

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16905

研究課題名（和文）抗原特異的制御性T細胞による実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎の抑制の試み

研究課題名（英文）Regulation of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) by antigen specific regulatory T cells

研究代表者

中山 真紀子（Nakayama, Makiko）

杏林大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：30736278

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：制御性T細胞(Treg)は免疫寛容の確立・維持に重要な役割を担っている。AS2863619(以下AS)はcyclin-dependent kinase 8/19(CDK8/19)の阻害作用を有し、抗原特異的Tregの誘導を促進する。本研究では実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)を用いてAS2863619による生体内でのFoxp3+Tregを介したEAUに対する炎症抑制効果を検討した。その結果、AS投与群でFoxp3+Tregの増加はみられなかったものの、基剤群に比較してAS投与群でEAUの重症度の有意な低下がみられた。CDK8/19はぶどう膜炎の新たな治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、非感染性ぶどう膜炎による治療はステロイド薬の点眼や全身投与、免疫抑制薬(シクロスポリン)、生物学的製剤(アダリムマブ)が用いられているが、これらの治療を行っても効果が不十分、また全身副作用のため減量・中止を要する症例が存在する。今回用いたAS2863619はCDK8/19に対する阻害作用をもち、ぶどう膜炎の動物モデルである実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎に対する炎症抑制効果を示した。先行研究では多発性硬化症など他の免疫疾患モデルでもAS2863619が抗炎症作用を示すことが報告されており、今後CDK8/19がヒト自己免疫疾患の新たな標的分子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Regulatory T cells (Tregs) have important roles for maintaining immunological tolerance. Systemic administration of cyclin-dependent kinase (CDK) 8/19 inhibitor AS2863619 (hereafter referred to as AS) is capable of increasing Foxp3+CD4+ Tregs in vitro and in vivo, exerting immune regulations. In this study, we investigated the anti-inflammatory effect of AS administration on experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). Although the rate of Tregs in vivo was not increased in EAU-induced mice treated with AS, oral administration of AS was effective for amelioration of EAU. In addition, AS significantly reduced IFN-gamma and IL-17 production in vitro in draining lymph-node cells. The present study demonstrate that CDK8/19 may be new therapeutic targets for autoimmune uveoretinitis.

研究分野：眼科学

キーワード：ぶどう膜炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

制御性 T 細胞(Treg)はマスター遺伝子 Foxp3 を発現し、免疫応答を抑制的に制御することで自己に対する免疫寛容の確立・維持、免疫恒常性の維持に重要な役割を担っている。さらに Treg の抑制機能の発現には安定的に Foxp3 が発現していることが必要とされる。

ぶどう膜炎動物モデルにおける Treg の主な治療戦略として in vitro で増幅した Treg を移入する方法と生体内で Treg を増幅する方法が報告されているが、ヒトへの応用を考えた場合、Treg の in vitro での増幅は効率が低く、必要時に十分な量の Treg を安定して得ることは困難である可能性がある。一方で生体内において免疫促進的に作用する他の免疫細胞を活性化することなく、抗原特異的な Treg を薬剤を用いて増幅することができれば、ぶどう膜炎の治療、再燃抑制に有用である可能性がある。

2. 研究の目的

Akamatsu, Sakaguchi らが発見した AS2863619 は cyclin-dependent kinase 8 (CDK8)、その paralog である CDK19 の阻害作用を有し、抗原特異的な Treg の誘導を生体内で促進することを報告している。(Sci Immunol, 2019)。AS2863619(以下 AS)による抗原特異的な Treg の誘導を介したぶどう膜炎に対する炎症抑制の可能性について検討することは、Treg によるぶどう膜炎の免疫制御機構の新たな理解、さらに眼科領域における Treg を介した新たな治療アプローチを構築していくうえで重要な知見を与えるものと考えられる。本研究では実験的自己免疫性ぶどう膜炎(EAU)を用いて AS2863619 の全身投与(誘導相)による生体内での Foxp3+Treg の誘導・増殖を介した EAU に対する炎症抑制効果について検討を行った。

