

機関番号：32645

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791715

研究課題名 (和文) 難治性ぶどう膜網膜炎における免疫補助シグナル分子の制御機構解明と新規治療法の開発

研究課題名 (英文) Role of Immune co-signals in the pathogenesis and development of new treatment of refractory uveoretinitis

研究代表者

臼井 嘉彦 (USUI YOSHIHIKO)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：50408142

研究成果の概要 (和文) : ベーチェット病に代表される難治性内因性ぶどう膜炎は、現在でも失明原因として大きな位置を占めており、発症には CD4 陽性 T 細胞 (Th) による抗原特異的反応が加わりその病態を形成している。CD4 陽性 T 細胞の活性化には抗原提示細胞からの抗原提示刺激に加えて補助シグナル分子による補助シグナルが必要である。抗原提示細胞上に発現する B7RP-1 (B7 related protein-1) 分子のリガンドと CD28 ファミリーに属する補助シグナル分子である ICOS (Inducible co stimulator) が T 細胞の活性化に重要である。眼ベーチェット病患者末梢血単核球における補助シグナル分子の mRNA の発現をマイクロアレイにより網羅的に解析した結果、補助シグナル分子の中でも ICOS の最も発現が高かった。また、活動期眼ベーチェット病患者末梢血 CD4+T 細胞上に ICOS が非活動期眼ベーチェット病患者や健常人と比較して有意に高発現していた。また、眼ベーチェット病患者末梢血単核球を Con A あるいはぶどう膜抗原である Interphotoreceptor binding protein (IRBP) を用いて *in vitro* で刺激し培養液中に anti ICOS mAb (10 μ g/ml) 添加したところ、Th1 サイトカインである IFN- γ や Th17 サイトカインである IL-17 の産生が低下した。よって CD4 T 細胞上の ICOS はベーチェット病によるぶどう膜炎の活動性の指標になりえ、ICOS を阻害することにより Th1 および Th17 サイトカインの産生を低下することができるため、ICOS を標的として将来的に眼ベーチェット病の治療としては有用ではないかと考えている。

研究成果の概要 (英文) : Endogenous uveitis such as Behçet's disease (BD) is a potentially blinding disease in humans and is responsible for 10-15% of the acquired blindness in Japan. Although endogenous uveitis covers a spectrum of clinical entities, all forms are believed to share immunohistological similarities characterized by the infiltration of mainly CD4 T cells. It is well known that CD4 T cell activation requires the integration of at least two distinct signals. Signal one results from antigen-specific T cell receptor engagement by MHC class 2-bound peptide presented by antigen presenting cells (APC). Signal two results from engagement of costimulatory molecules expressed by APC and T cell. The CD28 homolog inducible costimulator (ICOS) has recently been identified as a novel member of the CD28 costimulator family, and is expressed by activated T cells in both humans and mice. The ICOS ligand, B7-related protein (B7RP-1), also known as B7 homologous protein (B7h), is constitutively expressed by APC. As the result of microarray analysis, ICOS in PBMCs showed the greatest difference in expression in BD patients with uveitis compared to healthy controls. ICOS expression on CD4 T cells in BD patients with uveitis was significantly higher than that in healthy individuals both before and after Con A stimulation. Among BD patients, ICOS expression on CD4 T cells was significantly higher in those with active uveitis than in those with remitted uveitis. Blockade of ICOS/B7-related protein-1 interaction by anti-ICOS mAb significantly decreased IFN- γ and IL-17 production by PBMCs when stimulated with Con A or IRBP in BD with active uveitis. In conclusion, our data provide additional evidence for the potential utility of ICOS expression on CD4 T cells as a marker to determine disease activity and that ICOS represents a promising therapeutic target for ocular BD by inhibiting Th1 and Th17 cytokines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：ぶどう膜網膜炎、補助シグナル分子、CD4 T細胞、Th1反応、Th17反応、眼ベーチェット、ICOS、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

