

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791971

研究課題名（和文）インフリキシマブ治療によるベーチェット病網膜ぶどう膜炎患者の T 細胞抑制機序の解析

研究課題名（英文）Mechanisms of immune suppression for activated T cells by infliximab therapy in patients with Behçet's uveoretinitis.

研究代表者

川口 龍史（KAWAGUCHI TATSUSHI）

東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90376707

研究成果の概要（和文）：

ベーチェット病（BD）ぶどう膜炎では Th1 細胞や Th17 細胞が病態に関与していると考えられているが、近年自己免疫疾患に関与する細胞集団として新たに Th22 細胞の存在が報告された。我々は本研究において、活動性 BD ぶどう膜炎眼局所から T 細胞クローンを樹立し、これらが IL-22 や TNF- $\alpha$  などの Th22 に関連するサイトカインを産生することを解明した。また、BD 患者末梢血の CD4 陽性 T 細胞から Th22 細胞を誘導し、抗 TNF- $\alpha$  抗体であるインフリキシマブを添加したところ、IL-22 の産生能が有意に低下していた。一方、BD の動物モデルであるマウス実験ぶどう膜炎（EAU）において、眼局所の CD4 陽性 T 細胞に Th22 細胞が存在し、これらは網膜抗原である IRBP の存在下で IL-22 を産生することが判明した。これらの実験結果から、BD ぶどう膜炎の眼内炎症の病態に Th22 細胞が関与している可能性が示唆された。また、BD ぶどう膜炎にインフリキシマブが効果的である理由の一つに、Th22 細胞の抑制があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Previous studies suggested that the intraocular inflammation in Behçet's disease (BD) is predominated by Th1 and Th17 immune responses. Recently, Th22 cells were identified as a novel Th lineage associated with autoimmune diseases. We showed that Th22-type T cell clones established from ocular samples from patients with BD produced large amounts of Th22 associated cytokines IL-22 and TNF- $\alpha$ . CD4+ T cells from PBMCs of BD patients differentiated into Th22 cells. Th22 cells exposed to infliximab, anti-TNF- $\alpha$  antibody, in vitro failed to produce IL-22. Moreover, Th22 cells were isolated from mice with experimental autoimmune uveitis (EAU), an animal model of BD, and intraocular T cells from EAU produced large amounts of IL-22 in the presence of retinal antigens. These results suggest that Th22 cells may play a key role in the ocular inflammation in BD. Suppression of Th22 cells by infliximab may protect uveitis patients with BD from severe ocular inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：眼免疫学、ぶどう膜炎、ベーチェット病、T 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ベーチェット病 (BD) ぶどう膜炎患者の眼局所には、T 細胞、B 細胞、好中球などの多数の免疫担当細胞が浸潤して眼内炎症の病態に関与しているが、その中でも特に T 細胞は重要な役割を担っていると考えられている。これらの免疫担当細胞が産生するサイトカインは、TNF- $\alpha$  を中心に IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-17 などの炎症性サイトカイン/ケモカインがあり、これらがベーチェット病網膜ぶどう膜炎の病態に関与している (Sagawa et al, Ocul Immunol Inflamm, 1995; Hamzaoui et al, Scand J Rheumatol, 2002)。ベーチェット病ぶどう膜炎のマウスモデルとされている、実験的自己免疫ぶどう膜炎 (experimental autoimmune uveitis; EAU) には、CD4 陽性 T 細胞、特に IFN- $\gamma$  産生の Th1 細胞、および IL-17 産生の Th17 細胞が眼内に浸潤し、炎症の中心的役割を担っている。(Yoshimura et al, Int Immunol, 2008) この Th1 細胞や Th17 細胞は TNF- $\alpha$  を産生し、また TNF- $\alpha$  がこれらの細胞の分化にも関与していると考えられている。(Korn et al, Annu. Rev. Immunol, 2009)。一方、Th1 や Th17 とは異なる細胞集団である Th22 細胞の存在が近年報告され、BD の病態にも関与している可能性が考えられる。我々は、以前、活動性ベーチェット病網膜ぶどう膜炎患者の眼局所浸潤細胞から T 細胞クローンを樹立することに成功し、その眼局所 effector T cells の機能解析を行ってきた (Sagawa et al, Ocul Immunol Inflamm, 1995)。