3. 研究の方法

1) AS2863619 の全身投与による EAU 抑制効果の検討

EAU 誘導のため 6-8 週令の C57BL/6 マウスの頸部皮下に完全フロイントアジュバント(CFA)と human IRBP ペプチド(抗原量 200 μ g/マウス)を 1:1 に混和した乳液を接種した。同時に百日咳トキシンを 1 μ g/マウスの割合で腹腔内投与を行った。IRBP 免疫日から 14 日間、AS2863619 (30mg/kg)、対照群には AS2863619 の溶解に用いた蒸留水を同様の期間、内服投与、免疫後 10 日目から散瞳下にて眼底検査、また免疫後 21 日目に眼球を摘出し病理標本を作成し、EAU の抑制効果について免疫組織学的に評価した。

2) AS2863619 の全身投与による Foxp3+Treg の変動、Th1、Th17 反応の抑制効果の評価

免疫後 7、14 日目に基剤群、AS 投与群から脾臓、頸部リンパ節を採取し single cell suspension を作成後、フローサイトメーターにて抗 CD4 抗体、抗 Foxp3 抗体を用いて Foxp3+Treg の割合について測定した。免疫後 14 日目に頸部リンパ節細胞を採取し、抗原として用いた IRBP ペプチドにて刺激培養、72 時間後に培養上清を回収し IFN- γ 、IL-17 の産生を ELISA 法にて検討した。

3) AS2863619 の全身投与による網膜組織内の炎症性サイトカインの発現抑制効果の評価

免疫後 21 日目に基剤群、AS 投与群から眼球を摘出、網膜を採取し total RNA を抽出、網膜組織内の IFN- γ 、IL-6、IL-17 の発現について定量 PCR 法にて測定した。

4) AS2863619 の in vitro 投与による抗原特異的な Th1、Th17 反応の抑制効果の評価

免疫後 14 日目に頸部リンパ節細胞を採取し、抗原として用いた IRBP ペプチドにて刺激培養する。その際に基剤、および AS を添加、72 時間後に培養上清を回収し IFN- γ 、IL-17 の産生を ELISA 法にて検討した。

4. 研究成果

1) AS2863619 の全身投与による EAU 抑制効果の検討

EAU の臨床スコアについて免疫後 10 日目から散瞳下にて眼底検査を行ったところ、免疫後 18 日目、および 21 日目において、基剤群に比較して AS 投与群で臨床スコアの有意な低下を認めた。また免疫後 21 日目に眼球を摘出、病理組織学的な評価を行ったところ、基剤群では網膜血管炎や網膜皺襞、網膜外層への細胞浸潤を認めたが、AS 投与群では網膜血管炎は軽度であり、網膜の層構造も保持されていた。病理組織学的スコアでも AS 投与群で有意な低下を認めた。

2) AS2863619 の全身投与による Foxp3+Treg の変動、Th1、Th17 反応の抑制効果の評価

免疫後 14 日目に基剤群、AS 投与群から脾臓、頸部リンパ節を採取し single cell suspension を作成後、CD4+Foxp3+Treg の割合について測定した。その結果、基剤群、AS 投与群で Treg の割合に有意な差は認められなかった。同様に脾臓細胞を用いた検討でも両群間で有意な差は認められなかった。

免疫後 14 日目に頸部リンパ節細胞を用いて IRBP ペプチドにて刺激培養し、培養開始 72 時間後に培養上清を回収し、Th1 細胞の signature サイトカインである IFN- γ 、Th17 細胞の signature サイトカインである IL-17 の測定したところ、AS 投与群において IFN- γ の有意な低下がみられた。IL-17 については両群間で有意差は認められなかった。

3) AS2863619 の全身投与による網膜組織内の炎症性サイトカインの発現抑制効果の評価

免疫後 21 日目に基剤群、AS 投与群から眼球を摘出、網膜中の IFN- γ 、IL-6、IL-17 の発現について定量 PCR 法に測定したところ、基剤群と比較して AS 投与群において IFN- γ 、IL-6、IL-17 の有意な低下を確認した。

