

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462696

研究課題名(和文)硝子体による眼内免疫寛容の作用機構の解明

研究課題名(英文) Capability of vitreous fluid to enhance TGF-beta-induced Foxp3+ regulatory T cell conversion

研究代表者

慶野 博 (Keino, Hiroshi)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：90328211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では硝子体による免疫制御機構、特にCD4+Foxp3+制御性T細胞の誘導作用について検討を行った。その結果、in vitroにて抗CD3抗体、抗CD28抗体で刺激培養したCD4+T細胞に対して硝子体はTGF-beta1/2による制御性T細胞の誘導効果を促進すること、また制御性T細胞関連分子の発現の増強作用を有すること、また制御性T細胞の誘導はレチノイン酸受容体を介することが示された。以上より硝子体がTGF-beta1/2を介して制御性T細胞の誘導の促進、眼局所の炎症制御に関与している可能性が示唆された。本結果からぶどう膜炎の病態解明、新規治療法の開発へと繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we determined whether vitreous fluid can promote the generation of Foxp3+ CD4+ T regulatory (Treg) cells in vitro. Vitreous fluid was collected from fresh porcine eyes, sterilized by filtration. Vitreous was used for culture at a final concentration of 25%. CD4+ T cells purified from pooled splenocytes from naive C57Bl/6J were stimulated with plate-bound anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 96h in the presence or absence of vitreous fluid. CD4+ T cells were analyzed for Foxp3 expression using flow cytometry. In some experiments, CD4+ T cells were cultured in the presence of vitreous fluid with or without TGF-beta1 or 2. Vitreous fluid alone did not increase the frequency of Foxp3+ Tregs. Although TGF-beta 1 or 2 induced Foxp3+ Tregs in vitro, the frequency of TGF-beta1/2 induced Foxp3+ Tregs increased significantly in the presence of vitreous fluid. These findings suggest that vitreous fluid may enhance TGF-beta-induced Foxp3+ Treg conversion.

研究分野：ぶどう膜炎

キーワード：眼免疫

## 1. 研究開始当初の背景

眼(前房)内は古くから「隔絶された免疫寛容の場」として知られており、眼内に特殊な免疫制御機構があると考えられてきた。事実、前房水や硝子体液中には TGF- $\beta$  を始めとする様々な免疫制御物質が存在し、眼内に生じる免疫反応の制御に関与していることが報告されている (Streilein JW, Nat Rev Immunol.2003)。最近、米国 NIH の Caspi らは前房水を混合した培養液で T 細胞を刺激培養すると免疫寛容維持に重要な作用を持つ Foxp3+制御性 T 細胞(regulatory T cells: Treg)が強力に誘導されることを報告し、前房水自身が Treg 誘導因子として作用することを示した(Zhou R. et al, J Immunol. 2011)。これまで牛やヒト由来の前房水の免疫制御能に関する報告は散見されるものの、硝子体液の免疫抑制作用とその分子機序は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究課題では豚眼由来の硝子体液を用いて、主要な免疫担当細胞である T 細胞を硝子体液の存在下で培養することにより、T 細胞に対する硝子体の免疫抑制作用の解析、特に Foxp3+制御性 T 細胞(regulatory T cells: Treg)の誘導効果について検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 硝子体による制御性 T 細胞の誘導効果の検討

C57BL/6 マウスの脾臓を採取し、MACS beads を用いて CD4+T 細胞を分離する。

抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体を予め固相化した 96 well plate にて CD4+T 細胞( $2 \times 10^5$ /well)を培養開始(control 群)、そこに硝子体液を加えた群(vit 単独群)、TGF- $\beta$  1(5ng/ml)を加えた群(TGF- $\beta$  1 単独群)、TGF- $\beta$  1+硝子体液(培養液全体の 25%)を加えた群(TGF- $\beta$  1+ vit 群)を準備し、96 時間培養。培養後に T 細胞を採取し、抗 CD4 抗体、抗 Foxp3 抗体を用いて染色し、フローサイトメーターを用いて制御性 T 細胞誘導作用を比較する。

