

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791825

研究課題名(和文)白血球接着分子VAP-1阻害によるぶどう膜炎軽症化の検討

研究課題名(英文)Evaluation of vascular adhesion protein-1 inhibition on animal model of uveitis

研究代表者

竹本 裕子(TAKEMOTO, YUKO)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：20443939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：1. VAP-1の発現を確認：健常の網膜および脈絡膜にVAP-1が発現していることをWestern blottingとPCRで確認した。2. EAUにおけるVAP-1阻害薬の効果：マウスEAUにVAP-1阻害薬を連日全身投与した。EAUが軽症化する場合もあったが再現性が十分でなく、無効なこともあった。有意差はなかった。3. サイトカイン解析：培養液中の血管内皮細胞をTNF-alphaおよびIL-1betaで刺激した場合、可溶性VAP-1濃度は培養上清中で増加したが、mRNAは増加しなかった。

研究成果の概要(英文)：1. VAP-1 expression: It was determined that VAP-1 was expressed in retina and choroid in naive mice by using western blotting and PCR. 2. VAP-1 inhibitor into EAU: EAU was induced in mice by immunization with IRBP peptide, and VAP-1 inhibitor was injected systemically. Mice treated with VAP-1 inhibitor had a tendency to be mild. However, it was not significant. 3. Cytokines: Soluble VAP-1 concentrations were elevated when vascular endothelial cells were stimulated with TNF-alpha and IL-1beta, however, VAP-1 mRNA levels were not elevated.

研究分野：眼科学

キーワード：VAP-1 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎

1. 研究開始当初の背景

ぶどう膜炎は虹彩、毛様体、脈絡膜、およびその隣接組織の炎症で、網膜血管炎や網膜剥離、緑内障などの合併によって重篤な結果を招く。若年者やいわゆる働き盛りに発症および再発を繰り返し、失明率も高いため、本人はもとより社会的にも重要な疾患である。事実、西側先進諸国においては40歳以上の中途失明原因の約15%が本症によって占められている。本邦の3大ぶどう膜炎原因疾患はベーチェット病、サルコイドーシス、原田病であり、いずれも白血球が炎症の進展・増悪の主体である。

Vascular adhesion protein-1 (VAP-1) は、1992年に関節リウマチ患者の滑膜組織から同定された分子量 170kDa の糖タンパクであり、血管内皮細胞に発現する白血球接着分子である。同分子は白血球の血管外遊走における白血球と血管内皮細胞の相互作用を担っている。これまでに、皮膚、脳、肺、肝臓、消化管、眼球などにおける血管内皮細胞で発現が確認されており、その白血球血管外遊走に関わる接着分子としての機能を介して、健康状態ではリンパ球ホーミングなどの免疫機構に、そして病的状態では炎症性疾患、病的血管新生、腫瘍性疾患などでその病態メカニズムに深く関与することが知られている。

VAP-1 は遺伝子クローニングから Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase (SSAO) とよばれる酵素と homology を有することが解明され、生体内におけるその重要性はさらに明らかとなった。SSAO は、第一級アミンからアルデヒド、過酸化水素、アンモニアを産生する酵素活性を有する。毒性アルデヒド類や過酸化水素およびその代謝物の増加は血管内皮損傷を生じることが知られており、VAP-1 は酵素としても炎症性変化の増悪に関与している。このように VAP-1/SSAO は「接着分子」と「酵素」という2つの異なった機能を介して炎症に関与する点でユニ

ークな分子である。

2. 研究の目的

我々のグループは、過去にエンドトキシン誘発ぶどう膜炎 (EIU) モデルを用いた検討をおこない、VAP-1阻害薬の眼炎症抑制効果を報告した。同モデルは外毒素を用いた非特異的眼炎症であり、ヒトの内因性ぶどう膜炎のモデルではないため、VAP-1阻害剤のぶどう膜炎治療における有用性の検討としては不十分である。ただし、炎症抑制効果が確認できたことは本研究の良好な結果を予見させるものである。

本研究の目的は、ぶどう膜炎の病態動物モデルである実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (EAU) を用いて、眼炎症に対する VAP-1 阻害剤の抑制効果ならびに予防的介入効果を検討し、将来的に新たな治療薬カテゴリーを創造することである。

3. 研究の方法

(1) VAP-1 評価系の確立

マウス組織で VAP-1 を定量する系を確立する。標的組織である網膜とぶどう膜 (脈絡膜) に VAP-1 が発現しているか検討する。

(2) マウス EAU に VAP-1 阻害薬を投与

マウスに EAU を惹起し、VAP-1 阻害薬を連日投与して眼底検査による臨床的評価、組織学的評価を行う。

(3) 抗原特異的 T 細胞増殖反応と細胞性免疫への影響、サイトカインの解析

炎症抑制効果が見られた場合、免疫 10 日目に所属リンパ節細胞を回収し、抗原ペプチド、抗原提示細胞とともに *in vitro* で共培養し、72 時間後に [³H]チミジンの取り込み量と上清中サイトカインを測定する。

血管内皮細胞の培養系でも VAP-1 阻害薬の作用を検討する。

4. 研究成果

(1) VAP-1 の発現を確認

健常の網膜および脈絡膜に VAP-1 が発現していることを Western blotting と PCR で確認した。

(2) EAU における VAP-1 阻害薬の効果

マウス EAU に VAP-1 阻害薬を連日全身投与した。EAU が軽症化する場合もあったが再現性が十分でなく、無効なこともあった。有意差はつかなかった。

(3) サイトカイン解析

培養液中の血管内皮細胞を TNF-alpha で刺激した場合、可溶性 VAP-1 濃度は培養上清中で増加したが、mRNA は増加しなかった。一方、血管内皮細胞を IL-1beta で刺激した場合にも可溶性 VAP-1 培養上清中で増加したが mRNA は増加しなかった。

