

平成21年6月23日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19592044  
 研究課題名（和文） 眼組織移植における新規の免疫補助シグナル分子の機能解析とその臨床応用にむけた展開  
 研究課題名（英文） Role of new co-stimulatory signaling molecules in immune responses after ocular tissue 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

研究成果の概要：眼組織移植後の拒絶反応を自動制御する機構として、(1)眼組織に発現する Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Ligand (GITRL)が GITR シグナルを介して眼局所に制御性 T 細胞(Treg)を誘導する、(2)B7-H3 分子が前房関連免疫偏位を誘導する、ということを示した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	5,550,000

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：角膜移植、拒絶反応、免疫特権、制御性 T 細胞、GITRL、B7-H3、前房関連免疫偏位、補助刺激分子

## 1. 研究開始当初の背景

眼は、脳や生殖器官と同様に、臓器内炎症が自動制御される「免疫特権」を有する稀な臓器である。我々は、免疫特権の分子機構を解析し、眼組織に恒性発現する FasL や PD-L1 といった分子が眼局所で T 細胞機能を抑制することを示した。これらの分子の発現調節により、移植後拒絶反応を回避しやすいドナー組織を構築することに成功した。そして、さらなる新規の免疫制御分子の探索と機能解析をすることにした。

## 2. 研究の目的

眼組織移植後拒絶反応の自動制御における (1)制御性 T 細胞(Treg)と Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Ligand (GITRL) /GITR シグナル経路の役割、および (2) 免疫補助シグナル分子の新規の B7 ファミリー分子である B7-H3 分子の役割を知ること。本研究における眼炎症自動制御（免疫特権）の分子機構の解明と応用により、眼外臓器における新しい炎症制御法の確立も目指している。

## 3. 研究の方法

(1) マウス正常眼と角膜移植眼における GITRL の発現と、眼内浸潤 CD4+T 細胞における GTR と Foxp3 の発現を免疫蛍光法で解析した。アロ脾細胞前房接種後の前房関連免疫偏位 (ACAID) 誘導モデルと角膜アロ移植モデルに、GITRL 抗体、GTR 抗体、isotype 抗体を腹腔内投与し、ACAID 誘導と移植片生着を検討した。また、C57BL/6 マウスの正常角膜を抗 GITRL 抗体または対称 rat IgG で前処理した後、マウスの脾臓 CD4 陽性 T 細胞と共培養し、T 細胞における Foxp3 発現の変化と、角膜内皮細胞障害を解析した。

(2) In vivo の解析として、C57BL/6 ドナーから BALB/c 宿主への角膜アログラフトモデルと、C57BL/6 由来アロ抗原特異的な前房関連免疫偏倚 (ACAID) モデルを用い、抗 B7-H3 抗体投与を行い、眼局所と 2 次リンパ器官における免疫応答を解析した。また in vitro の解析として、C57BL/6 や C3H/He の脾細胞で免疫された BALB/c マウスまたは正常の BALB/c マウスの脾臓 T 細胞と C57BL/6 角膜を共培養する系で、共培養の前に C57BL/6 角膜を抗 B7-H3 抗体または対照 I g G で前処理した。共培養後、角膜内皮死細胞を定量解析した。

#### 4. 研究成果

(1) GITRL は正常角膜内皮細胞と虹彩毛様体に恒性発現していた。In vivo での GITRL 抗体と GTR 抗体の投与ははいずれも ACAID 誘導に影響しなかったが、移植角膜の生着を対照より有意に短縮させた。移植角膜内の GTR+CD4+T 細胞は、対照の生着角膜内では Foxp3 陽性であったのに対し、GITRL 抗体投与により Foxp3 陰性となった。In vitro では、GITRL 阻害角膜との共培養後と比較して、

GITRL 陽性角膜との共培養後に、T 細胞の Foxp3 発現は増強した。抗原特異的反応性 T 細胞と非特異的活性化 T 細胞のいずれによる角膜内皮細胞障害も、GITRL 陽性角膜と比較して GITRL 阻害角膜において有意に強かった。(結論)角膜に恒性発現する GITRL を介して眼局所で Treg が誘導される。この局所誘導型の Treg は活性化 T 細胞による角膜内皮細胞障害を抑制して前眼部の恒常性を保持し、移植片生着を維持する。

(2) B7-H3 は前眼部の角膜と虹彩毛様体組織に恒性的に発現し、前房関連免疫偏位 (ACAID) の誘導と角膜アログラフト生着に必要な分子であった、眼局所において、アロ反応性 T 細胞による角膜内皮障害は、B7-H3 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。一方、正常 BALB/c マウス、同系やアロ移植マウスのいずれの頸部リンパ節、脾臓にも B7-H3 発現細胞はほとんどなかった。(結論) B7-H3 は二次リンパ器官での免疫抑制よりは、眼局所での T 細胞との相互作用で抑制効果を発揮していることが示唆された。

