

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 5月30日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791685

研究課題名（和文） HMGB-1 を介した難治性網膜ぶどう膜炎の炎症制御と網膜保護の可能性

研究課題名（英文） Immunomodulation and neuroprotection in experimental uveoretinitis by regulation of HMGB-1

研究代表者

渡邊 交世 (WATANABE TAKAYO)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：90458901

研究成果の概要（和文）：

ぶどう膜炎の動物モデルであるエンドトキシン誘発ぶどう膜炎(EIU)を用いて、High Mobility Group Box (HMGB) HMGB-1を標的とした炎症制御の可能性について検討を行った。EIU誘導ラット、およびコントロールとして生食水を接種したラットの両群の眼球を摘出し免疫組織染色を行ったところ、両群の前眼部組織にHMGB-1 陽性像を認めEIU投与群で蛍光強度の増加がみられた。次にラットEIUにて抗HMGB-1(ポリクローナル)中和抗体を用いて眼炎症抑制効果の有無について検討したところ有意な炎症抑制作用はみられなかった。以上より、EIUにおける血液房水バリアーの破綻にHMGB-1は関与しない可能性が示唆されたものの、EIU誘導眼においてHMGB-1の発現増強が確認されたことからHMGB-1が眼局所でぶどう膜炎の病態に関与する可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We investigated whether High Mobility Group Box (HMGB)-1 is expressed and released in ocular tissue and inhibition of HMGB-1 in vivo can suppress ocular inflammation using endotoxin-induced uveitis (EIU). Immunohistochemical study showed higher expression of HMGB-1 in cornea and iris in EIU-induced rats compared to control rats. However, neutralization of HMGB-1 was not able to reduce ocular inflammation in EIU. These results suggest that HMGB-1 may not be involved in the destruction of blood-aqueous barrier in EIU-induced rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：DAMPs uveitis HMGB-1

1. 研究開始当初の背景

生体に感染や外傷が加って炎症が生じる際に、自己の分子でありながら免疫系を賦活させるシステム(DAMPs)が存在することが近年、報告されている(Immunological Reviews 220: 60-81, 2007)。中でも最近、注目を集

めている DAMPs 分子の一つとして High Mobility Group Box (HMGB)-1 が挙げられる。元来 HMGB-1 は DNA の安定性に関与する核内蛋白質として知られていたが、最近になり HMGB-1 が敗血症後期の炎症メディエーターであり、HMGB-1 を抑制することによって生存

率が大幅に改善されることが報告された (Science 285:248-251, 1999)。HMGB-1 の細胞外への分泌経路として、一つは壊死に陥った細胞が核内の HMGB-1 を受動的に細胞質あるいは細胞外へと放出される経路、もう一つは単球などの炎症担当細胞がエンドトキシンや TNF-alpha などの炎症メディエーターによって活性化された際に核内より HMGB-1 が分泌され、能動的に細胞外へ放出する経路である。

最近、我々は難治性ぶどう膜炎の動物モデルとして知られる実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) を発症したラットの眼局所で、HMGB-1 が炎症極期で急激に上昇することを見出した (Watanabe et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 50:2283-90, 2009)。これまでのところ、ぶどう膜炎を中心とした眼炎症疾患の病態における HMGB-1 の発現と作用については不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの我々の知見を踏まえヒトぶどう膜炎の動物モデルとして知られるエンドトキシン誘発ラットぶどう膜炎 (EIU) を用いて、HMGB-1 を標的分子としたぶどう膜炎における炎症制御と神経網膜保護の可能性について検討を行った。

3. 研究の方法

1) エンドトキシン誘発ラットぶどう膜炎 (EIU) の誘導と HMGB-1 発現の検討
既報 (Ilieva I et al. Exp Eye Res 83:651-657, 2006) に準じて、6 週令のルイスラットの足底皮下に lipopolysaccharide (LPS) 200ug/0.1ml 生食水を投与し、EIU を誘導した。皮下接種後、24 時間後に眼球を摘出し病理標本を作成、眼組織における HMGB-1 の発現、また眼内に浸潤した炎症細胞をマクロファージのマーカー分子である CD68 を用いて染色し、HMGB-1 の発現について免疫組織染色法にて検討を行った。対照群として生食水を皮下接種し、同様の実験を行った。

2) 抗 HMGB-1 中和抗体による EIU 抑制効果の検討

抗 HMGB-1 ポリクローナル抗体 (シノテスト) 0.5mg を LPS 投与と同時に腹腔内投与、24 時間後に前房水を採取、前房水中の蛋白濃度を測定し、抗 HMGB-1 中和抗体による EIU の炎症抑制効果を検討した。

