

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791859

研究課題名(和文) IL-10産生性制御性T細胞を用いた新しい眼炎症治療戦略

研究課題名(英文) Therapeutic potential of IL-10 producing regulatory T cells for refractory ocular inflammatory diseases

研究代表者

吉村 武 (Yoshimura, Takeru)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：40625802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：(1)実験的自己免疫性ぶどう膜炎を誘導したマウス網膜には、CD4陽性IL-10産生細胞の浸潤が確認された。IL-27は炎症各期のTh17を直接制御する一方、IL-35は炎症後期にCD4陽性T細胞からIFN- $\gamma$ を発現させ、Th1を介する炎症抑制機構に関与する可能性が示唆された。(2)IL-27/IL-35共通のサブユニットであるEBI3は炎症の初期にはTh1反応を惹起する作用があり、炎症後期(回復期)ではTh1およびTh17を減弱させる作用があることが示唆された。併せてEBI3はFoxp3陽性制御性T細胞には影響を及ぼさず、IL-10産生T細胞を増加させることで炎症を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：(1)Inflamed retina contains CD4-positive IL-10 producing cells. While IL-27 regulates Th17 infiltration, IL-35 suggested to produce IFN- $\gamma$  from CD4-positive cells, which leads to Th1-induced anti-inflammatory mechanism. (2) EBI3, a subunit of IL-27/IL-35, induces Th1 response and CD4-positive IL-10 producing cells upon initial inflammation, which in turn inhibits Th1/Th17 response on late inflammatory phase presumably by increasing CD4-positive IL-10 producing cells.

研究分野：免疫学

キーワード：眼科学 免疫学

1. 研究開始当初の背景

これまで研究代表者らは、interleukin-12(IL-12)関連サイトカインIL-27の抗炎症作用につき解析してきた。そのメカニズムとして、IL-27はIL-10産生制御性T細胞Tr1(T regulatory 1)を分化させることが明らかとなってきた。本研究では、主に実験的ぶどう膜網膜炎 (Experimental Autoimmune Uveoretinitis, EAU) の動物モデルを用いてまずTr1の浸潤を確認する。その後1) IL-27を投与のうえTr1の増殖を図ること、また2) 効率的に抗原提示細胞よりIL-27を産生させる方法を確立し同細胞群を移入すること、以上により眼炎症疾患におけるTr1細胞の関与を解明し、新たな治療戦略の提示をめざす。

研究の学術的背景

Behçet病やVogt-小柳-原田病、サルコイドーシスを代表とするぶどう膜炎は、青壮年 (working age) の中途失明原因の原因となり眼科領域では最も重篤な疾患の一つである。

治療にはステロイドやコルヒチン・シクロスポリンなどの免疫抑制剤の長期間の投与が必要となることが多いが、全身の副作用などがしばしば問題となる。近年抗TNF-療法 (infliximab, adalimumab, etanercept) や抗IL-1療法 (anakinra) などの生物製剤が用いられるようになり、有効な成績を収めるようになってきた。しかし易感染性や“二次無効”(同製剤そのものへの抗体が形成され治療に抵抗する状態に陥ること) 等がしばしば問題となる。

【Th17について】

エフェクターヘルパーT細胞はTh1, Th2がよく知られており、それぞれIL-12, IL-4によって誘導される。2006年にIL-17を産生するTh17という新たなヘルパーT細胞集団が発見され、自己免疫疾患や細菌感染、腫瘍免疫に重要であることが次々と報告されてきた。

研究代表者らはTh17の眼炎症に対する寄与につき、これまでEAUを用いて解析してきた。一連の解析で得られた結果は以下の通りである。

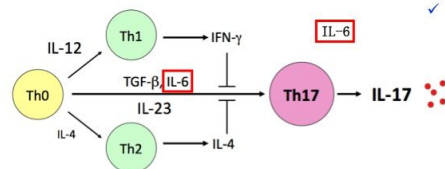
1) in vitroで網膜抗原(IRBP)特異的なTh17細胞を作成し、無処置のマウスに移入することによりEAUを誘導しうること。2) IL-17遺伝子欠損 (knockout, KO) マウスはTh1反応は正常に誘導されEAUを惹起するが、後期のみ炎症を抑えること (Yoshimura et al., Int Immunol 2008)。3) Th17誘導に必須であるIL-6, IL-23それぞれのKOマウスはEAUの炎症を抑制すること。4) C57BL/6(wild type, WT)野生型マウスにEAUを誘導しIL-6R中和抗体を投与することにより、眼炎症反応を抑制すること (Yoshimura T et al., Rheumatology 2009)。  
以上より、眼炎症はTh17をターゲットとする治療が有効であることが強く示唆された。