難治性内因性ぶどう膜炎は、現在でも失明原因として大きな位置を占めており、T細胞が病態の中心を担っている。ぶどう膜炎の動物モデルとして、実験的自己免疫性ぶどう膜炎（EAU）があり、CD4⁺T細胞が重要な役割を果たす疾患モデルである。CD4⁺T細胞は抗原特異的な活性化と分裂増殖、エフェクター細胞へと分化の過程を経て、EAUの免疫反応において中心的な役割を担っている。T細胞の活性化には抗原提示細胞からの抗原提示刺激に加えて補助シグナル分子による補助シグナルが必要である。しかしながら、多種多様の補助シグナル分子により、EAUやヒトぶどう膜炎において関与が不明な補助シグナル分子も存在し、どの補助シグナル分子が治療に一番有用か否かは不明である。

2. 研究の目的

これまでぶどう膜炎に関与が明らかにされていない補助シグナル分子の関与を明らかにし、病態の役割や治療効果を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

- 1) ぶどう膜炎患者の末梢血単核球より cDNA を作成し、マイクロアレイにより補助シグナル分子の発現を網羅的に解析する。
- 2) 発現の高かった補助シグナル分子の発現解析を行う。
- 3) さらに in vitro における補助シグナル分子の機能解析を行う。

4. 研究成果

- (1) 眼ベーチェット病の末梢血単核球におけるマイクロアレイの結果、補助シグナル分子の中でも ICOS が最も発現していた。
- (2) 眼ベーチェット病の末梢血 CD4 T 細胞上における ICOS の発現は健常人よりも有意に高かった。

(3) 活動期眼ベーチェット病患者の末梢血 CD4 T 細胞上における ICOS の発現は、非活動期眼ベーチェット病患者よりも有意に高かった。

(4) 活動期眼ベーチェット病患者における単核球を Con A あるいは IRBP で刺激し、抗 ICOS 抗体を添加したところ、Th1 および Th17 サイトカインが有意に抑制された。

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 21 件)

- 1) Usui Y, et al. Expression and function of inducible costimulator on peripheral blood CD4⁺ T cells in Behçet's patients with uveitis: a new activity marker? Invest Ophthalmol Vis Sci 51: 5099-5104, 2010.
- 2) Kezuka T, Usui Y, Goto H. Analysis of the pathogenesis of experimental autoimmune optic neuritis. J Biomed Biotechnol (in press).
- 3) Okunuki Y, Usui Y, et al. Four Cases of Delayed Onset Bilateral Acute Retinal Necrosis (ARN) in which Causative Virus in Both Eyes were Identified: an analysis of 108 cases of ARN. Br J Ophthalmol. (in press).
- 4) Miyake T, Usui Y, Goto H. Arch of corneal opacity. Arch Ophthalmol (in press).
- 5) Okunuki Y, Usui Y, et al. Relation of intraocular concentrations of inflammatory factors and improvement of macular edema after vitrectomy in branch retinal vein occlusion. Am J Ophthalmol (in press).
- 6) Keino H, Usui Y, et al. Correlation between cerebrospinal fluid cell count and cerebrospinal fluid level of chemokine,

