

Pathogenic Function of Herpesvirus Entry Mediator  
in Experimental Autoimmune Uveitis  
by Induction of Th1- and Th17-Type T Cell Responses

実験的自己免疫性ぶどう膜炎における  
Th1/Th17 を介した Herpesvirus Entry Mediator の病態関与について

氏名 永井智彦

所属 山口大学大学院医学系研究科

上皮情報解析医科学系専攻 眼科学分野

平成28年12月

## 目次

1. 研究の背景 . . . . . 1
2. 目的 . . . . . 1
3. 方法 . . . . . 2
4. 結果 . . . . . 2
5. 考察 . . . . . 3
6. 結語 . . . . . 4

【研究の背景】ぶどう膜炎は虹彩・毛様体・脈絡膜に炎症が生じる疾患で、失明原因のおよそ 10%にあたる。若年者や生産年齢に発症することも多く、社会経済に与える影響が懸念されている。

ぶどう膜炎は感染性と非感染性に分類され、非感染性ぶどう膜炎はベーチェット病、Vogt-小柳-原田病、全身性エリテマトーデス、サルコイドーシス、自己免疫性肝炎、多発性硬化症など自己免疫性疾患が原因となる。自己免疫性非感染性ぶどう膜炎の治療は過剰な炎症を抑制するためにコルチコステロイドの局所ならびに全身投与が第一選択となる。しかしながら、自己免疫疾患の治療は長期にわたるため、コルチコステロイドによる様々な副作用やステロイド抵抗性が問題となっており、副作用が少なく疾患特異性の強い効果的な治療法の開発が望まれている。

自己免疫性ぶどう膜炎の動物実験モデルとして、実験的自己免疫性ぶどう膜炎(experimental autoimmune uveitis; EAU)が広く用いられている。EAU は光受容体間結合タンパク(interphotoreceptor-binding protein: IRBP)の網膜抗原を完全フロイントアジュバント(Complete Freund's adjuvant: CFA)とともにマウスに免疫することによって誘導され、その病態には主に Th17 が関与していると報告されている。

近年、T 細胞を介した免疫反応における共シグナル分子の重要性が様々な疾患の病態に重要な役割を担っていることが報告されている。共シグナル分子の一つである Herpesvirus entry mediator (HVEM)は TNF レセプタースーパーファミリーに属し、環境に応じて免疫亢進作用もしくは抑制作用を示す特徴的な分子である。例えば、HVEM は T 細胞上のレセプターとして lymphotoxin-like, inducible expression, competes with herpes simplex virus glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes (LIGHT)や B- and T-lymphocyte attenuator (BTLA)などのリガンドと結合し、T 細胞内に免疫亢進作用のシグナルを伝達する。一方、HVEM は免疫抑制性のレセプターである BTLA や CD160 と結合するリガントとしての免疫抑制作用の役割も担っている。HVEM が免疫亢進もしくは抑制のどちらに作用するかは、抗原の種類と環境に依存している。HVEM は、移植片対宿主病や同種移植拒絶反応では免疫亢進作用を示す一方、Concanavalin A 誘導肝炎モデル(ConA-induced hepatitis)、実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE)、コラーゲン誘導性関節炎(collagen-induced arthritis : CIA)においては、HVEM の欠損や阻害により病勢が増悪することが報告されている。本研究以前に自己免疫性非感染性ぶどう膜炎における HVEM の作用は、我々の知る限り存在していない。

【目的】本研究では、実験的自己免疫性ぶどう膜炎 EAU における HVEM の免疫調節機能を解明し、HVEM が非感染性自己免疫性ぶどう膜炎に対する治療の標的となりえるか評価することを目的とする。

【方法】実験的自己免疫性ぶどう膜炎 EAU は、C57BL/6 バックグラウンドの野生型(WT)のマウスもしくは HVEM ノックアウト(HVEM-KO)マウスに 100  $\mu$ g のヒト IRBP、CFA、300  $\mu$ g の結核死菌の混合液を片側の後足底、単徑部に皮下注射にて免疫することで EAU を誘導した。同時に 100 ng の百日咳毒素を腹腔内に注射した。抗体を使用する実験では、免疫後 0、3、6、9 日目に 250  $\mu$ g の抗 HVEM 抗体(クローン LBH1)、もしくはコントロールとしてハムスターIgG を腹腔内に注射した。

