



Title	Microarray Analysis of Cytokine and Chemokine Gene Expression after Prednisolone Treatment in Murine Experimental Autoimmune Uveoretinitis
Author(s)	橋田, 徳康
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46355">https://hdl.handle.net/11094/46355</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	橋田徳康
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第20149号
学位授与年月日	平成18年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Microarray Analysis of Cytokine and Chemokine Gene Expression after Prednisolone Treatment in Murine Experimental Autoimmune Uveoretinitis. (プレドニゾロン治療後の実験的自己免疫性ぶどう膜炎マウスにおける、サイトカイン・ケモカイン遺伝子のマイクロアレイ法による発現解析)
論文審査委員	(主査) 教授 田野保雄  (副査) 教授 不二門尚 教授 片山一朗

#### 論文内容の要旨

##### 〔目的〕

実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (EAU) は、臓器特異的な CD4+ の T 細胞によって引き起こされる疾患で、遺伝学的に疾患感受性のあるマウスの系統に網膜関連抗原 interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) を免疫して作成される、確立されたヒト自己免疫性眼疾患のモデルである。一方、臨床で汎用されるステロイドは重症ぶどう膜炎の標準的治療法であり、薬理学的なステロイドの効果に関して様々なメカニズムが提唱されている。ステロイド投与によりいくつかのサイトカイン・ケモカイン遺伝子の発現変化が起こることが報告してきたが、EAU のモデルにおいてステロイド治療がこのような炎症関連遺伝子にどのような発現制御を及ぼしているのかは不明である。本研究は、EAU マウスを用いて、プレドニゾロンを全身投与した時の、サイトカイン・ケモカインとそれらの受容体遺伝子の発現変化をマイクロアレイ法により包括的に解析することを目的とした。

##### 〔方法ならびに成績〕

C57BL/6 マウスに IRBP ペプチドをアジュバントとともに免疫し EAU を作成した。眼の炎症状態の評価は既報に従い grade 1~4 に分類した。本研究では、grade 2 の EAU マウスを用い、発症ピーク時 (ペプチド接種後 16 日目) に 7.5 mg/kg のプレドニゾロン・ナトリウムを 1 回静脈内投与した。生理食塩水を投与した群をコントロールとした。薬物投与後、1 日目、2 日目、3 日目に眼球全体を取り出し mRNA を抽出し cDNA 合成した。遺伝子発現解析は cDNA マイクロアレイ法を用いて行った。解析した遺伝子の内訳は、マウスのサイトカイン 29 遺伝子、サイトカイン受容体 34 遺伝子、ケモカイン 33 遺伝子、ケモカイン受容体遺伝子 21 遺伝子の合計 117 遺伝子である。cDNA を合成する際に、Cy5-dUTP でコントロール群を、Cy3-dUTP で対象群を標識した。蛍光色素間の標識効率も評価した。ハイブリダイズされたマイクロアレイの蛍光イメージは、Affymetrix 社の 428Array Scanner を用い、蛍光強度生データの解析は、日立ソフトウェア社の DNASIS Array を用いてシグナル強度を計算した。検討項目は、1. EAU 発症マウス群と正常コントロール群との比較、2. プレドニゾロン投与群と、placebo 投与群の各時間 (1 日後、2 日後、

3日後)における遺伝子発現の比較である。マイクロアレイのデータは日立ソフトウェア社の DNASIS Stat を用いて階層的クラスター解析し可視化し、同時に Silhouette Index と Dunn's Index を用いて最適なクラスター数を決定した。マイクロアレイのデータを検証するために、IL-21r・TNF-alpha・CXCL1 遺伝子を EAU の発症に関わる遺伝子の例として、CXCL4・CXCL5・CXCR6・IL-16 の遺伝子をステロイド治療後の効果を解析した実験の代表例として選択した。GAPDH・18s rRNA 遺伝子を PCR 反応のコントロールとして用いた。マイクロアレイの結果と定量的 RT-PCR の結果は *t* 検定し、*P*<0.05 を統計的に優位とした。

