

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592040  
 研究課題名（和文） 自己免疫性ぶどう膜炎における補助シグナル分子の機能解析と臨床応用に向けた展開  
 研究課題名（英文） Functional analysis of costimulatory molecules in autoimmune uveitis and their intervention for clinical application  
 研究代表者  
 秋葉 久弥（AKIBA HISAYA）  
 順天堂大学・医学部・准教授  
 研究者番号：60338316

## 研究成果の概要：

補助シグナル分子は、T細胞の活性化や機能に重要な役割を担っており、これらの働きを制御する抗体を開発することにより、難治性ぶどう膜網膜炎の治療が可能になるのではないかと考え、種々の補助シグナル分子に対する抗体を作製し、ぶどう膜網膜炎マウスモデルに投与して治癒効果の検討を行った。この内、T細胞分化に関わる補助シグナル分子OX40Lに対する抗体投与が、発症抑制に効果的であり、臨床応用に期待がもてる結果が得られた。

## 交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,900,000 | 570,000   | 2,470,000 |
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000   | 2,080,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

## 研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：T細胞分化・制御、補助シグナル分子、自己免疫疾患、喘息、アレルギー

## 1. 研究開始当初の背景

眼ぶどう膜網膜炎の大半は発症原因が不明なことから、その治療は抗炎症療法を主体とした対症療法が中心となっている。綿密な経過観察と適切な治療を行えば、ほとんどの疾患はある程度の鎮静化と視機能の温存は可能であるが、ベーチェット病等に見られる難治性ぶどう膜網膜炎を誘発する疾患は、視力障害を残すケースも少なくはない。近年、このような難治性ぶどう膜網膜炎は、網膜視細胞層に局在する蛋白質が抗原となり発症する自己免疫疾患であることが示唆されている。実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)はその動物モデルであり、網膜抗原を特異的に認識す

る自己反応性CD4 T細胞によって惹起されることが明らかにされてきた。

免疫反応の中心的役割を果たすCD4 T細胞は、抗原刺激のみならず、補助シグナル分子と呼ばれる細胞表面機能分子の働きによって、その活性化・不活化が制御されている。近年、分子生物学や遺伝子工学の導入により従来の現象論の包囲網をせばめていく方法に代わり、いきなり遺伝子をクローニングするゲノムサイエンスの手法を駆使して、現象の核心に迫ることが出来るようになった。その結果、補助シグナル分子は飛躍的に増加し、いまだ詳細な機能が判明していない分子、さらに未知の分子も含めるとその数は膨大に

なり、T細胞制御は複雑さを増している。現在、補助シグナル分子はB7-CD28ファミリーとTNF-TNFレセプターファミリーの2大ファミリーに大別される。数年前まで単純に補助刺激分子あるいは共刺激分子と呼ばれていたこれらの分子は、単に活性化（プラス）のシグナルを伝達するだけでなく、抑制性（マイナス）のシグナルを伝達する分子も数多く発見されている。またTh1/Th2誘導に関わる新たな補助シグナル分子としてTIMファミリー分子が同定された。これら多種の補助刺激分子の介在の有無によりT細胞の活性化、不活化が決定され、さらに未だ解明されていないTh1細胞やTh2細胞等への分化の方向性を決定するなど、T細胞が持つ多様な機能が制御されている可能性が考えられる。

本研究代表者はこれまでに、B7-CD28ファミリーに属する新たな補助シグナル分子B7RP-1, B7-H1, B7-DC, PD-1に対する機能的なモノクローナル抗体を作製し、抗原提示細胞や活性化T細胞におけるこれらの分子の発現と機能を明らかにするとともに、外来抗原に対するTh1/Th2誘導、抗体産生、および実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)やNODマウスの糖尿病といった種々の免疫疾患モデルを用いてこれらの分子の生理的・病理的役割を明らかにしてきた。また、TNFファミリーに属する補助シグナル分子CD70, OX40L, 4-1BBLに対する機能的なモノクローナル抗体を作製し、抗原提示細胞におけるこれら分子の発現と機能を明らかにするとともに、寄生虫感染におけるTh2誘導やOVA誘発性喘息モデル、骨髄移植後の移植片対宿主病(GVHD)といった種々の免疫疾患モデルを用いてこれらの分子の生理的・病理的役割を明らかにしてきた。