EAU における炎症の評価は、眼底の炎症の広がりや組織の損傷を眼底鏡を用いて観察し、臨床スコアを算出した。臨床スコアは、スコア 0、炎症所見なし；スコア 1、局所的な血管炎もしくは 5 か所未満の浸出斑；スコア 2、網膜半域におよぶ血管炎もしくは浸出斑；スコア 3、網膜半域以上におよぶ血管炎もしくは浸出斑；スコア 4、網膜内出血もしくは強度の浸出斑；スコア 5、漿液性網膜剥離もしくは網膜下出血・硝子体出血；として評価した。

また、免疫後 21 日目に安楽死させたマウスから眼球を摘出し、組織標本を作製、HE 染色を行い、リンパ球の浸潤と組織の損傷をもとに組織学的スコアを算出して評価した。組織学的スコアは、スコア 0、炎症所見なし；スコア 0.5、脈絡膜・毛様体・網膜への非肉芽腫性の単球浸潤；スコア 1、網膜血管周囲や硝子体への単球浸潤；スコア 2、ぶどう膜・網膜への肉芽腫形成もしくは閉塞性網膜血管炎・視細胞層の皺壁・網膜剥離；スコア 3・4、ダレン-フックス結節の形成・網膜下新生血管(数と大きさによって段階的に評価)；として評価した。

IRBP 特異的な T 細胞は、増殖試験、サイトカイン・ケモカインの産生量により評価した。T 細胞増殖試験は、頸部、腋窩リンパ節から単離された T 細胞を放射線処理された WT マウスの脾臓細胞とともに IRBP で 3 日間刺激し、その後トリチウムで標識されたサイミジンと 18 時間共培養し、サイミジンの取り込み量により増殖能を測定した。また共培養開始から 48 時間後の培養上清を回収し、Bio-Plex Pro Mouse 23-plex kit®を用いてサイトカイン・ケモカイン濃度を測定した。

【結果】IRBP-immunized EAU において、HVEM-KO 群は WT 群に比べて臨床スコア(図 1A)、組織学的スコア(図 1B)ともに有意に低下し、炎症の減弱を認めた。また、IRBP 特異的な T 細胞の増殖試験においては、HVEM-KO 群は WT 群に比べて有意な増殖抑制がみられた(図 2A)。IRBP 特異的な T 細胞を IRBP で再刺激した培養上清のサイトカイン・ケモカイン濃度は、HVEM-KO 群では、IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF $\alpha$  の Th1 関連サイトカインに加え IL-17A、IL-17F、IL-22 の Th17 関連サイトカインの有意な減少がみられた(図 2B)。これらの Th17 関連サイトカインの産生低下が  $\gamma\delta$ +T 細胞の減少に依存するか否かを明らかにするため、EAU 誘導後 9 日目にリンパ節より T 細胞を単離し、IL-17A を産生する  $\gamma\delta$ +T 細胞の割合をフローサイトメーターにより調べたが、WT 群と HVEM-KO 群で有意差は認めなかった(図 3A)。さらに、IL-17A を産生する CD4 陽性 T 細胞の細胞数は HVEM-KO 群で有意に低下していた(図 3B)。これらの結果より、HVEM-KO 群における IRBP 特異的

T細胞による Th17 関連サイトカインの産生低下は、 $\gamma\delta$ +T 細胞の減少でなく、CD4 陽性 T細胞の減少によるものであることが示唆された。

次に EAU おける HVEM のリガンドの役割について調べるため、BTLA-KO マウスおよび LIGHT-KO マウスにおける EAU の炎症の程度を評価した。BTLA-KO マウス、LIGHT-KO マウスの両群において、WT 群に比べ臨床スコアが有意に低下し、BTLA または LIGHT の欠損による眼内炎症の抑制効果がみられた(図 4A-B)。さらに、IRBP 特異的 T細胞の増殖能の抑制もみられ(図 4C-D)、培養上清中の Th1 関連サイトカイン、Th17 関連サイトカインの産生減少もみられた(図 4E-F)。さらに、BTLA および LIGHT による眼局所の炎症反応を検討するため、ダブルノックアウト(DKO)マウスに EAU を発症させ、免疫後 14 日目に眼球を摘出し、Bio-Plex kit にてサイトカイン・ケモカイン濃度を測定した。WT 群では、IFN- $\gamma$ 、IL-17A が定量可能であったのに対し、DKO 群では検出不能であった(図 5)。以上の結果より BTLA-HVEM ならびに LIGHT-HVEM の共シグナル経路は炎症の標的組織である眼球においても重要な役割を担っていることが示唆された。

