

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23792010
 研究課題名（和文） 角膜における IL-6 トランスシグナリングの役割と病態との関連について
 研究課題名（英文） The role and pathophysiologic significance of IL-6 trans-signaling in the cornea
 研究代表者
 崎元 暢（SAKIMOTO TOHRU）
 日本大学・医学部・助教
 研究者番号：20465272

研究成果の概要（和文）： IL-6 は、細胞から放出された可溶性 IL-6R(sIL-6R)と IL-6+sIL-6R 複合体を形成してシグナル伝達する、IL-6 トランスシグナリングというシグナル伝達機構をもつ。この研究では、マウスアルカリ外傷角膜において IL-6R を阻害すると角膜の炎症細胞浸潤、角膜血管新生、角膜中において IL-6 シグナル伝達物質である STAT3 や炎症関連分子である VEGF-A、MCP-1、ICAM-1、さらに MMP-13 や clec7a などの発現が著明に抑制されることを明らかにし、IL-6R が角膜において pro-inflammatory であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： IL-6/s (soluble)IL-6R complex can bind and activate cells in a mechanism termed IL-6 trans-signaling. We investigated the effect of IL-6R blockade on corneal inflammation. Topical instillation of anti-IL-6R antibody was applied to mice corneas with alkali burn. By IL-6R blockade, the vascularized area and inflammatory cells infiltration were significantly reduced. Expressions of phosphorylated STAT3, ICAM-1, MCP-1, and VEGF-A in the corneal stroma were significantly inhibited by IL-6R blockade. We deduce that IL-6 trans-signaling plays a significant role in ocular surface inflammation and that the blockade of IL-6R contributes to the reduction in corneal inflammation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,900,000	570,000	2,470,000

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：角膜、IL-6 レセプター、炎症、抗体

1. 研究開始当初の背景
 IL-6 の受容体は、IL-6 結合ドメインを持つ

方で細胞内ドメインを有しない IL-6 receptor(IL-6R)と、細胞内ドメインを有する

gp130 との複合体で形成されている。gp130 がほぼすべての細胞に発現しているのに対し、IL-6R 発現はリンパ球や上皮系細胞などに限定されており、IL-6 が結合することができない。そのため、細胞外に存在する可溶性 (soluble)IL-6R (sIL-6R) が、IL-6 と複合体を形成し、その IL-6/sIL-6R 複合体が細胞表面の gp130 と結合することで IL-6R を発現していない細胞に IL-6 シグナル伝達する、IL-6 トランスシグナリングと呼ばれる機構がある。gp130 から細胞内へ伝達されたシグナルは転写因子 STAT3 のリン酸化を来し炎症やアポトーシスを誘導する。細胞外における sIL-6R の存在が IL-6 トランスシグナリングの中心的な役割を有し、分子標的療法として抗 IL-6R 抗体 (トシリズマブ) が臨床応用されている。また、局所炎症の遷延に IL-6 によって誘導される IL-17 産生 CD4 陽性 T 細胞と、その細胞から産生される IL-17 さらにはポジティブフィードバックを受けた IL-6 産生亢進が関わっている可能性も指摘されている。

2. 研究の目的

我々の先行研究で、角膜においては sIL-6R は角膜上皮から産生され、角膜実質は IL-6 トランスシグナリングの標的となることが示唆された。そこで、本研究では、IL-6 トランスシグナリングのキープレイヤーである sIL-6R に着目し、角膜における IL-6 トランスシグナリングの役割を明らかにすることを主題とした。マウスアルカリ外傷角膜を用いて、角膜上皮-実質相互作用において sIL-6R を介して角膜内に IL-6 の炎症性シグナルが伝達されるかを IL-6R 阻害剤を用いて検討した。

3. 研究の方法

研究 1 : IL-6R 阻害による角膜炎症への効果
強い炎症細胞浸潤や血管新生が生じるマ

ウスアルカリ外傷角膜に sIL-6R と細胞膜上の IL-6R 双方を阻害する作用を持つ抗 IL-6R 抗体を点眼することで IL-6 トランスシグナリング阻害効果によって前眼部炎症が軽減するかを確認する。

研究 2 : 培養角膜自室細胞を用いた研究

IL-6 トランスシグナリングの標的細胞である培養角膜実質細胞において IL-6/sIL-6R 複合体の阻害因子である可溶 gp130 (sgp130) が産生されるか、細胞外ドメインシグナリング刺激を通して検討した。またリコンビナント IL-6/IL-6R の複合投与で VEGF 産生が亢進するかも検討した。

4. 研究成果

研究 1 : マウスアルカリ外傷角膜においては、角膜実質中に IL-6 トランスシグナリング特異的な細胞内シグナルであるリン酸化 STAT3 陽性細胞がみられ、抗 IL-6R 抗体点眼によって角膜血管新生や角膜実質中のリン酸化 STAT3 陽性細胞や炎症細胞の浸潤、角膜実質中の炎症関連分子である VEGF-A、MCP-1、ICAM-1 などの抑制・発現低下を認めた。この IL-6R 阻害によって角膜炎症における IL-6R が pro-inflammatory であることを示す結果となった。

