

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791293
 研究課題名（和文） 神経ペプチド誘導制御性 T 細胞による実験的自己免疫性ぶどう膜炎の抑制機構の解明
 研究課題名（英文） Suppressive effect of neuropeptide induced regulatory T cells on experimental autoimmune uveoretinitis (EAU)
 研究代表者 慶野 博（ KEINO HIROSHI ）
 杏林大学・医学部・講師
 研究者番号：90328211

研究成果の概要：

以前に我々は免疫制御物質として注目されている vasoactive intestinal peptide (VIP) をもちいてヒトぶどう膜炎の実験モデルである実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (experimental autoimmune uveoretinitis:EAU) を抑制できるか否か検討を行った。その結果、マウス腹腔内由来マクロファージを網膜抗原と VIP で刺激培養し、それを養子移入すると EAU が軽症化することを見出した。

これらの結果を踏まえ、VIP 刺激マクロファージを養子移入されたマウスにおいて Foxp3⁺CD25⁺ 制御性 T 細胞が生体内で増加し、炎症の抑制に関与しているか否か検討した。

C57BL/6 マウスを網膜抗原で免疫、同日に VIP (12nM) と網膜抗原 interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP) で刺激培養したマクロファージを養子移入し、EAU の抑制効果の検討、また免疫後 18 日目にマウスを屠殺、所属リンパ節である頸部リンパ節、脾臓を採取し Foxp3⁺CD4⁺ 制御性 T 細胞の発現量について検討した。その結果、VIP 刺激マクロファージ投与群では EAU の抑制効果が認められたものの、対照群 (VIP 未刺激マクロファージ移入群) と比較して、その数に有意差はみられなかった。そこで VIP とともに免疫調節作用を有する神経ペプチドである calcitonin gene-related peptide (CGRP) を用いて同様の実験を行った。その結果、CGRP 刺激マクロファージ投与群では EAU の抑制効果がみられたものの、頸部リンパ節における Foxp3⁺CD4⁺ 制御性 T 細胞の発現量については有意な差は認められなかった。これらの結果から VIP ならびに CGRP 刺激マクロファージによる EAU の抑制機序として、マクロファージ自体による炎症制御の可能性が示唆された。現在、VIP および CGRP 刺激マクロファージからの炎症制御分子 (IL-10 など) の発現について検討中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,200,000	0	2,200,000
平成 20 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	270,000	3,370,000

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：神経ペプチド、自己免疫疾患、免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

以前に我々は眼球の前房内に豊富に存在し免疫制御物質として近年注目されている神経ペプチド vasoactive intestinal peptide (VIP) をもちいてヒト難治性ぶどう膜炎の実験モデルである実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (experimental autoimmune uveoretinitis:EAU) を抑制できるか否か検討を行った。その結果、VIP を連日腹腔内投与することによりマウスに誘導したEAUの重症度が軽減化されることが判明した。一方で最近の海外からの報告によれば、VIP を全身投与することで末梢性免疫寛容の誘導に関与するといわれるCD25⁺制御性T細胞が生体内で増加することが示された。これらの結果からVIPによるEAUの抑制機構の一つとしてCD25⁺制御性T細胞の関与が示唆された。

2. 研究の目的

本研究ではVIPによってEAUが抑制されたマウスにおいてCD25⁺制御性T細胞が生体内で増加し、炎症の抑制に関与しているか否か検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

1) C57BL/6 マウスを網膜抗原である interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP) で免疫、同日からVIP (2nmol) も連日投与し、免疫後18日目にマウスを屠殺、所属リンパ節である頸部リンパ節を採取しFoxp3⁺CD25⁺制御性T細胞の発現量についてフローサイトメーターを用いて検討する。
2) 正常マウスからリンパ節細胞を採取し、抗CD3抗体を用いて刺激培養を行い、同時にVIPも共培養してFoxp3⁺CD4⁺制御性T細胞の発現量について検討する。
3) C57BL/6 マウスを網膜抗原で免疫、同日にVIP (12nM) とIRBPで刺激培養したマクロファージを養子移入し、EAUの抑制効果の検討、また免疫後18日目にマウスを屠殺、所属リンパ節である頸部リンパ節、脾臓を採取しFoxp3⁺CD4⁺制御性T細胞の発現量について検討する。
4) VIPとともに免疫調節作用を有することが知られている神経ペプチドである calcitonin gene-related peptide (CGRP) をマクロファージを刺激後、それらを養子

移入し、EAUの抑制効果の検討し、また免疫後18日目にマウスを屠殺、所属リンパ節である頸部リンパ節、脾臓を採取しFoxp3⁺CD4⁺制御性T細胞の発現量について検討する。

