

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670738

研究課題名(和文)アトピー網膜剥離の病態におけるアラミン分子の役割

研究課題名(英文)The roles of Alarmin for the pathophysiology of Atopic Retinal Detachment

研究代表者

河野 博之(Kawano, Hiroyuki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70234094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：網膜剥離の中でも治療困難例の多いアトピー性網膜剥離の病態において、外傷性に組織から放出されるアラミン分子がどのような働きを持っているのかを明らかにすることを目的に研究を進めた。代表的なアラミンであるインターロイキン33(IL-33)が、網膜ミュラー細胞の細胞核に存在し、網膜外傷によって網膜硝子体内に放出されることを発見した。また、網膜硝子体内でIL-33は組織線維化を促進する遺伝子の発現を亢進させることを示した。IL-33は今後アトピー性網膜剥離の治療ターゲットとして検討する価値のある分子と考えられる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate roles 'Alarmins', which released from the injured tissue to alert danger to the neighbor healthy tissue, for the pathophysiological process of atopic retinal detachment, we investigated mouse retinal detachment models made by perforating retinal injury. We found positive immunolocalization of interleukin-33 (IL-33), a prototype of the alarmin, in the nuclei of the Muller glial cells of the healthy mouse retina. Upon perforating retinal injury, IL-33 released from the nuclei to the vitreo-retinal interface, and upregulate profibrotic genes in the injured retina. The results suggested that IL-33 may be a good therapeutic target or atopic retinal detachment in future.

研究分野：眼科学

キーワード：アトピー 網膜剥離 アラミン

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎に伴う網膜剥離(AD-RD)は若年者に多く、網膜最周辺部に大きな裂孔を伴い治療が困難な場合やアトピー白内障に病変がマスクされて治療が遅れたなどの理由で、視力予後不良の症例がみられる。日本全国では年間100例以上の発症がみられ、両眼発症も多く、その確実な治療法および予防法の検討が求められている。AD-RDの発症には、搔痒感に伴う自己叩打および網膜最周辺部に隣接する毛様体における慢性炎症が関係することが臨床的に推測されているが2、治療法の改善や予防につながる成果は得られていない。最近のアレルギー学の進歩により、外傷に伴って組織から放出される危険感知物質(アラミン)の一つであるinterleukin-33(IL-33)の放出によってアトピー性の炎症が引き起こされることが明らかになってきている。またIL-33はIL-1と受容体鎖(IL-1RAP)を共有しており、同様のアラミン分子であるIL-1の作用とのオーバーラップが考えられる。我々はアトピー性皮膚炎、アトピー角結膜炎、アトピー白内障の病態研究を、遺伝子多型によるリスク評価、IL-33をはじめとする病態関連分子の解析といった形で展開してきた。それらの成果を元にAD-RDとIL-33/IL-1の関連を検討するという着想を得た。

2. 研究の目的

網膜剥離の中でも治療困難例の多いアトピー性網膜剥離(AD-RD)の病態において、外傷性に組織から放出されるアラミン分子がどのような働きを持っているのかを明らかにすることを目的に研究を進める。具体的には、AD-RD発症における慢性炎症と外傷の役割をアラミン(IL-33/IL-1)およびその下流にあるIL-13/IL-6を軸に解析を勤める。まず、臨床サンプルの解析からAD-RD発症時にアラミン分子が眼組織から放出されていることを確認する。次にアラミン分子に暴露された網膜組織が、IL-13/IL-6の発現を亢進させることを実験的に確認してゆく。IL-13/IL-6は、各種の炎症モデルで組織線維化に必須の役割を果たすことが示されており7、AD-RD発症における関連も予想される。次にAD-RD発症におけるアトピー慢性炎症と白内障手術による外傷の役割をマウスモデルによって探求する。この際アラミンおよびIL-13/IL-6の役割を明らかにするため、遺伝子操作マウス(IL-33KOマウス8、IL-1トランスジェニックマウス9、IL-13レポーターマウス)を活用する。以上の方法を用いてアラミンとAD-RDの関連を明らかにしてゆくことを目標に研究を進める。

3. 研究の方法

1. AD-RDの手術治療の際に採取する前房水、網膜下液、硝子体液中の

IL-33、IL-1、IL-6、IL-13、MMP-2/MMP-9濃度をELISAで測定する。また、比較検討のためアトピー白内障、加齢性白内障においても前房水中の濃度を測定する。ELISA測定前に遠心により硝子体細胞は分取して、サイトスピンでマクロファージ、マスト細胞、好酸球等のマーカーを使用した解析を施行する。