4. 研究成果

1) EIU 誘導ラットにおける HMGB-1 の発現の検討 (免疫組織染色による検討)
対照群 (生食水群) では角膜上皮・実質・内皮細胞に HMGB-1 の陽性像がみられた。特に細胞内の核内に比べて細胞質内に陽性所見が

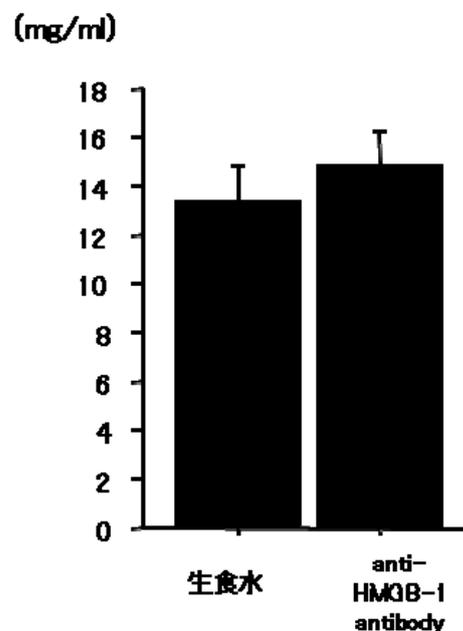
みられたが蛍光強度は全般的に軽度だった。虹彩実質、虹彩上皮細胞の核内と細胞質内で HMGB-1 の陽性像を認めた。網膜では神経節細胞、外顆粒層、内顆粒層、視細胞を中心に HMGB-1 の陽性像を認めた。

LPS 投与群でも角膜上皮・実質・内皮細胞の細胞内と核内に HMGB-1 の陽性像がみられたが、対照群に比較して HMGB-1 の陽性細胞数が多く、蛍光強度も全般的に高い傾向を示した。また虹彩実質・上皮細胞でも角膜と同様に LPS 投与群で HMGB-1 の蛍光強度が高い傾向にあり、全体的に核内より細胞質内に HMGB-1 の陽性像をみられた。網膜においては対照群と同様の染色パターンを示した。

前眼部での CD68 陽性細胞の分布をみると対照群では角膜輪部や虹彩根部に CD68 陽性細胞がわずかにみられたのに対して、LPS 投与群では角膜実質、虹彩や前房中に CD68 陽性細胞が多数認められた。また CD68 陽性、HMGB-1 陽性の浸潤細胞の存在が確認された。

2) 抗 HMGB-1 中和抗体を用いたラット EIU に対する炎症抑制効果の検討
「方法」で示したとおり、EIU 誘導のため LPS を皮下接種、抗 HMGB-1 抗体 (0.5 mg/ラット) を LPS 接種時に腹腔内投与、対照群には同時期に生食水投与、24 時間後に前房水を採取し、蛋白濃度を測定した。その結果、図 1 で示すとおり、両群間で前房水中の蛋白濃度に有意な差は認められなかった。

図 1



3) エチルピルビン酸によるラット EIU 抑制効果の検討

エチルピルビン酸 (EP) はピルビン酸の中間代謝産物であり、近年、敗血症や出血性ショック動物モデルにおいて EP が抗炎症効果を

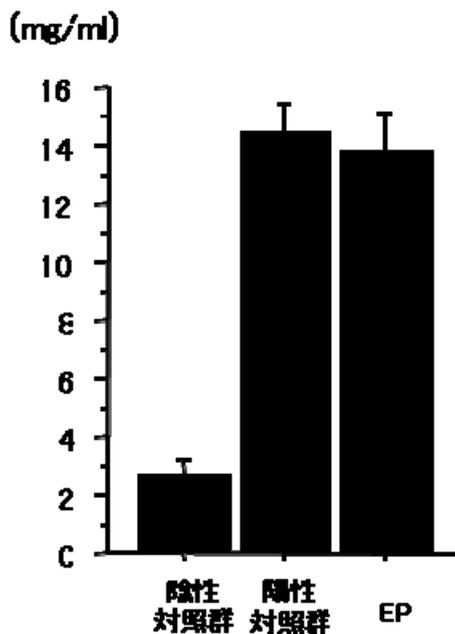
有すること、さらに EP がマクロファージにおいて HMGB-1 の核内から細胞質への移動を抑制することが報告されている。

今回 EP を用いて HMGB-1 を介した EIU に対する炎症抑制効果について検討を行った。

「方法」で示したとおり、 EIU 誘導のため LPS を皮下接種、EP (100 mg/0.2 ml/kg) を LPS 接種時と接種 6 時間後に腹腔内投与、対照群には生食水 (0.2 ml) 投与、24 時間後に前房水を採取し、蛋白濃度を測定した。

