

令和 5 年 4 月 7 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18362

研究課題名(和文)VISTA分子の角膜移植・免疫特権への寄与

研究課題名(英文)Contribution of VISTA molecules to corneal transplantation and immune privilege

研究代表者

國重 智之(Kunishige, Tomoyuki)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60516045

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文): マウス角膜においてVISTA mRNAの発現を認めた。また、マウス角膜移植において、VISTAは、移植成立の必須の分子の一つである可能性が示唆された。また、Anterior chamber-associated immune deviation(ACAID)の誘導においても、VISTAは、必須の分子の一つである可能性が示唆され、この機序において、CD8陽性制御性T細胞(CD8陽性CD103陽性T細胞)の関与の可能性が示唆された。すなわち、角膜に発現するVISTAが、CD8陽性制御性T細胞を介して、ACAID誘導に関与し、角膜移植免疫における免疫特権を維持する必須の分子である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究において、新規分子VISTAの免疫特権への寄与を解明したことは、今後の移植免疫の新たな研究における意義は大きい。近年、注目されている免疫チェックポイント阻害についての研究において、VISTAシグナルも、その阻害と抗腫瘍免疫応答の増強についての研究も国内外でさかんに研究されている。そのVISTAについて、角膜移植免疫におけるメカニズムを解明したことは、VISTAの新たな役割について解明することにつながると思われる。また、VISTAを強制的に発現させることは免疫特権的な状態を付与して移植片拒絶反応を抑制するための新たな戦略となる可能性がある。

研究成果の概要(英文): Expression of VISTA mRNA was observed in mouse corneas. It was suggested that VISTA may be one of the essential molecules for the establishment of corneal transplants. It was suggested that VISTA may be one of the essential molecules in the induction of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID). The possible involvement of CD8-positive regulatory T cells (CD8-positive CD103-positive T cells) in this mechanism was suggested. This means that VISTA expressed in the cornea may be involved in ACAID induction via CD8-positive regulatory T cells and may be an essential molecule that maintains immune privilege in corneal transplant immunity.

研究分野：眼移植免疫

キーワード：角膜移植 ACAID

1. 研究開始当初の背景

眼には、炎症が自動制御される「免疫特権 (immune privilege)」のシステムが備わっており、(Streilein JW. *Nat Rev Immunol* 2003;3:879-889) 実際の臨床において、角膜移植は、他の臓器移植と比べて生着率が高いことが知られている。しかし、細菌感染後など、血管新生のある角膜に移植を行った場合、拒絶反応が発症する割合が高くなる。拒絶反応を防ぐために、ステロイドや免疫抑制剤を投与しても効果不十分にて拒絶反応が起こる場合があり、また、副作用が懸念される。従って、拒絶反応の抑制に関する移植免疫のメカニズムの解明、拒絶反応の抑制をもたらし新規分子の治療法の確立が必要とされている。

