

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791646

研究課題名（和文）CD4+25+調節性T細胞の制御によるぶどう膜炎治療の開発

（英文）Development of uveitis therapy with control for CD4+CD25+ regulatory T cells

研究代表者

堀江 幸弘 (HORIE YUKIHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号：80547183

研究成果の概要（和文）：ヒト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（EAU）マウスにおける制御性T細胞の役割と、最近明らかとなった制御性T細胞上に発現している4型葉酸受容体（FR4）の機能と役割を明らかにする目的に研究を行った。EAUマウスに対して抗FR4抗体を用いて制御性T細胞を抑制した結果、眼炎症が重症化する傾向が見られた。FR4を発現している制御性T細胞が眼炎症を抑制的に機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this investigation was to make clear the role and function of regulatory T cells (Treg) expressing folate receptor 4 (FR4) which was recently known as a new marker of Tregs, on experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) which is an animal model of human uveitis. As suppression of Tregs by administration of anti-FR4 antibody in EAU mouse, the severity of EAU tended to be increased. This result suggested that Tregs expressing FR4 had a role to suppress intraocular inflammations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：ぶどう膜炎、調節性T細胞

1. 研究開始当初の背景

（1）難病指定されているベーチェット病をはじめとするぶどう膜炎は、ステロイド薬や免疫抑制薬を用いても失明を回避できない場合や、それらの副作用のために治療を中断せざるを得ない場合がある。そのため新たな治療法の実現が必要である。ヒトぶどう膜炎の動物モデルは実験的自己免疫性ぶどう膜

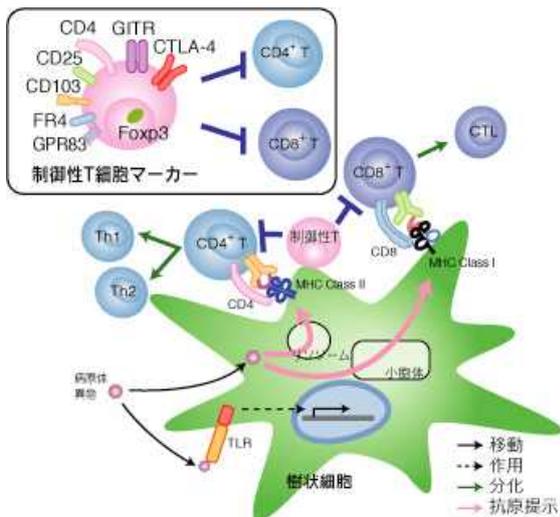
網膜炎（EAU）とよばれ、マウスで惹起できる抗原は世の中に3つしかないが、そのうち一つは我々の研究グループが発見・同定したものである（Namba K et al: Clin Exp Immunol, 1998, Namba K et al: J Immunol 2000）。当研究開始当初、我々の研究グループはオステオポンチンという骨由来の蛋白を介した新しいぶどう膜炎の制御系を解明し（Kitamura

M et al: J Immunol, 2007)、かつマウス生体内に投与して遺伝子サイレンシングを可能とする siRNA を開発し、EAU の軽症化に成功した (Iwata D et al: Exp Eye Res, In press)。また NF- κ B 阻害薬の開発・応用にも務め、安全性の極めて高い有効な結果を得た (Iwata D et al: Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010)。

(2) ①健康者の末梢血中の CD4 陽性 T 細胞は外来抗原に対し免疫反応を惹起する重要な細胞であるが、その中に免疫反応を抑制・制御する制御性 T 細胞 (Treg) が存在することが明らかとなっていた。これは CD25 を発現していることから「CD4 陽性 CD25 陽性 Treg」と呼ばれ、この Treg の機能低下、数の減少が多く自己免疫疾患に関与していることが示されている。また、Treg が腫瘍免疫を抑制的に働いていることも示唆されている。