近年ベーチェット病ぶどう膜炎に対する新しい治療として、抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体であるインフリキシマブが日本で認可され、実際の臨床で使用されるようになった。我々は、既存の治療に抵抗した本疾患の難治性網膜ぶどう膜炎患者に対し、インフリキシマブを投与したところ良好な結果が得られた事を報告した。(Ohno et al, J Rheumatol. 2004, Yamada et al, Br J Ophthalmol. 2009 and 2010; Kawaguchi et al, J Ocul Pharmacol Ther, 2010)。他の薬剤では眼炎症発作がコントロールできないような患者でも強い抑制効果が見られ、現在では本疾患の難治性網膜ぶどう膜炎患者に対し、最も有効な薬剤の一つになっている。しかしながら、その抑制作用機序の詳細は現在のところ解明されていない。

## 2. 研究の目的

ベーチェット病は本邦におけるぶどう膜炎の代表疾患であり、眼内炎症性疾患の中では失明にいたる原因として第一位である。本疾患における、全身および眼局所での炎症性 T 細胞の特徴を調べ、それらの炎症の活動性を比較することや、インフリキシマブによる影

響が解析できれば、本疾患の病態解明に大きく貢献することが予測される。特に、本疾患では眼炎症発作を繰り返す難症例において、有効な治療法は確立されたとはいえず、本研究における成果が臨床応用に重要な役割を果たす可能性がある。本研究では、ベーチェット病ぶどう膜炎の炎症機序を解明することを目的とし、Th22 細胞の炎症への関与と、インフリキシマブの T 細胞抑制効果について解析する。具体的には、(1) 活動性ベーチェット病患者において、眼局所の炎症に Th22 細胞が関与しているか、(2) インフリキシマブを作用させた場合、血清中および眼内液中の炎症性サイトカイン、特に Th22 細胞に関連するサイトカインにどのような変化がみられるか、(3) BD の動物モデルであるマウス EAU において、Th22 細胞が眼内炎症に関与しているか、などを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) BD ぶどう膜炎患者の T 細胞における Th22 関連サイトカインの測定。

活動性 BD ぶどう膜炎眼局所より CD4 陽性 T 細胞クローンを限界希釈法にて樹立する。BD 末梢血の CD4 陽性 T 細胞から TNF- $\alpha$ 、IL-6 ヒトリコンビナント蛋白を用いて Th22 細胞株を誘導する。Th22 サイトカイン (IL-22, TNF- $\alpha$ ) は ELISA および Flow cytometry で測定する。

(2) BD Th22 細胞に対するインフリキシマブの抑制効果の解析。

BD Th22 細胞に抗 TNF- $\alpha$  抗体インフリキシマブを添加して、Th22 サイトカイン産生に変化があるか検討する。コントロールには健常人末梢血の CD4 陽性 T 細胞から同様の方法で Th22 細胞株を誘導し、BD 由来 Th22 と比較する。また、インフリキシマブ治療中の BD 患者と未治療の患者から樹立した TCC において、IL-22 の産生能に差があるか比較検討する。

(3) 実験的自己免疫ぶどう膜炎における Th22 細胞の関与とインフリキシマブの抑制効果の解析。

網膜抗原である IRBP の免疫により EAU を誘導し、day14 と day21 における眼組織と脾臓における Th22 細胞の有無を確認する。眼組織から採取した T 細胞が、IRBP の存在下で IL-22 を産生するか ELISA で測定する。また、Th22 細胞が EAU の病態に関与しているかを調べるため、IRBP の免疫から day0, 1, 3, 5, 7 において抗 IL-22 抗体、抗 TNF- $\alpha$  抗体を投与し、day14, 21 における EAU の炎症所見を眼底所見と病理組織から評価する。