(3) 眼研究領域において、GITRL/GTR 経路、および B7-H3 分子の免疫制御的役割を明らかにしたのは、我々が国際的にも初めてである。今後、上記の分子機能調節により、移植以外の炎症性眼疾患や、他臓器の炎症疾患に対する新規治療に応用すること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 8 件)

1. Hori J, Joyce NC, Streilein JW: Immune privilege and immunogenicity reside among different layers of the mouse cornea. Issue of OII devoted to JW Streilein, *Ocul immunology & Inflammation*. 15: 225-240, 2007, 有
2. Hori J, Ng TF, Shatos M, Klassen H, Streilein JW, Young MJ. Neural progenitor cells lack immunogenicity and resist destruction as allografts. Issue of OII devoted to JW Streilein, *Ocul immunology & Inflammation*. 15: 261-274, 2007, 有
3. Wang MC, Kitahara Y, Yoshida A, Hori J. Latanoprost does not affect immune privilege of corneal allografts. *Exp Eye Res* 86: 394-402, 2008. 有
4. Hori J. Role of B7-H1 in Immune privilege of the eye. *J Nippon Med Sch*. 75: 56-57, 2009. 有
5. Hori J. Mechanisms of immune privilege of the anterior segment---what we learn from corneal transplantation--. *Journal of Ocular Biology Disease & Informatics*, 1(2), 94-100, 2009, 有
6. Hori J. Molecular mechanisms of immune-suppressive microenvironment in the cornea. *Cornea*, 2009, in press, 有
7. 堀 純子: 角膜における免疫制御とB7-H、*臨床免疫／アレルギー科、科学評論社*、48, 325-330, 2007、無
8. 堀 純子、*眼の免疫特権～角膜移植から学ぶ～*、*Journal of the Society of Japanese Women Scientists*, 8 (1):13-18, 2007、有

[学会発表] (計 25 件)

1. Hori J, Wang MC, Taniguchi H, Kitahara Y, Takahashi H, Oshima M, Sakaguchi S, Azuma M. Role of Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Ligand in Immune Privilege of Corneal Allografts. ARVO (Association for research in vision and ophthalmology) (2007.5.9, Fort Lauderdale, FL, USA)
2. Taniguchi T, Hori J, Wang MC, Kitahara Y, Takahashi H, Oshima M, Yagita H. B7-H3 is necessary for corneal allograft survival. ARVO (Association for research in vision and ophthalmology) (2007.5.6, Fort Lauderdale, FL, USA)
3. Hori J, Taniguchi H, Wang MC, Oshima M, Azuma M, Sakaguchi S. GITR-Ligand-induced regulatory T cells as a mechanism of immune privilege of corneal allografts. 9<sup>th</sup> international congress of IOIS (2007. 9. 17. Paris)
4. Hori J, Taniguchi H, Wang MC, Kitahara Y, Oshima M, Azuma M. GITR-ligand-dependent local expansion of regulatory T cells as a mechanism of immune privilege for corneal allografts. (Association for research in vision and ophthalmology) (2008.4.28, Fort Lauderdale, FL, USA)
5. H. Taniguchi, M.C. Wang, Y. Kitahara, M. Oshima, H. Yagita, J. Hori. B7-H3-mediated Protection Of Corneal Endothelial Cells From Killing By Allo-reactive-T Cells. ARVO (Association for research in vision and ophthalmology) (2008.4.27, Fort Lauderdale, FL, USA)
6. M.C. Wang, H. Taniguchi, A. Nakajima, J.