【IL-27について】

IL-27はIL-12サイトカインファミリーの一部で、Epstein-Barr virus (EBV)-induced gene 3 (EBI3)とIL-27p28の2つのサブユニットから構成される。当初は、初期Th1分化を促進する proinflammatory cytokineとして認識されていた。WSX-1(IL-27レセプター)欠損マウス (WSX-1KO)を用いて解析したところ、WSX-1KOはWTマウスに比べて眼炎症の発症が遅れることが判明し、proinflammatoryであるIL-27の性格を裏付けることとなった (Sonoda KH, Yoshimura T., et al. Int Immunol 2007)。

EAUの解析より

- IL-27R block (Th1誘導障害) ✓ 初期のみ抑制
- IL-17 block: Th17(+) ✓ 発症
- IL-6 block: Th17 ↓, Th17由来IL-6 (-), 他の細胞由来IL-6 (-) ✓ 抑制
- IL-23 block: Th17 ↓ ✓ 抑制



研究代表者らは、IL-27は初期にはTh1を誘導しIL-27はIL-23により誘導されたIL-17産生細胞のサイトカイン産生を抑制することを見出した

(Yoshimura T, et al. J Immunol 2006)。以上の結果、IL-27はT細胞分化初期ではproinflammatoryである一方、後期・慢性期炎症ではTh17を抑制しanti-inflammatoryに働く2面性をもったユニークなサイトカインであると考えられた。

#### 【Tr1について】

転写因子Foxp3に変異があるマウス“scurfy”またはヒト(IPEX症候群)は様々な自己免疫疾患を発症することが報告されている。Foxp3を発現する制御性T細胞は、主にTGF- $\beta$ を介して免疫反応を抑制することが知られている。Foxp3非発現性IL-10産生性の抑制性T細胞はTr1として長くその存在を知られており、当初はIL-10存在下でT細胞を活性化することにより分化すると考えられていた。しかし最近になりTr1の分化にはIL-10でなくIL-27が必須であることが報告され、IL-27の免疫抑制作用に対する解析が進みつつある。

#### 2. 研究の目的

- (1) 眼炎症におけるIL-27とTr1の意義を明らかにし、それらを用いて新しい眼炎症治療戦略の提示を目指す。今回同じIL-12関連サイトカインであるIL-35も解析対象とした。
- (2) IL-12関連サイトカインファミリーのIL-27およびIL-35に共通するサブユニットであるEBI3(Epstein-Barr virus-induced gene 3)に着目し、EAUのモデルを用いて炎症動態につき解析を行う。

#### 3. 研究の方法

- (1) 6週齢のC57BL/6マウスに

Interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP)および Complete Freund's Adjuvant (CFA)を用いてEAUを誘導後0, 7, 14, 21日目に所属リンパ節および脾臓を摘出し磁気ビーズシステムを用いてCD4陽性T細胞を精製。細胞内染色フローサイトメトリーを用いてCD4陽性IL-10産生細胞の存在について解析を行った。抗CD3抗体

およびIRBP刺激下でMMC処理後脾細胞と共にリコンビナントIL-27(rIL-27)およびrIL-35を添加し、IFN- $\gamma$ 、IL-17産生を3日後にELISAで、7日後に細胞内染色FACSを用いて検討した。また所属リンパ節CD4陽性T細胞の転写因子の発現をPCRにて検討した。

- (2) 野生型およびEBI3欠損マウスにEAUを誘導、臨床スコアおよび病理学的検討を行った。また所属リンパ節を採取し、CD4陽性分画のTh1/Th17分画およびFoxp3発現分画について検討した。