マウスのアログラフト角膜移植モデルでは、無治療でもほぼ半数のグラフトが生着にいたる (Hori J, Streilein JW. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:720-726)。その理由は、やはり免疫特権による寄与が大きいと考えられている。そのため、臓器移植モデルの中で、角膜移植モデルは生着率が高く、免疫特権の分子機構の解析に適している。免疫特権を確立するメカニズムについて下記に述べる。一つ目が、前房内に侵入した異物 (抗原) に対して、抗原特異的な全身性の免疫寛容が誘導される現象の前房関連免疫偏位 (Anterior chamber-associated immune deviation ACAID) (Hori J, *Ocul Immunol Inflamm* 18 : 325-333, 2010) である。ACAID 誘導により、生体は前房内の抗原に特異的な免疫寛容を獲得する。ACAID は、移植抗原、可溶性蛋白抗原、ウイルス抗原、腫瘍抗原、などの各種抗原に対して誘導される。また、もう一つの重要な免疫抑制機序は、免疫抑制性眼内微小環境 (immune suppressive ocular microenvironment) (Hori J, *Ocul Immunol Inflamm* 18 : 325-333, 2010) である。角膜から前房にかけて多くの免疫制御因子が恒性発現しており、眼内に浸潤した免疫細胞の機能を抑制して眼内の恒常性を維持している。このような眼内環境を、免疫抑制性眼内微小環境といい、自然免疫応答と獲得免疫応答の両方を抑制している。角膜移植後の免疫応答においては、眼内の多種の分子が眼局所で各々の免疫抑制の役割を担い、角膜移植の生着に貢献している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規分子 (V-domain Ig suppressor of T cell activation : VISTA) の眼局所における発現と、角膜移植・免疫特権への寄与について、解析を行うことである。VISTA は、新しい Ig スーパーファミリーの一つとして発見され、免疫応答への関与が示唆されている新しい免疫補助刺激分子である (Wang L, et al. VISTA, *J Exp Med* 2011;208:577-592)。VISTA の発現は眼局所の発現は明らかになっておらず、眼の免疫特権に関する報告はない。そこで、今回、VISTA の眼局所での発現・角膜移植における免疫特権の役割を解析することを目的とした研究を行った。

3. 研究の方法

マウス正常角膜、角膜移植片における VISTA 分子、VISTA mRNA の発現を、RT-PCR と免疫組織化学により解析した。マウスの正常角膜は、BALB/c ならびに C57BL/6 マウスの眼を用いた。

マウス角膜移植モデルは、C57BL/6 ドナーと BALB/c レシピエントの組み合わせにて、11-0 ナイロン糸にて 8 針縫合し、角膜移植手術を行った。抗 VISTA 抗体をマウス角膜移植モデルの宿主に投与し、8 週間角膜混濁の程度、新生血管の程度を観察し、抗 VISTA 抗体投与に伴う角膜移植の生着への寄与を解析した。また、角膜移植後 3~5 週のアログラフトを免疫染色し、アログラフトに浸潤した CD4・CD8 陽性 T 細胞数を定量解析し比較した。また、シンジェニック角膜移植モデルを用いて、VISTA の関与を検討した。BALB/c マウスの角膜に、別個体の BALB/c マウスの正常角膜を移植した。

VISTA 分子が、ACAID の誘導に関与しているかどうか、抗 VISTA 抗体をマウスの ACAID 誘導モデルに腹腔内投与して、能動的に遅延型過敏反応が抑制される免疫偏位が起きるかどうか解析した。ACAID 誘導モデルの作成方法を以下に述べる。Allogeneic な C57BL/6 の脾細胞を BALB/c 前房に注入した。前房投与 2 週間後、C57BL/6 の脾細胞を BALB/c の皮下に注射し、免疫を行った。皮下注射 1 週間後、C57BL/6 の脾細胞を BALB/c の耳介に皮内注射し、遅延型過敏反応がおこる 24 ならびに 48 時間後に、耳介の腫脹を計測した。ACAID が誘導された場合には、遅延型過敏反応が抑制され、耳介の腫脹が軽減される。また、ACAID 後のリンパ節、脾臓など 2 次リンパ器官における VISTA 分子、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、CD4 陽性制御性 T 細胞、CD8 陽性 CD103 陽性制御性 T 細胞、抗原提示細胞の経時的な発現の変化をフローサイトメトリーにて解析した。

また、In vitro において、抗 VISTA 抗体を前処置したマウスの角膜内皮細胞と T 細胞の共培養を行い、角膜内皮死細胞をカウントし、コントロールと比較した。角膜内皮において、VISTA が、角膜内皮細胞を障害するエフェクター T 細胞に対して、直接、抑制に働いているかどうか、検討した。角膜は正常の C57BL/6 角膜を用いた。T 細胞は、BALB/c マウスの脾臓から分離精製した allo 反応性 T 細胞、thirdparty 反応性 T 細胞、naïve T 細胞を用いた。対照として同系 C57BL/6 の脾臓 T 細胞を用いた。

