

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：32666
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2015～2016
課題番号：15K20290
研究課題名(和文)角膜血管リンパ管新生におけるICOSの働き

研究課題名(英文)Role of ICOS on Corneal Lymphangiogenesis

研究代表者
國重 智之(Kunishige, Tomoyuki)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：60516045
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：角膜炎症の予防と治療のためには、血管リンパ管新生を抑制することが重要と考えられる。ICOS(inducible T-cell co-stimulator, Inducible Costimulator)はB7RP-1と結合してT細胞機能を調節する副刺激分子である。今回、ICOS/B7RP-1の経路が角膜の自然免疫応答としての血管新生に関与するかどうかを知るため、縫合系による角膜血管新生モデルにICOSノックアウト(KO)マウスを用いて解析した。

研究成果の概要(英文)：Interaction between the inducible costimulatory molecule (ICOS) and its ligand, B7-related protein (B7RP-1), has been reported to have an impact on differentiation and functions of various T regulatory cells. The purpose of the present study is to further investigate the role of ICOS on inflammatory lymphoangiogenesis in the cornea and its mechanisms.

研究分野：眼免疫

キーワード：ICOS 血管新生 免疫学 副刺激分子シグナル

1. 研究開始当初の背景

角膜炎症の予防と治療のためには、血管リンパ管新生を抑制することが重要と考えられる。ICOS (inducible T-cell co-stimulator, Inducible Costimulator) は、B7RP-1 と結合して T 細胞機能を調節する副刺激分子である。われわれのグループでは、ICOS/B7RP-1 が角膜非特異的炎症時の血管、リンパ管新生を抑制することを明らかにしたが、その機序は不明である。

眼は免疫特権部位 (immune privilege site) として知られている。免疫特権は、高度な生命活動や種の存続に必須の組織にのみ備わった免疫特性と考えられ、炎症による障害から組織を保護するために、炎症反応を最小限に抑える自然治癒力と理解されている。また、角膜は血管・リンパ管が欠如しているため、免疫応答が起きにくい解剖学的特徴がある。角膜血管新生は本来は生体防御反応として発生するが、ときに、過度の炎症を誘導する。例えば、角膜移植時において、血管リンパ管新生のある宿主角膜では拒絶反応が誘導される。移植以外にも、自然免疫応答 (感染、外傷、術後) と獲得免疫応答 (自己免疫応答、移植免疫応答、アレルギー) が原因で生じる多様な角膜炎症において、血管リンパ管新生は病態に深く関連している。

乾性角結膜炎など重度の角膜炎にともない角膜血管新生がみられる症例がある。視覚障害や顕著な不快感、痛みをともない、眼科領域以外の症状を呈することも稀ではない。そのため角膜炎症を抑制し、角膜の恒常性と透明性を回復させ、痛みなどのストレスから解放させるために、血管リンパ管新生を抑制することが重要である。

2. 研究の目的

本研究では、角膜血管リンパ管新生における ICOS/B7RP-1 の役割を解析し、この分子の機能調節による血管リンパ管新生をともなう角膜炎症の治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 使用動物として、正常 (W/T) BALB/c および ICOS ノックアウト (KO) BALB/c を用いた。角膜炎症モデルを作製するため、W/T BALB/c および ICOS KO BALB/c の角膜中心部より 1mm の位置に 11-0 ナイロン糸を用いて 1 箇所縫合した。各々に手術用顕微鏡を用いて血管新生の有無および角膜血管新生臨床スコアを観察し、ICOS の有無にともなう血管新生を臨床的に評価した。さらに組織学的、免疫組織化学的な解析を行うため、以下の方法で解析した。観察および角膜眼球摘出は手術後 0, 3, 5, 7, 10 および 14 日目に行った。いずれの実験も N=10 以上とし、有意差を統計学的に検定した。

次に、ICOS が組織学的にどのような役割をしているか調べるため、それぞれの角膜眼球を摘出後、切片をヘマトキシリン-エオジン (H E) 染色し、血管リンパ管と角膜への浸潤細胞に関して組織学的な解析を行った。

