

論文内容の要旨

Protective Role of ICOS and ICOS Ligand in Corneal Transplantation and in Maintenance of
Immune Privilege

角膜移植と免疫特権の維持における ICOS・ICOS Ligand の保護的な役割

日本医科大学大学院医学研究科 眼科学分野
研究生 國重 智之

Investigative Ophthalmology & Visual Science 第 57 卷 第 15 号 (2016) 掲載

Inducible costimulatory molecule (ICOS)は、CD28 スーパーファミリー副刺激分子の一つである。ICOS Ligand(ICOSL)を介して、T細胞の活性化および Th1/Th2 分化に関与していると報告されている。今回、マウス角膜移植の生着において、ICOS・ICOSL がどのように寄与しているのか、研究した。

まず、RT-PCR にて、マウスにおける ICOS・ICOSL の発現を解析した。ICOSL mRNA の発現を、角膜・虹彩・網膜において認めた。一方、ICOS mRNA の発現は、角膜において認めたが、弱かった。

続いて、ドナーに C57BL/6(B6)マウス、レシピエントに ICOS ノックアウト(ICOSKO)BALB/c マウス、または抗 ICOSL 抗体を投与した BALB/c マウスを用いて、アロ角膜移植を行った。コントロールとして、レシピエントにナイーブ BALB/c マウスを用いて、生着率を比較、解析した。その結果、レシピエントが ICOSKO マウス、または抗 ICOSL 抗体を投与したマウスであった場合、コントロールと比較して有意に生着率は短縮した($p < 0.01$)。よって、ICOS・ICOSL が、マウス角膜移植の生着維持に必須である可能性が示唆された。

この機序を解明するために、マウスアロ角膜移植の生着グラフト・拒絶グラフトの ICOSL の発現について、Real-time PCR を行い、ICOSL mRNA の発現量を比較した。拒絶グラフトにおける ICOSL mRNA の発現量は、生着グラフトと比較し、有意に低かった($p < 0.01$)。次に、アログラフトにおいて、免疫染色を行い、ICOS+ Foxp3+ CD4+ T細胞と ICOS+ Foxp3(-) CD4+ T細胞の数を比較した。生着グラフトでは、ICOS+ Foxp3+ CD4+ T細胞の発現を認めたが、ICOS+ Foxp3(-) CD4+ T細胞と比較して、細胞数において有意差を認めなかった。逆に、拒絶グラフトでは、ICOS+ Foxp3(-) CD4+ T細胞数が ICOS+ Foxp3+ CD4+ T細胞数よりも有意に多かった($p < 0.05$)。Real-time PCR と免疫染色の結果から、ICOS・ICOSL は、ICOSL の発現が維持された場合、ICOS+CD4+ 制御性 T細胞の作用を介し、移植片を生着させる働きをするメカニズムが示唆された。

次に角膜移植の生着維持に必須のメカニズムである Anterior Chamber-Associated Immune Deviation (ACAID)の解析を行った。ICOSKO BALB/c マウスまたは、ナイーブ BALB/c マウスを用いて、比較検討した。B6 マウス脾細胞を前房注入し、2週間後、B6 マウス脾細胞を皮下注射し、免疫した。さらに、1週間後、B6 マウス脾細胞を耳介に皮内注射し、その 24 時間後に耳介の腫脹を比較し、ACAID の誘導の有無を検討した。前房注入のないポジティブコントロールと比較すると、ICOSKO マウスの耳介の腫脹は有意に弱く($p < 0.01$)、ACAID は誘導された、と考えられた。しかし、ACAID を誘導したコントロールと比較すると、ICOSKO マウスの耳介の腫脹が有意に強く($p < 0.05$)、ACAID の誘導は弱かった。以上から、ICOSはACAID誘導にも一部関与し、角膜移植の生着に寄与している可能性が示唆された。

続いて、角膜内皮細胞とT細胞の共培養を *in vitro* にて行い、ICOSが眼局所において、角膜内皮保護に寄与しているかどうか検討した。B6 脾細胞を免疫した ICOSKO BALB/c マウス、または、コントロールとして B6 脾細胞を免疫したナイーブ BALB/c マウスから T細胞を分離した。角膜内皮細胞とT細胞を 6 時間共培養後、角膜内皮死細胞数を測定し、比較検討した。ICOSKO-T細胞と共培養した結果、コントロールと比較して有意に角膜内皮死細胞数が多く($p < 0.01$)、ICOS は眼局所

において、角膜内皮保護作用がある可能性が示唆された。次に、この T 細胞のうち、Foxp3+ CD25+ CD4+ T 細胞の割合をフローサイトメトリーにて比較検討した。培養後の ICOSKO-T 細胞における Foxp3+ CD25+ CD4+ T 細胞の割合は、コントロールと比較して、有意に低かった ($p < 0.05$)。よって、ICOS は眼局所において、CD4+制御性 T 細胞を介して、角膜内皮細胞を保護している可能性が示唆された。

以上から、ICOS・ICOSL は、角膜移植の生着に必須であり、角膜局所または、ACAID を介して作用し、その機序として、CD4 陽性制御性 T 細胞を介して、角膜移植の生着に寄与している可能性が示唆された。