4) AS2863619 の in vitro 投与による抗原特異的 Th1、Th17 反応の抑制効果の評価

免疫後 14 日目に頸部リンパ節細胞を採取、IRBP ペプチドにて刺激培養開始時に基剤、および AS を添加、72 時間後に培養上清を回収し IFN- γ 、IL-17 の測定したところ、基剤群と比較して AS 投与群において IFN- γ と IL-17 の有意な低下を認めた。

これらの結果より CDK8/19 阻害剤である AS を投与することで EAU の軽症化が確認されたことから、CDK8/19 がぶどう膜炎の免疫病態に関与している可能性が示唆された。本研究では AS 投与群で CD4+Foxp3+Treg の増加がみられなかったものの、MHC-テトラマーなどを用いた抗原特異的な CD4+T 細胞の細胞分画での解析は行っておらず、AS 投与により CD4+Foxp3+Treg が EAU の軽症化に作用している可能性は否定できない。また in vitro の系において AS 投与群で IFN- γ と IL-17 の有意な低下を認めたことから抗原特異的な免疫反応が AS によって抑制されている可能性が考えられる。最近では他の CDK8/19 阻害剤を用いることで、マクロファージや単球の活動性の低下が誘導されることが報告されており (Johannessen et al. Nat Chem Biol 2017、Kokinos et al. Viruses 2023)、本研究においても AS が自然免疫系にも作用し、EAU の軽症化を誘導した可能性も考えられる。EAU の病態における CDK8/19 の関与についてさらに検討を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakayama M, Okada AA, Hayashi I, Keino H COVID-19 vaccination-related intraocular inflammation in Japanese patients.	4. 巻 261
2. 論文標題 COVID-19 vaccination-related intraocular inflammation in Japanese patients.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 897-899
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00417-022-05866-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakayama M, Okada AA, Hayashi I, Ando Y, Watanabe T, Keino H.	4. 巻 31
2. 論文標題 A COVID-19 Risk Reduction Strategy for the Treatment of Acute Vogt-Koyanagi-Harada Disease Utilizing the Antiviral Potential of Cyclosporine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Ocul Immunol Inflamm m .	6. 最初と最後の頁 462-467
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09273948.2022.2028293.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakayama M, Keino H, Watanabe T, Okada AA.	4. 巻 50
2. 論文標題 Prognostic value of subfoveal choroidal thickness in new-onset acute Vogt-Koyanagi-Harada disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin Exp Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 678-680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ceo.14088.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Keino H, Aman T, Furuya R, Nakayama M, Okada AA, Sunayama W3, Hatanaka Y	4. 巻 12
2. 論文標題 Automated Quantitative Analysis of Anterior Segment Inflammation Using Swept-Source Anterior Segment Optical Coherence Tomography: A Pilot Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 2703
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics12112703	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nagahori K, Keino H, Nakayama M, Watanabe T, Ando Y, Hayashi I, Abe S, Okada AA	4. 巻 260
2. 論文標題 Clinical features and visual outcomes of ocular sarcoidosis at a tertiary referral center in Tokyo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 3357-3363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-022-05701-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito S, Keino H, Takasaki I, Abe S, Kohno H, Ichihara K, Hayashi I, Nakayama M, Tsuboshita Y, Miyoshi S, Okamoto S, Okada AA	4. 巻 23