### (2) 制御性 T 細胞関連分子の発現の検討

制御性 T 細胞に高発現していることが知られている CD25、CD103、CD152 分子の発現について、上記実験 A と同様の方法で CD4+T 細胞を培養し、control 群、vit 単独群、TGF- $\beta$  1 単独群、TGF- $\beta$  1+ vit 群の各群で検討する。

### (3) レチノイン酸受容体阻害剤(LE540)存在下での制御性 T 細胞増殖促進作用の変動の有無

抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体を予め固相化した 96 well plate にて CD4+T 細胞( $2 \times 10^5$ /well)を培養開始(control 群)、そこに TGF- $\beta$  1(5ng/ml)を加えた群(TGF- $\beta$  1 単独群)、TGF- $\beta$  1+硝子体液(培養液全体の 25%)を加えた群(TGF- $\beta$  1+ vit 群)、TGF- $\beta$  1+硝子体液+LE540 群(TGF- $\beta$  1+ vit+LE 群)を準備し、96 時間培養。培養後に T 細胞を採取し、抗 CD4 抗体、抗 Foxp3 抗体を用いて染色し、フローサイトメーターを用いて制御性 T 細胞誘導作用を比較する。

## 4. 研究成果

### (1) 硝子体による制御性 T 細胞の誘導効果の検討

in vitro にて抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体で CD4+T 細胞を 96 時間培養後に CD4+T 細胞中の CD4+Foxp3+制御性 T 細胞数を control 群と vit 単独群で比較したところ vit 単独群で有意な増加は認められなかった。次に control 群、vit 群に加えて、TGF- $\beta$  1 単独群、TGF- $\beta$  1+vit 群において制御性 T 細胞の誘導効果を検討したところ、TGF- $\beta$  1 単独群で制御性 T 細胞の誘導効果がみられ、さらに TGF- $\beta$  1+ vit 群では制御性 T 細胞の誘導効果がさらに促進された。これらの結果は、TGF- $\beta$  2 を用いた実験系でも同様であった。

### (2) 制御性 T 細胞関連分子の発現の検討

制御性 T 細胞に高発現していることが知られている CD25、CD103、CD152 分子の発現を検討したところ、TGF- $\beta$  1 単独群で CD25、CD103、CD152 分子の発現上昇がみられ、さらに TGF- $\beta$  1+ vit 群では、上記分子の発現がさらに促進された。これらの結果は、TGF- $\beta$  2 を用いた実験系でも同様であった。

### (3) レチノイン酸受容体阻害剤(LE540)存在下での制御性 T 細胞増殖促進作用の変動の有無

in vitro にて抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体で CD4+T 細胞を培養する際にレチノイン酸受容体阻害剤である LE540 を付加したところ、TGF- $\beta$  1 単独群、TGF- $\beta$  1+ vit 群で観察された制御性 T 細胞増殖作用は有意に抑制された。これらの結果は、TGF- $\beta$  2 を用いた実験系でも同様であった。これらの結果から TGF- $\beta$  および TGF- $\beta$  + 硝子体による制御性 T

細胞の誘導効果はレチノイン酸受容体を介して作用していることが明らかとなった。

上記結果から in vitro にて抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体で刺激培養した CD4+T 細胞に対して硝子体は TGF- $\beta$ 1/2 による制御性 T 細胞の誘導効果を促進すること、また制御性 T 細胞関連分子の発現の増強作用を有すること、また制御性 T 細胞の誘導はレチノイン酸受容体を介することが示された。これらの結果から硝子体が TGF- $\beta$ 1/2 を介して制御性 T 細胞の誘導の促進、眼局所の炎症制御に關与してい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 13 件)