## 4. 研究成果

(1) 活動性 BD ぶどう膜炎眼局所より樹立した Th22-type T 細胞クローン (TCC) では、健常人の TCC と比較して、IL-22 や TNF- $\alpha$  な

どの Th22 サイトカインの産生が有意に高かった。また、活動性 BD ぶどう膜炎の末梢血における CD4 陽性 T 細胞においても、健常人と比較して、Th22 サイトカインの発現が有意に高かった。それに加え、BD 末梢血の CD4 陽性 T 細胞から誘導した Th22 細胞株では、健常人と比較して Th22 サイトカインの産生が有意に高かった。これらの結果から、BD ぶどう膜炎の眼局所には Th22 細胞が含まれ、IL-22 と Th22 細胞は BD ぶどう膜炎に関与していることが示唆された。

(2) 活動性 BD ぶどう膜炎から誘導した Th22 に *in vitro* でインフリキシマブを作用させると、IL-22 の産生能は有意に抑制された。また、インフリキシマブは、BD ぶどう膜炎の眼局所から樹立した TCC に対しても、同様の抑制効果を示した。

(3) EAU マウスにおいて、IRBP で免疫してから day14, 21 の眼組織では、CD4 陽性 IL-22 陽性の Th22 細胞が有意に存在していたが、脾細胞ではわずかであった。また、EAU から分離した Th22 細胞、とりわけ眼組織から分離した Th22 細胞は、*in vitro* において IRBP の存在下で有意に多くの IL-22 を産生した。EAU の afferent phase において IL-22 と TNF- $\alpha$  の中和抗体を投与したところ、眼内炎症が有意に抑制された。

これらの結果から、炎症性サイトカインである IL-22 は BD ぶどう膜炎の炎症を増悪させる作用があること、TNF- $\alpha$  は BD において Th22 の誘導を促進することが示された。IL-22 と TNF- $\alpha$  を産生する Th22 は、BD において Th1 や Th17 とは異なるエフェクター細胞の役割を持ち、眼内炎症の病態に関与している可能性が示唆された。BD ぶどう膜炎にインフリキシマブが効果的な理由の一つに Th22 細胞抑制があると考えられた。

ベーチェット病ぶどう膜炎は、日本を中心とした東アジア地域や、トルコ、イタリアなどの地中海沿岸地域など、世界の一部の地域のみで見られる。そのために、本疾患における眼内炎症の病態解明は世界中をみても十分に進んでおらず、日本やトルコのグループが研究の最先端を担っているという事実がある。本研究から、ベーチェット病ぶどう膜炎の病態に Th22 細胞が関与していることが示され、インフリキシマブの影響について解明が進歩した。これは国内のみならず海外でもなされていない研究であり、本疾患の治療法を確立するために重要な研究成果であるといえる。

## 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 1 件)

Sugita S, Kawazoe Y, Imai A, Kawaguchi T, Horie S, Keino H, Takahashi M, Mochizuki M.

Role of IL-22- and TNF- $\alpha$ -Producing Th22 Cells in Uveitis Patients with Behcet's Disease.

*J Immunol.* 2013; 190(11):5799-808

[学会発表] (計 3 件)

### ① 川口龍史

Vogt - 小柳 - 原田病の ICG 蛍光眼底造影所見. 第 115 回日本眼科学会総会, 2011. 5. 15, 東京.

### ② Kawaguchi T, Iwasaki Y, Kanda S, Sugita S, Mochizuki M.

Clinical course of patients with Behçet's uveoretinitis that discontinued infliximab therapy. Association for Research in Vision and Ophthalmology 2012 Annual Meeting, 2012. 5. 10, Fort Lauderdale, FL, USA.

### ③ 川添裕子, 杉田 直, 今井彩乃, 堀江真太郎, 高瀬 博, 望月 學.

ベーチェット病ぶどう膜炎の Th22 細胞の関与. 第 46 回日本眼炎症学会, 2012. 7. 15, 横浜.

[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

川口 龍史 (TATSUSHI KAWAGUCHI)

東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90376707