

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659807

研究課題名（和文）制御性T細胞によるぶどう膜炎に対する新しいパーソナルメイド免疫療法の開発

研究課題名（英文） Personal Made Immuno-therapy for Uveitis Using Regulatory T Cells

研究代表者

望月 學 (MOCHIZUKI MANABU)

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：10010464

研究成果の概要（和文）：

網膜色素上皮細胞により誘導される制御性T細胞（Treg）は、マウスにおいて活性化T細胞の細胞分裂と炎症性サイトカインを強く抑制する。さらに、Tregの中のnon-suppressivな分画を除去することにより、非常に強力なTregを誘導できた。このsuppressive分画の網膜色素上皮細胞により誘導されたTregはマウスの実験的自己免疫性ぶどう膜炎を抑制した。ヒトにおいてはTGFβの前刺激を加えることによりマウスと同様にTregを誘導できた。これらの研究成果は、ヒト網膜色素上皮細胞により誘導されるTregは非感染性ぶどう膜炎の治療に応用できることを示している。

研究成果の概要（英文）：

Regulatory T cells (Treg) induced by retinal pigment epithelial cells strongly suppressed proliferation of active T cells and production of inflammatory cytokines by T cells. Furthermore, removing non-suppressive fraction of Treg exhibited much more intense suppressive activities. The suppressive fraction of Treg was capable of suppressing experimental autoimmune uveitis in mice. In human, Treg and suppressive fraction of Treg were induced similarly, but using pre-stimulation by TGF-β.

These results indicate that Treg (or suppressive fraction of Treg) can be used for the treatment of non-infectious uveitis in human.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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 7310

キーワード：眼免疫

1. 研究開始当初の背景

ぶどう膜炎は重要な失明原因であり、その発症機序解明と治療法開発は臨床的に重要な課題である。ぶどう膜炎の中で、感染症を除く約80%の患者では自己免疫機序が関与し、その治療には副腎皮質ステロイド薬、各種免疫抑制薬、最近では標的治療として多くの生物製剤の治療が用いられているが、制御性T細胞を用いる免疫治療は未だ開発途上である。

2. 研究の目的

本研究は、これら従来の治療法では不可能であった患者個人に由来するリンパ球から制御性T細胞を作成して治療に用いるというパーソナルメイドな新しい免疫療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

C57BL/6マウスから脾臓を摘出し、T細胞分離カラム（MACS T cell isolation kits）を用いてCD4⁺ また

はCD8⁺ T cellを採取する。このCD4⁺またはCD8⁺ T cellsと眼色素上皮に抗マウスCD3抗体を添加して共生培養する。眼色素上皮細胞は、正常マウス (C57BL/6) の眼から既報の方法 (Sugita, et al. J Immunol. 2004;172) で分離樹立する。

IPE、RPE、毛様体色素上皮細胞 (CBPE) とT細胞を共生培養し、X線照射後に制御性T細胞として使用する。その免疫抑制機能は、活性化T細胞に以下の方法で解析する。①抗CD3抗体や抗CD28抗体によるT細胞の活性化、②混合リンパ球反応によるT細胞活性化、③チミジン (³H) の取り込み試験、④フローサイトメトリーによるCFSE 取り込み試験、⑤培養上清中のサイトカイン産生能 (IFN- γ 、IL-2、IL-17など) である。

RPE 誘導制御性 T 細胞の phenotype の解析を行い、制御性 T 細胞マーカー分子 (CD25^{high}、Foxp3) の細胞染色をフローサイトメトリーにより解析する。

制御性 T 細胞をこれらの方法で *in vitro* において増やし純度の高いヒト制御性 T 細胞を作成する (図 1)。また、このヒト制御性 T 細胞の Phenotype を CD25^{high}、CTLA-4、Glucocorticoid-induced TNF receptor family related gene (GITR)、Foxp3 などの制御性 T 細胞マーカーを測定して解析する。

培養網膜色素上皮細胞 (RPE) による制御性 T 細胞誘導方法を確立して、その機能解析をおこなう。即ち、①抗 CD3 抗体や抗 CD28 抗体による T 細胞の活性化、②混合リンパ球反応による T 細胞活性化、③チミジン (³H) の取り込み試験、④フローサイトメトリーによる CFSE 取り込み試験、⑤培養上清中のサイトカイン産生能である。

ヒト RPE 細胞株 ARPE-19 細胞をレコンビナント TGF- β で処理し、その上清を使用してヒト制御性 T 細胞の誘導する方法で、*in vitro* において増やし純度の高いヒト制御性 T 細胞を作成する。また、このヒト制御性 T 細胞の Phenotype を CD25^{high}、CTLA-4、Glucocorticoid-induced TNF receptor family related gene (GITR)、Foxp3 などの制御性 T 細胞マーカーを測定して解析する。

4. 研究成果

マウスにおいては網膜色素上皮細胞の培養上清をT細胞と培養することにより、活性化T細胞を免疫抑制作用を有する制御性T細胞 (Treg) に誘導する事が出来る事が明らか