1. Keino H, Okada AA, Watanabe T, Nakayama M, Nakamura T. Efficacy of Infliximab for Early Remission Induction in Refractory Uveoretinitis Associated with Behçet Disease: A 2-year Follow-up Study. *Ocul Immunol Inflamm.* 25:46-51, 2017. doi: 10.1080/09273948.2016.1239746. (査読あり)
2. Keino H, Watanabe T, Taki W, Nakayama M, Nakamura T, Yan K, Okada AA. Clinical features of uveitis in children and adolescents at a tertiary referral centre in Tokyo. *Br J Ophthalmol.* 101:406-410, 2017. doi: 10.1136/bjophthalmol-2015-308194. (査読あり)
3. Higashi K, Meguro A, Takeuchi M, Yamane T, Kitaichi N, Horie Y, Namba K, Ohno S, Nakao K, Sakamoto T, Sakai T, Tsuneoka H, Keino H, Okada AA, Takeda A, Fukuhara T, Mashimo H, Ohguro N, Oono S, Enaida H, Okinami S, Mizuki N. Investigation of the association between IL10 gene polymorphisms and Vogt-Koyanagi-Harada disease in a Japanese population. *Ophthalmic Genet.* 38:187-89, 2017. doi: 10.3109/13816810.2016.1145698. (査読あり)
4. Keino H, Okada AA, Watanabe T, Echizen N, Inoue M, Takayama N, Nagane M. Spectral-domain Optical Coherence Tomography Patterns in Intraocular Lymphoma. *Ocul Immunol Inflamm.* 24:268-73, 2016. doi: 10.3109/09273948.2014.1002568. (査読あり)
5. Watanabe T, Keino H, Kudo A, Sato Y, Okada AA. MicroRNAs in retina during development of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Br J Ophthalmol.* 100:425-431, 2016. doi:10.1136/bjophthalmol-2015-30692. (査読あり)
6. 渡邊交世、慶野博、宮東昭彦<sup>1</sup>、佐藤泰彦<sup>2</sup>、岡田アナベルあやめ. 外国誌要覧 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎における眼局所のmicroRNAの発現. *日本眼科学会雑誌.* 120:465, 2016. doi:なし. (査読なし)
7. Inokawa S, Watanabe T, Keino H, Sato Y, Hirakata A, Okada AA, Fukuda K, Fukushima A, Umezawa K. Dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel nuclear factor- $\kappa$ B inhibitor, reduces chemokines and adhesion molecule expression induced by IL-1 in human corneal fibroblasts. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 253:557-563, 2015. doi: 10.1007/s00417-014-2879-9. (査読あり)
8. Keino H, Watanabe T, Sato Y, Shudo K, Kitaoka Y, Harada T, Okada AA. Retinoic acid receptor stimulation ameliorates experimental autoimmune optic neuritis. *Clin Experiment Ophthalmol.* 43:558-567, 2015. doi: 10.1111/ceo.12308. (査読あり)
9. 肥留川京子、慶野博、渡邊交世、瀧和歌子、平形明人、岡田アナベルあやめ 網膜動静脈閉塞症に対してステロイドパルス療法が奏効したSLE網膜症の1例 (原著論文/症例報告) *あたらしい眼科* 32:904-908, 2015. doi:なし (査読あり)
10. Takase H, Okada AA, Goto H, Mizuki N, Namba K, Ohguro N, Sonoda KH, Tomita M, Keino H, Kezuka T, Kubono R, Mizuuchi K, Shibuya E, Takahashi H, Yanai R, Mochizuki M. Development and validation of new diagnostic criteria for acute retinal necrosis. *Jpn J*