2. IL-33ノックアウト(KO)マウス網膜組織および培養網膜マクロファージ(網膜から分離)を用い、IL-33刺激によって変動する遺伝子を網羅的に解析(マイクロアレイ)し、IL-33とAD-RDの病態をつなぐ可能性のあるシグナルを検討する。またIL-1トランスジェニックマウスとワイルドタイプマウスの網膜組織も同様にマイクロアレイを用いたシグナル解析に供する。結果は上述の臨床サンプルの解析にもフィードバックする。

3. AD-RD発症における白内障摘出および組織炎症の役割を検討するため、マウスのアトピー性皮膚炎モデルNc/Ngaマウスを用いて、()水晶体囊外摘出術を施行し、IL-1/IL-33の発現を検討する。()毛様体炎症とアトピー網膜剥離の関連を評価するため、アレルギーであるパピインまたはダニ抗原で感作したマウスの前房中に対応する抗原を注入し、虹彩毛様体炎を誘発する。この際の眼組織中および血中のIL-1、IL-33、IgE、IL-6、IL-13、MMP濃度を測定するとともに組織学的な変化を検討する。

4. AD-RD発症とアラミン分子の関連を検討するため、IL-1トランスジェニックマウス、IL-33KOマウスおよびIL-13-GFPレポーターマウスを用いて、網膜剥離モデルを作成する。網膜剥離モデルは()マウス角膜に穿孔創を作成12、()網膜下にヒアルロン酸を注入といった方法で作成が可能であり、前述の毛様体炎症および水晶体摘出モデルと組み合わせ、より臨床に近いAD-RDモデルを作成する。

5. アトピー網膜剥離の発症には前部硝子体の収縮が関連していることが報告されているが2、IL-33が組織の癒着化を引き起こすM2型マクロファージへの分化を促進14する事実と前囊収縮との関連が予想される。上述のAD-RDマウスモデルをIL-33KOマウスとwild typeマウスを用いて作成し、前部硝子体および網膜の組織線維化におけるIL-33の役割を両者の比較によって明らかにし、同時にIL-13レポーターマウスを用いることで、IL-33の下流で実際の組織線維化のエフェクター分子であるIL-13の動態を明らかにするとともに、前部硝子体および網膜におけるIL-13産生細胞を同定する

6. 網膜におけるIL-33分子の動態解析。のミュラー細胞並びに毛様体上皮細胞の細胞核にIL-33タンパクが発現していることが判明しており、鈍的外傷で前房水中および硝子体中にIL-33が放出され、網膜における増殖性変化を誘導している可能性が考えられ

る。網膜ミューラー細胞からの IL-33 放出のメカニズムを明らかにするため、マウス網膜組織を用いた免疫電顕法によって、マウス網膜剥離モデルにおける IL-33 の超微局在の変化を明らかにする。

7. AD-RD の最重症型である proliferative vitreoretinopathy(PVR)の発症には、IL-6 が関連しているとの報告がなされており、IL-1 トランスジェニックマウスを用いて AD-RD モデルを作成し、さらに硝子体内に dispase を注射することによって PVR モデルを作成して、IL-1 ,IL-6 および IL-6 が誘導するとの報告がある各種の細胞外マトリックスの発現をタンパクレベル・遺伝子レベルで検討する。

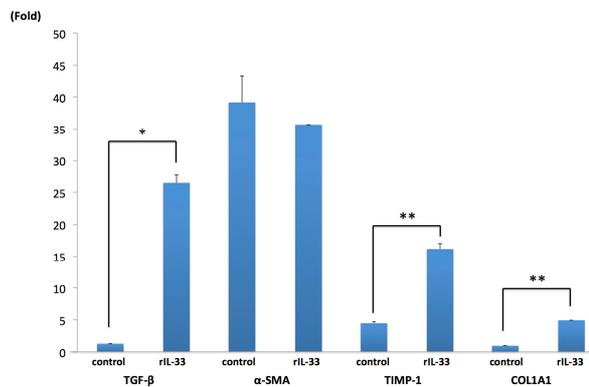
8. アラーミンの制御が AD-RD の治療に有用か否かを検討するため、平成 25 年度に作成した AD-RD マウスモデルにアラーミンとその下流分子の抑制薬を投与し、効果を検討する。効果は組織学的な解析、リアルタイム PCR 法を用いた組織癒着化関連遺伝子(-smooth muscle actin, fibronectin, TGF-)の発現を指標にする。ヒト IL-1 トランスジェニックマウスを用いて AD-RD マウスモデルを作成することでヒト IL-1 受容体アンタゴニスト (Anakinra) を用いた実験が可能である。また、IL-33, IL-13, IL-6 に関してはマウスサイトカインに対する中和抗体を投与する。

