

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659816

研究課題名(和文)ドライアイの病態におけるインフラマゾームの関与についての研究

研究課題名(英文)The contribution of inflammasome in the pathogenesis of dry eye

研究代表者

篠宮 克彦(Shinomiya, Katsuhiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50585289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において必要になるドライアイモデルマウスの構築を行った結果、眼窩外涙腺摘出、眼窩内・外涙腺摘出モデルマウスの有用性を確認した。上記モデルを用いた検討では、インフラマゾーム形成カスケードにおいて必要とされるIL-1変換酵素(caspase-1)を欠失させたcaspase-1 KO、およびそのwild typeマウスにおいて、眼表面で涙液減少に伴う二次的炎症が生じていた。しかしcaspase-1 KOにおいても涙液中IL-1の増加が認められたことより、ドライアイによって生じる眼表面の炎症にはインフラマゾームは関連していない可能性が高いと考えられ、我々が提唱した仮説は証明できなかった。

研究成果の概要(英文)：We developed two dry-eye mouse models induced by exorbital lacrimal gland and introrbital lacrimal gland excision that could maintain a tear decrease state in a normal breeding environment to investigate the contribution of inflammasome in the pathogenesis of dry eye. We examined interleukin-1 beta (IL-1beta) production in the tear fluid of each model and found that it was increased in the exorbital lacrimal gland excised mice [both wild-type and caspase-1 knock-out (KO)] compared with the untreated controls. The increase of IL-1beta in the tear fluid might suggest that persistent tear-volume reduction could cause some kind of inflammatory reaction on the ocular surface. Of note, the IL-1beta increase in the tear fluid of the caspase-1 KO model was the same as in the wild-type model, suggesting that the IL-1beta production in both models is caspase-1 independent. Our findings suggest that inflammasome is not associated with dry-eye-related inflammation on the ocular surface.

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：ドライアイ インフラマゾーム caspase-1 ドライアイモデルマウス

1. 研究開始当初の背景

Inflammasome は炎症反応においてみられる細胞内タンパク複合体で、ASC、パターン認識受容体の NALP1 あるいは NALP3、および caspase-1 などを含む分子群である。Inflammasome はリガンド依存的に caspase-1 を活性化し、pro IL-1 β を炎症性サイトカインである活性型 IL-1 β に変換、その分泌を誘導することで炎症反応に大きく関与している。我々が注目しているドライアイは涙液分泌量の低下、質的な変化により角膜および結膜上皮の健常状態が損なわれる疾患で、治療は眼表面保水、涙液貯留誘導などの対症療法が主流となっている。一方で、近年ドライアイ患者の涙液中で IL-1 β 産生量の増加が見られる (Molgan L et.al., 2009)、ドライアイモデルマウスの角膜上皮で IL-1 β 産生量および mRNA 発現の増加が見られる (Zhu L et.al., 2009) といった報告が発表され、IL-1 β がドライアイの病態に関与している可能性が示唆されている。IL-1 β は inflammasome を介する経路で産生されることが明らかとなっていることなどから、ドライアイの病態に inflammasome が関与している可能性を考えた。

2. 研究の目的

炎症性サイトカイン IL-1 β が関わる炎症機構に inflammasome と呼ばれる分子が関与していることが明らかとなり、注目を集めている。IL-1 β が関与する眼表面疾患としては、ドライアイが知られている。ドライアイは種々の要因による角結膜の慢性疾患であるが、近年患者数が大きく増加していること、QOL 低下を招くことから社会的に大きな問題となっている。近年ドライアイにおいて涙液中 IL-1 β の増加が見られ、その病態に炎症が関連していることが判明した。本研究では、ドライアイにおける IL-1 β を介した眼表面炎症に inflammasome が関与していることを証明し、その炎症制御機構の解明ならびにその制御方法を開発する。