### [ 結 果 ]

ハイブリダイゼーションの信頼性・再現性の検討を dye swap 法により行い良好な結果を得た (*R*=0.995)。EAU 発症において発現変化する遺伝子群では、解析した 117 遺伝子中、91 遺伝子で 2 倍以上有意に EAU において発現上昇し、17 遺伝子には有意な変化はみられなかった。9 個の遺伝子については、コントロールにおいて発現を検出できなかつたので、発現についての評価をしていない。しかしながら、この 9 個の遺伝子は確かに EAU 発症において発現上昇していた。発現上昇していた遺伝子の大部分は Th1 タイプのサイトカイン・ケモカインおよび受容体遺伝子であったが、いくつかの Th2 タイプの遺伝子も有意に発現上昇していた。サイトカイン・ケモカイン受容体遺伝子が特に EAU 発症においてより強く発現上昇される（上位 10 遺伝子中 8 遺伝子）ことも明らかにした。プレドニゾロン投与後に発現変化する遺伝子のマイクロアレイの結果では、治療 1 日目後、有意に発現低下した遺伝子が 47 遺伝子、2 日目に 10 遺伝子、3 日目に 46 遺伝子が発現低下していた。1 日目に 10 遺伝子が発現上昇していたが、その後は上昇した遺伝子は無かった。発現低下した上位 10 遺伝子はそれぞれの時点で異なっていた。

遺伝子発現変化のクラスター解析では、Index 値を参考にして 4 クラスターが適切なクラスター数と判定した。クラスター 1 は、投与 1 日目、2 日目もしくは両方で発現変化のない (flat pattern) で 28 遺伝子が含まれる。クラスター 2 は全ての観察ポイントで常に発現が抑制されているが 2 日目の抑制の程度が弱い (mountain pattern) で 67 遺伝子を含んでいる。クラスター 3 には 1 日目で有意に発現上昇 (2.5 倍以上) し、2 日目 3 日目で劇的に発現低下するパターンを示している (Steep downhill pattern)。クラスター 4 には 17 遺伝子が含まれるが、1 日目で 2 倍以下の軽度発現上昇と、2 日目 3 日目での緩徐な発現低下を示す (small downhill pattern) パターンである。選択した遺伝子について定量的 PCR を行った結果、マイクロアレイ解析と定量的 RT-PCR 実験における発現比には相関が認められた。

### [ 総 括 ]

この論文はマウスの EAU モデルにおいてステロイド投与後に炎症に関する遺伝子を包括的に解析した最初の論文である。ステロイドの投与により、EAU 発症のピークで発現上昇する遺伝子の中で、大部分のサイトカイン・ケモカインおよび受容体遺伝子が発現抑制されることを明らかにした。また、ステロイド投与後の遺伝子発現変化がそれぞれの観察時で異なる事、加えてそれぞれの観察時の上位 10 遺伝子が異なっているため、プレドニゾロン投与後の遺伝子発現制御の様子を明らかにするために階層的クラスタリングの方法を用いて解析を行った。クラスター解析は、マイクロアレイ法による膨大で連続的な変化を包括的に解析することができる有用な方法であり、結果として 4 クラスター (flat, mountain, large downhill, and small downhill patterns) に分類されることを明らかにできた。それぞれのクラスターの意味づけは難しいが、この研究成果は眼の炎症治療における新たな治療法の開発につながる可能性を示唆するものである。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、ぶどう膜（虹彩・毛様体・脈絡膜）を炎症の主座とするヒトぶどう膜炎の病態解明をめざして遺伝子発現の観点から行われた研究である。ヒトぶどう膜炎の確立された動物モデルである実験的自己免疫性ぶどう膜炎マウスを用いて、眼における炎症関連遺伝子であるサイトカイン・ケモカインとそれらの受容体遺伝子の遺伝子発現をマ

イクロアレイ法により包括的に解析した。加えて、ぶどう膜炎治療で汎用されるステロイドをこの炎症モデルマウスに投与したときの炎症関連遺伝子の経時的な発現変化も包括的に解析した。発現プロファイルをクラスター解析により分類し、視覚的に捉え易くなり、4つのクラスター（flat, mountain, steep downhill, less steep downhill）にパターン分類することができ、結果として今まで明らかにされていなかった遺伝子の関与を明らかにした点は独創的である。膨大なアレイ発現データの包括的な解析において、クラスター解析を応用し新規の遺伝子相互関係の発見や、新たな標的遺伝子の探索へ繋がる方法論の提示に至った本論文は、博士（医学）の学位授与に値するものと認める。