最後に、HVEM のアンタゴニストである抗 HVEM 抗体(クローン LBH1)を用いて HVEM の共シグナルを阻害し、炎症の抑制が可能であるかを調べた。抗 HVEM 抗体投与群はコントロール群に比べ、組織学的スコアが有意に低下し、炎症の改善効果がみられた(図 6A)。また、免疫後 21 日目にマウスより T細胞を単離し IRBP で刺激後、培養上清中のサイトカインを Bio-Plex Pro Mouse 23-plex kit<sup>®</sup>にて測定したところ、抗 HVEM 抗体投与群では IFN- $\gamma$ 、IL-17A、IL-17F、IL-22 が有意に減少していた(図 6B)。これらの結果より、EAU の炎症は HVEM 阻害剤によって改善できることが示された。

【考察】本研究では HVEM 共シグナルが実験的自己免疫性ぶどう膜炎 EAU の IRBP 特異的 Th1 および Th17 の機能を亢進させ、免疫亢進効果を示すことを明らかにした。一方で、HVEM は抑制性共シグナルを伝達する BTLA のリガンドとして作用するため、EAE、ConA-induced hepatitis、CIA では炎症抑制効果を示すことが報告されている。当研究室においても HVEM-KO マウスに MOG-immunized EAE を発症させると、既報通り IFN- $\gamma$  および IL-17 の産生が増加し、EAE の増悪がみられることを確認した。このことから、自己免疫性ぶどう膜炎と自己免疫性脳脊髄炎の発症における抗原特異的 T細胞に対する HVEM の作用が異なる可能性が示唆された。

また、本研究では BTLA と LIGHT の両者が EAU の病態に関与していることが示唆された。EAU における BTLA-HVEM と LIGHT-HVEM の詳細な経路については未だ解明されていないが、本研究では臨床スコアの詳細な解析から次に示すような興味深いデータと仮説を得ることができた。BTLA 欠損は EAU の病初期に改善を呈するのに対し、LIGHT 欠損は主に病後期に改善を示している。BTLA と LIGHT は免疫細胞上に時間的空間的に異なる発現をしているため EAU において異なる機序を有している可能性がある。C57BL/6 マウスでは BTLA は B細胞、T細胞、樹状細胞、マクロファージ、NK細胞など幅広い種類

の免疫細胞に発現しているのに対し、LIGHT は成熟した樹状細胞と活性化した T 細胞に発現が限定されている。よって、EAU の初期では、炎症を引き起こす免疫細胞上の BTLA と HVEM が作用し、一方、LIGHT は浸潤した T 細胞に発現し、EAU の後期に HVEM と作用している可能性が考えられた。

近年、非感染性ぶどう膜炎において抗 TNF- $\alpha$  抗体が臨床応用され、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17A など炎症性サイトカインに対する抗体療法の開発も積極的に進められている。本研究により HVEM を阻害することで、これらのサイトカインの産生を抑制し EAU の眼内炎症を抑制できることを示すことができた。これらの結果は HVEM がぶどう膜炎の治療標的となりえることを支持している。

【結語】本研究により、HVEM は実験的自己免疫性ぶどう膜炎 EAU の炎症を亢進し、HVEM を阻害することにより Th1/Th17 関連サイトカインを減少させ、炎症を抑制し、ぶどう膜炎の病勢を改善させることを示した。