近年ドライアイ患者数は増加の一途であり、さらには未治療の潜在患者も相当数存在すると考えられている。ドライアイをはじめとした眼表面炎症疾患は QOL に大きく関わる疾患であり、そのコントロールは重要であるが、眼科臨床におけるドライアイ治療は保存療法が一般的で、根治を目的とした治療は難しい。ドライアイ病態に inflammasome が関与することが特定できれば、新規治療法あるいは薬剤の開発につながる可能性があり、ドライアイ治療の飛躍的な進展の契機となることが期待できる。

3. 研究の方法

ドライアイの病態に IL-1 β ならびに inflammasome が関与していることを証明するとともに、その炎症制御機構の解明および制御方法を開発するために、培養細胞ならび

に動物を用いた以下の実験を計画した。なお、caspase-1 ノックアウト (casp-1 KO) マウスは大阪大学で確立された動物の供与を受ける。

(1) Inflammasome を介して活性化する IL-1 β に焦点を絞り、薬剤刺激を与えた培養ヒト角結膜上皮細胞における IL-1 β 産生量、mRNA 発現量の変化、caspase-1 inhibitor などの阻害剤の効果を検討する。

(2) 我々の研究に使用可能なドライアイモデルマウスを作製し、モデル動物としての適性を評価する。モデル動物の評価には組織学的検討も実施する。ドライアイモデルマウスは文献で報告されている手法 (Zhu L et.al., 2009, Fujihara T et.al., 2001) などを参考にして作製し、症状の程度、再現性などを考慮して実験に最適と思われる系を用いる。

(3) Casp-1 KO マウスについてドライアイモデルを作製し、角膜、結膜上皮からの IL-1 β 産生量および mRNA 発現量、NALP1、NALP3 mRNA 発現量を非ドライアイ動物と比較、検討する。また、マウス眼球の組織切片を作製し、組織評価を行うとともに、IL-1 β あるいは inflammasome 構成分子の発現を免疫組織学的に確認する。

以上の実験で種々の角膜、結膜上皮障害に対し、IL-1 β が関与していることを確認する。さらに caspase-1 が IL-1 β 産生に関与していることを証明する。最終的にはドライアイモデルマウスにおける IL-1 β 産生量、mRNA 発現の変化、および阻害剤の効果、inflammasome 構成分子の発現などを検証し、ドライアイに inflammasome が関与することを証明する。

4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いた検討

ヒト結膜上皮由来の初代細胞を培養し、各種シグナル阻害剤を添加した場合に、IL-1 β の産生量がどのように変化するかを ELISA 法にて測定し、検討した。その結果、ヒト結膜上皮初代細胞の IL-1 β 産生に対して明らかな阻害作用を有する薬剤は見出せなかった。

(2) ドライアイマウスモデルの作製

動物実験を行うにあたり、適切なマウスのドライアイモデルが必要となるため、その作製方法について検討した。過去の文献等を参考にして C57BL/6 マウスを用い、マウスドライアイモデルとして既報があったベンザルコニウム塩化物点眼、ラットドライアイモデルとして既報があった眼窩外涙腺摘出の二法を検討した。

その結果、眼窩外涙腺摘出で安定した涙液減少および軽度の角膜上皮障害を惹起できることが判明した。本法は簡単な外科手術で

長期間にわたり涙液減少を持続できる。眼窩外涙腺摘出は、マウスにドライアイ症状を惹起させる手法として有用であり、我々の実験にも適切と考えられ、今後の実験のモデルとして使用することとした。

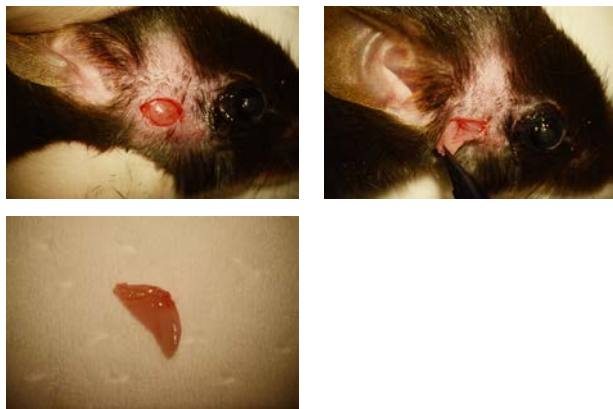


図1. 眼窩外涙腺摘出モデルの作製
眼球耳側の皮膚に小切開を入れ、摘出する。
(左上：眼窩外涙腺を露出させたところ、右上：摘出後、下：摘出した眼窩外涙腺)

