

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592619

研究課題名(和文) 眼内微小環境の恒常性維持の分子機構の解析と眼組織移植への応用

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of immunosuppressive intraocular microenvironment in corneal transplantation

研究代表者

堀 純子(Hori, Junko)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60251279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：眼内免疫抑制性微小環境の維持に、以下の2つのシグナル経路が必要であることを示した。
(1) Galectin-9 (Gal-9)とそのレセプターであるT-cell immunoglobulin and mucin domain (Tim)-3のシグナル経路において、角膜に発現するGal-9は角膜移植後も発現が維持され、Tim-3を介して角膜へのT細胞浸潤を抑制している。
(2) 眼組織に発現するB7RP-1は浸潤細胞のICOSを介して制御性T細胞を誘導する。

研究成果の概要(英文)：(1) Tim-3 is a regulatory molecule for T-cell function, and Gal-9 is a Tim-3 ligand. Gal-9 is constitutively expressed on the corneal epithelium, endothelium and iris-ciliary body in normal mouse eyes and eyes bearing surviving allografts, and Tim-3 was expressed on CD8 T cells infiltrating the allografts. Allograft survival in recipients treated with anti-Tim-3 mAb or anti-Gal-9 mAb was significantly shorter than that in control recipients. In vitro, destruction of corneal endothelial cells by allo-reactive T cells was enhanced when the cornea was pretreated with anti-Gal-9 mAb. Gal-9 may play an immunosuppressive role in corneal allografts. Gal-9 expressed on corneal endothelial cells protects them from destruction by allo-reactive T cells within the cornea.
(2) ICOS/B7RP-1 signaling has an immune suppressive effect in corneal allografts. B7RP-1 expressed on ocular tissue and ICOS expressed on T-cells may interact in the eye and play a role in the survival of the corneal allograft.

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：免疫特権 副刺激シグナル 移植免疫応答 Galectin-9/Tim-3 ICOS/B7RP-1(ICOSL)

1. 研究開始当初の背景

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。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、多彩な免疫制御性分子のネットワークをもつことが示唆されている。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、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。

2. 研究の目的

本研究の目的は、眼内微小環境の制御に関与する分子の発現と機能解析を行うことである。分子機能の調節を試み、移植眼に人為的な免疫抑制性微小環境を誘導し、移植組織の生着を誘導する新しい分子治療の確立を目指している。

3. 研究の方法

眼組織移植のマウスモデルを用い、In vivoでの眼局所における免疫関連分子 (Galectin-9/Tim-3 シグナル経路、ICOS/B7RP-1 シグナル経路) の発現変化と、宿主の二次リンパ器官における免疫応答を解析する。

上記分子の機能は、阻害抗体やノックアウトマウスを用い、移植後の移植片生着、血管新生誘導、アロ抗原特異的遅延型過敏反応といった宿主応答を解析する。

さらに、In vitro で、様々なポテンシャルのT細胞と眼組織を反応させる系 (シャーレ内の拒絶反応モデル) を用い、眼組織に発現する上記の分子群の発現調節により、T細胞の機能が変化するかどうかを解析する。この系により拒絶反応の効果相における分子の機能解析が可能である。

4. 研究成果

(1) 眼内免疫抑制性微小環境の維持に関与する Galectin-9 (Gal-9) とそのレセプターである T-cell immunoglobulin and mucin domain (Tim)-3 のシグナル経路における眼内での局在と機能、および分子機能の調節による移植後の眼炎症の制御解析を行い、下記の結果を得た。

- ・Gal-9 は正常角膜上皮と内皮、虹彩毛様体に恒性発現し、移植後に生着しているアログラフト内皮でも維持されていた。
- ・角膜アログラフト生着は Tim-3/Gal-9 阻害により有意に短縮した。
- ・In vitro では、眼局所における Gal-9 と T細胞

の相互作用において、アロ反応性 T細胞による角膜内皮障害は、Gal-9 を発現する角膜に比して、阻害された角膜の方で有意に強かった。

- ・ACAID(前房関連免疫偏位)は Tim-3/Gal-9 阻害の影響を受けなかった。

(結論)

角膜に発現する Gal-9 は角膜移植後も発現が維持され、角膜局所での免疫応答に重要な役割をもつと考えられた。Tim-3 や Gal-9 は角膜への T細胞浸潤を抑制していることが示唆された。

(2) Inducible costimulatory molecule (ICOS) とそのリガンドである B7RP-1 のシグナル経路と眼炎症制御の関連について、下記の結果を得た。