- Hori. A New Model of Anterior Scleritis Associated With Type II Collagen-Induced Arthritis. ARVO (Association for research in vision and ophthalmology) (2008. 4. 27, Fort Lauderdale, FL, USA)
7. M. Tomita, M.C. Wang, H. Taniguchi, H. Takahashi, J. Shimazaki, H. Yagita, J. Hori. Tim-3 Is Necessary for Corneal Allograft Survival. ARVO (Association for research in vision and ophthalmology) (2008. 5. 1, Fort Lauderdale, FL, USA)
8. H. Taniguchi, M.C. Wang, Y. Kitahara, M. Oshima, H. Yagita, J. Hori. Role of B7-H3 on immune privilege of corneal allografts. XVIII ICER (International Congress for Eye Research) (2008. 9. 24, Beijing, China)
9. 堀 純子、角膜移植拒絶反応、シンポジウム眼炎症と眼感染症への取り組み～動物モデルから学ぶこと～、第111回日本眼科学会総会、(2007. 4. 19、大阪)
10. 堀 純子、角膜移植拒絶反応の自動制御機構、シンポジウム1：眼炎症。基礎研究の最前線、第41回日本眼炎症学会、(2007. 7. 6、東京)
11. 堀 純子、角膜炎症の自動制御の分子機構、シンポジウム13：眼免疫調節機構の不思議、第113回日本眼科学会総会、(2009. 4. 17、東京)
12. 堀 純子、日本女性科学者の会第12回奨励賞受賞講演、眼組織の移植と再生における免疫学的研究、(2007. 6. 16)
13. 堀 純子、免疫特権に関与する新規B7ファミリー分子の機能解析、第75回日本医科大学医学会総会、平成18年度丸山記念研究助成金受賞記念講演、(2007. 9. 1)
14. 谷口ヒロ子、堀 純子、王 明聡、北原由紀、高橋 浩 (日本医大眼科) 大島正道 (国立感染研免疫)、八木田秀雄 (順天堂免疫)：眼局所の免疫応答におけるB7-H3の役割、学術展示優秀賞、第112回日本眼科学会、2008年4月
15. 堀 純子、王 明聡、谷口ヒロ子、北原由紀、高橋 浩、(日本医大眼科) 大島正道 (国立感染研免疫)、東みゆき (東京医歯大分子免疫)、角膜移植におけるGlucocorticoid-Induced TNF Receptor Ligandと制御性T細胞の役割、第23回角膜移植学会(2007. 2. 9、宮崎)
16. 北原由紀、堀 純子、王 明聡、谷口ヒロ子、角膜移植の生着におけるB7-H3の役割、第23回角膜移植学会(2007. 2. 10、宮崎)
17. 堀 純子、王 明聡、谷口ヒロ子、北原由紀、高橋 浩 (日本医大眼科) 大島正道 (国立感染研免疫)、坂口志文 (京大再生研生体機能調節)、東みゆき (東京医歯大分子免疫)、前眼部の抗原特異的免疫応答におけるGITR - GITRL経路の役割、第111回日本眼科学会総会、(2007. 4. 22、大阪)
18. 谷口ヒロ子、堀 純子、王 明聡、北原由紀、高橋 浩 (日本医大眼科) 大島正道 (国立感染研免疫)、八木田秀雄 (順天堂免疫)、前眼部の抗原特異的免疫応答におけるB7-H3の役割、第111回日本眼科学会総会、(2007. 4. 22、大阪)
19. Hori J, Wang MC, Taniguchi H, Kitahara Y, Sakaguchi S, Azuma M. GITR-Ligand-induced regulatory T cells as a mechanism of immune privilege of corneal allografts. 第37回日本免疫学会総会、(2007. 11. 20, 東

- 京)
20. Taniguchi H, Hori J, Wang MC, Kitahara Y, Yagita H. Role of B7-H3 on immune privilege of corneal allografts. 第37回日本免疫学会総会、(2007. 11. 20, 東京)
  21. 堀 純子、谷口ヒロコ、王 明聡、高橋浩、坂口志文、東みゆき、GITRLを介した角膜局所における制御性T細胞の誘導、第32回角膜カンファレンス(2007. 2. 28、千葉)
  22. 谷口ヒロコ、堀 純子、王 明聡、北原由紀、大島正道、八木田秀雄、角膜移植後の免疫応答におけるB7-H3 の役割、第32回角膜カンファレンス(2007. 2. 29、千葉)
  23. 富田真智子、堀 純子、王 明聡、谷口ヒロコ、高橋 浩、島崎 潤、八木田秀雄、角膜移植の生着におけるTim-3 の役割、第32回角膜カンファレンス(2007. 2. 29、千葉)
  24. 堀 純子、谷口ヒロコ、王 明聡、高橋浩、坂口志文、東みゆき、前眼部に発現するGITRLを介した制御性T細胞の誘導と眼組織障害の抑制、第112回日本眼科学会総会(2008. 4. 18, 東京)
  25. 谷口ヒロ子、堀 純子、王 明聡、北原由紀、大島正道、八木田秀雄、眼局所の免疫応答におけるB7-H3 の役割、第112回日本眼科学会総会(2008. 4. 18, 東京)

[図書] (計 2 件)

1. J. Hori, J. Y. Niederkorn, Corneal transplantation and Immune privilege. Treatment of Immune mediated Ocular Diseases, *Immune Response and the Eye II*, ed. J. Y. Niederkorn & H. A. Kaplan, Chemical Immunology and Allergy, Karger, Basel, Switzerland. 290-299, 2007
2. TF Ng, H Klassen, J Hori, MJ Young,

Retinal transplantation. Treatment of Immune mediated Ocular Diseases, *Immune Response and the Eye II*, ed. J. Y. Niederkorn & H. A. Kaplan, Chemical Immunology and Allergy, Karger, Basel, Switzerland. 300-316, 2007.

#### 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

王 明聡 (WANG MINGCONG)  
日本医科大学、医学系研究科、ポスドクター  
研究者番号：90445825

##### (3) 連携研究者