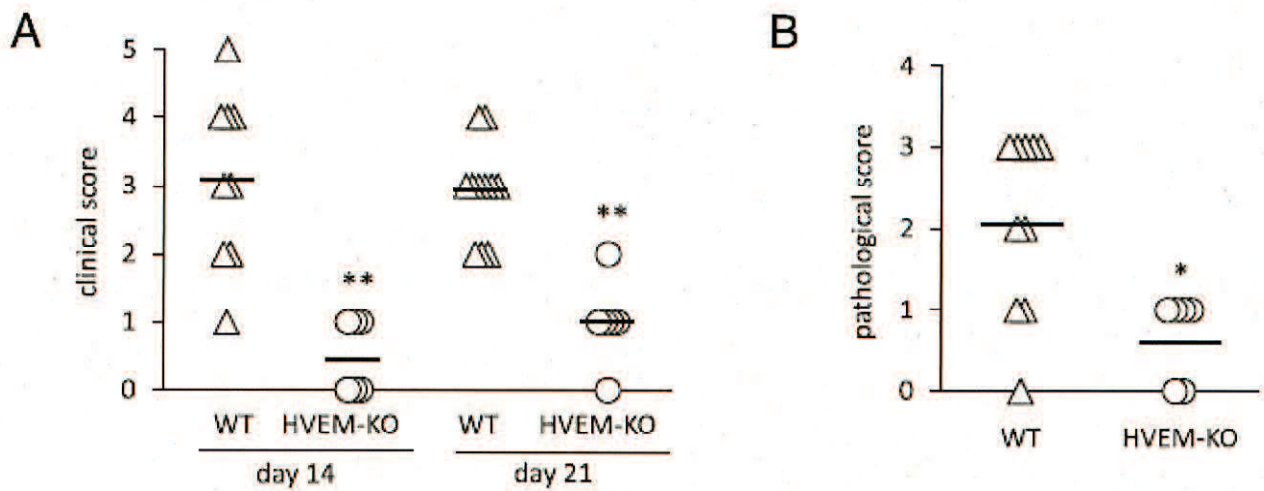
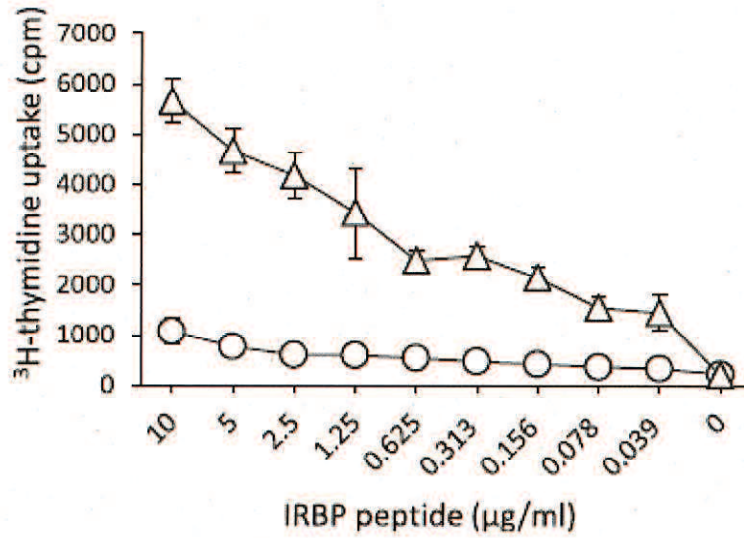


図1 WT群およびHVEM-KO群におけるEAUの炎症の評価

(A) WT群(△)、HVEM-KO群(○)ともにIRBPによる免疫後14日、21日目に眼底の炎症を臨床スコアによって評価した。

(B) 免疫後21日目に両群のマウスの眼球を摘出しの組織標本を作製し、組織学的スコアを算出した。各群の平均スコアを横線で示した。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ 。

A



B

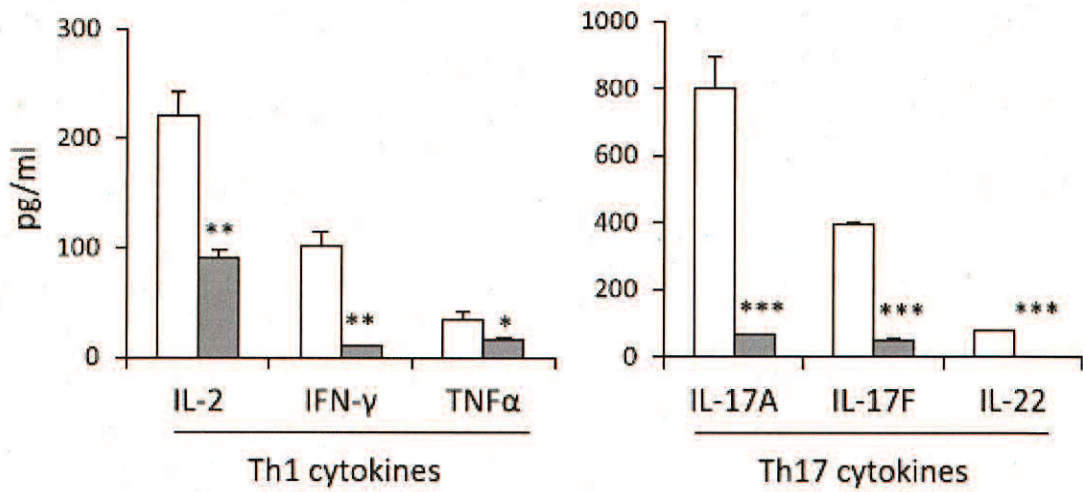


図2 WT群およびHVEM-KO群におけるIRBP特異的T細胞の増殖能、サイトカイン・ケモカイン産生能の評価

(A) WT群(△)、HVEM-KO群(○)ともにIRBPによる免疫後21日目にマウスから採取した所属リンパ節よりT細胞を単離しIRBPにて3日間刺激後、トリチウムサイミジン取り込み試験にてIRBP特異的T細胞の増殖能を評価した。

(B) IRBP刺激後48時間後に細胞培養上清を回収しBio-plexにてサイトカイン・ケモカイン濃度を測定した。(WT群、□; HVEM-KO群、■)

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ 。



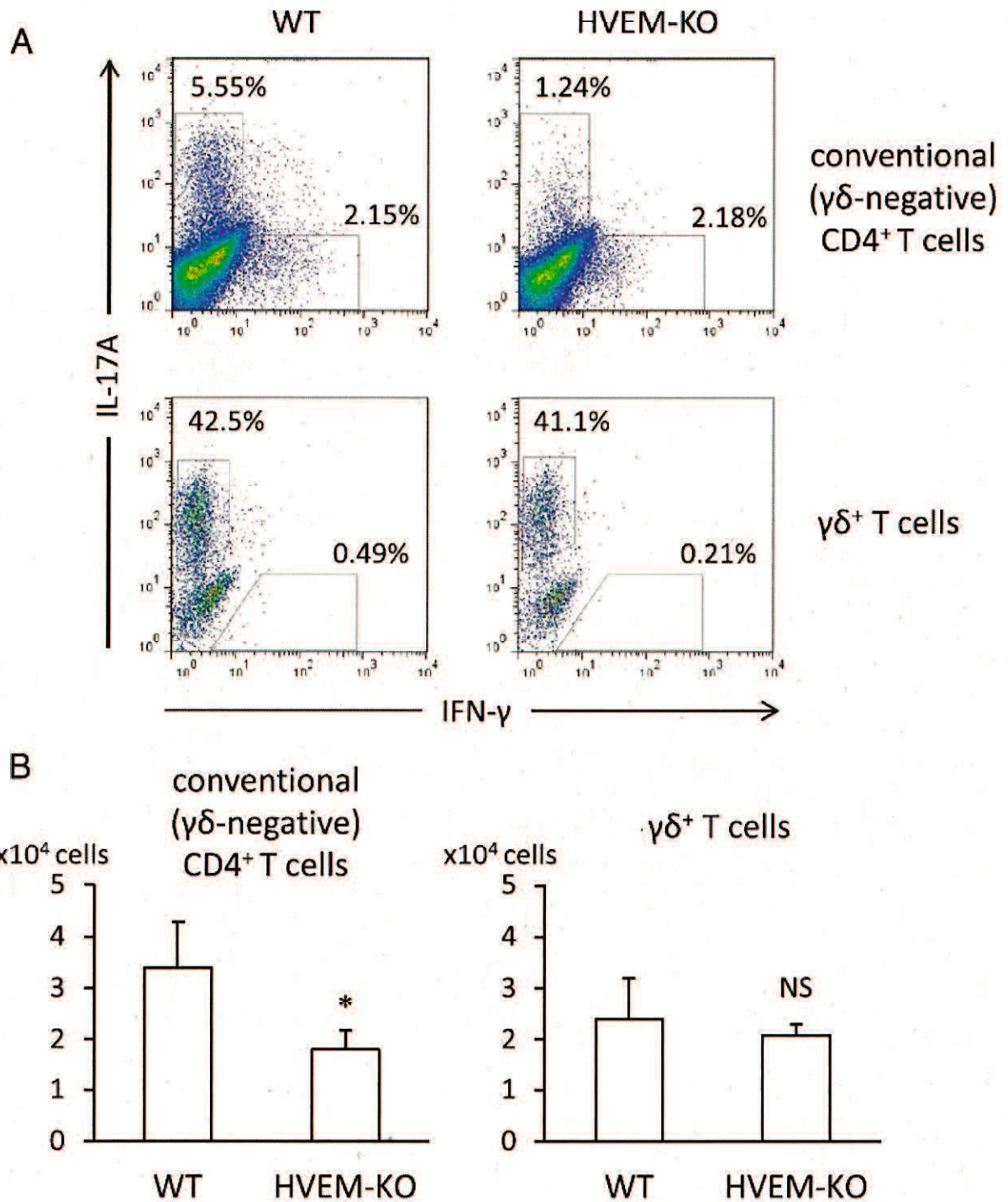


図3 WT群、HVEM-KO群における $CD4^+$ T細胞、 $\gamma\delta^+$ T細胞中のIL-17A陽性細胞の割合  
 (A) IRBPによる免疫後9日目に所属リンパ節よりT細胞を単離し、 $CD4^+$ T細胞と $\gamma\delta^+$ T細胞におけるIL-17AとIFN- $\gamma$ の発現をフローサイトメーターを用いて調べた。  
 (B)  $CD4^+$ T細胞と $\gamma\delta^+$ T細胞におけるIL-17A陽性細胞の細胞数を示した。\* $p < 0.05$ 。

