

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462757

研究課題名(和文)自己免疫性眼炎症疾患における制御性T細胞の役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of regulatory T cells in autoimmune ocular inflammatory diseases

研究代表者

福島 敦樹 (FUKUSHIMA, Atsuki)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：40281737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：BALB/cヌードマウスの腎皮膜下にF344ラット胎児の胸腺を移植しておくともウスは免疫能を獲得する(TGヌードマウス)。制御性T細胞(Treg)の産生に必要なaire遺伝子の発現をラット由来の胸腺髄質の上皮細胞に認めた。このマウスの末梢には充分量のTregが存在するが、眼球等に多発性に自己免疫病が発症する。TGヌードマウスに自己免疫病が発症する前に正常マウスのTregを注射しておくとも、発病が予防できた。

研究成果の概要(英文)：When F344 embryonic rat thymus was transplanted beneath the renal capsule of BALB/c nude mice, the mice acquired the immunity of mouse origin. Autoimmune regulator (aire) gene was expressed in the rat thymic medullary epithelial cells, and enough regulatory T cells (Treg) presented in the periphery, however severe organ-localized autoimmune diseases developed. When Treg population of the normal mouse was injected before the symptoms of autoimmune diseases developed in TG nude mice, the onset of the diseases has been prevented.

研究分野：アレルギー・ぶどう膜炎

キーワード：胸腺 自己免疫病 制御性T細胞 aire遺伝子 ヌードマウス 自己抗体 網膜 涙腺

1. 研究開始当初の背景

臓器局在性の自己免疫病が自然発症するモデルマウス(TGヌードマウス)が開発されているが、このマウスではぶどう膜網膜炎、涙腺炎、角膜炎等の自己免疫性眼炎症疾患の発症も見られた。

2. 研究の目的

TGヌードマウスに発症する眼炎症の詳細や原因を検討するとともに、自己免疫性眼炎症疾患の治療に制御性T細胞(Treg)の投与が有効であるかを検討する。

3. 研究の方法

4週令のBALB/cヌードマウスの腎被膜下に、胎齢15日のF344ラットから採取した胸腺を移植する(TGヌードマウス)。血液を経時的に採取し、血中に自己抗体が出現するかを蛍光抗体間接法で検討する。そして眼球や涙腺は組織標本として、組織学的に検討する。また屠殺時に、脾リンパ球を採取して、表面抗原をFACSで検討する。また移植ラット胸腺の免疫組織化学も試みる。

眼炎症が自己免疫病であれば、リンパ球でもって病変を他のマウスにトランスファーすることができるので、ヌードマウスを用いて検討する。

TGヌードマウスに発症する病変が自己免疫病であれば、このマウスにおけるTregの状態を検討する。そしてTregが産生されるためには $air2$ 遺伝子の発現が必要であるが、その発現様式を免疫組織化学的に検討する。

TGヌードマウスに発症する病変が自己免疫病であれば、それを抑制するためにTregの投与を試みる。Tregは無処置のBALB/cマウスより採取する。Tregは病変を発症しているマウスや発症前のマウスに静注する。

TGヌードマウスのT細胞はラットの胸腺で教育されるので、Tregはラットの $air2$ 遺伝子の影響下で教育されている可能性が高く、ラット抗原に対して反応するTregが産生されている可能性がある。そこでマウスとラットの新生児から自己免疫病の標的臓器を採取し、TGヌードマウスの腎被膜下に移植し、炎症反応が生じるかを検討する。もしラットの移植臓器に炎症反応がなければ、TGヌードマウスにはラット抗原に対するTregが存在している可能性が高い。そこでラット臓器を移植したTGヌードマウスに抗CD25抗体(PC61)を投与し、Tregの削除を試みる。この処置により移植ラット臓器に炎症反応が認められれば、TGヌードマウスの末梢にはラット抗原に対するTregが存在していることになる。

4. 研究成果

TGヌードマウスに発症する病変

TGヌードマウスには甲状腺、胃、唾液腺、ハーダー腺、松果体、ぶどう膜、網膜(図1)、角膜、涙腺(図2)、副腎、卵巣、精巣、副

睾丸、前立腺等に炎症が発症した。そして血中にはこれらの臓器組織と反応する自己抗体が検出できた(図1)。

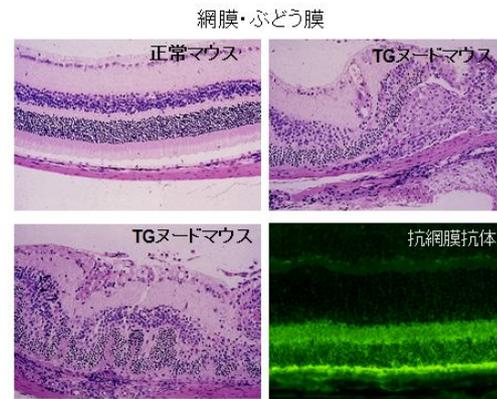


図1. TGヌードマウスに発症した網膜・ぶどう膜炎。激しいリンパ球の浸潤があり、組織構築の破壊が見られる。杆状体錐状体層と強く反応する自己抗体が検出できた。

TGヌードマウスの脾細胞による病変のトランスファー

網膜・ぶどう膜炎や涙腺炎を発症しているTGヌードマウスから脾リンパ球を回収し、ナイロンウールカラム法によりT細胞を回収する。さらに抗CD8抗体と補体でもってCD8陽性リンパ球を取り除いてCD4陽性リンパ球のみを回収する。このリンパ球をヌードマウスの腹腔内に注射し、病変がトランスファーできるかを検討した。2ヶ月後の組織学的な検索で、対象臓器にはドナーと同じ病変が確認できた。また血中にはそれぞれの組織と反応する自己抗体が確認できた。これによりTGヌードマウスに発症する病変は自己免疫病であることが明らかとなった。

TGヌードマウスの移植ラット胸腺におけるIa抗原と $air2$ 遺伝子の発現

TGヌードマウスの移植ラット胸腺の髄質部位におけるラットとマウスのIa抗原の発現を免疫組織化学的に検討した(図2)。赤色はラットIa抗原を示しており、ラット由来の胸腺上皮細胞である。緑色はマウスIa抗原を示しているが、この細胞はマウス由来の樹上細胞である。

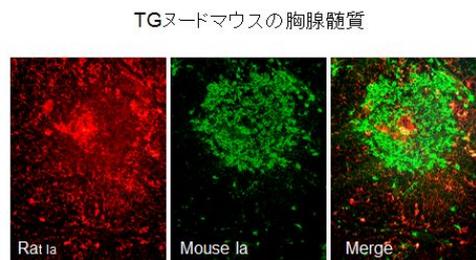


図2. TGヌードマウスの胸腺髄質におけるラットIa抗原とマウスIa抗原の発現

次に aire を発現している細胞がどこに存在しているかを免疫組織化学的に検討した。その結果ラット Ia 発現を発現している胸腺髄質上皮細胞の核に aire 遺伝子の発現が見られた(図3)。

TGヌードマウスの胸腺におけるラットIaとaireの発現

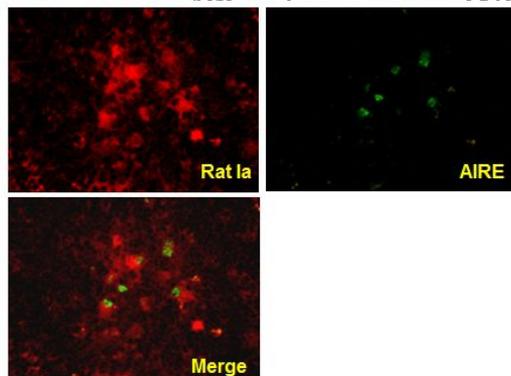


図3 .TGヌードマウスの胸腺髄質におけるラットIa抗原とaire遺伝子の発現。

TGヌードマウスにおけるTreg細胞の発現

TGヌードマウスの脾リンパ球を回収して、抗CD4抗体、抗CD25抗体と抗Foxp3抗体でそれぞれ2重染色し、FACSでTregの量を検討した。対照には正常BALB/cマウスを用いた。その結果TGヌードマウスにおいてはTregは正常マウス並みに存在した(図4)。

TGヌードマウスに正常BALB/cマウスのTregの投与

TGヌードマウスには十分量のTregが存在するが、しかしながら臓器局在性の自己免疫病が多発する。TGヌードマウスに存在するTregはラットのaire遺伝子の元で教育されたので、マウス抗原に対して反応するTregが存在しない可能性がある。そこで正常マウスの脾リンパ球から回収したTregをTGヌードマウスに投与することを試みた。

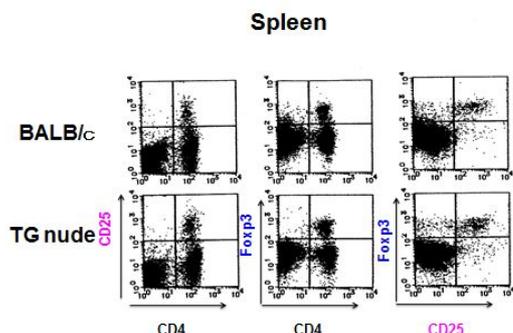


図4 .TGヌードマウスと正常BALB/cマウスの脾リンパ球におけるTregの存在

発病しているマウスにTreg(1×10⁶)を静注し、2か月後に病理学的に検索したが、病変は抑制できていなかった。一方、まだ自己免疫病が発症していないラットの胸腺を

移植した2週後にTregを静注しておいたマウスにおいては、病変の発症は予防できた。このことはTregは活性化しているエフェクターリンパ球を抑制するのは難しいが、抗原と出くわして活性化しようとしているリンパ球は抑制することができることを示している。

TGヌードマウスの腎被膜下へマウスとラットの臓器移植

TGヌードマウスに存在するTregがラット抗原に対して作用するようなリンパ球であるならば、ラット臓器に対しては障害反応は起こさないと考えられる。そこでマウスとラットの新生児から涙腺を摘出し、TGヌードマウスの腎被膜下に移植し、組織の状態を検討した。臓器移植1ヶ月後に臓器を回収し、組織標本とした(図5)。その結果マウス涙腺には激しいリンパ球浸潤があり、上皮細胞の破壊が見られた。一方、ラット涙腺にはリンパ球の浸潤もなく、正常な組織構築が見られた。

ラット涙腺 マウス涙腺

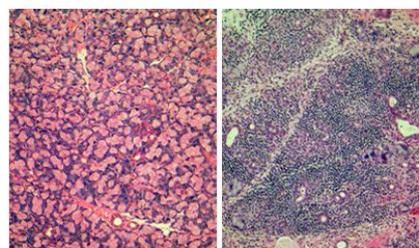


図5 .TGヌードマウスの腎被膜下に移植したラットとマウスの涙腺

そこで次にTGヌードマウスにラットの涙腺を移植した後で、抗CD25抗体(PC61)を腹腔内投与し、Tregの削除を試みた。この処置をしておくとも移植ラット涙腺には激しいリンパ球の浸潤があり、組織破壊が見られた。これらの結果からTGヌードマウスに存在するTregはラット抗原を守るように働く、Tregであることが、伺えた。

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21件)

Todaya H, Higuchi T, Yagyu K, Sugiyama Y, Yamaguchi F, Morisawa K, Ono M, Fukushima A, Tsuda M, Taniguchi T, Sakamoto S. Overexpression of NF90-NF45 represses myogenic microRNA biogenesis, developing skeletal muscle atrophy and centronuclear muscle fibers. Mol Cell Biol, 35(13): 2295-2308, 2015
査読有 doi: 10.1128/MCB.01297-14.

Inokawa S, Watanabe T, Keino H, Sato Y, Hirakata A, Okada AA, Fukuda K, Fukushima A, Umezawa K. Dehydroxymethylepoxyquinomicin, novel nuclear factor- B inhibitor, reduces chemokines and adhesion molecule expression induced by IL-1 in human corneal fibroblasts. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 253(4): 557-563, 2015 査読有 doi: 10.1007/s00417-014-2879-9.

Fukuda K, Ishida W, Harada Y, Wakasa Y, Takagi H, Takaiwa F, Fukushima A. Prevention of allergic conjunctivitis in mice by a rice-based edible vaccine containing modified Japanese cedar pollen allergens. *Br J Ophthalmol*. 99(5): 705-709, 2015 査読有 doi: 10.1136/bjophthalmol-2014-305842.

Asada Y, Nakae S, Ishida W, Hori K, Sugita J, Sudo K, Fukuda K, Fukushima A, Suto H, Murakami A, Saito H, Ebihara N, Matsuda A. Roles of epithelial cell derived type 2 initiating cytokines in experimental allergic conjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56(9): 5194-5202, 2015 査読有 doi: 10.1167/iovs.15-16563.

Tanihara H, Inoue T, Yamamoto T, Kuwayama Y, Abe H, Fukushima A, Suganami H, Araie M, for the K-115 Clinical Study Group. One-Year Clinical Evaluation of 0.4% Ripasudil (K-115) in Patients with Open-Angle Glaucoma and Ocular Hypertension. *Acta Ophthalmologica*, 94(1): e26-34, 2016 査読有 doi: 10.1111/aos.12829.