- Ophthalmol. 59:14-20, 2015. doi: 10.1007/s10384-014-0362-0. (査読あり)
11. Hirota K, Keino H, Inoue M, Ishida H, Hirakata A. Comparisons of microRNA expression profiles in vitreous humor between eyes with macular hole and eyes with proliferative diabetic retinopathy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 253:335-42, 2015. doi: 10.1007/s00417-014-2692-5. (査読あり)
  12. Takeuchi M, Kezuka T, Sugita S, Keino H, Namba K, Kaburaki T, Maruyama K, Nakai K, Hijioka K, Shibuya E, Komae K, Horii J, Ohguro N, Sonoda KH, Mizuki N, Okada AA, Ishibashi T, Goto H, Mochizuki M. Evaluation of the long-term efficacy and safety of infliximab treatment for uveitis in Behçet's disease: a multicenter study. Ophthalmology. 121:1877-84, 2014. doi: 10.1016/j.ophtha.2014.04.042. (査読あり)
  13. Keino H, Okada AA, Watanabe T, Taki W. Long-term efficacy of infliximab on background vascular leakage in patients with Behçet's disease. Eye (Lond). 28:1100-6, 2014. doi: 10.1038/eye.2014.138. (査読あり)
  4. 慶野博, 中山真紀子, 厚東隆, 渡邊交世, 岡田アナベルあやめ: レーザースペックル法にて視神経乳頭部血流を観察できた急性網膜壊死の1例. 第33回日本眼循環学会, 福岡, 2016年7月22日-7月24日.
  5. 中山真紀子, 慶野博, 渡邊交世, 岡田アナベルあやめ 原田病初発例 123例の臨床経過の検討. 第50回日本眼炎症学会, 東京, 2016年7月2日-7月3日.
  6. 重安千花, 中島貴友, 慶野博, 山根みお, 堀江大介, 朝戸裕, 山田昌和. ハンセン病における眼疾患後遺症の現状. 第50回日本眼炎症学会, 東京, 2016年7月2日-7月3日.
  7. 慶野博. 教育シンポジウム ぶどう膜炎の画像検査 眼底自発蛍光. 第50回日本眼炎症学会, 東京, 2016年7月2日-7月3日.
  8. Keino H, Nakayama N, Watanabe T, Koto T, Okada AA: Compromised optic nerve head blood flow in acute retinal necrosis. ARVO Imaging Conference, Seattle, USA. April 30th, 2016.
  9. 中山真紀子, 慶野博, 渡邊交世, 福岡利仁, 駒形嘉紀, 有村義宏, 岡田アナベルあやめ: ベーチェットぶどう膜網膜炎におけるインフリキシマブ中止後の眼炎症活動性の評価. 第120回日本眼科学会総会, 仙台, 2016年4月7日-4月10日.
  10. 慶野博, 中山真紀子, 渡邊交世, 中村友子, 岡田アナベルあやめ: 原田病初発例における中心窩下脈絡膜厚の長期経過. 第69回日本臨床眼科学会, 名古屋市, 2015年10月23日-10月25日.
  11. 中山真紀子, 山本亜希子, 慶野博, 渡邊交世, 中村友子, 眞鍋歩, 岡田アナベルあやめ: 点状脈絡膜内層症の臨床的特徴および予後. 第69回日本臨床眼科学会, 名古屋市, 2015年10月23日-10月25日.
  12. 津田麻祐子, 中山真紀子, 慶野博, 渡邊交世, 岡田アナベルあやめ, 平形明人: サイトメガロウイルス網膜炎の発症を機に HIV 陽性と診断された2症例. 第58回東京多摩地区眼科集談会, 三鷹市, 2015年10月17日.
  13. Keino H, Watanabe T, Nakayama M, Nakamura T, Okada AA: Efficacy of infliximab for early remission induction in refractory uveoretinitis associated with

[学会発表](計23件)

1. 中山真紀子, 慶野博, 渡邊交世, 岡田アナベルあやめ: AZOORにおける眼底自発蛍光の検討. 第70回日本臨床眼科学会, 京都, 2016年11月3日-11月6日.
2. Nakayama M, Keino H, Watanabe T, Okada AA: Clinical features and visual outcomes of patients with acute new-onset Vogt-Koyanagi-Harada disease at a tertiary center in Tokyo. International Uveitis Society Group (IUSG), Dublin, Ireland, April 18th-21th, 2016.
3. Keino H, Okada AA, Watanabe T, Nakayama M: Maintained remission of uveoretinitis associated with Behçet's disease after discontinuation of successful infliximab therapy. International Uveitis Society Group (IUSG), Dublin, Ireland, April 18th-21th, 2016.