- ・正常角膜、虹彩毛様体、網膜のいずれも B7RP-1 は発現していた。

- ・B7RP-1 阻害が角膜移植の拒絶を増強させた。

・ICOS KO 宿主の異系グラフトは全例拒絶され、W/T 宿主よりも有意に生着が短縮した。ICOS KO 宿主と、B7RP-1 阻害抗体を投与された W/T 宿主の異系グラフトの生着に、有意差は無かった。

・ICOS KO マウスに ACAID は誘導されたが、W/T マウスに比較して抑制効果は減弱した。
(結論) 眼組織に発現する B7RP-1 は浸潤細胞の ICOS を介して免疫抑制的役割をもち、異系グラフト生着に必須である、一方、ACAID 誘導には必須ではないが貢献する分子であると考えられた。

(3) 眼領域では報告の無い、Galectin-9/Tim-3 シグナル経路、および ICOS/B7RP-1 シグナル経路の免疫制御的役割を明らかにしたのは、我々が国際的にも先駆的なものとなる。

将来、上記分子の機能調節により、眼領域の移植、炎症性眼疾患のみでなく、他臓器の移植後拒絶反応や、自己免疫疾患などの新規治療にも応用が期待できると考える。

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 5 件)

1. Shimmura-Tomita M, Wang M, Taniguchi H, Akiba H, Yagita H, Hori J. Galectin-9-mediated protection from allo-specific T cells as a mechanism of immune privilege of corneal allografts. PLoS One. 査読有. May 7;8(5):e63620. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0063620.

2. Kunishige T, Hori J. Immune privilege as new therapeutic strategies for success of corneal transplantation. *Journal of Inflammation and Regeneration*. 査読有. Nov; 33(5). 2013.
<http://jsir.gr.jp/journal/Vol33No5/pdf/0274-0282.pdf>
 3. 国重智之、堀純子、眼表面の免疫特権、「オキュラーサーフェス診療アップデート」臨床眼科（医学書院）、査読有、66巻、2012、pp.346-350
 4. Hori J, Taniguchi H, Wang M, Oshima M, Azuma M. GITR ligand-mediated local expansion of regulatory T cells contributes to immune privilege of corneal allografts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 査読有. 2010 Dec; 51(12):6556-65.
doi:10.1167/iovs.09-4959.
 5. Hori J, Vega JL, Masli S. Review of ocular immune privilege in the year 2010: modifying the immune privilege of the eye. *Ocul Immunol Inflamm*. 査読有. 18(5):325-33, 2010.
doi: 10.3109/09273948.2010.512696.
- 〔学会発表〕(計 24 件)
1. J Hori. Novel Developments in the Investigation of Ocular Immunomodulation 「Anterior chamber-associated immune deviation (ACAID)」, 第 118 回日本眼科学会総会、2014.4.5、東京
 2. 堀純子、谷口ヒロ子、眼炎症を制御する新しい分子群 Molecular mechanisms in regulation of ocular inflammation、第 116 回日本眼科学会総会、2012.4.6、東京
 3. 堀純子、眼の恒常性の不思議 "Immune privilege"の謎を解く—亡き恩師からのミッション—、宮城眼科先進医療研究会、2012.10.3、宮城
 4. 堀純子、眼炎症疾患へのアプローチ診断のコツと新治療の展望、函館眼科医会学術講演会、2012.8.27、北海道
 5. 堀純子、眼炎症の自動制御機構“免疫特権”の謎を解く、レディースアイフォーラム in 横浜、2011.8、神奈川
 6. J Hori. Ocular cell-mediated regulation and immune privilege. ARVO/JOS symposium: Immune pathogenesis and regulation in the eye. 第 115 回日本眼科学会総会、2011.5.12、東京
 7. 堀純子、眼の恒常性の不思議“Immune privilege”の謎を解く、第 3 回学問のすずめ、2011.4.2、新潟
 8. T Kunishige, H Taniguchi, T Ohno, M Azuma, J Hori. Role of V-Domain Ig Suppressor of T Cell Activation (VISTA) on Immune Privilege of Corneal Allograft, WOC (World Ophthalmology Congress), 2014.4、東京
 9. 国重智之、谷口ヒロ子、堀純子、大野建州、東みゆき、角膜移植の生着における V-domain Ig Suppressor of T Cell Activation (VISTA)の役割、第 47 回日本眼炎症学会、2013.7.1、大阪
 10. T Kunishige, H Taniguchi, T Ohno, M Azuma, J Hori. V-domain Ig Suppressor of T Cell Activation (VISTA) is Necessary for Corneal Allograft Survival. ARVO (Association for research in vision and ophthalmology) 2013.5.6、Seattle
 11. H Taniguchi, Y Kitahara, J Hori. Induction of Corneal Inflammation in the Collagen-Induced Scleritis Model. ARVO 2013.5.6、Seattle
 12. 谷口ヒロ子、王明聡、北原由紀、中島敦夫、堀純子、コラーゲン誘導性強膜炎モデルにおける角膜病変の誘導、第 117 回日本眼科学会総会、2013.4.6、東京
 13. 榛村真智子、堀純子、王明聡、谷口ヒロ子、高橋浩、梯彰弘、秋葉久弥、八木田秀雄、角膜移植後の免疫寛容における Tim-3 / Gal-9 経路の抑制的役割、第 46 回日本眼炎症学会、2012.7.15、横浜
 14. M Terada, H Taniguchi, K Maruyama, R Abe, J Hori. Inhibitory Role of ICOS in Antigen-specific T cell-mediated Ocular Tissue Damage. ARVO 2012.5.10, USA
 15. H Taniguchi, MC Wang, Y Kitahara, A Nakajima, J Hori. Ocular Immune Pathological Analysis in a Murine Model of Anterior Scleritis. ARVO 2012.5.10, USA
 16. 寺田節、堀純子、谷口ヒロ子、安部良。抗原特異的 T 細胞による眼組織障害における ICOS の抑制的役割。第 116 回日本眼科学会総会、2012.4.5、東京
 17. 谷口ヒロ子、堀純子、王明聡、北原由紀、中島敦夫、前部強膜炎マウスモデルにおける眼局所の病態解析、第 116 回日本眼科学会総会、2012.4.5、東京
 18. 榛村真智子、堀純子、王明聡、谷口ヒロ子、秋葉久弥、八木田秀雄、角膜移植の免疫特権における Tim-3/Gal-9 経路の役割、第 16 回 Tokyo Ocular Immunology Meeting、2011.9.30、東京
 19. 谷口ヒロ子、堀純子、秋葉久弥、八木田秀雄、東みゆき、角膜アログラフトの生着における脾臓内 Foxp3+CD8+ 制御性 T 細胞の関与、第 45 回日本眼炎症学会、2011.7.9、京都
 20. 谷口ヒロ子、堀純子、秋葉久弥、八木田秀雄、長谷英徳、東みゆき、角膜移植後の眼局所における TLT-2 の発現と機能、第 115 回日本眼科学会、2011.5.12、東京
 21. 寺田節、堀純子、谷口ヒロ子、丸山和一、安部良、角膜血管リンパ管新生における二次リンパ器官の関与と ICOS の抑制的役割、第 115 回日本眼科学会総会、2011.5.12、東京