その結果、図 2 で示すとおり、陽性対照群と EP 投与群の間で前房水中の蛋白濃度に有意な差は認められなかった。

図 2



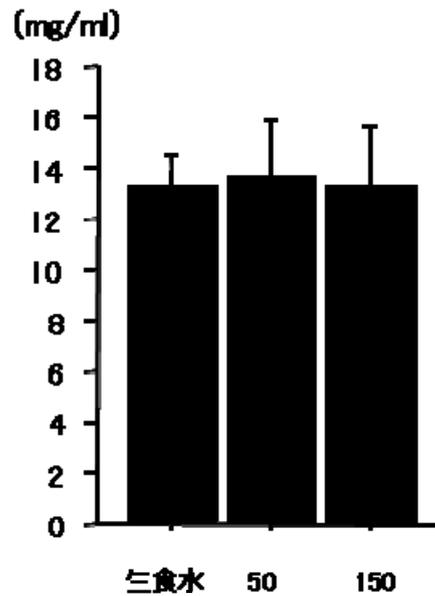
4) メトフォルミンを用いたラット EIU 抑制効果の検討

メトフォルミンは糖尿病治療薬として使用されている薬剤であるが、抗炎症効果も有することが近年明らかとなってきた。さらに最近では LPS で処置したマクロファージからの HMGB-1 の放出を抑制する作用も持つことも報告されている。今回、メトフォルミンによる HMGB-1 を介した EIU に対する抗炎症効果を検討した。

「方法」で示したとおり、 EIU 誘導のため LPS を皮下接種、メトフォルミン (50 mg/0.2 ml と 150 mg/0.2 ml の 2 群を準備) を LPS 接種 4 時前と LPS 接種時に腹腔内投与、対照群には同時期に生食水 (0.2 ml) 投与、24 時間後に前房水を採取し、蛋白濃度を測定した。

その結果、図 3 で示すとおり、3 群間で前房水中の蛋白濃度に有意な差は認められなかった。

図 3



5) まとめ

免疫組織染色にて LPS 投与群で角膜、虹彩を中心に HMGB-1 の発現が上昇していることが確認された。しかしながら、HMGB-1 の中和抗体、炎症細胞からの HMGB-1 の放出抑制作用を有するエチルピルビン酸やメトフォルミンを用いても EIU に対する炎症抑制効果は認められなかった。これより EIU における血液房水バリアーの破綻に HMGB-1 は関与しない可能性が示唆された。一方で EIU 誘導眼において HMGB-1 の発現増強が確認されたことから眼局所で炎症の病態に関与する可能性が考えられた。

HMGB-1 の制御による網膜に対する神経保護効果については ERG などを用いて現在検討中であり、引き続き研究を行う予定である。

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 8 件)

- Keino H, Watanabe T, Taki W, Okada AA. Effect of infliximab on gene expression profiling in Behcet's disease. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011;52: 7681-7686.
- Keino H, Okada AA, Watanabe T, Taki W. Decreased ocular inflammatory attacks and background retinal and disc vascular leakage in patients with Behcet's disease on infliximab therapy. Br J Ophthalmol 2011;95: 1245-1250.
- Taki W, Keino H, Watanabe T, Nakashima C, Okada AA. Interferon-gamma release