4. 研究成果

1. **アトピー網膜剥離の手術治療の際に採取した前房水、網膜下液、硝子体液中の炎症性サイトカイン濃度の測定。**アトピー網膜剥離患者から手術中に網膜下液を採取し、ELISA 法により、ヒト IL-33 タンパク濃度を測定した。いずれのサンプルも IL-33 タンパク濃度は検出限界以下であった。ELISA キット (R&D 社) の抗体が認識する部位の IL-33 タンパクにスプライシング等の現象が生じている可能性を確認するため、現在ウエスタンブロットによる IL-33 タンパクの分子量を含めた発現解析を施行中である。硝子体液では何らかのプロテアーゼによる IL-33 分子の分解が生じている可能性も検討中である。

2. **IL-33 ノックアウトマウスの硝子体内にリコンビナント IL-33 を注射するモデルにおいて、変動する遺伝子の発現解析を施行。**TGF-beta 1 遺伝子と 1 型コラーゲン遺伝子の発現誘導が確認された(図 1)。また M2 マクロファージのマーカーである Arg1 遺伝子の発現上昇も確認された。この結果は第 119 回日本眼科学会総会で発表した。また、網膜内に IL-33 の受容体である ST2L 分子の発現を確認した。今後網羅的遺伝子解析を施行し、IL-33 を硝子体内に注入した際のシグナル経路を詳細に解析する予定である。

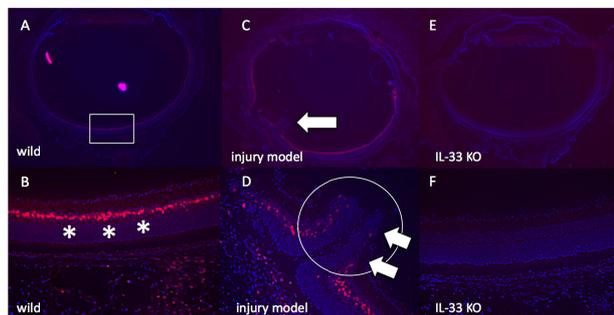
図 1 リコンビナント IL-33 をマウス硝子体内に注入した際の組織線維化に関連する遺伝子発現の定量



3. AD-RD 発症における白内障摘出および組織炎症の役割を検討するため、マウスのアトピー性皮膚炎モデル Nc/Nga マウスを用いて、毛様体炎症とアトピー網膜剥離の関連を評価するため、アレルゲンであるパインまたはダニ抗原で感作したマウスの前房中に対応する抗原を注入し、虹彩毛様体炎の誘発を試みたが、ごく軽度の炎症を認めるのみであった。

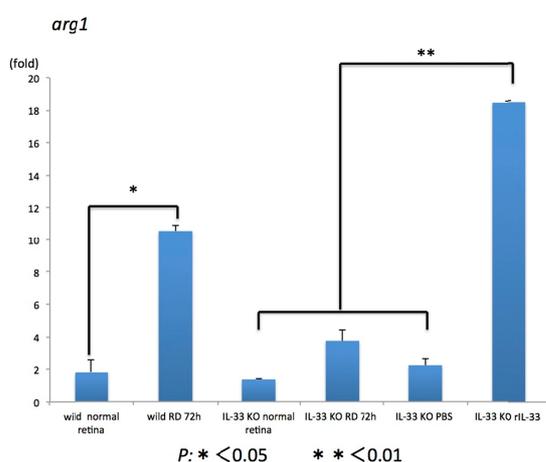
4. **アトピー網膜剥離のマウスモデル作成。**マウス網膜穿孔創を作成するモデル、を作成し、形態学的な解析とともに、剥離網膜における遺伝子発現を定量した。マウス網膜に 30G 針を用いて、網膜剥離モデルを作成し、抗 IL-33 抗体を用いて免疫組織染色を施行した。その結果、健常網膜ではミューラー細胞の細胞核に IL-33 は発現しており、外傷受傷時に IL-33 は細胞核から放出される(アラーミン)ことが判明した(図 2)。また、IL-33 遺伝子の発現量は受傷後 72 時間で約 3 倍に増加した。IL-33 遺伝子の発現増加は網膜組織内に浸潤したマクロファージ等の炎症細胞によるものである可能性が免疫組織染色の結果から示唆された。現在ヒアルロン酸注入によるモデルの解析も進めている。