EAU研究は、国内では東京医科大学眼科学臼井正彦教授が中心となり、本研究代表者も共同で免疫学の視点からB7-CD28ファミリーに属するB7RP-1-ICOS系がEAU発症に重要な役割を持ち、抗B7RP-1抗体投与によって治療効果があることを明らかにしてきた。EAEとEAUは、免疫するペプチドが異なる以外はまったく同じ方法で誘発される疾患モデル系である。にもかかわらず抗B7RP-1抗体投与はEAEでは悪化、EAUでは治療と正反対の結果をもたらした。これまでにこのような報告はなく、脳脊髄と眼では免疫系の同じ分子が異なる働きを有する可能性が示唆された。EAE研究は、免疫学の分野では世界的に見ても先端であるのに対して、EAU研究はその陰に隠れた状態にある。米国では免疫学を専門とするDr. R. Caspiが基礎からEAU研究に取り組み大きな成果をあげている。基礎研究者と臨床医が協力して研究や実験の正しい技術と知識を広めて行くことも重要であり、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

免疫反応の中心的役割を果たすT細胞の過度の反応は、自己免疫疾患やアレルギーといった免疫疾患のように生体にとってむしろ有害となることがある。補助シグナル分子は、T細胞の活性化と機能に重要な役割を担っており、これらの分子機能を人為的にコントロールすることによって、難治性ぶどう膜網膜炎の発症機序の解明や発症制御、治療へとつながるものと考えている。従って本研究は、既知および未知の補助シグナル分子を同定して、それらの分子に特異的に結合して機能惹起あるいは機能阻害するモノクローナル抗体を作製し、マウスEAUモデルに投与して治療効果の検討を行った。EAUにおける各補助シグナル分子の病理的役割を解明するとともに、より良い治療方法を見いだすことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)ペプチドをC57BL/6マウスに免疫してEAUマウスを作製。21日間、あるいは前期、後期に分けて抗体を腹腔内投与。抗体は独自に調製した。ぶどう膜網膜炎の発症および抑制効果を、免疫開始から継続的に眼球の臨床所見から、または21日後に眼組織染色を行い、炎症状態、組織破壊などの所見から症状の悪化を数値化して評価した。またこれらのマウスからリンパ節細胞を調製して、IRBPペプチドとともに培養を行い、CD4<sup>+</sup>T細胞の機能変化と各補助シグナル分子系の関係について解析するとともに、EAU発症メカニズムとの関連について検討を行った。

(2) 既に作製済みのOX40LやB7-H1, B7-DC, PD-1に対する抗体をEAUマウスに投与して、これらの分子とEAU発症のメカニズムとの関連について検討を行った。

(3) TIMファミリー分子をそれぞれ強発現する細胞(transfectants)をラットに免疫してそれぞれの分子と特異的に反応するモノクローナル抗体を樹立し、EAUマウスに投与して各分子の病理的役割の検討を行った。

(4) EAUマウス作製、眼科的・組織学的所見は、研究分担者の臼井が測定を行い、免疫学的なin vitro実験や抗体作製は、研究代表者の秋葉が行った。

## 4. 研究成果

(1) OX40-OX40L結合を阻害することが可能な抗OX40Lモノクローナル抗体(anti-OX40L mAb)をEAU誘導のインダクションフェーズ

(IF)、エフェクターフェーズ(EF)に分けて投与した結果、IF 時投与では発症が増悪、Th1 タイプサイトカインの産生増強が認められた。また OX40 に刺激を加えることができる anti-OX40 mAb を IF 時に投与した結果、発症抑制、Th1 タイプサイトカインの産生抑制が認められた。このことから初期の T 細胞活性化に、OX40-OX40L は Th2 細胞誘導に重要な分子であり、通常、EAU の発症抑制に働いていることが示唆された。一方、anti-OX40L mAb を EF 時に投与した結果、IF 時投与と同様に発症増悪ではなく、有意な発症抑制が認められた。このことから OX40 は、初期の T 細胞活性化・分化誘導時には Th2 誘導に働き Th1 を抑制、一度活性化された後のエフェクター T 細胞では、その効果機能を発揮させる分子として機能することが示唆された。従って、すでにぶどう膜網膜炎を発症してしまった患者さんへの治療を考えた場合、anti-OX40L mAb 投与は発症抑制・治癒に効果があるのではないかと考えられる。