- Behcet's disease. Third International Assembly of Ocular Inflammation Societies, San Francisco, USA, September 25th-27th, 2015.
14. Watanabe T, Keino H, Taki W, Nakayama M, Nakamura T, Okada AA: Clinical features of uveitis in children and adolescents at a tertiary center in Tokyo. Congress of the International Ocular Inflammation Society, Third International Assembly of Ocular Inflammation Societies, San Francisco, USA, September 25th-27th, 2015.
  15. 中山真紀子, 慶野博, 渡邊交世, 井上真, 岡田アナベルあやめ: 硝子体手術後に発症した ANCA 陽性強膜炎の1例. 第49回日本眼炎症学会, 大阪, 2015年7月10日-7月12日.
  16. 中村友子, 慶野博, 眞鍋歩, 中山真紀子, 渡邊交世, 林篤志, 岡田アナベルあやめ. 妊娠16週に発症したトリアムシノロンアセトニドテノン嚢下注射で治療した原田病の1例. 第49回日本眼炎症学会, 大阪, 2015年7月10日-7月12日.
  17. Keino H, Sato Y, Okada AA. Capability of vitreous fluid to enhance TGF- $\beta$ -induced Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell conversion. Denver, USA, May 3rd-7th, 2015.
  18. Keino H. EDI-OCT of chronic and recurrent phases of VKH. The International Workshops on Granulomatous Uveitis and Ocular Behcet's Disease and the Asia-Pacific Intraocular Inflammation Study Group (APIISG) Meeting. Cebu, Philippines, May 15th-17th, 2015.
  19. 慶野博, 渡邊交世, 中山真紀子, 岡田アナベルあやめ. 罹病期間別でみたインフリキシマブ導入後のベーチェット病ぶどう膜炎の活動性評価. 第119回日本眼科学会総会, 札幌市, 2015年4月16日-19日.
  20. 安藤良将, 渡辺俊樹, 慶野博, 気賀澤一輝, 平形明人. レーザースペックル法にて視神経乳頭部血流を観察できた抗AQP4抗体陽性視神経炎の1例. 第119回日本眼科学会総会, 札幌市, 2015年4月16日-19日.
  21. 慶野博. サブスペシャリティーサンデーぶどう膜炎診療アップデート. ぶどう膜炎の眼底画像検査. 第119回日本眼科学会総会, 札幌 2015年4月16日-19日.
  22. 渡邊交世, 肥留川京子, 慶野博, 瀧和歌子, 越前成旭, 岡田アナベルあやめ. 糖尿病虹彩炎を発症した患者の臨床的特徴についての検討. 第48回日本眼炎症学会, 東京, 2014年7月4日.
  23. Watanabe T, Keino H, Taki W, Echizen N, Okada AA: Efficacy of infliximab in two young patients with Behcet's disease. World Ophthalmology Congress® of the international council of ophthalmology, Tokyo, April 2nd-6th, 2014.
- 〔図書〕(計6件)
1. 慶野博. 中間部ぶどう膜炎. 眼科疾患最新の治療2016-2018. 東京, 南江堂, 2016. p256.
  2. 井上真, 慶野博. 裂孔不明の全剥離. どう診てどう治す 網膜剥離. 東京, メジカルビュー社, 2016. p203-207.
  3. 慶野博. ぶどう膜炎 OCT. 眼科診療マイスター 診察と検査. 東京, メジカルビュー社, 2016. p240-243.
  4. 慶野博. 真菌性眼内炎. 今日の眼疾患治療指針. 東京, 医学書院, 2016. p434-435.
  5. 慶野博. 全眼球炎. 今日の眼疾患治療指針. 東京, 医学書院, 2016. p436.
  6. 慶野博. サルコイドーシス. 超広角でみる眼底病変診断. 東京, メジカルビュー社. 2015. p182-185.
- 〔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

慶野 博 (Keino, Hiroshi)  
杏林大学・医学部・准教授  
研究者番号：90328211

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )