

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592073

研究課題名（和文） ヒト角膜内皮細胞に関する免疫学的・分子生物学的機能解析

研究課題名（英文） Analysis for mechanisms of immune suppression by human corneal endothelial cells

研究代表者

杉田 直 (SUGITA SUNAO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：10299456

研究成果の概要（和文）：角膜内皮細胞（Corneal endothelial cells）は免疫学的抑制機能を有する。今回我々は、ヒト角膜内皮細胞の炎症抑制機構を明らかにするために、培養ヒト角膜内皮細胞株を作成し、その抑制機能について解析した。その結果、培養 HCE は *in vitro* で $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、pan-T 細胞を有意に細胞増殖抑制した。また、培養 HCE は $CD8^+$ T 細胞を *in vitro* で制御性 T 細胞へと変換していた。その制御性 T 細胞は $CD25^{high}$ 、*Foxp3* を強発現し、*in vitro* で強い抑制能を持っていた。以上の結果より角膜内皮細胞は活性化 T 細胞抑制能および制御性 T 細胞誘導能を示した。

研究成果の概要（英文）：Corneal endothelial cells have immunosuppressive activities. We report here that human corneal endothelial cell lines significantly suppressed activation of $CD4^+$ T cells, $CD8^+$ T cells, pan-T cells *in vitro*. Moreover, cultured corneal endothelial cell lines converted $CD8^+$ T cells into Treg cells that have immunosuppressive capacity. The CE-induced Treg cells greatly expressed $CD25^{high}$ and *Foxp3*. Therefore, we demonstrated that human corneal endothelial cells indicate suppression of bystander T cell activation and induction of regulatory T cells *in vitro*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：ぶどう膜炎

科研費の分科・細目：ぶどう膜炎／眼免疫学

キーワード：角膜内皮細胞、T細胞、免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

眼には特殊な免疫防御機構が存在する。その中には眼内組織（虹彩色素上皮、毛様体色素上皮、網膜色素上皮など）と眼内液（前房水、硝子体液）があり、いずれも炎症に対して抑制的な機能を有している事がわかっている。今回、眼表面ではなく眼内側に位置し、前房水が接している重要な組織、角膜内皮の抑制機構に着目した。

2. 研究の目的

我々は、そのヒト角膜内皮細胞の炎症抑制機構を明らかにするために、ヒト角膜内皮細胞株（human corneal endothelial cells: 以下 HCE cells）を樹立し、*in vitro* で使用した。

3. 研究の方法

(1) ヒト角膜内皮細胞はレトロウイルス使用の培養 HCE 細胞株 (cell lines) を作成した。この培養 HCE を利用して、インフォームド Consent で同意の得られた健常人、角膜内皮炎、ぶどう膜炎患者の末梢血から T 細胞を採取し、活性化 T 細胞として使用した。*In vitro* の HCE 細胞抑制の評価を行う目的で、サイミジン取り込み試験と *flow cytometry* を用いた CFSE 取り込み試験、活性化 T 細胞の産生するサイトカイン測定にて検討した。

(2) 同様に、この培養 HCE が制御性 T 細胞 (Tregs) 誘導能を有するか、またその責任分子検索も行った。

4. 研究成果

(1) 培養 HCE は *in vitro* で CD4⁺、CD8⁺、pan-T 細胞いずれも有意に細胞増殖を抑制していた。また、活性化 T 細胞産生サイトカイン測定では、特に炎症性サイトカインの IFN γ

の産生抑制が強く認められていた。その抑制が細胞接触かどうかを確認するために、cell insert transwell membrane および HCE 細胞培養上清を用いて抑制実験を行ったところ、この HCE 細胞は細胞接触のみで活性化 T 細胞抑制を行っていた。また B 細胞、マクロファージ (単球) の活性化抑制も見られた。その責任分子は PD-L1 (B7-H1) 副刺激分子で、この細胞表面分子を介して PD-1 陽性 Th 1 細胞を特異的に抑制していた (Sugita S, et al. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2009; 50: 263-272)。

(2) 次に、我々は、この HCE が制御性 T 細胞 (Tregs) 誘導能を有するかも検討した。その結果、培養 HCE は CD8⁺ T 細胞を *in vitro* で制御性 T 細胞へと変換していた。その制御性 T 細胞は CD25^{high}、Foxp3 を強発現し、*in vitro* で強い抑制能を持っていた。また、その責任分子は膜結合型 TGF- β であることを見出した (Sugita S, et al. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2010, 51: 2548-2557)。

(3) ヒトで証明した角膜内皮細胞の制御性 T 細胞誘導能をマウスの角膜内皮細胞を用いて検討した。マウスの角膜内皮細胞は正常マウスから樹立した細胞株を使用した。我々は、マウス角膜内皮細胞が CTLA-2 α という新しい免疫抑制因子を発現し、TGF- β と共にその制御性 T 細胞誘導に関与している事を報告した (Sugita S, et al. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2011, in press)。現在は、このマウス角膜内皮細胞が眼炎症に重要な細胞、Th1 細胞、Th17 細胞を抑制するかどうか検討中である。

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 3 件)

1. Sugita S, Usui Y, Horie S, Futagami Y, Yamada Y, Ma J, Kezuka T, Hamada H, Usui T, Mochizuki M, Yamagami S. Human corneal endothelial cells expressing programmed death-ligand 1 (PD-L1) suppress PD-1⁺ T helper 1 cells by a contact-dependent mechanism. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009; 50: 263-272.

2. Sugita S*, Yamada Y*, Horie S, Yamagami S, Mochizuki M. Mechanisms of immune suppression for CD8⁺ T cells by human corneal endothelial cells via membrane-bound TGFβ¹. *co-first authors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010;51:2548-2557.

3. Sugita S, Yamada Y, Horie S, Nakamura O, Ishidoh K, Yamamoto Y, Yamagami S, Mochizuki M. Induction of T regulatory cells by cytotoxic T-lymphocyte antigen-2 alpha on corneal endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011, in press.

[学会発表] (計 3 件)

1. 培養ヒト角膜内皮細胞の免疫抑制能の解析 山田由季子、杉田直、堀江真太郎、二神百合、望月學 (東京医歯大)、臼井嘉彦 (東京医大)、濱田洋文 (札幌医大分子医学研究部門)、臼井智彦、山上 聡 (東京大学) 第 42 回日本眼炎症学会 福岡市

2. 山田由季子、杉田直、堀江真太郎、望月學、山上聡 角膜内皮細胞による膜結合型 TGFβ¹を介した制御性 T 細胞誘導能 第 43 回日本眼炎症学会 大阪

3. 杉田直 シンポジウム 眼炎症ホット・トピックス：眼内誘導制御性 T 細胞 (Eye-induced regulatory T cells) の特徴とその抑制機能について 第 114 回日本眼科学会 名古屋市

[図書] (計 0 件)

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉田 直 (SUGITA SUNAO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：10299456

(2) 研究分担者

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

菅本良治 (SUGAMOTO YOSHIHARU)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20334419

鴨居功樹 (KAMOI KOJYU)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40451942

(3) 連携研究者

()

研究者番号：