< 考察 >

VAP-1 は網膜およびぶどう膜に存在しており、かつエンドトキシン等の非特異的全身炎症では誘導されるため、その阻害薬は一定の炎症軽減効果を示す。しかし、TNF-alpha や IL-1beta などの炎症性サイトカインは血管内皮細胞からの VAP-1 を直接誘導しない。そのため抗原特異的ぶどう膜網膜炎モデルである EAU では、最高重症度を軽症化するには至らなかったと推測された。

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 1 件)

1. Takemoto Y, Namba K, Mizuuchi K, Ohno S, Ishida S. Two cases of subfoveal choroidal neovascularization with tubulointerstitial nephritis and uveitis (TINU) syndrome. Eur J Ophthalmol. 2013; 23: 255-257、査読有、doi: 10.5301/ejo.5000240

[学会発表] (計 13 件)

1. Namba K, Mizuuchi K, Takemoto Y, Tagawa Y, Uno T, Fukuhara T, Ohno S,

Kitaichi N, Ishida S. The appearance of antibodies to infliximab in the course of infliximab administration in Behçet's disease. 16th International Conference on Behçet's disease 2014/9/18-20, Cite Internationale Universitaire de Paris (Paris, France)

2. Tagawa Y, Namba K, Mizuuchi K, Takemoto Y, Uno T, Fukuhara T, Hirooka K, Ohno S, Kitaichi K, Ishida S. Choroidal thickening prior to anterior recurrence in patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease. 12th International Ocular Inflammation Society (IOIS) Congress/ 2nd International Assembly of Ocular Inflammation Societies/ 27th Spanish Uveitis Study Group Meeting、2014/2/27-3/1、VALENCIA CONFERENCE CENTRE (Valencia, Spain)
3. 水内一臣、南場研一、齋藤 航、堀江幸弘、田川義晃、宇野友絵、竹本裕子、福原崇子、北市伸義、石田 晋. ぶどう膜炎に続発した血管増殖性網膜腫瘍の 2 症例、第 67 回 臨床眼科学会、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)、2013/10/31-11/3
4. Hase K, Namba K, Saito W, Takemoto Y, Mizuuchi K, Ohno S, Ishida S. A Case of tuberculous endophthalmitis. International Workshop on Granulomatous Uveitis and Ocular Behçet's disease and Asia-Pacific Intraocular Inflammation Study Group, 2013/4/12-14、Han-Hsien International Hotel (Kaohsiung, Taiwan)
5. 南場研一、北市伸義、安藤 亮、竹本裕子、水内一臣、堀江幸弘、大野重昭、天

- 野麻穂、西村紳一郎、石田 晋. ぶどう膜炎における網羅的糖差解析、第117回日本眼科学会、東京国際フォーラム(東京都) 2013/4/4-7
6. 水内一臣、竹本裕子、南場研一、宇野友絵、大野重昭、石田 晋. ベーチェット病眼炎症発作とインフリキシマブ治療値・サイトカイン血中濃度との相関、第117回 日本眼科学会、東京国際フォーラム(東京都) 2013/4/4-7
7. 大川剛司、水内一臣、西坂紀実利、竹本裕子、田川義継、石田 晋. ドライアイに対するレバミピド点眼薬の効果、角膜カンファランス2013、白浜町立総合体育館(和歌山県・白浜町) 2013/2/14-16
8. 竹本裕子、南場研一、水内一臣、橋本勇希、宇野友絵、北市伸義、大野重昭、石田 晋. Vogt-小柳-原田病の前眼部炎症再発時における脈絡膜循環障害、第66回日本臨床眼科学会、国立京都国際会館(京都府・京都市) 2012/10/25-28
9. 竹本裕子、新田卓也、南場研一、水内一臣、宇野友絵、大川剛司、新明康弘、陳進輝、石田 晋. 隅角結節を伴う続発緑内障の臨床像、第23回 緑内障学会、石川県立音楽堂、ANA クラウンプラザホテル金沢(石川県・金沢市) 2012/9/28-30
10. 櫻井友梨、南場研一、水内一臣、竹本裕子、宇野友絵、及村俊史、大野重昭、石田 晋. 尋常性感癩に伴う難治性ぶどう膜炎に対しインフリキシマブ治療が奏功した1例、第159回 北海道眼科集談会、旭川ターミナルホテル(北海道・旭川市) 2012/9/8
11. 長谷敬太郎、南場研一、竹本裕子、齋藤航、中村佳代子、今野 哲、網島 優、大野重昭、石田 晋. 肺粟粒結核に伴う結核性眼内炎の1例、第159回 北海道眼科集談会、旭川ターミナルホテル(北海道・旭川市) 2012/9/8
12. 田川義晃、南場研一、水内一臣、竹本裕子、北市伸義、大野重昭、石田 晋. 網膜色素上皮裂孔および漿液性網膜剥離を伴ったぶどう膜炎、第46回 眼炎症学会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 2012/7/14-16
13. 竹本裕子、南場研一、齋藤 航、水内一臣、北市伸義、大野重昭、石田 晋. Relentless placoid chorioretinitis の1例、第46回 眼炎症学会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 2012/7/14-16

〔その他〕
ホームページ等
<http://eye.med.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹本 裕子 (TAKEMOTO YUKO)

北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号：20443939