

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32666
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2020～2022
 課題番号：20K09813
 研究課題名(和文) 眼免疫特権に寄与する分子群と制御性T細胞の解析および移植と眼炎症疾患治療への展開

研究課題名(英文) Analysis of Molecular Mechanisms Contributing to Ocular Immune Privilege and Regulatory T Cells for Transplantation and Treatment of Ocular Inflammatory Diseases

研究代表者
 堀 純子 (HORI, JUNKO)
 日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：60251279
 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)：新規免疫チェックポイントであるTIM4とICOS/ICOSLの機能について下記のように明らかにした。

TIM4は、正常角膜内の骨髄由来細胞には発現していないが、角膜移植後の浸潤細胞に発現することがわかった。さらに、TIM4は角膜移植後のエフェクターCD4T細胞の浸潤を抑制し、拒絶反応に抑制的な役割をもつ。ICOSは、抗原非特異的炎症時の角膜血管リンパ管新生において角膜内VEGFA, IL1, IL2, IL6, IL10, IL17A, TNF, IGF1, PDGF発現を抑制し、活性化F4/80+マクロファージ表面のVEGFR1とCCR2の発現を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイントは本来、眼、脳、生殖器官といった高度な生命活動に必須の臓器に多く発現し、その臓器内の炎症を抑制して恒常性を維持する。ゆえに、この3つの臓器は免疫特権臓器と呼ばれる。本研究で示したTIM4, ICOS/ICOSLは、我々の研究により初めて眼内炎症制御機能が明らかになった免疫チェックポイントである。これらの分子は、眼内細胞に発現して眼内炎症を抑制する役割をもつ。中でもICOS/ICOSLは、抗原特異的炎症のみならず、抗原非特異的炎症時の血管リンパ管新生も抑制する。移植医療や自己免疫疾患のほか、創傷や異物などの反応性炎症に対する新しい治療にも応用が期待できる分子である。

研究成果の概要(英文)：The functions of the novel immune checkpoints TIM4 and ICOS/ICOSL were clarified as follows.

TIM4 was found to be expressed on infiltrating cells after corneal transplantation, although not on bone marrow-derived cells within the normal cornea. Furthermore, TIM4 suppressed the infiltration of effector CD4+ T cells after corneal transplantation, suggesting that TIM4 has an inhibitory role in rejection.

ICOS suppresses the expression of VEGFA, IL1, IL2, IL6, IL10, IL17A, TNF, IGF1, and PDGF in the corneal vascular-lymph-angiogenesis during antigen nonspecific inflammation, and inhibits the expression of VEGFR1 and CCR2 on the surface of activated F4/80+ macrophages.

研究分野：眼免疫学

キーワード：免疫チェックポイント 免疫特権 移植拒絶反応 血管リンパ管新生 TIM4 ICOS ICOSL

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

眼は、免疫特権(Immune Privilege)を有する希有な臓器であり、眼内の炎症が自動制御される機構がある。我々はこれまで、眼炎症を自動制御する分子として、角膜や虹彩に恒性発現している免疫チェックポイント分子 (PD-1/PD-L1, GITR/GITRL, Galectin-9/TIM-3, FAS/FASL, ICOS/ICOSL, VISTA)などの機能解析を行ってきた。眼炎症の動物モデルにおいて、これらの分子の機能を調節すると眼炎症が制御されたことから、ぶどう膜炎や眼組織移植後の拒絶反応の臨床応用に有用であることを示してきた。(J Immunol 2006, Invest Ophthalmol Vis Sci 2000, Invest Ophthalmol Vis Sci 2003, Invest Ophthalmol Vis Sci 2010, PLoS ONE 2013, Invest Ophthalmol Vis Sci 2016; Invest Ophthalmol Vis Sci 2019; など)

本研究課題では、これまでの研究をさらに発展させ、新規免疫チェックポイント分子TIM-4の眼内発現と核膜移植モデルを用いた機能解析、およびICOS/ICOSLについて血管リンパ管新生モデルにおける機能解析を行い、眼炎症制御のための新しい治療方法確立に向けた展開をしている。我々が従来から継続している免疫特権機構の解析のうち、特に、上記の免疫チェックポイント分子はさまざまな疾患の新しい治療の標的分子となっており、眼炎症の制御のみでなく、他の全身性疾患への臨床応用においても意義が大きい研究である。

2. 研究の目的

Medawerにより1948年に初めて提唱されたImmune Privilege (免疫特権)の分子機構を解明し、移植医療の臨床に展開していくことが目的である。眼領域の移植医療は多様化しているが、現状における重要課題の1つは、宿主応答による移植組織の脱落や機能不全の克服である。眼内炎症の制御に関与する分子の発現と機能解析を行い、移植眼に人為的な免疫抑制性微小環境を誘導し、移植組織の生着と機能再生を誘導する新しい分子治療を確立することが最終目標である。正常眼は、脳や生殖器官と同様に、臓器内の炎症が自動制御される「免疫特権」を有しており、「免疫チェックポイント」と呼ばれる免疫制御性分子群のネットワークをもつことがわかってきている。疾患眼に「免疫特権」を人為的に再建できれば、移植医療のみならず、強膜炎などの難治性の自己免疫性疾患などの他の炎症疾患への応用も期待できる。