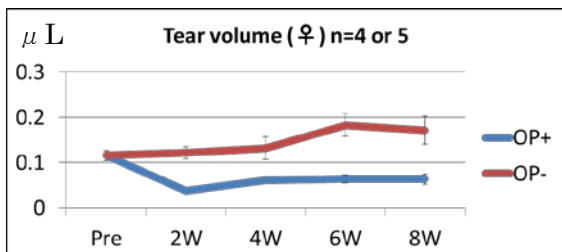
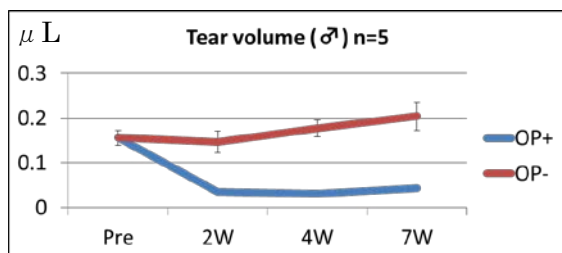


図2. 眼窩外涙腺摘出モデルの涙液量
眼窩外涙腺摘出眼 (OP+：青線) では、処置後8週まで持続的な涙液量低下を認める。

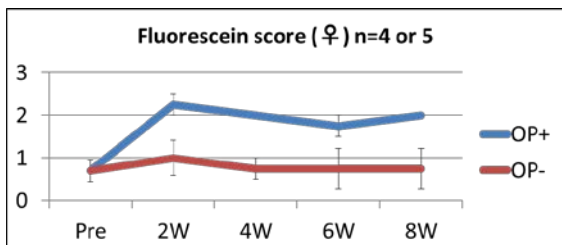
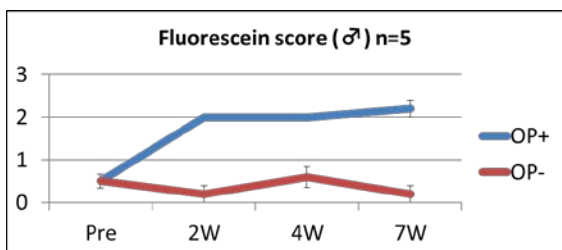


図3. 眼窩外涙腺摘出モデルのフルオレセイン染色スコア

眼窩外涙腺摘出眼 (OP+：青線) では、処置後8週まで前眼部障害が持続している。

(3) Caspase-1 KO マウスを用いた検討

Casp-1 KO マウスが入手でき、順調に個体数を増やすことができたため、(2) で検討した眼窩外涙腺摘出モデルとして動物実験を実施することとした。

まず casp-1 KO, wild type (WT) マウスに眼窩外涙腺摘出を施し、涙液減少および角膜上皮障害の程度を比較した。その結果、いずれも同程度の変化を示し、明らかな差は見られないことが判明した。また雌雄差も見られなかった。

さらに、眼窩外涙腺摘出および無処置の casp-1 KO, WT マウスから涙液を採取し、ELISA法にて涙液中の Interleukin-1 beta (IL-1β) を測定した。その結果、casp-1 KO, WT マウスいずれもドライアイ眼において、正常眼と比較して涙液中の IL-1β が増加する傾向にあり、眼表面に何らかの炎症性変化が起こっていると考えられた。

興味深いことに、casp-1 KO マウスは IL-1β 変換酵素である caspase-1 を欠損しているにもかかわらず、ドライアイ症状の惹起に伴って涙液中の IL-1β が増加した。これは我々の予想とは反するものであった。