4. 研究成果

VISTA mRNA の発現を RTPCR にて確認したところ、マウス角膜において VISTA mRNA の発現を認め

た(図 1)。免疫染色においては、naïve BALB/c マウス角膜実質に、CD11b 陽性細胞との共発現を認めた。

アロ角膜移植モデルを用いて、VISTA の免疫特権への関与を検討した。対照 Rat IgG 投与群は、半数が生着にいたった(図 2)。抗 VISTA 抗体投与群は全てのアログラフトが拒絶され、Rat IgG 投与群と比較して、有意に生着が短縮した($p < 0.05$)(図 2)。VISTA が、マウス角膜移植の生着維持に必須の分子である可能性が示唆された。また、角膜移植後 3~5 週のアログラフトを免疫染色し、アログラフトに浸潤した CD4・CD8 陽性 T 細胞数を定量解析し比較すると、抗 VISTA 抗体投与群は対照群よりも、アログラフト接合部と角膜中央部における浸潤 CD4・8 陽性 T 細胞が有意に多かった($p < 0.05$)。シンジェニック角膜移植モデルを用いて、VISTA の関与を検討した。両群ともに、全例が生着にいたった(図 2)。VISTA は、シンジェニックモデルでは、角膜移植の生着に寄与しないことが示唆された。

次に、マウス ACAID モデルを用いて、VISTA の免疫特権における働きを検討した。前房注入のないポジティブコントロールと比較すると抗 VISTA 抗体投与群の耳介の腫脹は有意に弱かった(図 3)。しかし、ACAID を誘導したコントロール群と比較すると、抗 VISTA 抗体投与群のマウスの耳介の腫脹が有意に強く($p < 0.05$ 、図 3)、抗 VISTA 抗体の投与により ACAID の誘導は弱くなった可能性が示唆された。以上から、VISTA は ACAID 誘導に一部関与し、角膜移植の生着に寄与している可能性が示唆された。

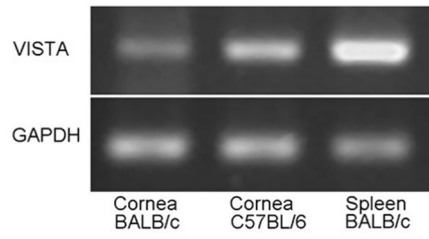
また、ACAID 導入後の抗 VISTA 抗体投与群の脾細胞をフローサイトメトリーにて解析し、コントロール群と比較した。その結果、抗 VISTA 抗体投与群では、コントロール群と比較して、CD8 陽性 CD103 陽性細胞の割合が有意に少なかった($p < 0.05$)。CD4 陽性 T 細胞においては、両群に有意な差を認めなかった。また、無治療の生着アログラフトに免疫染色を行ったところ、CD8 陽性 CD103 陽性 T 細胞の発現を認めた。

CD8 陽性制御性 T 細胞のひとつに、CD8 陽性 CD103 陽性 T 細胞があり(Koch SD et al : Hum Immunol 69 : 737-744, 2008)、CD103 は CD8 制御性 T 細胞の ACAID 誘導において必要な分子という報告がある(Keino H et al : Invest Ophthalmol Vis Sci 47 : 1533-1542, 2006)。ACAID が誘導されると、CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞は、脾臓で ACAID 誘導調節性 T 細胞(ACAID-Tregs) に分化する。CD4 陽性 ACAID-Tregs は、リンパ節などの二次リンパ組織における Th1 T 細胞の分化を阻害し、CD8 陽性 ACAID-Tregs は局所におけるエフェクター T 細胞の機能を阻害する(Skelsey ME, Mayhew E, Niederkorn JY Immunology 110 : 18-29, 2003)。以上から、VISTA が制御性 CD8 陽性 T 細胞を介した ACAID 誘導に関与し、角膜移植の生着に関与している可能性が示唆された。