かにされている。そこで、本研究ではマウスにおいて虹彩色素上皮細胞、毛様体色素上皮細胞、網膜色素上皮細胞により誘導される Treg の免疫活性を解析し、Treg によるぶどう膜炎への治療への応用を検討した。更に、マウスと同様の方法により、ヒトにおいても Treg が誘導できるかを検討した。

マウスと同様の方法ではヒト網膜色素上皮細胞はT細胞を Treg に誘導できなかった。しかし、ヒト網膜色素上皮細胞をヒト・レコンビナント TGF β で前刺激することで、ヒト網膜色素上皮細胞の Treg 誘導能力を引き出せるかを検討した。その結果、ヒト・レコンビナント TGF β で前刺激したヒト網膜色素上皮細胞の培養上清をT細胞を培養することにより、bystander T細胞の活性化を抑制し、炎症性サイトカイン産生を抑制する CD25FoxP⁺ の Treg を誘導できることが明らかとなった。

その Treg には CD25^{low}CD45AR⁺ の resting Treg 分画、CD25^{high}CD45AR⁻ の active Treg 分画、CD25^{low}CD45AR⁻ の suppressive Treg 分画が混在していた。その中から、non-suppressive Treg 分画を除去することにより、極めて免疫抑制活性の高い Treg 分画を得ることに成功した。TGF β で前刺激した網膜色素上皮細胞培養上清で誘導され、suppressive Treg 分画を除去した Treg を網膜色素上皮細胞誘導 Treg として用いて、実際にぶどう膜炎が抑制できるかを、マウスの実験的自己免疫性ぶどう膜炎において検討した。その結果、少量の網膜色素上皮細胞誘導 Treg を網膜抗原 (IRBP) 免疫後 10 日後にマウスの腹腔に注射するだけで、非投与の IRBP 免疫マウスに比べて著明にぶどう膜炎が抑制された。

以上の本研究の結果は、網膜色素上皮細胞で誘導される Treg はヒトのぶどう膜炎の治療に応用できることを示すものである。

5. 主な発表論文

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

1. Kawazoe Y, Sugita S, Keino H, Yamada Y, Imai A, Horie S, Yamagami S, Mochizuki M. Retinoic acid from retinal pigment epithelium induces T regulatory cells. *Exp Eye Res*, 2012, 94: 32-40.
2. Sugita S, Kawazoe Y, Imai A, Yamada Y, Horie S, Mochizuki M. Inhibition of Th17 differentiation by anti-TNF-alpha therapy in uveitis

- patients with Behcet's disease.
Arthritis Res Ther, 2012; 14: R19
3. Imai A, Sugita S, Kawazoe Y, Horie S, Yamada Y, Keino H, Maruyama K, Mochizuki M.
Immunosuppressive properties of regulatory T cells generated by incubation of peripheral blood mononuclear cells with supernatants of human RPE cells. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012; 53: 7299-7309.

[学会発表] (計 6 件)

1. Mochizuki M. Immunosuppressive properties of retinal pigment epithelial (RPE)-induced regulatory T cells. The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Florida (U.S.A.), 2012.5.5
2. Mochizuki M. Role of regulatory T cells in uveitis. 8th International Symposium on Uveitis, Thessaloniki (Greece), 2012.10.19
3. Sugita S, Kawazoe Y, Horei S, Yamada Y, Mochizuki M. Inhibitory effect of regulatory T cells expanded in vitro by human retinal pigment epithelial (RPE) cells. Amyloid β enhances migration of endothelial progenitor cells via upregulation of CX3CR1. The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Florida (U.S.A.), 2012. 5.9
4. 川添裕子, 杉田 直, 今井彩乃, 堀江真太郎, 高瀬 博, 望月 學. ベーチェット病ぶどう膜炎の Th22 細胞の関与. 第 46 回日本眼炎症学会, 横浜, 2012.7.15.
5. 今井彩乃, 杉田 直, 川添裕子, 堀江真太郎, 慶野 博, 望月 學. 網膜色

素上皮細胞誘導制御性 T 細胞の実験的自己免疫性ぶどう膜炎の抑制. 第 46 回日本眼炎症学会, 横浜, 2012.7.15.

6. 川添裕子, 鴨居功樹, 宮永 将, 高瀬博, 望月 學. ベーチェット病に対するインフリキシマブ長期投与成績の検討. 第 66 回日本臨床眼科学会総会, 京都, 2012.10.25.

[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]
なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
望月 學 (MOCHIZUKI MANABU)
東京医科歯科大学・医歯 (薬) 学総合研究科・教授
研究者番号 : 10010464

(2) 研究分担者
杉田 直 (SUGITA SUNAO)
理化学研究所・網膜再生医療研究チーム・研究員
研究者番号 : 10299456

高瀬 博 (TAKASE HIROSHI)
東京医科歯科大学・医歯 (薬) 学総合研究科・講師
研究者番号 : 20451940