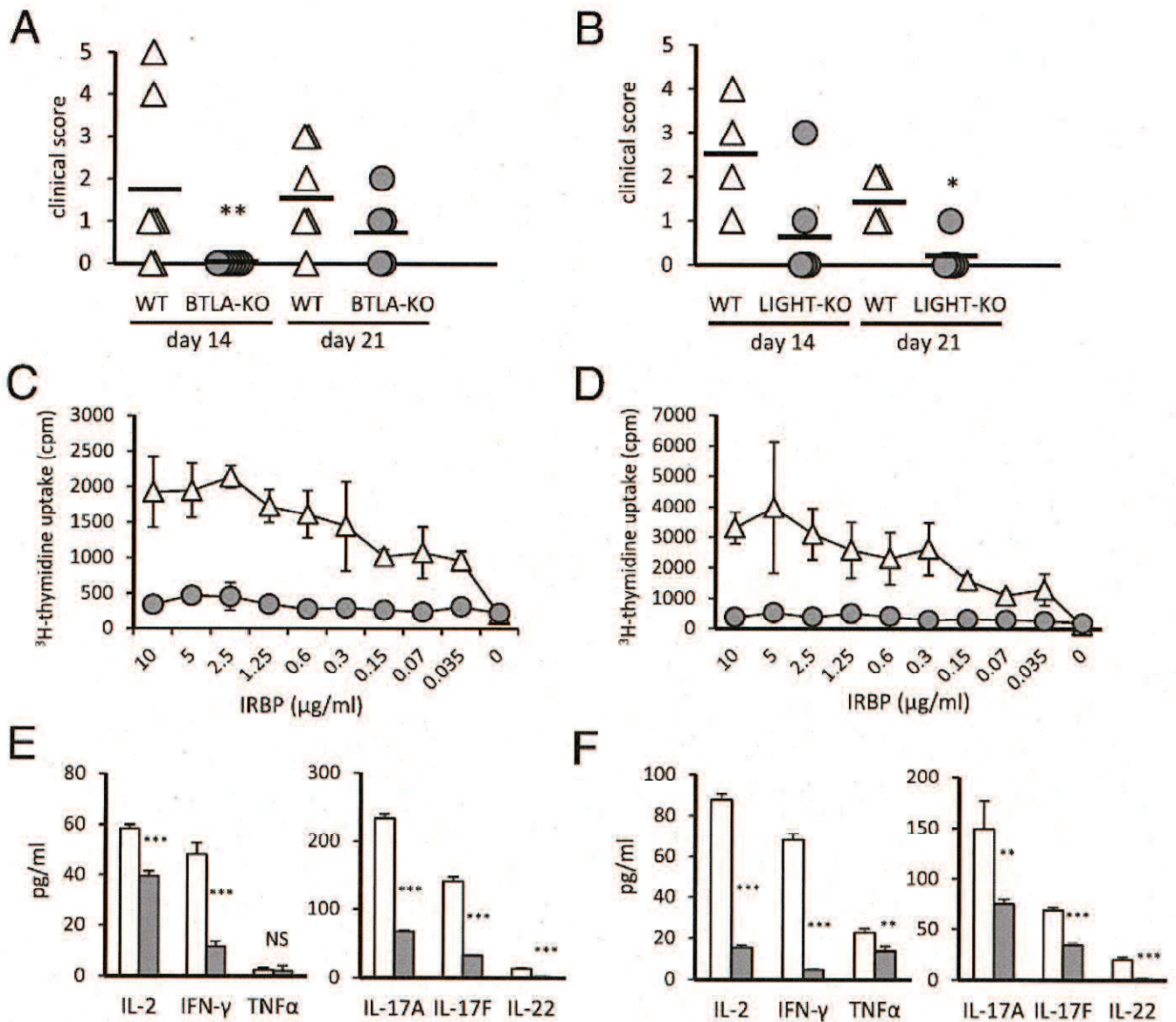


図4 BTLA-KO群およびLIGHT-KO群におけるEAUの炎症の評価やIRBP特異的T細胞の評価  
 BTLA-KO群(A)(○)、LIGHT-KO群(B)(○)をWT群(△)とともにIRBPを免疫し、14日・21日後に  
 眼底の炎症の程度を臨床スコアによって評価した。各群の平均スコアを横線で示した。

IRBPによる免疫後21日目にマウスから採取した所属リンパ節よりT細胞を単離しIRBPにて3日  
 間刺激後、トリチウムサイミジン取り込み試験にてBTLA-KO群(C)(○)、LIGHT-KO群(D)(○)  
 両群におけるIRBP特異的T細胞の増殖能をそれぞれWT群(△)と比較した。

IRBP刺激後48時間後にBTLA-KO群(E)(■)、LIGHT-KO群(F)(■)両群の細胞培養上清を回収  
 しBio-plexにてサイトカイン・ケモカイン濃度を測定した。

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$ 。

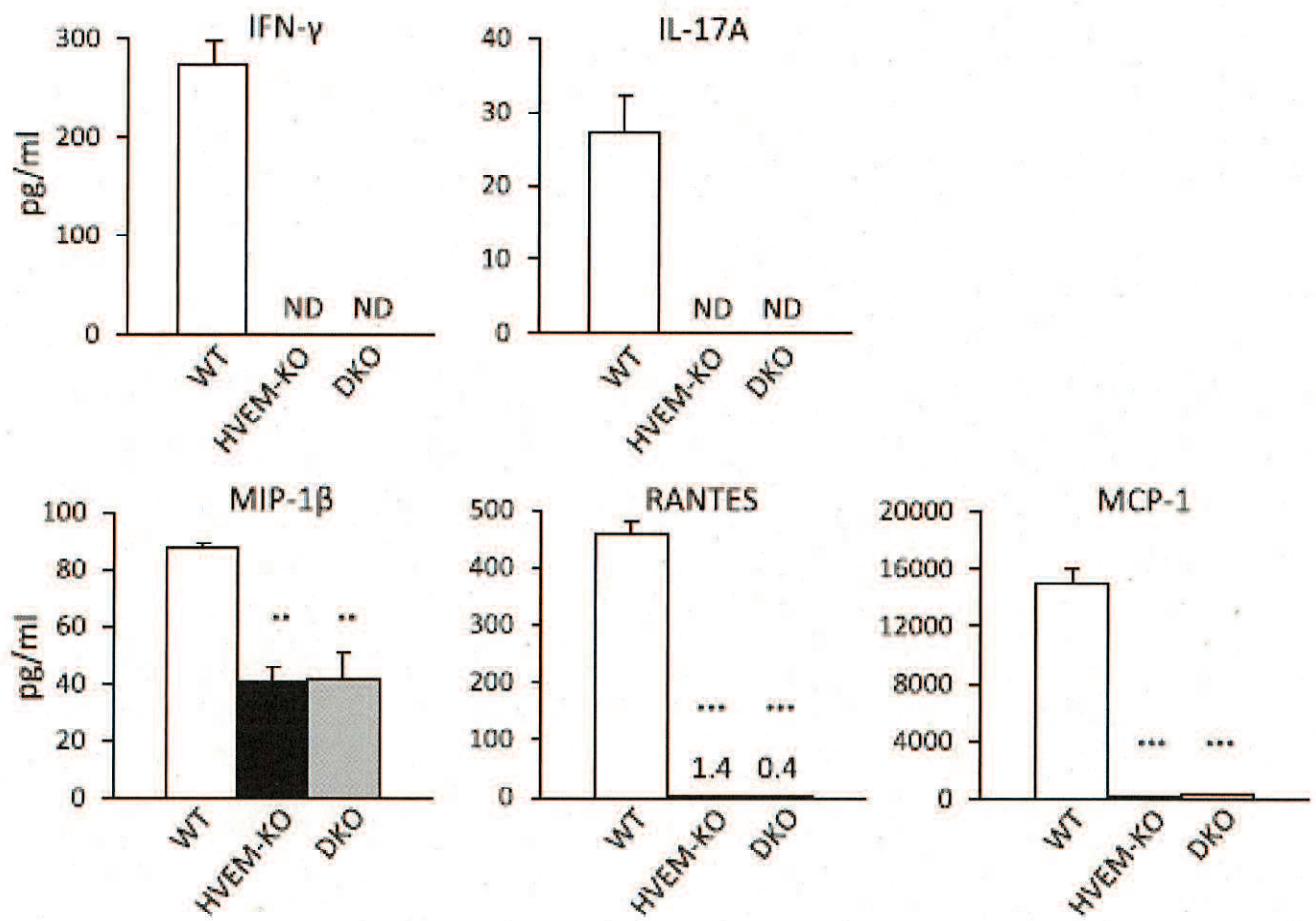


図5 HVEM-KO群、BTLA/LIGHT-DKO群の眼球における炎症反応の抑制  
 WT群、HVEM-KO群、BTLA/LIGHT-DKO群にIRBPを免疫後14日目に眼球を摘出し、  
 磨り潰して得られた上清のサイトカイン・ケモカイン濃度をBio-Plexを用いて測定した。  
 \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ 。

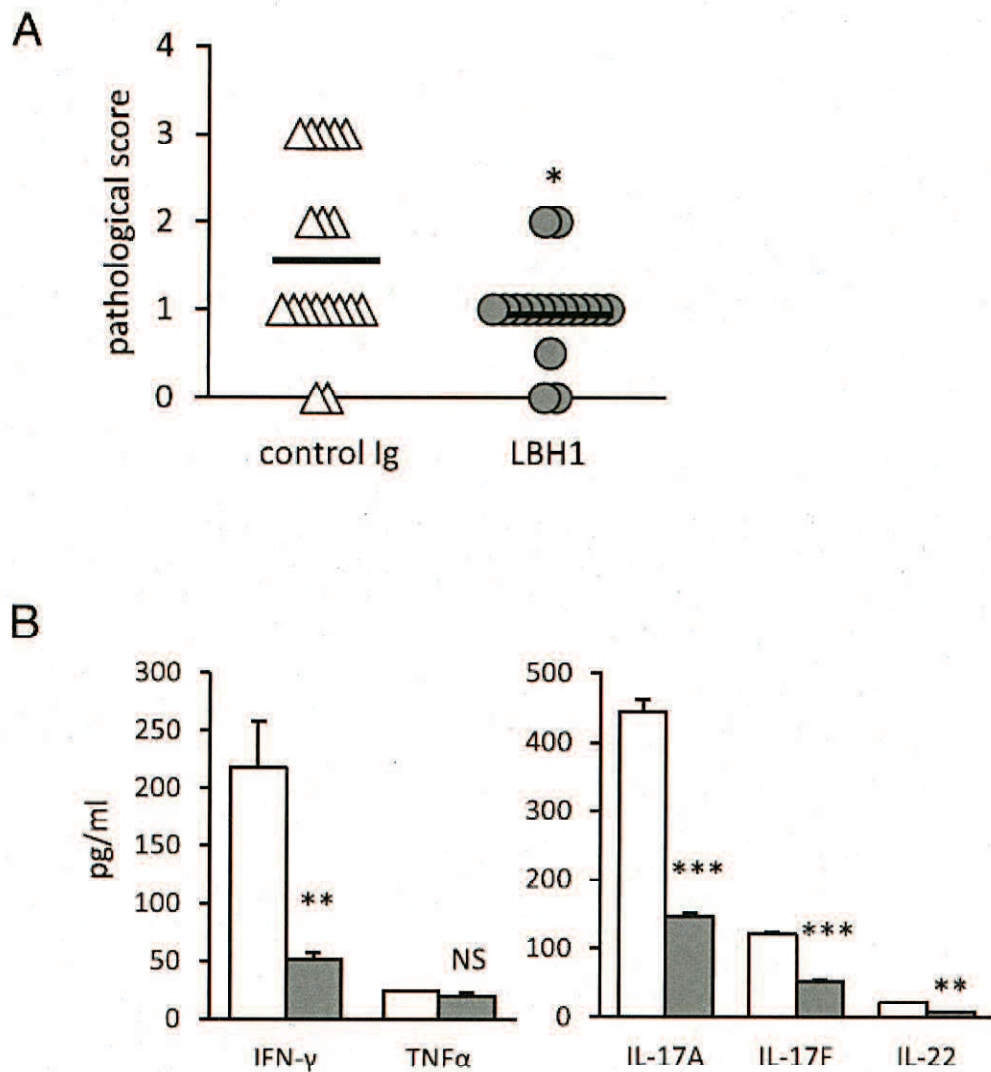


図6 抗HVEM抗体投与によるEAUの炎症の改善

(A)コントロール抗体群(△)、抗HVEM抗体投与群(クローンLBH1)(○)ともにIRBP免疫後21日目にマウスの眼球を摘出、組織標本を作製し組織学的スコアを算出した。

(B)IRBP免疫後21日目にマウスのリンパ節よりT細胞を単離しIRBPで刺激後、培養上清中のサイトカインをBio-Plexを用いて測定した。(コントロール抗体群、□; 抗HVEM抗体投与群、■)

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ 。