3. 研究の方法

(1) マウス正常眼の角膜におけるTIM4の発現と局在の解析した。

(2) 近交系マウスBALB/Cを宿主、C57BL6をドナーとして角膜アログラフト移植を行い、移植後の宿主に抗TIM4抗体と対照IgGを腹腔内投与し、移植アログラフトの生着を比較した。

(3) TIM4阻害された宿主のアログラフト角膜における各種免疫細胞のphenotypeを解析した。

(4) ICOS ノックアウト(KO)と野生型(W/T)の BALB/c マウス角膜に 11-0 ナイロン糸を縫合し血管リンパ管新生を誘導し、共焦点顕微鏡下で角膜血管リンパ管の増生、Foxp3 陽性 CD4 陽性 T 細胞(制御性 T 細胞)の浸潤を解析した。

(5) ICOS ノックアウト(KO)と野生型(W/T)の BALB/c マウスの角膜に 11-0 ナイロン糸を縫合し、1,3,7,14 日に角膜を輪部含め採取しマルチプレックスサイトカイン測定装置 Lunaris™にて Interleukin(IL1, IL2, IL4, IL5, IL6, IL10, IL12p70, IL13, IL17A, IFN, GM-CSF, TNF, CCL2, IGF1, VEGFA, PDGFBB)のタンパク定量解析を行った。また角膜縫合後 7,14 日の眼球を摘出し、VEGFR1, CCR2, I-Ab, F4/80, CD11b, CD11c を免疫組織化学(共焦点顕微鏡)で解析した。

4. 研究成果

TIM4 の機能：正常角膜に TIM4 陽性の骨髄由来細胞はほとんど存在しないが、角膜移植後 3 週には、生着角膜にも拒絶角膜にも TIM4 陽性浸潤細胞を認め、その数は拒絶眼で有意に多かった。抗 TIM4 抗体を投与された宿主では、コントロール群に比して、有意に角膜移植の生着が低下した。抗 TIM4 抗体投与群の角膜(移植後 3 週)では、コントロール群のそれらに比して、有意に CD4 陽性 T 細胞の浸潤が多く、しかも、Foxp3 陰性 CD4 陽性 T 細胞が有意に多かった。以上の結果から、新規免疫チェックポイント分子である TIM4 は、正常角膜内の骨髄由来細胞には発現していないが、角膜移植後の浸潤細胞に発現することがわかった。さらに、TIM4 は角膜移植後のエフェクター CD4⁺T 細胞の浸潤を抑制し、拒絶反応に抑制的な役割をもつことが示唆された。

ICOS の機能：ICOS KO は W/T に比して、縫合糸に誘導される角膜血管リンパ管新生が有意に増強した。角膜血管リンパ管新生をきたしたマウスの頸部リンパ節と脾臓における Foxp3⁺ CD4⁺T 細胞(制御性 T 細胞)の比率は ICOS KO が W/T に比して有意に低下した。さらに、角膜血管リンパ管新生をきたしたマウス角膜における Foxp3-CD4⁺T 細胞(エフェクター T 細胞)の数は ICOS KO が W/T に比して有意に増加した。