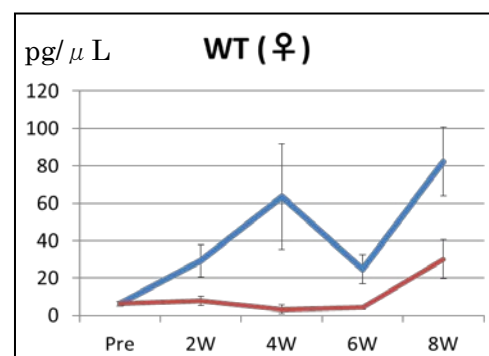
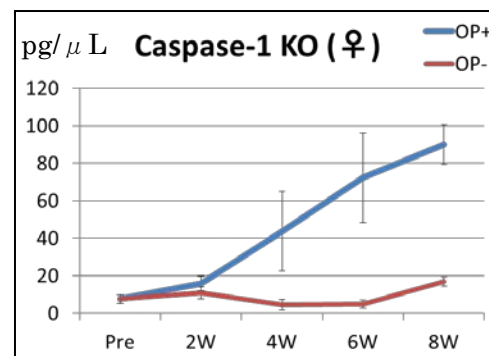


図4. Caspase-1 KO マウスと WT マウスの涙液中 IL-1β 量

眼窩外涙腺摘出眼の涙液中 IL-1β は、caspase-1 KO, WT いずれにおいても上昇している。

(4) 眼窩外涙腺摘出ドライアイモデルマウ

スを用いた組織学的検討

① C57BL/6 (wild type) マウスを用いてドライアイを惹起させた際の角結膜下への炎症性細胞浸潤の程度を組織学的に検討した。その結果、ドライアイ眼において結膜下への好中球主体の炎症性細胞浸潤が観察された。一方で、マウスは本来非特異的炎症反応が出やすい動物であるため、非処置眼と比べて炎症性細胞の浸潤程度に統計学的有意差は認められなかった。

② 次に、好中球がEGFP由来の蛍光を発する遺伝子改変マウス (LysM-eGFP マウス) を用いてドライアイを惹起させた際の角結膜下への炎症性細胞浸潤の程度を検討した。角結膜の伸展標本 (whole mount) を作製して検討した結果、ドライアイ眼において結膜下への好中球主体の炎症性細胞浸潤が観察された。しかし検討例数が少なかったこともあり、非処置眼と比べて炎症性細胞の浸潤程度に統計学的有意差は認められなかった。

以上のように、眼窩外涙腺摘出モデルマウスではドライアイ症状に誘発される眼表面の炎症性細胞浸潤に関する組織学的解析で十分満足できる結果が得られなかった。眼窩外涙腺摘出モデルでは、著明な涙液減少は観察されるものの、組織学的には炎症反応は軽度である可能性が考えられた。

(5) ドライアイモデルマウスの改良

これまでのドライアイモデルマウス (眼窩外涙腺摘出モデル) では炎症反応の惹起が不十分であった。そのため、より強い涙液減少を惹起可能な炎症を惹起できる可能性がある眼窩内・外涙腺摘出モデルの検討を行った。

LysM-eGFP および C57BL/6 マウスの眼窩内・外涙腺を摘出し、ドライアイを惹起させた際の角結膜の炎症性変化を組織学的に検討した。その結果、ドライアイ眼において結膜下に強い炎症性細胞浸潤が観察され、眼窩外涙腺のみ摘出モデルに比べて炎症反応は有意に強かった。また角膜にも強い炎症性変化が確認された。さらに LysM-eGFP マウスでは、浸潤する炎症性細胞はその多くが eGFP 由来の蛍光を発しており、本モデルでは好中球主体の強い炎症反応が見られることが判明した。