②我々の研究グループでも Treg がぶどう膜炎の消炎や再発抑制に重要な役割を果たしていることを明らかにしていた。

(3) Treg のマーカーにはマスター遺伝子である転写因子 Foxp3 があるが、表面マーカーには下図に示すように多数の受容体が存在することが報告されている。Treg 制御によるぶどう膜炎に対する介入は Foxp3 分子導入 Treg 細胞により (EAU) の発症が抑制されることが示されているが (Keino H et al: Br J Ophthalmol, 2007)、4 型葉酸受容体 (FR4) や Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein (GITR) といった新しい分子標的の影響は不明である。



2. 研究の目的

本研究では EAU における FR4, GITR 分子の発現について明らかにするとともに、実験的自家免疫性ぶどう膜炎 (EAU) を用いて Treg を生体内でノックダウンする介入実験を行い EAU 発症における Treg の関与を明らかにする。

3. 研究の方法

EAU は C57BL/6 マウスに視細胞間レチノイド結合蛋白由来ペプチド IRBPp1-20 と完全フロイドアジュバント (CFA) のエマルジョンを皮下注射した後に、追加免疫として百日咳菌毒素を腹腔内投与することにより誘導した。免疫から 7-10 日後に EAU が発症し、約 21 日後に炎症のピークに達するモデルである。

(1) Treg を抑制する抗体として、抗 GITR 抗体である DTA-1 と抗 FR4 抗体である TH6 を用意した。どちらか一方の抗体を、EAU 免疫日 (day0) に 100 μ g 静脈注射し、コントロール群には rat IgG2bk を注射した。EAU 重症度は day12 から経時的にマウスの眼底を観察し、臨床スコアを既報に則って評価した。また、day42 に安楽死させ眼球を摘出し、組織病理学的に EAU 重症度を評価した。

(2) DTA-1、TH6 の投与量を増量して実験をおこなうため、両抗体の産生能を持つ B 細胞ハイブリドーマを大阪大学免疫学フロンティア研究センター・実験免疫学講座・坂口志文教授から分与していただいた。ハイブリドーマ細胞を培養し安定して抗体が精製できるようになり、その培養上清から抗体を生成した。両抗体 DTA-1、TH6 の投与量をそれぞれ 400 μ g、200 μ g と増量し、かつ、抗体投与日を EAU 免疫日から day0, 3, 7, 10 と 4 回に増やして抗体投与実験を再度行った。EAU 重症度評価は①と同様に眼底を観察し臨床スコアをつけることで行った。

4. 研究成果

(1) EAU 免疫日に 2 種類の Treg 抑制抗体を投与し、day12 から day42 まで経時的に EAU 臨床スコアをつけた。いずれの時点でもコントロール群と 2 種類の抗体投与群とで EAU の臨床スコアに差はみられなかった (図 1)。また、day42 での組織病学的スコアにもコントロール群と 2 種類の抗体投与群とで差は見られなかった (図 2A, B)。この結果から抗体投与量の増量、投与時期の調整が必要と考えられた。

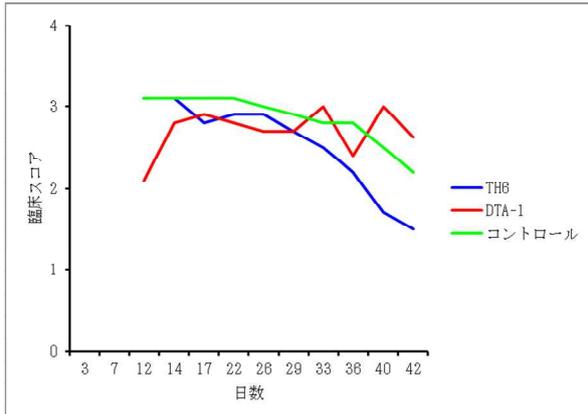


図1 Treg抑制抗体によるマウスEAUの抑制
抗GITR抗体(DTA-1)および抗FR4抗体(TH6)をEAU免疫日にそれぞれ100 μ g静脈注射し、経時的にマウス眼底の臨床スコアを評価した。コントロール群と抗体投与群との間に有意な差は見られなかった。

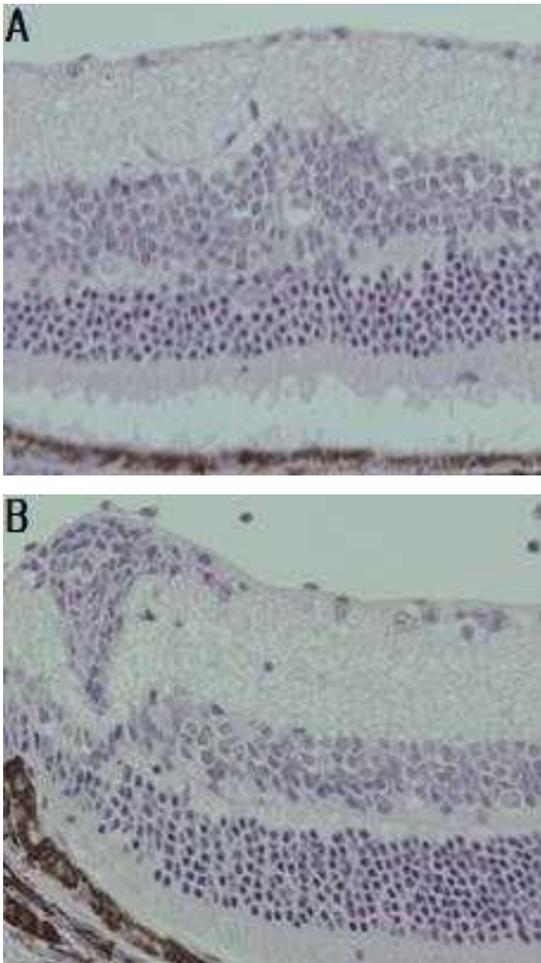


図2 摘出した眼球の網膜組織 HE 染色 (Day42)

FR4投与群(A)およびコントロール群(B)において炎症細胞浸潤、肉芽形成が同程度にみられ、EAU組織スコアに有意な差はみられなかった。

(2) 2種類のB細胞ハイブリドーマを入手し、両抗体(DTA-1、TH6)を精製した。EAU免疫日からday0, 3, 7, 10の4回いずれかの抗体をそれぞれ400 μ g、200 μ gを投与した。TH6投与群はコントロール群に比べeday11で臨床スコアが高く、eday21で低い傾向がみられた(図3)。DTA-1投与群については、原因は不明だが途中で眼底の観察ができなくなり、実験の中断を余儀なくされた。

これらの結果は抗FR4抗体投与によりTregが抑制され眼内の炎症が強くなること、また、抗体の投与中止後はTregが抑制されず抑制的に機能するようになったため、EAUが軽微化したものと考えて矛盾のないものであった。このことから、我々の仮説どおりFR4陽性TregがEAUを抑制的に機能していることが示唆された。

今後は抗GITR抗体による抑制実験をすすめるほか、Foxp3との関連性について、眼内でのTregの動態について免疫染色をおこなうなど、ぶどう膜炎でのTreg機能について研究を重ねていきたい。

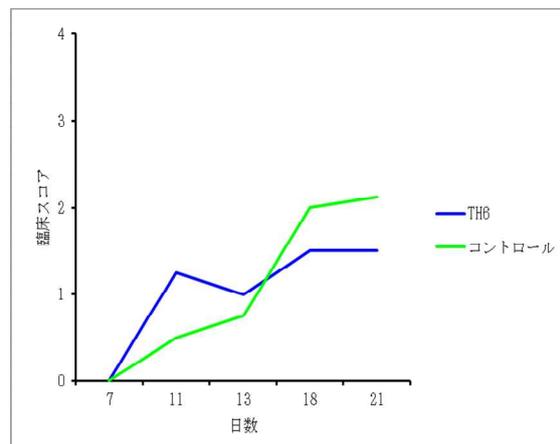


図3 抗体増量によるTreg抑制抗体によるマウスEAUの抑制

抗FR4抗体(TH6)投与量を200 μ gと増量し、かつEAU免疫日からday0, 3, 7, 10の4回投与したところ、コントロール群に比べてTH6投与群ではeday11にEAUが増悪していた。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀江 幸弘 (HORIE YUKIHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号：80547183

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：