4. 研究成果

1) 所属リンパ節を採取し、Foxp3⁺CD4⁺制御性T細胞の発現量について検討したところ、VIP投与群でも基剤投与群でもその発現数に差はみられなかった。
2) VIPの存在下で抗CD3抗体を用いてナイーブなCD4⁺T細胞の刺激培養を行ったが、Foxp3⁺CD4⁺制御性細胞の発現は基剤群と比較して有意な差は認められなかった。
3) EAUを誘導したマウスにおいてVIP刺激マクロファージ移入群ではEAUに対する有意な抑制効果が確認されたものの、VIP刺激マクロファージ移入群と対照群 (VIP未刺激マクロファージ移入群) との間でFoxp3⁺CD4⁺制御性T細胞の発現量に有意差はみられなかった。
4) CGRP刺激マクロファージ投与群ではEAUの抑制効果がみられたものの、頸部リンパ節におけるFoxp3⁺CD4⁺制御性T細胞の発現量については有意な差は認められなかった。これらの結果からVIPならびにCGRP刺激マクロファージによるEAUの抑制機序として、マクロファージ自体による炎症制御の可能性が示唆される。現在、VIPおよびCGRP刺激マクロファージからの炎症制御分子 (IL-10 など) の発現について検討中である。

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8件)

① Oh-i K, Keino H, Goto H, Yamakawa N, Takeuchi M, Usui M, Iwasaki T.
Up-regulation of neurotrophic factor-related gene expression in retina with experimental autoimmune uveoretinitis by intravitreal injection of tacrolimus (FK506). Br J Ophthalmol. 91:1537-40. 2007 (査読有)

② Ng TF, Lavik E, Keino H, Taylor AW, Langer RS, Young MJ.

Creating an immune-privileged site using retinal progenitor cells and biodegradable polymers. Stem Cells. 25:1552-9, 2007 (査読有)

③Keino H, Okada AA. Clinical features of Silk Road disease (Editorial). Br J Ophthalmol. 91:1573-4. (査読有)

④Usui Y, Okunuki Y, Hattori T, Kezuka T, Keino H, Ebihara N, Sugita S, Usui M, Goto H, Takeuchi M. Functional expression of B7H1 on retinal pigment epithelial cells. Exp Eye Res. 86:52-9. 2008 (査読有)

⑤Fujimori K, Oh-I K, Takeuchi M, Yamakawa N, Hattori T, Kezuka T, Keino H, Suzuki J, Goto H, Sakai JI, Usui M. Circulating neutrophils in Behçet disease is resistant for apoptotic cell death in the remission phase of uveitis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 246:285-90. 2008 (査読有)

⑥Iwasaki T, Matsuno K, Yamamoto M, Kawahata D, Keino H: Penicillium endophthalmitis in necrotizing scleritis treated with topical corticosteroid and cyclosporin A. Jpn J Ophthalmol 52:506-8. 2008 (査読有)

⑦Sugita S, Horie S, Nakamura O, Futagami Y, Takase H, Keino H, Aburatani H, Katunuma N, Ishidoh K, Yamamoto Y, Mochizuki M: Retinal pigment epithelium-derived CTLA-2alpha induces TGFbeta-producing T regulatory cells. J Immunol 181:7525-36, 2008 (査読有)

⑧Keino H, Watanabe T, Sato Y, Niikura M, Wada Y, Okada AA: Therapeutic effect of the potent IL-12/IL-23 inhibitor STA-5326 on experimental autoimmune uveoretinitis. Arthritis Res Ther 10:R122, 2008 (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

①Keino H, Watanabe T, Sato Y, Niikura M, Wada Y, Okada AA: Therapeutic effect of the potent IL-12/IL-23 inhibitor STA-5326 in experimental autoimmune uveoretinitis. ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) April 29-May 3, 2008. Fort

Lauderdale, Florida,

②慶野 博、渡辺交世、瀧 和歌子、岡田アナベルあやめ ベーチェット病難治性網膜ぶどう膜炎に対する infliximab 治療の経過 第 61 回日本臨床眼科学、2007 年 10 月 11 日 京都

③慶野 博 CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞を用いた実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎の抑制機序の解析 第 41 回日本眼炎症学会 2007 年 7 月 6 日 東京

[図書] (計 1 件)

①慶野 博 中山書店 眼科診療のコツと落とし穴 4 巻 薬物療法 2008. 2 ページ

[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 0 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
慶野 博 (KWINO HIROSHI)
杏林大学・医学部・講師
研究者番号 : 90328211

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし