

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462700

研究課題名(和文) 眼組織の移植と再生のための眼免疫応答の制御

研究課題名(英文) Immune regulation for tissue transplantation and regeneration in the eye

研究代表者

堀 純子 (Hori, Junko)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60251279

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)：眼内炎症の自動制御機構について、以下の分子の発現と機能解析を行った。眼内免疫抑制性微少環境の維持に關与するInducible costimulator (ICOS)のリガンドであるB7RP-1や、V-domain Ig Suppressor of T Cell Activation (VISTA)シグナルは、角膜組織に恒発現しており、ICOS/B7RP-1シグナルやVISTAシグナルを阻害すると、角膜移植後の拒絶が増強した。これらの分子は、末梢性免疫寛容の誘導に關与し、さらに角膜局所での制御性T細胞の維持に關与して、眼の免疫特権に貢獻することがわかった。

研究成果の概要(英文)：ICOS and ICOS-ligand (ICOSL) have been reported to have an impact on differentiation and functions of various T cells. ICOSL mRNA is constitutively expressed in the cornea. Blockade of ICOSL and ICOS deficiency in the recipients accelerated rejection of corneal allografts. ICOSL mRNA is kept to express on the survived allograft. ICOS deficiency induced alloantigen-specific anterior chamber associated immune deviation (ACAID) weakly. ICOS/ICOSL is necessary for leading immune privilege of corneal allografts. The expression of ICOSL and ICOS-mediated Foxp3+CD4+ regulatory T cells may contribute to success corneal allograft survival. VISTA is a novel and structurally distinct Ig superfamily inhibitory ligand. VISTA was constitutively expressed in the cornea of normal eyes. VISTA may play an important role in the acceptance of corneal allografts and inducing allo-specific ACAID.

研究分野：医歯薬学

キーワード：免疫特権 副刺激シグナル 移植免疫応答 ICOS/B7RP-1(ICOSL) VISTAシグナル

1. 研究開始当初の背景

眼領域の移植医療は多様化しているが、現状における重要課題の1つは、宿主応答による移植組織の脱落や機能不全の克服である。

正常眼は、脳や生殖器官と同様に、臓器内の炎症が自動制御される「免疫特権」を有しており、多彩な免疫制御性分子のネットワークをもつことが示唆されている。疾患眼に「免疫特権」を人為的に再建できれば、移植医療のみならず、難治性の自己免疫性疾患などの他の炎症疾患への応用も期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、眼内炎症の制御に関与する分子の発現と機能解析を行い、移植眼に人為的な免疫抑制性微小環境を誘導し、移植組織の生着と機能再生を誘導する新しい分子治療を確立することである。

3. 研究の方法

角膜移植のマウスモデルを用い、In vivo での眼局所における免疫関連分子 (Inducible costimulator (ICOS)とそのリガンドである B7RP-1 のシグナル、V-domain Ig Suppressor of T Cell Activation (VISTA)シグナル) の発現変化と、宿主の二次リンパ器官における免疫応答を解析した。

上記分子の機能は、阻害抗体やノックアウトマウスを用い、移植後の移植片生着、血管新生誘導、アロ抗原特異的遅延型過敏反応といった宿主応答を解析した。末梢性免疫寛容誘導には、ACAID マウスモデルを用いた。B6 マウスの脾細胞を BALB/c マウスに皮下注射による免疫をする2週間前に前房内注射を施行し、免疫1週間後 B6 マウスの脾細胞を BALB/c マウスの耳介に皮下注射した。BALB/c マウスには阻害抗体やノックアウトマウスを用い、皮下注射24時間後に、耳介腫脹の差を測定、比較検討した。

さらに、In vitro で、様々なポテンシャルの T 細胞と眼組織を反応させる系 (シャーレ内の拒絶反応モデル)を用い、眼組織に発現する上記の分子群の発現調節により、T 細胞の機能が変化するかどうかを解析した。

4. 研究成果

(1) 眼内免疫抑制性微小環境の維持に関

与する Inducible costimulator (ICOS) とそのリガンドである B7RP-1 のシグナル経路における眼内での局在と機能、および分子機能の調節による移植後の眼炎症の制御解析を行い、下記の結果を得た。

- ・ICOS のリガンドである B7RP-1 は、正常角膜、虹彩毛様体、網膜のいずれも発現していた。
- ・ICOS /B7RP-1 シグナルを阻害すると、角膜移植後の拒絶が増強した。
- ・ICOS /B7RP-1 シグナルを阻害すると、ACAID は誘導され、アロ抗原特異的遅延型過敏反応が抑制されたが、W/T マウスと比較してその抑制効果は減弱した。
- ・T 細胞は角膜との相互作用で、T 細胞表面の ICOS 発現に依存した Treg 増多を生じた。眼局所での Treg 増多がアロ反応性 T 細胞による角膜障害を抑制することが示された。

(結論) 眼組織に発現する B7RP-1 は浸潤細胞の ICOS を介して免疫抑制的役割をもち、角膜移植の生着に必須である。一方、末梢性免疫寛容 (ACAID) の誘導には必須ではないが貢献する分子であると考えられた。さらに、角膜局所での制御性 T 細胞の維持を介して、眼の免疫特権に貢献することが示唆された。

(2) 眼内免疫抑制性微小環境の維持に関与する可能性のある V-domain Ig Suppressor of T Cell Activation (VISTA)シグナルの眼内での局在と機能について、下記の結果を得た。