22. H. Taniguchi, H. Sase, H. Akiba, H. Yagita, M. Azuma, J. Hori. Expression of TLT-2 in corneal tissue and macrophages after corneal transplantation and association with immune privilege of corneal allografts. ARVO 2011. 5.4, USA
23. K. Wakayama, H. Taniguchi, H. Akiba, H. Yagita, M. Azuma, J. Hori. Correlation between proportion of splenic Foxp3+CD8+T regulatory cells and corneal allograft survival. ARVO. 2011. 5.1, USA
24. M. Terada, H. Taniguchi, K. Maruyama, R. Abe, J. Hori. Inhibitory role of ICOS on corneal lymphangiogenesis and involvement of Foxp3+CD4+T regulatory cells in secondary lymphoid organs. ARVO 2011. 5.1, USA

〔その他〕

ホームページ等

研究テーマおよび研究内容

<http://tlo.nms.ac.jp/researcher/1193.html>

<http://hosp.nms.ac.jp/staff/988.html>

日本医科大学眼科研究業績

<http://www.nms.ac.jp/nms/ganka/achievements/original.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

堀 純子 (HORI, Junko)

日本医科大学、医学部、准教授

研究者番号：60251279

(2)研究分担者

北原 由紀 (KITAHARA, Yuki)

日本医科大学、医学部、助教

研究者番号：30360176

谷口 ヒロ子 (TANIGUCHI, Hiroko)

日本医科大学、医学部、研究員

研究者番号：00535445

(3)研究協力者

東 みゆき (AZUMA, Miyuki)

東京医科歯科大学、大学院・医歯学総合研究科、教授

研究者番号：90255654

八木田 秀雄 (YAGITA, Hideo)

順天堂大学、医学部、准教授

研究者番号：30182306