

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861471

研究課題名(和文) 免疫制御性遺伝子導入樹状細胞によるPU.1を介したEAONの抑制メカニズム解析

研究課題名(英文) Mechanism analysis, suppression of EAON by DC Transfected with PU.1.

研究代表者

松田 隆作 (Matsuda, Ryusaku)

東京医科大学・医学部・兼任講師

研究者番号：10449209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ぶどう膜炎の発症メカニズムは、いまだ明らかでないので、実験的自己免疫ぶどう膜網膜炎発症マウスをもちいて、メカニズム解析を試みた。

この研究において、我々はEAUで実験的自己免疫ぶどう膜網膜炎(EAU)において、PU.1発現レベルと炎症の関係を調査した。

PU.1は実験的ぶどう膜炎の発症に関与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated PU.1 expression in the retina of mice with experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) and the association between PU.1 expression level and inflammation in EAU.

PU.1 may play crucial roles in the development and progression of inflammation in EAU

研究分野：遺伝治療 神経眼科 ぶどう膜炎

キーワード：PU.1 EAE EAON

1. 研究開始当初の背景

以前から難治性視神経炎を生じ、かつステロイド治療の無効例の場合には、血漿交換療法が行われるようになった。しかし、血漿交換療法は、患者の身体的負担が大きく問題視されており、新しい治療法の開発が望まれていた。そのため申請者らは、安定して高率に発症する視神経脊髄炎の動物モデルの確立が必要であると考えてきた。Shaoらは、C57BL/6 マウスに脊髄蛋白に対するペプチドを免疫し、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE) を発症させ、視神経炎も併発させることに成功した (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci, 1994)。このモデルでは、EAE の発症率は 100% に近いものの、視神経炎の発症率が 50% 程度と低下しているため、治療モデルとしては問題があった。そこで申請者は、これらの視神経脊髄炎マウスモデルを改良することによって、視神経炎の発症率を 9 割にまで引き上げる方法を開発した。さらに申請者らは治療に応用可能なマウスモデルを確立する一方、樹状細胞を用いた新しい免疫治療法である免疫制御システムの開発を検討した。

2. 研究の目的

多発性硬化症に併発する視神経脊髄炎は、ステロイド治療などを行っても症例によっては両眼の失明に至る可能性のある疾患である。また、Neuromyelitis optica (NMO) に併発する視神経炎の治療にはステロイド大量療法や血漿交換療法などが行われるが、その予後は様々であり、時に重篤な視力障害を来すことがある。すなわち、これらの視神経炎はいずれも現行の治療法では視機能の改善に限界があるのが現状である。そこで、実験的自己免疫性視神経炎モデル (experimental autoimmune optic neuritis : EAON) を用いて免疫細胞療法としての遺伝子治療の可能性を模索し、難治なヒト視神経炎への臨床応用の実現を目的とする。

<研究の学術的背景>

背景(1): 従来の視神経炎研究の背景

以前から難治性視神経炎を生じ、かつステロイド治療の無効例の場合には、血漿交換療法が行われるようになった。しかし、血漿交換療法は、患者の身体的負担が大きく問題視されており、新しい治療法の開発が望まれていた。そのため申請者らは、安定して高率に発症する視神経脊髄炎の動物モデルの確立が必要であると考えてきた。Shaoらは、C57BL/6 マウスに脊髄蛋白に対するペプチドを免疫し、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune

encephalomyelitis : EAE) を発症させ、視神経炎も併発させることに成功した (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci, 1994)。このモデルでは、EAE の発症率は 100% に近いものの、視神経炎の発症率が 50% 程度と低下しているため、治療モデルとしては問題があった。そこで申請者は、これらの視神経脊髄炎マウスモデルを改良することによって、視神経炎の発症率を 9 割にまで引き上げる方法を開発した。さらに申請者らは治療に応用可能なマウスモデルを確立する一方、樹状細胞を用いた新しい免疫治療法である免疫制御システムの開発を検討した。

背景(2): 申請者の今までの研究

我々は以前より脱髄性視神経炎の病態解明について、ヒトおよびマウスモデルにおいて臨床研究と基礎研究を行ってきた。具体的には、当教室で開発した高率に視神経炎を発症する実験的自己免疫性視神経炎マウスモデル (EAON) (Kezuka, J. et al. Biomed, Biotech 2011) を用いて、一貫して視神経炎の病態解明および新規治療法の開発を行ってきた経緯がある。前房水中には TGF- β 2 の他、CGRP、VIP に代表される種々の神経ペプチドが存在しており、特殊な免疫制御機構を形成している。治療実験として、申請者らは免疫抑制物質として知られる神経ペプチドの一種である CGRP に着目し、CGRP 遺伝子のプラスミドを成熟樹状細胞に移入して CGRP 遺伝子導入樹状細胞を作製した。この細胞を実験的自己免疫性視神経炎 (EAON) および実験的自己免疫脳脊髄炎 (EAE) マウスの尾静脈に投与することにより、それらの発症を有意に抑制することを報告した (Matsuda, IOVS, 2012)。さらに、CGRP 遺伝子導入樹状細胞を投与したマウスの脾細胞培養上清中では IL-10 および制御性 T 細胞が多く存在し、発症の抑制に関わっていることを併せて報告してきた。この細胞治療の結果は、近年報告された CGRP 刺激樹状細胞が自己反応性細胞に対する抑制性のサイトカインである IL-10 を通常より多く産生し、調節性 T 細胞の誘導に関与している可能性があるという *in vitro* の実験結果とも合致しており、視神経炎モデルの治療に応用可能であることを示唆している。さらに申請者は、IL-10 遺伝子のプラスミドを用い、IL-10 遺伝子導入樹状細胞を作製、その細胞を EAON-EAE マウスの尾静脈に投与することによって、視神経炎の発症および重症度が有意に抑制されることを報告した (Matsuda, R et al. IOVS 2012)。その際の遺伝子導入細胞の生存率は 70% で、遺伝子