(2) T 細胞の機能制御に働くと考えられている抑制性の補助シグナル分子 PD-1 に対するモノクローナル抗体を EAU マウスに投与した結果、コントロール抗体投与群と比較して早期発症および症状の増悪が認められた。抗原特異的な CD4<sup>+</sup> T 細胞の増殖促進、IFN- $\gamma$  および IL-17 の産生増強が認められたことから、PD-1 は、通常 EAU 発症に抑制的に機能していることが明らかとなった。PD-1 のリガンドは、2 種類、B7-H1 (PD-L1) と B7-DC (PD-L2) が知られており、それぞれの分子に対するモノクローナル抗体を EAU マウスに投与した結果、anti-B7-H1 mAb 投与群よりも anti-B7-DC mAb 投与群において明らかな症状の増悪が認められた。EAU 発症に関わる Th1 細胞は、Th2 細胞に比べ PD-1 の発現量が高く、可溶性の B7-H1-Ig と B7-DC-Ig で結合能を検討した結果、B7-H1-Ig が弱く結合するのに対して、B7-DC-Ig は強い結合性を示した。このことから EAU 発症に直接関与する Th1 細胞は、PD-1 を高発現し、通常、B7-H1 よりも B7-DC と強固に結合することにより発症抑制に働いていると考えられた。従って、anti-B7-H1 mAb よりも anti-B7-DC mAb 投与の方がより症状を悪化させたと推測した。

(3) TIM ファミリー分子のうち、TIM-4 に対するモノクローナル抗体(anti-TIM-4 mAb)を新たに作製し、EAU 誘導のインダクションフェーズ(IF)とエフェクターフェーズ(EF)に分けて投与した。結果、IF 時投与では発症抑制が、EF 時投与では発症増悪が認められた。これらの結果は、マウス喘息モデルや関節炎モデルで得られている結果、すなわち IF 時投与で増悪、EF 時投与で抑制と正反対の結果

を示しており、現在そのメカニズムについて解析中である。

#### 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 15 件)

1. Usui, Y., M. Takeuchi, T. Hattori, Y. Okunuki, K. Nagasawa, T. Kezuka, K. Okumura, H. Yagita, H. Akiba, and H. Goto. 2009. Suppression of experimental autoimmune uveoretinitis by regulatory dendritic cells in mice. Arch Ophthalmol 127:514-519.
2. Totsuka, T., T. Kanai, Y. Nemoto, T. Tomita, R. Okamoto, K. Tsuchiya, T. Nakamura, N. Sakamoto, H. Akiba, K. Okumura, H. Yagita, and M. Watanabe. 2009. RANK-RANKL signaling pathway is critically involved in the function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in chronic colitis. J Immunol 182:6079-6087.
3. Nakayama, M., H. Akiba, K. Takeda, Y. Kojima, M. Hashiguchi, M. Azuma, H. Yagita, and K. Okumura. 2009. Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. Blood 113:3821-3830.
4. Nakano, N., C. Nishiyama, H. Yagita, A. Koyanagi, H. Akiba, S. Chiba, H. Ogawa, and K. Okumura. 2009. Notch signaling confers antigen-presenting cell functions on mast cells. J Allergy Clin Immunol 123:74-81.
5. Wong, M. G., Y. Suzuki, C. Tanifuji, H. Akiba, K. Okumura, T. Sugaya, T. Yamamoto, S. Horikoshi, S. Y. Tan, C. Pollock, and Y. Tomino. 2008. Peritubular ischemia contributes more to tubular damage than proteinuria in immune-mediated glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol 19:290-297.
6. Ueno, T., A. Habicht, M. R. Clarkson, M. J. Albin, K. Yamaura, O. Boenisch, J. Popoola, Y. Wang, H. Yagita, H. Akiba, M. J. Ansari, J. Yang, L. A. Turka, D. M. Rothstein, R. F. Padera, N. Najafian, and M. H. Sayegh. 2008. The emerging role of T cell Ig mucin 1 in alloimmune responses in an experimental mouse transplant model. J Clin Invest 118:742-751.
7. Nagashima, O., N. Harada, Y. Usui, T. Yamazaki, H. Yagita, K. Okumura, K. Takahashi, and H. Akiba. 2008. B7-H3