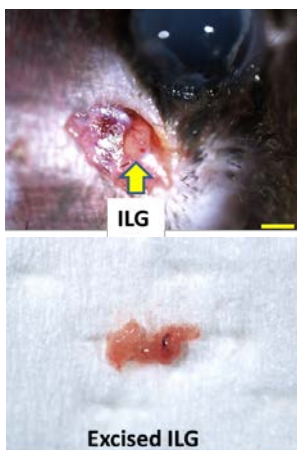


図 5. 眼窩内涙腺摘出
眼球の耳側下方からの低侵襲アプローチで摘出可能となった。

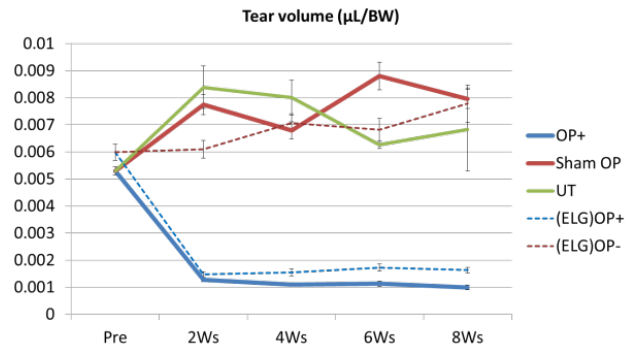


図 6. 眼窩内外涙腺摘出モデルの涙液量変化
眼窩内外涙腺摘出モデルの涙液量 (青線) は sham operation 側 (赤線)、眼窩外涙腺のみ摘出 (青破線) に比べて有意に減少していた。

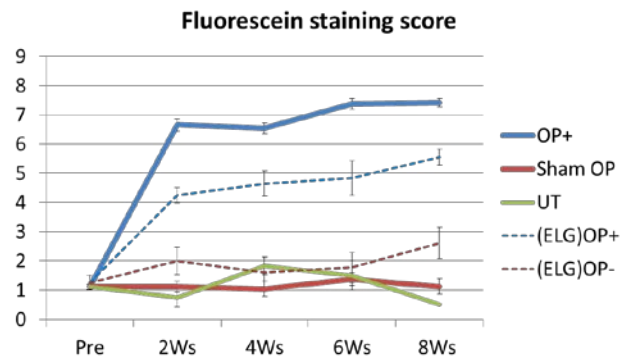


図 7. 眼窩内外涙腺摘出モデルのフルオレセイン染色スコア
眼窩内外涙腺摘出モデルの処置側 (青線) では sham operation 側 (赤線)、眼窩外涙腺のみ摘出 (青破線) に比べてスコアは有意に高値を示した。