- monokine induced by interferon-gamma in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Acta Ophthalmol* 88: e30-31, 2010.
- 7) Takeuchi M, Iwasaki T, Kezuka T, Usui Y, et al. Functional and morphological changes in the eyes of Behçet's patients with uveitis. *Acta Ophthalmol* 88: 257-262, 2010.
 - 8) Sugita S, Horie S, Yamada Y, Keino H, Usui Y, et al. Suppression of bystander T helper 1 cells by iris pigment epithelium-inducing regulatory T cells via negative costimulatory signals. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 2529-2536, 2010.
 - 9) Usui Y, Wakabayashi Y, et al. Correlation of vascular endothelial growth factor with chemokines in the vitreous in diabetic retinopathy. *Retina* 30: 339-344, 2010.
 - 10) Takeuchi M, Usui Y, et al. Immune responses to interphotoreceptor retinoid-binding protein and S-antigen in Behçet's patients with uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 3067-3075, 2010.
 - 11) Usui Y, et al. Clinical statistic of endogenous uveitis: comparison between general clinic and university hospital. *Int Ophthalmol* 30: 297-301, 2010.
 - 12) Zhang L, Ma J, Takeuchi M, Usui Y, et al. Activation of aryl hydrocarbon receptor suppress experimental autoimmune uveoretinitis by inducing differentiation of regulatory T cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 2109-2117, 2010.
 - 13) Usui Y, Wakabayashi Y, et al. Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine in the vitreous of patients with diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 89: e59-61, 2010.
 - 14) Usui Y, et al. Human uveal melanoma cells inhibit the immunostimulatory function of dendritic cells. *Exp Eye Res* 91: 491-499, 2010.
 - 15) Usui Y, et al : Regulatory dendritic cell suppress experimental autoimmune uveoretinitis in mice. *Arch Ophthalmol* 127:514-519, 2009.
 - 16) Usui Y, Okunuki Y, Nagai N, Kezuka T, Ishida S, Takeuchi M, et al : Angiotensin II type 1 receptor blocker telmisartan suppress experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:2255-2261, 2009.
 - 17) Sugita S, Usui Y, Horie S, Futagami Y, Aburatani H, Okazaki T, et al : T cell suppression by programmed cell death 1 ligand 1 on retinal pigment epithelium during inflammatory conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:2862-2870, 2009.
 - 18) Takeuchi A, Takeuchi M, Oikawa K, Sonoda KH, Usui Y, Yoshida K, et al : Dioxin promotes vascular endothelial growth factor (VEGF) production in the retina and enhances choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:3410-3416, 2009.
 - 19) Usui Y, Goto H, Sakai J, Takeuchi M, Usui M, Rao NA : Presumed Vogt-Koyanagi-Harada Disease with unilateral ocular involvement: report of three cases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 247:1127-1132, 2009.
 - 20) Sugita S, Usui Y, Horie S, Futagami Y, Yamada Y, Ma J, et al : Human corneal endothelial cells expressing programmed death-ligand 1 (PD-L1) suppress PD-1+ T helper 1 cells by a contact-dependent mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:263-272, 2009.
 - 21) Hattori T, Kezuka T, Usui Y, Okunuki Y, Takeuchi M, Maruyama K, et al. Human iris pigment epithelial cells suppress T-cell activation via direct cell contact. *Exp Eye Res* 89: 358-364, 2009.
- [学会発表] (計 4 件)
- 1) 第 114 回 日本眼科学会 総会 2010.4.15-18 名古屋国際会議場 Vogt-小柳-原田病患者の末梢血単核球 IL-17 産生とステロイド治療に対する反応の検討 奥貫陽子、白井嘉彦他
 - 2) Annual meeting of the ARVO(Association for Research in Vision and Ophthalmology) (2010.5.2-6) Fort Lauderdale. Usui Y, Takeuchi M, Okunuki Y, Takeuchi A, Kezuka T, Hattori T, Matsuda R, Akiba H, Goto H. Expression and Function of Inducible Costimulator in Patients with Ocular Behçet's Disease: Possible Involvement in IFN and IL-17 Production.
 - 3) Annual meeting of the ARVO(Association for Research in Vision and Ophthalmology) (2010.5.2-6) Fort Lauderdale. Takeuchi M, Usui Y, et al. Immune responses to Interphotoreceptor Retinoid-binding protein and S-Antigen in Behçet's patients with uveitis.
 - 4) Annual meeting of the ARVO(Association

for Research in Vision and Ophthalmology)
(2010.5.2-6) Fort Lauderdale. Okunuki Y,
Usui Y, et al. Cytokine analysis to
estimate the disease activity in
Vogt-Koyanagi-Harada disease
patients.

〔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 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

臼井 嘉彦 (USUI YOSHIHIKO)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：50408142

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