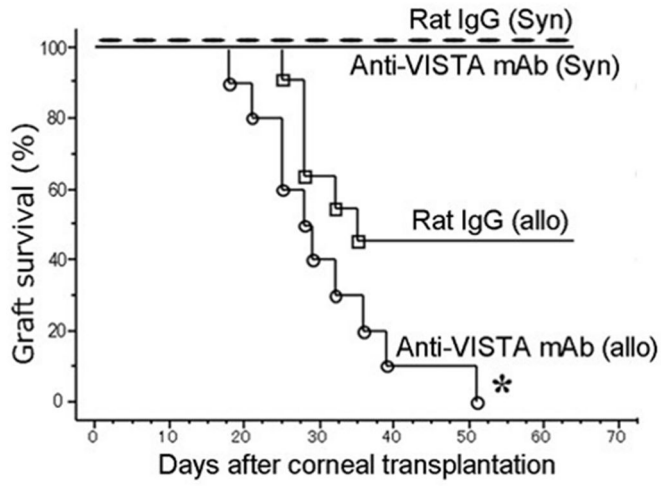
続いて、角膜内皮細胞と CD4 陽性 T 細胞の共培養を *in vitro* にて行い、角膜局所の VISTA の発現が角膜内皮保護にどのように寄与しているか検討した。この実験系は、抗体投与や、ノックアウトマウスを用いて、共培養後の角膜内皮死細胞を定量解析することにより、目的の分子がマウスの角膜局所において、アロ反応性 T 細胞による角膜内皮障害がどのように関与するかを検討することができる実験系である。C57BL/6 マウスや C3H/He マウスの脾細胞で免疫された BALB/c マウスの脾臓 CD4 陽性 T 細胞と前 C57BL/6 マウス角膜を 6 時間共培養し、角膜内皮死細胞を定量解析した。角膜内皮死細胞数は、2 群間にいずれの群も有意な差を認めなかった。この結果から、角膜局所の VISTA の発現は、アロ反応性 T 細胞による角膜内皮障害に関与しない可能性が示唆された。

以上の結果から、マウス角膜移植の免疫応答において VISTA は、移植成立の必須の分子の一つであることが明らかになった。その機序として、角膜に発現する VISTA が、CD8 陽性制御性 T 細胞を介して、ACAID 誘導に関与し、免疫特権を維持する可能性が示唆された。

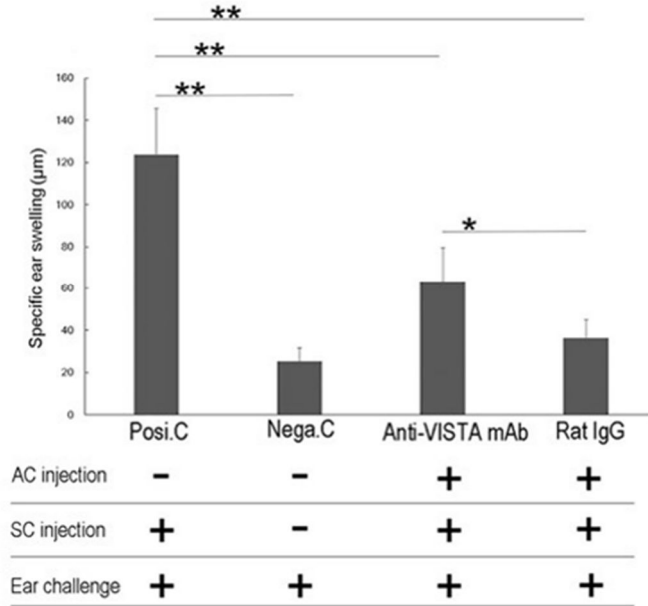
☒ 1



☒ 2



☒ 3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

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 ~ 3962
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomoyuki Kunishige, Tatsukuni Ohno, Miyuki Azuma, Junko Hori
2. 発表標題 VISTA is crucial for corneal allograft survival and immune privilege
3. 学会等名 The 7th Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國重智之
2. 発表標題 眼の免疫特権における新規の免疫チェックポイント分子の役割
3. 学会等名 第54回日本眼炎症学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------