- ・マウス角膜において、VISTAmRNA の発現していた。免疫染色においては、生着した移植角膜の接合部に、VISTA 陽性 CD4 陽性細胞の発現していた。
- ・対照として rat IgG を投与した。対照 rat IgG 投与群と比較して、抗 VISTA 抗体投与群は全てのアログラフトが拒絶され、有意に生着が短縮した ($p < 0.05$)。
- ・抗 VISTA 抗体投与群では、DTH は抑制されたが、その抑制はコントロール群と比較して、有意に少なかった ($p < 0.05$)。

(結論) 新規の免疫補助刺激分子である VISTA は角膜組織に恒性的に発現していた。角膜移植の免疫応答においては、免疫抑制的な役割をもち、角膜移植の生着を維持する分子であると考えられた。

- (3) 眼領域では報告の無い、ICOS/B7RP-1 シグナル経路、および VISTA シグナルの免疫制御的役割を明らかにしたのは、我々が国際的にも先駆的なものとなる。

将来、上記分子の機能調節により、眼領域の移植、炎症性眼疾患のみでなく、他臓器の移植後拒絶反応や、自己免疫疾患などの新規治療にも応用が期待できると考える。

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 4 件)

1. Kunishige T, Taniguchi H, Terada M, Akiba H, Yagita H, Abe R, Hori J. Protective role of ICOS and ICOS Ligand in corneal transplantation and in maintenance of immune privilege. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016 Dec 1;57(15):6815-6823. DOI; 10.1167/iovs.16-20644、査読有
2. 堀 純子、細胞生物学から理解する前眼部疾患 14.角膜移植の拒絶と生着、眼科、58 巻 4 号 p441-446(2016)、査読有
3. 堀 純子、眼の免疫学、医学のあゆみ、第 256 巻 13 号(2016 年 3 月 26 日号) 査読有
4. 國重智之、堀純子、角膜移植後免疫応答にみる眼内微小環境の特殊性、医学のあゆみ、第 256 巻 13 号(2016 年 3 月 26 日号) 査読有

[学会発表](計 12 件)

1. J Hori. Molecular mechanisms of immune privilege of the cornea-as a potential of Immune checkpoint therapy. European Association for Vision and Eye Research (EVER) 2016. (2016.10.7、NICE, France)

2. J Hori. Checkpoint Inhibitors: A Potential Treatment in Uveal Melanoma? The 31st Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress; APAO. (2016.3.26、台湾)
3. J Hori, H Taniguchi, M Azuma, R Abe, H Yagita. Molecular mechanisms of immune privilege of the cornea - as a potential of Immune Checkpoint therapy. Tokyo Ocular immunology meeting (2016.2.26、東京)
4. J Hori, H Taniguchi, M Azuma, R Abe, H Yagita. Corneal Cell-Mediated Immune Regulation and Immune Privilege. Harvard Medical School Cornea Center of Excellence international Workshop, (2015.10.15, Boston, MA, USA)
5. 堀 純子、眼免疫と眼炎症性疾患について、第 2 回眼科学術講演会(2016.11.18、新潟)
6. 堀 純子、免疫による炎症病態制御による免疫「眼表面の炎症制御、免疫特性」、角膜カンファランス 2017 ランチョンセミナー(2017.2.17、福岡)
7. T Kunishige, H Taniguchi, T Ohno, M Azuma, J Hori. Role of V-domain Ig suppressor of T cell activation (VISTA) in Anterior Chamber Associated Immune Deviation. ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology). 2016.5.1, Seattle, WA, USA.
8. H Taniguchi, T Kunishige, H Akiba, H Yagita, R Abe, J Hori.

Expression of ICOS and Foxp3 on T cells infiltrating in corneal allografts. ARVO. 2016.5.1, Seattle, WA, USA.

9. H Taniguchi, H Hase, H Akiba, H Yagita, M Azuma, J Hori. Role of B7-H3/TLT-2 pathway in immune privilege of corneal allografts. ARVO. 2017.5.11, Baltimore, USA.
10. 國重智之、堀純子、角膜移植免疫と V-domain Ig suppressor of T cell activation (VISTA)、眼免疫研究会 (2015.6.19、東京)
11. 國重智之、角膜移植の生着における免疫と V-domain Igsuppressor of T cell activation (VISTA)の役割、平成 26 年度丸山記念研究助成金受賞記念講演(2015.9.5、東京)
12. T Kunishige, J Hori. マウス角膜移植におけるICOS/ICOS-Lの役割、Tokyo Ocular immunology meeting (2015.9.11、東京)

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

日本医科大学眼科 研究業績

<http://www2.nms.ac.jp/nms/ganka/achievements/original.html>

Researchmap 研究業績

<http://researchmap.jp/read0143707/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

堀 純子 (Hori, Junko)

日本医科大学、医学部、准教授

研究者番号 : 60251279

(2)研究分担者

谷口 ヒロ子 (Taniguchi, Hiroko)

日本医科大学、医学部、研究員

研究者番号 : 00535445

國重 智之 (Kunishige, Tomoyuki)

日本医科大学、医学部、助教

研究者番号 : 60516045

(3)研究協力者

東 みゆき (Azuma, Miyuki)

東京医科歯科大学、大学院・医歯学総合研究科、教授

研究者番号 : 90255654

安部 良 (Abe, Ryo)

東京理科大学、研究推進機構生命医科学研究所、教授

研究者番号 : 20159453

八木田 秀雄 (Yagita, Hideo)

順天堂大学、医学部、准教授

研究者番号 : 30182306

秋葉 久弥

(Akiba, Hisaya)

順天堂大学、大学院医学研究科、准教授

研究者番号 : 60338316