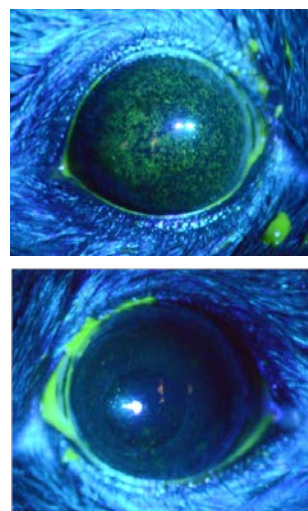


図 8. 眼窩内外涙腺摘出モデルマウスのフルオレセイン染色像
処置側 (上) では角膜に斑点状の染色像が認められる。

められるが、sham operation 側（下）ではほとんど認められない。

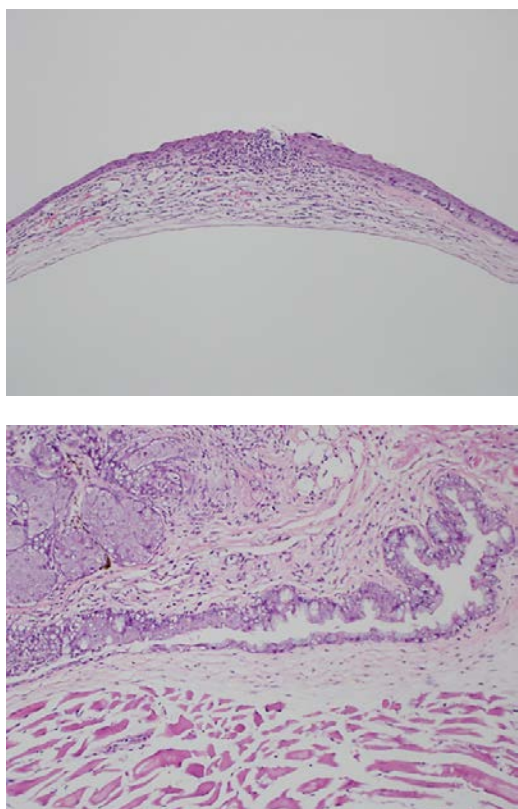


図 9. 眼窩内外涙腺摘出モデルマウスの角膜、結膜の組織像
角膜（上）、結膜（下）ともに強い炎症性変化を認める。

(6) 研究結果のまとめ

ドライアイとインフラマゾームの関連を明らかにするため、ドライアイモデルマウスの作製を検討した。種々のモデルのうち、眼窩外涙腺摘出、あるいは眼窩内・外涙腺摘出モデルがドライアイ状態を良好に維持でき、眼表面の炎症を観察するために有用であるモデルであることが判明し、眼表面の炎症性変化を組織学的にも検討した。これらのモデルの眼表面では種々のステージの炎症性変化が観察された。眼窩内外涙腺摘出および眼窩外涙腺摘出モデルマウスはドライアイモデルとして病態の解明に有用と考えられる。特に眼窩内外涙腺摘出モデルは重症のドライアイモデルとして有用と考えられる。

さらに眼窩外涙腺摘出モデルの検討においては涙液中の IL-1 β が有意に増加していた。しかしインフラマゾーム形成カスケードにおいて必要とされる IL-1 β 変換酵素 (caspase-1) を欠失させた caspase-1 KO マウスにおいても涙液中 IL-1 β の増加が認められた。ドライアイモデルマウスの組織学的評価においても、炎症性細胞浸潤は好中球が主体であり、涙液の減少による眼表面の二次的な非特異的反応がドライアイにおける炎症反応の主体ではないかと考えられた。よっ

て、ドライアイによる炎症にはインフラマゾームは関連していない可能性が高いと考えられ、当初我々が提唱した仮説は証明できなかった。

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 2 件)

- (1) 上田真由美、微生物認識受容体とインフラマゾーム、あたらしい眼科、2011 年、28 巻 9 号、1291-1292
- (2) 篠宮克彦、上田真由美、外園千恵、稲富勉、横井則彦、小泉範子、木下茂、Immunohistochemical analysis of inflammatory limbal conjunctiva adjacent to Mooren's ulcer, British Journal of Ophthalmology, 査読あり、97:362-366.
(doi:10.1136/bjophthalmol-2012-302631)

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 篠宮克彦、上田真由美、小堀麻紀、木下茂、眼窩外涙腺摘出マウスのドライアイモデルとしての有用性、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総会)、東京都ホテルニューオータニ (2012 年 2 月 23 日)
- (2) 篠宮克彦、上田真由美、小堀麻紀、中西憲司、横井則彦、木下茂、眼窩外涙腺摘出ドライアイマウスモデルにおける涙液中 caspase-1 非依存的 IL-1 β の増加、第 116 回日本眼科学会総会、東京都 東京国際フォーラム (2012 年 4 月 5 日)
- (3) Katsuhiko Shinomiya, Mayumi Ueta, Maki Kobori, Kenji Nakanishi, Norihiko Yokoi, Shigeru Kinoshita, Usefulness of a dry-eye mouse model produced by exorbital lacrimal gland excision and analysis of the increase of caspase-1 independent IL-1beta in the tear fluid of those mice, ARVO2012, Greater Fort Lauderdale Broward Country Convention Center, Fort Lauderdale, FL, USA (2012/5/7)
- (4) 篠宮克彦、上田真由美、古賀彩加、木下茂、眼窩内・外涙腺摘出マウスドライアイモデルの有用性、角膜カンファレンス 2014・第 38 回日本角膜学会総会、沖縄県宜野湾市 沖縄コンベンションセンター (2014 年 2 月 1 日)
- (5) Katsuhiko Shinomiya, Mayumi Ueta,

Ayaka Koga, Shigeru Kinoshita,
Usefulness of a new dry-eye mouse model
produced by exorbital and intraorbital
lacrimal gland excision, ARV02014,
Orange County Convention Center,
Orlando, FL, USA (2014/5/4)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠宮 克彦 (SHINOMIYA, Katsuhiko)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：50585289

(2) 研究分担者

横井 則彦 (YOKOI, Norihiko)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号：60191491

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