さらに、ICOS による角膜への血管およびリンパ管新生退縮への影響を免疫組織化学的に調べるため、血管リンパ管新生を経時的に解析し、BD rat anti mouse CD31 および Anti rat IgG FITC を用いて血管内皮を染色し、Reliatech rabbit anti mouse LYVE-1 および Anti rabbit IgG CY3 を用いてリンパ管内皮を染色し免疫組織化学的な解析を共焦

点顕微鏡下で行い、ICOS 陽性(W/T)マウスと KO マウスで比較した。

また、血管リンパ管新生の定量解析を行うため、蛍光顕微鏡画像を ImageJ ソフトを用いて解析し、角膜の全面積における血管新生の面積の割合を統計学的に比較検討した。

- (2) 角膜炎症マウスモデルを作製するため、血管リンパ管新生における角膜・2次リンパ器官における ICOS 陽性 T 細胞の存在、その分布を解析した。上記の方法で血管リンパ管新生を誘発した角膜を採取し、ICOS 陽性 CD4 または CD8 細胞の浸潤、Foxp3 の発現を解析した。

また、二次リンパ器官においての ICOS の役割を解明するため、脾臓および頸部リンパ節における ICOS 陽性 CD4 または CD8 細胞の浸潤、Foxp3 の発現をフローサイトメトリーを用いて解析した。

さらに、血管リンパ管新生における ICOS/B7RP-1 の役割を明らかにするために、角膜におけるサイトカイン (IL-10 など)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGFA・VEGFC) などの発現を Real Time-PCR を用いて解析した。

4. 研究成果

- (1) ICOS KO および W/T とともに縫合 2 日目より輪部血管から角膜周辺部への血管新生が認められた。ICOS KO の多くは 7 日目に縫合系に新生血管が到達するのが確認され、10 日目以降は縫合系を越えて角膜中心部に到達した。一方、W/T では新生血管が角膜中央部まで到達する個体は少なく、14 日目の血管新生は ICOS KO において W/T よりも有意に増強していた ($p < 0.05$)。

- (2) ICOS KO と W/T の角膜血管背新生スコアは、縫合後 7 日では有意差がなかったが、14 日では ICOS KO で有意に高い値を示した。脾臓 CD4+細胞における Foxp3+細胞と CD25+Foxp3+細胞の比率は、7 日と 14 日ともに ICOS KO で有意に低かった。一方、頸部リンパ節 CD4+細胞における Foxp3+細胞の比率は、7 日では両群間に有意差がなかったが、14 日では ICOS KO で有意に低かった。

また、角膜における VEGF A の発現では、ICOS-KO は W/T と比較して 7 日目および 14 日目ともに有意差はなかったが、高い発現傾向を示した。

(結論) ICOS/B7PR-1 が角膜血管リンパ管新生において抑制的な役割を持ち、二次リンパ器官における ICOS 依存性の制御性 T 細胞の誘導を介して角膜炎症を抑制していると考えられた。

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 1 件)

1. Kunishige T, Taniguchi H, Terada M, Akiba H, Yagita H, Abe R, Hori J. Protective role of ICOS and ICOS Ligand in corneal transplantation and in maintenance of immune privilege. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016 Dec 1;57(15):6815-6823. DOI; 10.1167/iov.16-20644 査読あり

[学会発表](計 2 件)

1. H Taniguchi, T Kunishige, H Akiba, H Yagita, R Abe, J Hori. Expression of ICOS and Foxp3 on T cells infiltrating

in corneal allografts. ARVO. 2016.5.1,
Seattle, WA, USA.

2. T. Kunishige, J Hori. マウス角膜移植
におけるICOS/ICOS-Lの役割、 Tokyo
Ocular immunology meeting (2015.9.11、
東京)

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

日本医科大学眼科 研究業績

<http://www2.nms.ac.jp/nms/ganka/achievements/original.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

國重 智之 (Kunishige, Tomoyuki)

日本医科大学、医学部、助教

研究者番号 : 60516045