of a genome-wide association study. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 126(6): 1218-1225.
16. Ueta M, Sotozono C, Yokoi N, Inatomi T, Kinoshita S: Prostaglandin E receptor 4 expression in human conjunctival epithelium and its downregulation in devastating ocular surface inflammatory disorders. *Arch Ophthalmol*. 2010; 128(10): 1369-1371.
17. Ueta M, Kinoshita S: Ocular surface inflammation mediated by innate immunity.

- Eye Contact Lens. 2010; 36(5): 269-281.
18. Ueta M, Mizushima K, Yokoi N, Naito Y, Kinoshita S: Gene-expression analysis of polyI:C-stimulated primary human conjunctival epithelial cells. Br J Ophthalmol. 2010; 94(11): 1528-1532.

〔学会発表〕（計 3 5 件）

国際学会

Invited:

1. Ueta M: Genetic Predisposition of Stevens-Johnson Syndrome with Ocular Complications. APAO/SOE Busan 2012, Busan, Korea, 2012.4.16.
2. Ueta M: Regulation of Ocular Surface Inflammation by Prostaglandin E Receptor Subtype EP3. ESF-JSPS Frontier Science Conference for Young Researchers Cutting Edge Immunology and its Clinical Application (日本欧州先端科学セミナー), Hulshout, Netherlands, 2011.3.5.
3. Ueta M: Innate Immunity of the Ocular Surface. The 2nd Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting. Symposium 5. Basic Research (1) Angiogenesis and Immunoregulation, Kyoto, JAPAN, 2010.12.1.
4. Ueta M: Downregulation of TSLP expression by Prostaglandin E Receptor Subtype EP3 in human conjunctival epithelium. 2010 Korea-Japan Joint Allergy Symposium and KAAACI (the Korean Academy & Asthma, Allergy and Clinical Immunology) Spring Congress, Seoul, Korea, 2010. 5. 28.

General:

1. Ueta M, Matsuoka T, Narumiya S, Akira S, Kinoshita S: EP3 Negatively Regulates TLR3 dependent eosinophilic infiltration of allergic conjunctivitis. European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2012, Geneva, Switzerland, 2012.6.17.
2. Ueta M, Matsuoka T, Narumiya S, Akira S, Kinoshita S: Epistatic interaction between TLR3 and ptger3 genes in experimental allergic conjunctivitis. 2012 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2012.5.8.
3. Ueta M, Tamiya G, Tokunaga K, Sotozono C, Ueki M, Sawai H, Inatomi T, Matsuoka T, Akira S, Narumiya S, Kinoshita S: Epistatic interaction between TLR3 and PTGER3 confers an increased risk for Stevens-Johnson syndrome with ocular complications. 2012 Gordon Research Conference : Biology & Pathobiology of the

Cornea, Ventura, California, USA, 2012.3.28.

4. Ueta M, Yokoi N, Kinoshita S: Prostaglandin E2 suppresses polyI:C-stimulated cytokine production via EP2 and EP3 in human ocular surface epithelial cells. The European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), Istanbul, Turkey, 2011.6.12.
5. Yamada K, Ueta M, Sotozono C, Yokoi N, Inatomi T, Koizumi N, Kinoshita S: Prostaglandin E receptor subtype Ep4 expression in human conjunctival epithelium and its changes in various ocular surface disorders. 2011 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2011.5.4.
6. Imai K, Ueta M, Mori K, Ikeda Y, Ueno M, Yokoi N, Koga T, Narumiya S, Kinoshita S: FP localization and expression in ocular tissue. 2011 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2011.5.4.
7. Ueta M, Matsuoka T, Yokoi N, Kinoshita S: Prostaglandin E₂ suppresses polyi:c-stimulated cytokine production via EP2 and EP3 in human conjunctival epithelial cells. 2011 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2011.5.3.
8. Ueta M, Sotozono C, Nakano M, Taniguchi T, Yagi T, Tokuda Y, Fuwa M, Inatomi T, Yokoi N, Tashiro K, Kinoshita S: Association between prostaglandin E receptor 3 polymorphisms and Stevens-Johnson syndrome with ocular involvement identified by genome-wide association study in a Japanese population. Keystone Symposia, Bioactive Lipids, Biochemistry and Diseases, Kyoto, JAPAN, 2010.6.9.
9. Ueta M, Mizushima K, Yokoi N, Naito Y, Kinoshita S: Gene expression analysis of polyI:C-stimulated primary human conjunctival epithelial cells. Gordon Research Conferences, Biology & Pathobiology of the Cornea, Ventura, California, USA, 2010. 3. 10.

国内学会

シンポジウム

1. 上田真由美: 上皮細胞による眼表面炎症制御機構. 第 117 回日本眼科学会総会, 東京, 2012.4.4.
2. 上田真由美: 結膜上皮細胞によるアレレギー炎症制御. 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), 東京, 2012.2.23.