図 2 マウス網膜剥離モデルにおける IL-33 分子の発現 (抗 IL-33 免疫組織染色)



5. アトピー網膜剥離の発症には前部硝子体の収縮が関連していることが報告されているが、IL-33 が組織の癒痕化を引き起こす M2 型マクロファージへの分化を促進する可能性をマウス網膜外傷モデルで検討した。その結果野生型マウスにおいて網膜受傷後 72 時間で、M2 マクロファージの分化マーカーである *arg1* 遺伝子の発現が約 10 倍増加することを発見した。また IL-33 欠損マウスでは *arg1* 遺伝子発現の増大は約 3 倍で、リコンビナント IL-33 を投与することで *arg1* 遺伝子発現が約 17 倍増加することを発見、報告した(図 3)。この結果は網膜外傷によって放出される IL-33 が M2 マクロファージへの分化誘導を促進する可能性を示唆するものと考えられた。

図 3 マウス網膜外傷モデルにおける *arg1* 遺伝子発現



6. 網膜における IL-33 分子の動態解析。マウス網膜組織を用いた免疫電顕法によって、マウス網膜剥離モデルにおける IL-33 の超微局在の変化を明らかにする。現在抗ウス IL-33 抗体を用いた免疫電顕法を施行中である。結果が得られ次第、学会等で報告を予定している。

7. 硝子体内に dispase を注射することによって PVR モデルを作成して細胞外マトリックスであるペリオチシンの発現をタンパクレベル・遺伝子レベルで検討した。PVR モデルでは有意にペリオチシン遺伝子の発現が亢進していた。

8. AD-RD マウスモデルにアラミンとその下流分子の抑制薬を投与し、効果を検討する IL-33 分子のデコイ受容体である soluble ST2 のマウス腹腔内投与を施行して、組織線維化関連遺伝子の発現を現在定量している。

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3件)

Nakama T, Yoshida S, Ishikawa K, Kobayashi Y, Zhou Y, Nakao S, Sassa Y, Oshima Y, Takao K, Shimahara A, Yoshikawa K, Hamasaki T, Ohgi T, Hayashi H, Matsuda A, Kudo A, Nozaki M, Ogura Y, Kuroda M, Ishibashi T. Inhibition of choroidal fibrovascular membrane formation by new class of RNA interference therapeutic agent targeting periostin. *Gene Ther.* 2015;22:127-137. (査読あり) doi: 10.1038/gt.2014.112.

Ishikawa K, Yoshida S, Nakao S, Nakama T, Kita T, Asato R, Sassa Y, Arita R, Miyazaki M, Enaida H, Oshima Y, Murakami N, Niuro H, Ono J, Matsuda A, Goto Y, Akashi K, Izuhara K, Kudo A, Kono T, Hafezi-Moghadam A, Ishibashi T. Periostin promotes the generation of fibrous membranes in proliferative vitreoretinopathy. *FASEB J.* 2014; 28:132-142. (査読あり) doi: 10.1096/fj.13-229740.

Nakanishi W, Yamaguchi S, Matsuda A, Suzukawa M, Shibui A, Nambu A, Suto H, Saito H, Matsumoto K, Yamasoba T, Nakae S. IL-33, but not IL-25, is crucial for the development of house dust mite antigen-induced allergic rhinitis in mice. *PLoS One* 2014; 9:e86106. (査読あり) doi: 10.1371/journal.pone.0078099.

[学会発表](計2件)

Jobu Sugita, Yosuke Asada, Hiroyuki Kawano, Nobuyuki Ebihara, Akira Murakami, Susumu Nakae, Akira Matsuda. The role of interleukin-33 expression in retinal tissue. Annual meeting of the association for research in vision and ophthalmology (ARVO) Orlando, FL 4th May 2014.

杉田丈夫、浅田洋輔、河野博之、海老原伸行、村上晶、中江進、松田彰。マウス網膜外傷モデルにおける IL-33 の役割。2015 年 4 月 17 日、第 119 回日本眼科学会総会、ロイトン札幌、札幌市

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 博之 (KAWANO, Hiroyuki)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号 70234094

(2) 研究分担者

松田 彰 (MATSUDA, Akira)
順天堂大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：00312348

海老原 伸行 (EBIHARA, Nobuyuki)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：20255699

佐久間 俊郎 (MORI, Kazuhiko)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：50327805

(3) 連携研究者

中江 進 (NAKAE, Susumu)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：60450409

多田昇弘 (TADA, Nobuhiro)
順天堂大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号 50338315