導入効率は50%であった。また、IL-10 遺伝子導入樹状細胞の注入群における遅延型過敏反応は有意に低下していた(p<0.05)。培養上清サイトカインは対照群と比べてIL-10 遺伝子導入群の IL-2, IL-6, IL-17, IFN- γ , TNF- α が低値であった。一方、脾細胞および頸部リンパ節のFACS解析により、制御性 T 細胞の上昇が確認され、CD80、CD86、MHC class II の発現が治療群で抑制されていた。

3. 研究の方法

平成 26 年度

EAE-EAON の発症実験

実験的自己免疫性視神経炎マウスモデル (EAON) は当教室の毛塚らの報告に準じて作成する (Kezuka, J. et al. Biomed, Biotech 2011)。EAON を高率に発症させるモデルの作製には、MOG 抗原に対する部分ペプチド(MOG35-55)を用い、そのペプチドに Dimethyl sulfoxide (DMSO)を混和させ、抗原の均一化を図る。次に MOG ペプチドに結核死菌を CFA (complete Freund's adjuvant) と共に乳化混和させ、マウス免疫と同時に百日咳トキシンを腹腔内投与する。C57BL/6 マウスの背部、頸部に計 300 μ l 皮下注する。マウスの麻酔は蒸留水、ソムノペンチル、セラクタルの混和したものをマウスの腹腔内に投与する。

制御性 B 細胞の解析

C57BL/6 マウス骨髄細胞から分化させた成熟樹状細胞に、エレクトロポレーション法により IL-10 プラスミド(pCR3.1-IL-10) または CGRP プラスミド (pCR3.1-FL-hCGRP)を導入して IL-10 遺伝子導入樹状細胞または CGRP 遺伝子導入樹状細胞を作製する。対照群 (mock) として IL-10 や CGRP を含まない pCR3.1 を用い、同様の方法により遺伝子導入細胞を作製する。免疫後 1 日目または 9 日目に遺伝子導入樹状細胞を尾静脈より投与し、免疫後 14 日、21 日および 28 日目にマウスを屠殺し脾臓、リンパ節および視神経を採取する。採取した脾細胞、リンパ節に CD1d 抗体、CD5 抗体、IL-10 抗体を用いて制御性 B 細胞の存在を FACS で解析する。

PU.1 の解析

1) EAE-EAON においては、免疫後 14 日目、21 日目および 28 日目にマウスを屠殺し、脾臓、リンパ節、視神経を採取する。各細胞を単離し、RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany)にある RLT buffer を使用し、細胞を破砕する。

2) Total RNA を得るため RNeasy kit を使用し作製する。純度の高い total RNA を 65 $^{\circ}$ C で 5 分インキュベートし、氷上で急速冷凍(-4 度)する。その後、cDNA を精製するために High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を使用し、5 \times RT Buffer 2 μ l, Primer Mix 0.5 μ l, RT Enzyme Mix 0.5 μ l を total RNA と混和し、逆転写反応として 37 度 15 分インキュベートする。さらに、酵素失活反応のため 98 度で 5 分インキュベートし、急速冷凍(-4 度)する。これで cDNA が精製される。

3) cDNA より real time PCR を用いて、PU.1 の mRNA を測定する。cDNA と tapman fast advanced master mix を混和し、PU.1 の tap man probe mix を入れる。これを、real time PCR で測定する。

4. 研究成果

我々は EAU で実験的自己免疫ブドウ膜網膜炎 (EAU) において、PU.1 発現レベルと炎症の関係を調査した。

PU.1 は実験的ぶどう膜炎の発症に関与している可能性がある。

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)

Role of PU.1 Expression as an Inflammatory Marker in Experimental Autoimmune Uveoretinitis. Ocul Immunol Inflamm. 2017

Umazume A, Kezuka T, Matsuda R, Usui Y, Takahashi H, Yamakawa N, Yashiro T, Nishiyama C, Goto H. (査読あり)

{ 図書 } (計 0 件)

{ 産業財産権 }

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

{ その他 }

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 隆作 (Matsuda Ryusaku)

東京医科大学・医学部・兼任講師
研究者番号：10449209

(2)研究分担者

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

馬詰 朗比古 (Umazume Akihiko)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：20617568

山川 直之 (Yamakawa Naoyuki)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：80599134