3. 上田真由美: 眼結膜上皮細胞の自然免疫応答とアレルギー炎症制御への関与. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会, シンポジウム11, 環境と体内物質のTh2アジュバント作用, 東京, 2011.11.11.
4. Ueta M: Epistatic interaction associated with Stevens-Johnson Syndrome with ocular surface complications. 17th Annual Meeting of the Kyoto Cornea Club, Kyoto, 2011.12.3.
5. 上田真由美: 眼表面炎症性疾患と自然免疫. スリーサム2011 京都 (第48回日本眼感染症学会・第45回日本眼炎症学会), 自然免疫と炎症 感染症に関する合同シンポジウム, 京都, 2011.7.8.
6. 上田真由美: 眼表面上皮細胞の自然免疫. 第47回日本眼感染症学会, シンポジウム2, 感染とアレルギーの謎を解く, 東京, 2010.7.10.
7. 上田真由美: 眼表面の自然免疫と眼表面炎症性疾患. 第114回日本眼科学会総会, シンポジウム4, 眼表面サイエンスの最前線. 名古屋, 2010.4.15.

教育セミナー

1. 上田真由美: 眼表面上皮による炎症制御. 教育セミナー2, 眼の免疫のしくみ-新たな理解-, 第114回日本眼科学会総会, 名古屋, 2010.4.15.

ワークショップ

1. 上田真由美, 水島かつら, 横井則彦, 内藤裕二, 木下茂: ヒト結膜上皮細胞におけるアレルギー関連遺伝子の誘導, ミニワークショップ1「アレルギー性鼻炎・結膜炎研究の進歩」第60回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2010.11.25.

一般講演

1. Mayumi Ueta, Shuh Narumiya, Shizuo Akira, Shigeru Kinoshita. EP3 negatively regulates TLR3-dependent cytokine expression in conjunctival epithelium. 第41回日本免疫学会学術集会, 神戸, 2012.12.6.
2. Ayaka Koga, Mayumi Ueta, Masaru Ishii, Noriko Koizumi, Tadimitsu Kishimoto, Shigeru Kinoshita. Eye drops of IL-6 Ab suppress the infiltration of LysM-positive granulocytes after corneal alkali burn. 第41回日本免疫学会学術集会, 神戸, 2012.12.5.
3. 上田真由美, 峠岡理沙, 外園千恵, 横井桂子, 加藤則人, 木下茂: アトピー性皮膚炎の重症度と眼表面合併症. 第66回日本臨床眼科学会, 京都, 2012.10.25.
4. 上田真由美, 田宮元, 徳永勝士, 外園千

恵, 植木優夫, 澤井裕美, 稲富勉, 木下茂: 眼発症を伴う Stevens-Johnson 症候群発症における TLR3-EP3 遺伝子間相互作用の関与. 第46回日本眼炎症学会, 横浜, 2012.7.15.

5. 上田真由美, 成宮周, 審良静男, 木下茂: PGE₂受容体サブタイプEP3とTLR3の遺伝子間相互作用. 第33回日本炎症・再生医学会, 福岡, 2012.7.5.
6. 上田真由美, 松岡俊行, 成宮周, 審良静男, 木下茂: アレルギー性結膜炎におけるTLR3とPGE₂受容体サブタイプEP3の遺伝子間相互作用. 第116回日本眼科学会総会, 東京, 2012.4.6.
7. Ueta M, Sotozono C, Kinoshita S: Downregulation of MCP-1 expression by prostaglandin E₂ in human ocular surface epithelium. 第40回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2012.11.29.
8. 上田真由美, 外園千恵, 稲富勉, 横井則彦, 小泉範子, 木下茂: 特発性周辺部角膜潰瘍の病変部結膜におけるプロスタグランジンE₂受容体EP3の発現. 第65回日本臨床眼科学会, 東京, 2011.10.8.
9. 上田真由美, 横井則彦, 木下茂: 眼表面上皮細胞におけるPGE₂のサイトカイン産生抑制作用. 第32回日本炎症・再生医学会, 京都, 2011.6.3.
10. 今井浩二郎, 上田真由美, 森和彦, 池田陽子, 上野盛夫, 横井則彦, 小賀徹, 成宮周, 木下茂: プロスタグランジンF受容体(FP)の眼球組織における局在と発現の解析. 第115回日本眼科学会総会, 東京, 2011.5.13.
11. 上田真由美, 松岡俊行, 横井則彦, 木下茂: 結膜上皮細胞におけるPGE₂のサイトカイン産生抑制作用. 第115回日本眼科学会総会, 東京, 2011.5.13.
12. 木下茂, 上田真由美, 外園千恵, 稲富勉, 横井則彦, 中野正和, 谷口孝純, 八木知人, 徳田雄市, 不破正博, 田代啓: Stevens-Johnson 症候群に対する全遺伝子アプローチによる遺伝子多型解析. 第31回日本炎症・再生医学会, 東京, 2010.8.5.
13. 上田真由美, 水島かつら, 横井則彦, 内藤裕二, 木下茂: polyIC 刺激ヒト培養結膜上皮細胞の網羅的遺伝子発現解析. 第34回角膜カンファレンス, 仙台, 2010.2.11.

〔図書〕(計1件)

上田真由美, 木下茂: 粘膜免疫と臨床 眼科との接点. 臨床粘膜免疫学(清野宏編). 2010, p600-615, 株式会社シナジー

〔その他〕
ホームページ等

<http://saisei.tissue-engineering-doshisha.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

上田真由美 (UETA MAYUMI)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号：60398386