- assay in tuberculous scleritis. Arch Ophthalmol 2011;129: 368-371.
4. 渡邊交世, 三木大二郎, 岡田アナベルあやめ, 平形明人. 急性網膜壊死の治療成績の検討. 日本眼科学会雑誌 2011;115:7-12.
 5. Keino H, Watanabe T, Sato Y, Okada AA. Oral Administration of Retinoic Acid Receptor- α/β -Specific Ligand Am80 Suppresses Experimental Autoimmune Uveoretinitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011;52:1548-1556.
 6. Nakashima C, Keino H, Watanabe T, Taki W, Okada AA. Intravitreal bevacizumab for iris metastasis of small cell lung carcinoma and neovascular glaucoma. Jpn J Ophthalmol 2011; 55:80-81.
 7. Keino H, Watanabe T, Sato Y, Okada AA. Anti-inflammatory effect of retinoic acid on experimental autoimmune uveoretinitis. Br J Ophthalmol 2010;94:802-807.
 8. Keino H, Watanabe T, Taki W, Nakashima C, Okada AA. Clinical features and visual outcomes of Japanese patients with scleritis. Br J Ophthalmol 2010;94:1459-1463.
- [学会発表] (計 16 件)
1. 松木奈央子, 渡邊交世, 並木泉, 二宮夕子, 永本敏之 角膜内皮細胞減少例における白内障手術 第 35 回日本眼科手術学会 2012 年 1 月 27-29 日 京都
 2. 渡邊交世, 二宮夕子, 並木泉, 松木奈央子, 永本敏之 偽楽屑症候群の白内障手術 第 35 回日本眼科手術学会 2012 年 1 月 27-29 日 京都
 3. 慶野博, 渡邊交世, 中山真紀子, 瀧和歌子, 岡田アナベルあやめ. EDI-OCT を用いた原田病回復期の脈絡膜厚の評価. 第 65 回日本臨床眼科学会 2011 年 10 月 7-10 日 東京
 4. 渡邊交世, 慶野博, 瀧和歌子, 越前成旭, 岡田アナベルあやめ. 滲出型加齢黄斑変性に対し初回治療に pegaptanib 硝子体内投与を選択した症例の治療成績. 第 65 回日本臨床眼科学会 2011 年 10 月 7-10 日 東京
 5. 岡田アナベルあやめ, 中山真紀子, 慶野博, 渡邊交世, 渡邊望, 井上真, 平形明人. 眼炎症疾患における EDI-OCT. 第 13 回 Japan Macula Club 2011 年 8 月 20-21 日 蒲郡
 6. 瀧和歌子, 慶野博, 渡邊交世, 伊東真知子, 岡田アナベルあやめ. EDI-OCT を用いた片眼性後部強膜炎の脈絡膜厚の評価. 第 45 回日本眼炎症学会 2011 年 7 月 8-10 日 京都
 7. 中山真紀子, 慶野博, 渡邊交世, 瀧和歌子, 岡田アナベルあやめ. 原田病における脈絡膜厚の長期経過. 第 45 回日本眼炎症学会 2011 年 7 月 8-10 日 京都
 8. 中島史絵, 慶野博, 渡邊交世, 瀧和歌子, 岡田アナベルあやめ. Bevacizumab 硝子体注射により新生血管の退縮がみられた転移性虹彩腫瘍の 1 例. 第 115 回日本眼科学会総会 2011 年 5 月 12-15 日 東京.
 9. Nakayama M, Keino H, Watanabe T, Inoue M, Hirakata A, Okada AA. Enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in new-onset acute Vogt-Koyanagi-Harada disease. 2011 年 5 月 1-4 日 Ft.Lauderdale, Florida, USA
 10. 渡邊交世, 中野敦雄, 二宮夕子, 永本敏之 小眼球における白内障手術 第 34 回日本眼科手術学会 2011 年 1 月 30 日 京都
 11. 中山真紀子, 慶野博, 渡邊交世, 井上真, 平形明人, 岡田アナベルあやめ. Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) 病における脈絡網厚の経時的評価. 第 64 回日本臨床眼科学会 2010 年 11 月 11-14 日 神戸
 12. 慶野博, 渡邊交世, 瀧和歌子, 伊東真知子, 岡田アナベルあやめ. ベーチェット病網膜ぶどう膜炎に対するインフリキシマブ長期投与の有効性. 第 64 回日本臨床眼科学会 2010 年 11 月 11-14 日 神戸
 13. 渡邊交世, 慶野博, 井上真, 吉野啓, 岡田アナベルあやめ 結核性ぶどう膜炎の合併が疑われた眼内悪性リンパ種の 1 例. 第 44 回日本眼炎症学会 2010 年 7 月 9-11 日 東京
 14. 渡邊交世, 中野敦雄, 二宮夕子, 永本敏之 アトピー性皮膚炎患者における結膜囊細菌叢 第 49 回日本白内障学会, 第 25 回日本白内障屈折矯正手術学会 2010

年 6 月 25 日 大阪

15. 渡邊交世 サブスペシャリティーサンデー・白内障診療の落とし穴・白内障の形態と症状-視力に影響する混濁はどれ？ 第 114 回日本眼科学会総会 2010 年 4 月 15 日 名古屋
16. 渡邊交世、慶野博、中島史絵、瀧 和歌子、岡田アナベルあやめ 眼結核診断における QuantiFERON-TB2G の有用性についての評価 第 63 回日本臨床眼科学会学術展示優秀賞受賞講演 第 114 回日本眼科学会総会 2010 年 4 月 15 日 名古屋

[図書] (計 1 件)

1. 渡辺交世 眼科診療クオリファイ 8 網膜血管障害 結核 2011 年 p146-153.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 交世 (WATANABE TAKAYO)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：90458901

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：