2. 論文標題 Comparative Analysis of Serum microRNA in Diagnosed Ocular Sarcoidosis versus Idiopathic Uveitis with Ocular Manifestations of Sarcoidosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 10749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms231810749.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Maruko I, Okada AA, Iida T, Hasegawa T, Izumi T, Kawai M, Maruko R, Nakayama M, Yamamoto A, Koizumi H, Tamashiro T, Terao N, Wakugawa S, Mori R, Onoe H, Tanaka K, Wakatsuki Y, Itagaki K, Kasai A, Ogasawara M, Sekiryu T, Shintake H, Sugano Y	4. 巻 259
2. 論文標題 Brolucizumab-related intraocular inflammation in Japanese patients with age-related macular degeneration: a short-term multicenter study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 2857-2859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-021-05136-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Makiko, Okada Annabelle A, Hayashi Isami, Ando Yoshimasa, Watanabe Takayo, Keino Hiroshi	4. 巻 15
2. 論文標題 A COVID-19 Risk Reduction Strategy for the Treatment of Acute Vogt-Koyanagi-Harada Disease Utilizing the Antiviral Potential of Cyclosporine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ocular Immunology and Inflammation	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09273948.2022.2028293	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Keino Hiroshi, Watanabe Takayo, Nakayama Makiko, Komagata Yoshinori, Fukuoka Kazuhito, Okada Annabelle A	4. 巻 105
2. 論文標題 Long-term efficacy of early infliximab-induced remission for refractory uveoretinitis associated with Behçet's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1525 ~ 1533
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bjophthalmol-2020-316892	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 1. 中山真紀子, 慶野博, 林勇海, 安藤良将, 岡田アナベルあやめ
2. 発表標題 COVID-19パンデミックにおける急性期Vogt-小柳-原田病の治療選択
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 6. 中山真紀子, 慶野博, 林勇海, 安藤良将, 岡田アナベルあやめ
2. 発表標題 COVID-19ワクチン接種後に発症した眼炎症疾患8例における臨床経過
3. 学会等名 第55回日本眼炎症学会
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 9. 慶野博, 中山真紀子, 岡田アナベルあやめ
2. 発表標題 杏林アイセンターにおける特発性ぶどう膜炎患者の臨床像と視力予後の検討
3. 学会等名 第51回杏林医学会総会
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 田中公二, 丸子一郎, 板垣可奈子, 山本亜希子, 中山真紀子, 玉城環, 湧川空子, 寺尾信宏, 和泉雄彦, 河合萌子, 丸子留佳, 長谷川泰司, 若月優, 小野江元, 森隆三郎, 古泉英貴, 石龍鉄樹, 岡田アナベルあやめ, 飯田知弘
2. 発表標題 治療歴のない滲出型加齢黄斑変性に対するBroLucizumab硝子体内注射の短期成績
3. 学会等名 第125回日本眼科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大岩未来, 中山真紀子, 慶野博, 林勇海, 嶋崎鉄兵, 倉井大輔, 岡田アナベルあやめ
2. 発表標題 当院における梅毒性ぶどう膜炎治療の近況報告
3. 学会等名 第11回東京多摩眼科連携セミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鎌田紗知衣, 中山真紀子, 片岡恵子, 篠原大佑, 山本亜希子, 岡田アナベルあやめ
2. 発表標題 当院における近視性脈絡膜新生血管に対する治療成績
3. 学会等名 第3回日本近視学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉城環, 湧川空子, 寺尾信宏, 古泉英貴, 田中公二, 若月優, 小野江元, 森隆三郎, 板垣可奈子, 小笠原雅, 菅野幸紀, 笠井暁仁, 新竹広晃, 石龍鉄樹, 中山真紀子, 山本亜希子, 片岡恵子, 岡田アナベルあやめ, 丸子一郎, 和泉雄彦, 河合萌子, 丸子留佳, 長谷川泰司, 飯田知弘
2. 発表標題 滲出型加齢凹版変性に対するプロルシズマブ治療後の脈絡膜厚短期変化
3. 学会等名 第37回眼循環学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林勇海, 慶野博, 中山真紀子, 安藤良将, 渡邊交世, 岡田アナベルあやめ
2. 発表標題 杏林アイセンターにおけるぶどう膜炎患者の臨床像
3. 学会等名 第75回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 中山真紀子 (分担執筆)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Medical Tribune	5. 総ページ数 -
3. 書名 症例クイズ 帯状疱疹の角膜炎	

1. 著者名 中山真紀子 (分担執筆)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メディカ出版	5. 総ページ数 128
3. 書名 眼科グラフィック2021年6号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------