- contributes to the development of pathogenic Th2 cells in a murine model of asthma. *J Immunol* 181:4062-4071.
8. Fukushima, A., T. Sumi, K. Fukuda, N. Kumagai, T. Nishida, K. Okumura, H. Akiba, H. Yagita, and H. Ueno. 2008. Roles of galectin-9 in the development of experimental allergic conjunctivitis in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 146:36-43.
  9. Chen, Q., J. L. Cannons, J. C. Paton, H. Akiba, P. L. Schwartzberg, and C. M. Snapper. 2008. A novel ICOS-independent, but CD28- and SAP-dependent, pathway of T cell-dependent, polysaccharide specific humoral immunity in response to intact *Streptococcus pneumoniae* versus pneumococcal conjugate vaccine. *J Immunol* 181:8258-8266.
  10. Xiao, S., N. Najafian, J. Reddy, M. Albin, C. Zhu, E. Jensen, J. Imitola, T. Korn, A. C. Anderson, Z. Zhang, C. Gutierrez, T. Moll, R. A. Sobel, D. T. Umetsu, H. Yagita, H. Akiba, T. Strom, M. H. Sayegh, R. H. DeKruyff, S. J. Khoury, and V. K. Kuchroo. 2007. Differential engagement of Tim-1 during activation can positively or negatively costimulate T cell expansion and effector function. *J Exp Med* 204:1691-1702.
  11. Nakae, S., M. Iikura, H. Suto, H. Akiba, D. T. Umetsu, R. H. DeKruyff, H. Saito, and S. J. Galli. 2007. TIM-1 and TIM-3 enhancement of Th2 cytokine production by mast cells. *Blood* 110:2565-2568.
  12. Hattori, T., Y. Usui, Y. Okunuki, Y. Sonoda, M. Usui, E. Takada, J. Mizuguchi, H. Yagita, K. Okumura, H. Akiba, and M. Takeuchi. 2007. Blockade of the OX40 ligand prolongs corneal allograft survival. *Eur J Immunol* 37:3597-3604.
  13. Fukushima, A., T. Sumi, K. Fukuda, N. Kumagai, T. Nishida, T. Yamazaki, H. Akiba, K. Okumura, H. Yagita, and H. Ueno. 2007. B7-H3 regulates the development of experimental allergic conjunctivitis in mice. *Immunol Lett* 113:52-57.
  14. Fukushima, A., T. Sumi, K. Fukuda, N. Kumagai, T. Nishida, K. Okumura, H. Akiba, H. Yagita, and H. Ueno. 2007. T-cell Ig and mucin domain-containing protein (Tim)-2 regulates murine allergic conjunctivitis during the effector phase. *Immunol Lett* 110:133-138.
  15. Fukushima, A., T. Sumi, K. Fukuda, N. Kumagai, T. Nishida, H. Akiba, K. Okumura, H. Yagita, and H. Ueno. 2007. Antibodies to T-cell Ig and mucin domain-containing proteins (Tim)-1 and -3 suppress the induction and progression of murine allergic conjunctivitis. *Biochem Biophys Res Commun* 353:211-216.
- 以上、全て査読有り
- [学会発表] (計 9 件)
1. Hattori T. Functional expression of CD40 in corneal neovascularization. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting 2008, 4, 28. Fort Lauderdale, FL
  2. Usui Y. The role of PD-1/PD-L pathway in regulation of murine experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting 2008, 4, 28. Fort Lauderdale, FL
  3. Usui Y. Roles of PD-1/PD-1 ligands pathway in the development of murine experimental autoimmune uveoretinitis. 日本免疫学会 2008, 12, 1. 国立京都国際会館
  4. Kawamoto T. The role of TIM-2 in regulation of collagen-induced arthritis. 日本免疫学会 2008, 12, 2. 国立京都国際会館
  5. Nakayama M. TIM-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells by inflammatory macrophage and CD8 dendritic cell subsets. 日本免疫学会 2008, 12, 3. 国立京都国際会館
  6. Akiba H. TIM-1 signaling in B cells regulates antibody production. 日本免疫学会 2007, 11, 20. グランドプリンスホテル新高輪
  7. Nagashima O. B7-H3 regulates asthmatic response in a murine model of asthma. 日本免疫学会 2007, 11, 20. グランドプリンスホテル新高輪
  8. Nakano N. Notch signaling induces MHC class II expression on mast cell surface. 日本免疫学会 2007, 11, 21. グランドプリンスホテル新高輪
  9. Fukushima A. 実験的アレルギー性結膜疾患発症における共刺激分子 Tim の関与.

日本眼炎症学会 2007, 7, 6. 東京国際  
フォーラム

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋葉 久弥 (AKIBA HISAYA)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：60338316

(2) 研究分担者

臼井 嘉彦 (USUI YOSHIHIKO)  
東京医科大学・医学部・助教  
研究者番号：50408142

(3) 連携研究者