血管リンパ管新生をきたしたマウス角膜において、ICOS KO が W/T に比して縫合後 3 日または 7 日の角膜の網羅的サイトカイン定量解析 VEGFA, IL1, IL2, IL6, IL10, IL17A, TNF, IGF1, PDGF が有意に高かった($p < 0.00556$)。また、角膜の免疫組織化学と共焦点顕微鏡解析にて ICOS KO では W/T に比して縫合後 7 日または 14 日に、CCR2⁺F4/80⁺ 細胞、VEGFR1⁺F4/80⁺細胞、I-Ad⁺及び CD11b⁺細胞が有意に多かった($p < 0.05$)。結論として、縫合糸に誘発される抗原非特異的炎症時の角膜血管リンパ管新生において、ICOS は角膜内 VEGFA, IL1, IL2, IL6, IL10, IL17A, TNF, IGF1, PDGF 発現を抑制し、活性化 F4/80⁺マクロファージ表面の VEGFR1 と CCR2 の発現を抑制することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Takeuchi Masaru, Usui Yoshihiko, Namba Kenichi, Keino Hiroshi, Takeuchi Masaki, Takase Hiroshi, Kamoji Koji, Hase Keitaro, Ito Takako, Nakai Kei, Maruyama Kazuichi, Kobayashi Eri, Mashimo Hisashi, Sato Tomohito, Ohguro Nobuyuki, Hori Junko, Okada Annabelle A., Sonoda Koh- hei, Mizuki Nobuhisa, Goto Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Ten-year follow-up of infliximab treatment for uveitis in Behçet disease patients: A multicenter retrospective study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 1095423-1095423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2023.1095423	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishio Yusuke, Taniguchi Hiroko, Takeda Ayaka, Hori Junko	4. 巻 23
2. 論文標題 Immunopathological Analysis of a Mouse Model of Arthritis-Associated Scleritis and Implications for Molecular Targeted Therapy for Severe Scleritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 341 ~ 341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23010341	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ono Takashi, Goto Hiroshi, Sakai Tsutomu, Nitta Fumihiko, Mizuki Nobuhisa, Takase Hiroshi, Kaneko Yutaka, Hori Junko, et al	4. 巻 66
2. 論文標題 Comparison of combination therapy of prednisolone and cyclosporine with corticosteroid pulse therapy in Vogt-Koyanagi-Harada disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 119 ~ 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-021-00878-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hori Junko, Kunishige Tomoyuki, Nakano Yuji	4. 巻 21
2. 論文標題 Immune Checkpoints Contribute Corneal Immune Privilege: Implications for Dry Eye Associated with Checkpoint Inhibitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3962-3975
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21113962	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Meguro Akira, Ishihara Mami, Petrek Martin, Namba Kenichi, Morimoto Shin-ichiro, Hori Junko, et al	4. 巻 3
2. 論文標題 Genetic control of CCL24, PDR, and IL23R contributes to the pathogenesis of sarcoidosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 465-474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01185-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kimura Ayaka, Takeda Ayaka, Ikebukuro Toyo, Hori Junko	4. 巻 11
2. 論文標題 Serum IgE reduction and paradoxical eosinophilia associated with allergic conjunctivitis after dupilumab therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection	6. 最初と最後の頁 3-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12348-020-00234-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Junko Hori
2. 発表標題 Immune checkpoints and immune privilege in corneal inflammation after transplantation. Corneal Immunology and transplantation.
3. 学会等名 International Society for Eye Research
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 仲野 裕一郎, 山本 恵, 山口 剛史, 國重 智之, 堀 純子
2. 発表標題 抗原非特異的炎症時の角膜血管リンパ管新生におけるICOSの役割とその関連因子
3. 学会等名 第127回日本眼科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀純子
2. 発表標題 眼内免疫チェックポイントと免疫特権 シンポジウム01 角膜における炎症制御機構：透明性と恒常性の謎を解く
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀純子
2. 発表標題 重症強膜炎の治療 サブスペシャリティサンデー05 眼炎症治療のNEWスタンダード
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲野裕一郎, 武田彩佳, 國重智之, 山本恵, 寺田節, 丸山和一, 山口剛史, 堀純子
2. 発表標題 抗原非特異的な炎症時の角膜血管リンパ管新生における角膜内サイトカインの変化
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀純子
2. 発表標題 眼の免疫学的特殊性～眼内免疫チェックポイントを中心に～
3. 学会等名 第4回 広島県アレルギー疾患対策研修会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀純子
2. 発表標題 眼の免疫特権 ～免疫チェックポイントを中心に～
3. 学会等名 東京歯科大学市川総合病院ドーナツセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Junko Hori
2. 発表標題 Corneal angiogenic privilege and immune checkpoints. Immune Keratitis: Pathogenesis and Regulation of Corneal Inflammation: from bench to bedside
3. 学会等名 International Ocular Inflammation Society Meeting 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Junko Hori
2. 発表標題 Immune Check Point, Immune Privilege, and Immunogenicity of Each Layer in the Cornea.
3. 学会等名 ARVO Annual Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Junko Hori
2. 発表標題 Academic IM Career Networking Session
3. 学会等名 ARVO Annual Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田彩佳、国重智之、山本恵、寺田節、丸山和一、堀純子
2. 発表標題 ICOSシグナルによる角膜血管リンパ管抑制の機序
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 山岡正卓、堀純子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 376
3. 書名 前眼部疾患 強膜疾患 2 炎症性強膜炎 眼科疾患最新の治療2022-2024.	

1. 著者名 堀純子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 総合医学社	5. 総ページ数 436
3. 書名 6. 膠原病および類縁疾患 関節リウマチ. 眼疾患アトラスシリーズ「眼と全身病アトラス」	

1. 著者名 武田彩佳、堀純子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 892
3. 書名 .構造とその病態 E.強膜. 眼科学 第3版.	

1. 著者名 堀純子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 1568
3. 書名 強膜炎・上強膜炎. 私の治療 第3版.	

1. 著者名 武田彩佳、堀純子.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 総合医学社	5. 総ページ数 477
3. 書名 2.強膜、上強膜炎・強膜炎. 眼疾患アトラスシリーズ「前眼部アトラス」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>日本医科大学多摩永山病院 眼科 研究実績 https://www.nms.ac.jp/tama-h/section/ophthalmology/_12252.html ReserchMap 堀純子 https://researchmap.jp/read0143707/ HORI Junko researchmap https://researchmap.jp/read0143707/</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	武田 彩佳 (TAKEDA AYAKA) (20804610)	日本医科大学・医学部・助教 (32666)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	仲野 裕一郎 (NAKANO YUICHIRO) (70867978)	日本医科大学・医学部・助教 (32666)	
研究分担者	國重 智之 (KUNISHIGE TOMOYUKI) (60516045)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関