三浦 悠作、笠井 真央、福田 憲、高橋 利幸、福島 敦樹、高知大学附属病院眼科における視神経炎の治療の検討、*臨眼* 69(4): 541-545, 2015 査読有 <http://medicalfinder.jp/doi/pdf/10.1147/7/mf.1410211302>

福島 敦樹、眼科アレルギー診療 編集企画にあたって・・・、*OCULISTA* 24: 1, 2015 査読無 <http://www.zenniti.com/f/b/show/b01/708/zc01/9.html>

福島 敦樹、アレルギー性結膜疾患の難治症例 総論、*NANO OPHTHALMOLOGY* 47: 2, 2015 査読無

福島 敦樹、日本眼科アレルギー研究会 Special Interest Group Meeting (SIG)報告、*臨眼* 69(3): 368-369, 2015 査読無

<http://medicalfinder.jp/doi/pdf/10.1147/7/mf.1410211260>

福島 敦樹、特集 / アレルギー性結膜疾患アップデート . 結膜充血の定量的評価、アレルギー・免疫 22(5): 666-672, 2015 査読無 https://www.iyaku-j.com/iyakuj/system/M2-1/summary_viewer.php?trgid=29796

福島 敦樹、アレルギー性結膜疾患 - アトピーに伴うもの以外 -、別冊 *B I O C l i n i c a* 慢性炎症と疾患 眼疾患と炎症 4(3): 32-37, 2015 査読無

福島 敦樹、ぶどう膜炎の病型別分類：疫学調査から学ぶこと、*日本眼科学会雑誌* 119(10): 667-669, 2015 査読有 <http://journal.nichigan.or.jp/PastContent?year=2015&vol=119&number=10&mag=0>

Ishida W, Harada Y, Fukuda K, Taguchi O, Yagita H, Fukushima A. Inhibition of very late antigen-4 and leukocyte function-associated antigen-1 in experimental autoimmune uveoretinitis. *Clin Immunol*, 153(1): 136-144, 2014. 査読有 doi: 10.1016/j.clim.2014.04.009.

Fukuda K, Ishida W, Tanaka H, Harada Y, Fukushima A. Inhibition by rebamipide of cytokine- or lipopolysaccharide-induced chemokine synthesis in human corneal fibroblasts. *Br J Ophthalmol*, 98(12): 1751-1755, 2014. 査読有 doi: 10.1136/bjophthalmol-2014-305425.

Ishida W, Fukuda K, Harada Y, Yagita H, Fukushima A. Oral immunotherapy for allergic conjunctivitis. *Cornea*. 33 Suppl 11: S32-36, 2014. 査読有 doi: 10.1097/ICO.0000000000000241.

福島 敦樹、ぶどう膜炎：アレルギーが関与する眼疾患。アレルギーと眼疾患、アレルギーの臨床、34(13):1138, 2014 査読無

Ishida W, Fukuda K, Harada Y, Sumi T, Taguchi O, Tsuda M, Yagita H, Fukushima A. Oral administration of Ag suppresses Ag-induced allergic conjunctivitis in mice: critical timing and dose of Ag. *Br J Ophthalmol*, 97(4): 492-497, 2013. 査読有 doi: 10.1136/bjophthalmol-2012-302639.

Taguchi O, Tsujimura K, Kontani K, Harada Y, Nomura S, Ikeda H, Morita A, Sugiura H, Hayashi N, Yatabe Y, Seto M, Tatematsu M, Takahashi T, Fukushima A. Behavior of bone marrow-derived cells

following in vivo transplantation: differentiation into stromal cells with roles in organ maintenance. Am J Pathol, 182(4): 1255-1262, 2013. 査読有
doi: 10.1016/j.ajpath.2012.12.034.

Tanaka H, Fukuda K, Ishida W, Harada Y, Sumi T, Fukushima A. Rebamipide increases barrier function and attenuates TNF- α -induced barrier disruption and cytokine expression in human corneal epithelial cells. Br J Ophthalmol, 97(7): 912-916, 2013. 査読有
doi: 10.1136/bjophthalmol-2012-302868.

Fukuda K, Ishida W, Tanaka H, Harada Y, Matsuda A, Ebihara N, Fukushima A. Alarmins from corneal epithelial cells up-regulate CCL11 and VCAM-1 in corneal fibroblasts. Invest Ophthalmol Vis Sci, 54(8):5817-5823, 2013. 査読有
doi: 10.1167/iovs.13-11969.

21 Harada Y, Ishida W, Fukuda K, Sumi T, Kawakita T, Taguchi O, Fukushima A. Identification of keratocyte-like cells differentiated from circulating bone marrow-derived cells in the mouse cornea. Med Mol Morphol, 46(4):233-238, 2013. 査読有
doi: 10.1007/s00795-013-0031-2.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

福島 敦樹 (FUKUSHIMA, Atsuki)
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部
門・教授
研究者番号：40281737

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：