また、Th17 系 PCR アレイを用いて遺伝子発現を網羅的に検討した結果、抗 IL-6R 抗体点眼によって MMP-13 や共にマクロファージ遊走に関わるケモカインである MCP-1 と CCL22、さらに自然免疫・真菌感染防御に関わる clec7a (dectin-1) の発現が著明に抑制された。逆に、IL-17 の受容体である IL-17RE や好中球遊走に関わるケモカインである CXCL-5 の発現が増強していた。これらのことは、IL-6R 抗体点眼はマクロファージ遊走に関わるケモカインや MMP などの遺伝子発現を抑制することで抗炎症効果を生じる可能性

が考えられた。さらに、IL-6 シグナルは IL-17 産生細胞を誘導するため、IL-6R 抗体による IL-17 受容体の発現の上昇結果は IL-6R によるサイトカインシグナル伝達と関連がある可能性が示唆された。

研究 2：角膜細胞における IL-6/sIL-6R 複合体の阻害因子である可溶性 gp130 (sgp130) の産生能を培養角膜上皮細胞、培養角膜実質細胞を用いて検討したところ、細胞外ドメインシミュレーションを促進させることで角膜実質細胞から sgp130 が産生され、角膜上皮細胞からは産生されないことが分かった。このことは、角膜上皮-実質相互作用を介して IL-6 シグナルを遮断する機構として矛盾のないものと考えられた。また、またリコンビナント IL-6/IL-6R の複合投与を行うと濃度依存性に VEGF 産生が亢進することを明らかにし、研究 1 での IL-6R 阻害による角膜実質中 VEGF 抑制を裏付けることができた。

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 5 件)

①Sakimoto T, Sawa M: Metalloproteinases in corneal diseases: degradation and processing. *Cornea* 31:S50-S56, 2012. 査読無

②Sakimoto T, Sugaya S, Ishimori A, Sawa M: Anti-inflammatory effect of IL-6 receptor blockade in corneal alkali burn. *Exp Eye Res* 97: 98-104, 2012. 査読有

③崎元 暢：眼科 臨時増刊号 眼科薬物療法 周辺部角膜潰瘍 (Marginal, Mooren ulcer など) 眼科 54 : 1282-1286, 2012. 査読無

④崎元 暢：臨床眼科 臨時増刊号 オキキュラ

ーサーフェイス診療アップデート 角膜実質融解における MMP. *臨床眼科* 66 : 341-345, 2012. 査読無

⑤崎元 暢：新しい展望 結膜：眼表面におけるムチン研究の動向. *眼科* 54 : 965-974, 2012. 査読無

[学会発表] (計 9 件)

①Sugaya , Sakimoto T, Yamada A, Ohnishi T, Ishimori A, Sawa M: The effects of IL-6 receptor blockade on gene expressions in experimental corneal alkali burn. ARVO, Seattle, WA, 5.7.2013.

② Yamada A, Sakimoto T, Ishimori A, Ohnishi T, Sugaya S, Sawa M: Effect of Interleukin-17(IL-17) and IL-17 receptor on ocular surface inflammation. ARVO, Seattle, WA, 5.6.2013.

③崎元 暢、石森秋子、澤 充：細胞外ドメインシミュレーション亢進による tumor necrosis factor-alpha の角膜上皮細胞内シグナル阻害効果の検討. 第 117 回日本眼科学会総会. 東京. 4.5.2013.

④山田 愛、崎元 暢、石森秋子、大西貴子、菅谷哲史、澤 充：前眼部炎症と Th17 細胞系蛋白. 第 37 回日本角膜学会総会・第 29 回日本角膜移植学会. 和歌山. 2.15.2013.

⑤菅谷哲史、崎元 暢、山田 愛、大西貴子、石森秋子、澤 充：角膜アルカリ外傷における抗 Interleukin-6 受容体抗体点眼後の遺伝子発現の変化. 第 37 回日本角膜学会総会・第 29 回日本角膜移植学会. 和歌山. 2.14.2013.

⑥Sakimoto T, Sugaya S, Ishimori A, Sawa M: Anti-inflammatory effect of IL-6 receptor blockade on corneal alkali burn. ARVO, Fort Lauderdale, FL, USA. 5.9.2012.

⑦崎元 暢、菅谷哲史、石森秋子、澤 充：

アルカリ外傷角膜実質中の炎症関連分子発現に対するIL-6 受容体阻害効果. 第116回日本眼科学会総会. 東京. 4.5.2012.

⑧ 崎元 暢、澤 充：角膜上皮におけるP2Y受容体を介した細胞外ドメインシェディングの検討. 第36回日本角膜学会総会. 東京. 2.24.2012.

⑨ Sakimoto T: Metalloproteinase and corneal diseases -degradation and processing- 17th annual meeting of the Kyoto Corneal Club. 京都. 12.2.2011.

[その他]

ホームページ

<http://www.med.nihon-u.ac.jp/department/eye/school/project.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

崎元 暢 (SAKIMOTO TOHRU)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：20465272

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：