#### 4. 研究成果

- (1) 炎症時の所属リンパ節および網膜内浸潤IL-10産生CD4陽性T細胞の存在が確認できた。rIL-27はd0, d7のみIFN- $\gamma$ 発現を増加させた一方、EAU各期のIL-17産生を抑制した。rIL-35はEAU誘導後各期のIL-17産生に影響を及ぼさなかったが、炎症後期にIFN- $\gamma$ の発現を増加させた。またEAU各期の所属リンパ節・脾臓においてrIL-27はTh1特異的転写因子(T-bet)の発現上昇およびTh17特異的転写因子(ROR $\gamma$ t)の発現減弱をみたが、rIL-35はT-bet, ROR $\gamma$ tの発現は不変であった。IL-27は炎症各期のTh17を直接制御する一方、IL-35は炎症後期にCD4陽性T細胞からIFN- $\gamma$ を発現させ、Th1を介する炎症抑制機構に関与する可能性が示唆された。

- (2) 実験的自己免疫性ぶどう膜炎の炎症初期ではEBI3欠損マウスでは野生型に比し臨床スコアの減弱がみられ、併せて網膜浸潤細胞の減少が観察された。また同時期にEBI3欠損マウスのCD4陽性T細胞においてTh1反応とIL-10産生細胞の減弱がみられた。炎症後期のCD4陽性細胞においてはTh1反応とIL-10陽性細胞の回復およびTh17細胞の増加がみられた。各期を通じてCD4陽性Foxp3陽性細胞数に変化はみられなかった。以上よりIL-27/IL-35共通の

サブユニットであるEBI3は炎症の初期にはTh1反応を惹起する作用があり、炎症後期(回復期)ではTh1およびTh17を減弱させる作用があることが示唆された。併せてEBI3はFoxp3陽性制御性T細胞には影響を及ぼさず、IL-10産生T細胞を増加させることで炎症を抑制する可能性が示唆された。

#### 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)

##### [雑誌論文] (計1件)

EBI3 is pivotal for the initiation of experimental autoimmune uveitis.

Takeda A, Hasegawa E, Fukuhara T, Hirakawa S, Yamada H, Yang Y, Yoshimura T, Hisatomi T, Oshima Y, Yoshida H, Sonoda KH, Ishibashi T.

Exp Eye Res. 2014 Aug;125:107-13.

##### [学会発表] (計4件)

平川 沙弥香、吉村 武、武田 篤信、大島 裕司、川野 庸一、石橋 達朗、実験的自己免疫性ぶどう膜炎におけるIL-27およびIL-35の役割、第118回日本眼科学会総会 2014年4月3日 東京都

IL-27の眼炎症治療効果についての検討

平川 沙弥香、吉村 武、楊 暘、石橋 達朗

第117回日本眼科学会総会 2013年4月4日 東京都

吉村 武、IL-27による自己免疫性ぶどう膜炎治療の可能性(シンポジウム/眼炎症に関する因子・遺伝子アップデート)、第117回日本眼科学会総会 2013年4月4日 東京都

吉村 武、今後ぶどう膜炎治療に期待される生物学的製剤(シンポジウム/今後ぶどう膜炎に期待される治療薬)、第67回日本臨床眼科学会、2013年11月2日 横浜市

[図書] (計3件)

吉村 武、中山書店、小児のぶどう膜炎(若年性特発性関節炎、間質性腎炎) 専門医のための眼科診療クオリファイ15 メディカルオフサルモロジー 眼薬物治療 のすべて(分担)、2012、235-238

吉村 武、実験的自己免疫性ぶどう膜炎の新たな展開 アレルギーの臨床(分担)、2012年3月号 427号、242-246

吉村 武、医学書院、コラム:実験的ぶどう膜炎、所見から考えるぶどう膜炎(分担)、2013年

[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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等 無し

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉村 武 (YOSHIMURA, Takeru)

研究者番号 : 40625802

(2)研究分担者 無し

( )

研究者番号 :

(3)連携研究者 無し

( )

研究者番号 :