

研究題目 免疫抑制性シグナル分子の網膜変性症発症と病態進展における役割の解析

研究組織

研究代表者：渡邊 すみ子（東京大学医科学研究所）

共同研究者：岡崎 拓（徳島大学先端酵素学研究所）

共同研究者：馬場 行広（東京大学医科学研究所）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

我々は網膜神経変性症におけるマイクログリア細胞の役割を研究しているが、抑制性免疫シグナルのマイクログリア活性制御における役割を指摘する予備的なデータを得た。我々が着目している抑制性免疫シグナル解析について岡崎教授グループが国内で最高レベルの研究を行っており、多数のノックアウトマウスの解析を行っていることから、中枢神経変性症での抑制性免疫シグナルの役割について共同で明らかにすることを目的としている。

[1-2] 研究の方法・経過

眼内ではミューラーグリア細胞、網膜色素上皮細胞などがサイトカインの放出により免疫的環境を構築していると考えられるが、中枢神経常在のマクローファージ様の細胞であるマイクログリア細胞も重要な役割を果たしていることが近年急速に知られてきた。マイクログリアは視細胞変性に伴い活性化するが、この活性化が神経変性にとって正負いずれに作用するのか、多くの議論があり明らかではない。私たちは網膜の正常時、変性時における神経細胞、ミューラーグリア、マイクログリア細胞の相互作用による病態形成について明らかにするため、それぞれの細胞を精製し、RNA-seqにより遺伝子発現パターンを検討してきた。その過程で、抑制性免疫補助受容体であるPD-1が正常網膜における静止期、および網膜変性に伴う活性化後のマイクログリアに高発現することを明らかにした。一方、PD-1と同様に抑制性シグナルを伝達する免疫補助受容体であるLAG-3は、静止期のマイクログリアで強く発現し、活性化に伴い発現がほぼ消失することが明らかになった。このことは、PD-1とLAG-3が正常網膜でマイクログリアを静止状態に維持する役割を果たしており、活性化に伴い、少なくともLAG-3シ

グナルからの離脱により活性化が可能になることを示唆している。そこで、PD-1、LAG-3が正常時、および視細胞変性時にマイクログリアの状態を規定し、これにより変性の病態が修飾されることを仮定し、またこれらの分子が視細胞変性制御の創薬ターゲットとなる可能性を考えて、本共同研究を平成29年度より開始した。

最終年度である本年度は、遺伝的背景の異なるマウスのフェノタイプについて、より分子的な検討を詰めて、メカニズム研究に展開することを計画した。特に既存のSLE, AMDモデルマウスとの表現型の違い、あるいは共通点についてより詳細に検討を行う。一方、加齢の影響についても検討を行う。マイクログリアのみならず、視細胞、シナプス、介在神経、前眼部、網膜色素細胞など広く眼内の各細胞系列の状態を免疫染色、遺伝子発現の検討により時系列を追って検討する。こうして得られたフェノタイプについてPD-1ノックアウトによる変化と、既存のぶどう膜炎, AMDモデルとの類似性を検討することにより、観察されているフェノタイプがどういった病態と関連しているのか評価を行う。視細胞変性が自然発症する系統のマウスにおいてはPD-1のノックアウトにより耐性になることが示唆され、この現象が他の要因による網膜変性に対しても同様に観察されるのかNaIO₃などを用いて視細胞変性を誘導し、その表現型を比較検討し、分子基盤の検討を行う。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

PD-1がノックアウトされた様々な系統のマウスの解析

あるマウスの背景においては眼球の毛様体あるいは脈絡膜にIba1陽性のマイクログリア細胞あるいはマクローファージが集積しており、PD-1のノックアウトにより眼内にぶどう膜炎様の炎症

が起こっている像が観察された。このことは、PD-1 ノックアウトによる弱いシステム的な炎症が眼内に何らかの免疫学的変化を起こしているという我々の仮説を裏付けるものであった。一方、別系統のマウスでは、人為的に視細胞変性を起こすと、変性がコントロールより深刻になり、マイクログリアから産生されると想定されるケモカイン類のレベルも高くなっていた。この表現型はヒトの深刻な失明原因である加齢性黄斑変性(AMD)と共通点があり、このモデルマウスとなり得る可能性があった。

炎症像に存在する免疫担当細胞の検討

PD-1 ノックアウトマウスで観察される後眼部の炎症像における免疫担当細胞を種々の免疫染色により検討すると、Iba1 陽性のマイクログリアはむしろ少数で、Ly6c 陽性のモノサイト/マクロファージが侵入していること、さらにCD4/CD3 陽性の T 細胞がコロイド付近に集積していることが明らかになった。

網膜変性時における PD-1 の役割

視細胞変性が自然発症する系統のマウスにおいては PD-1 のノックアウトにより耐性になることが示唆され、この現象が他の要因による網膜変性に対しても同様に観察される可能性を考え MNU, NaIO₃ を投与し、これらにより引き起こされる視細胞変性への PD-1 ノックアウトの影響について検討を加えた。しかし、視細胞の厚み(変性の進展に伴い薄くなる)、炎症像などに明らかな差は観察されなかったため、少なくともこの二つの系における PD-1 の神経変性進展への役割については見出されなかった。ただし個々のサイトカインに関しては上昇しているものも観察され、その意義については現段階では不明で今後の解析結果が期待される。

加齢マウスの解析

40 週齢、72 週齢の PD-1 ノックアウトマウスの網膜の組織学検討を行ったが、明らかなフェノタイプは観察されず、PD-1 ノックアウトが網膜変性の背景になるという結果は得られなかった。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究では PD-1 ノックアウトマウスについて、マウスの背景を複数検討することで、明確に異なる表現型の観察に至った。その生物学的意義や分子基盤が今後明らかになると期待される。本研究では、当初の仮説を裏付ける結果と同時に、当初の考えとは異なる結果であるが興味深いフェノタイプを背景のことなる複数のマウスのラインから得ることができた。これらの結果は、さらに

この分子機構を探り、免疫抑制分子と網膜疾患、全身性のアレルギーなどの関係を検討することで、がん患者に対する PD-1 をはじめとする免疫チェックポイント阻害薬投与時に観察される有害事象の理解や回避への分子機構はもとより、ストラテジの検討にも有用な知見となることが期待される。

【3】 主な発表論文等

[3-1] 論文発表 なし

[3-2] 学会発表

2019年11月11-15日 OIST retina workshop, 講 "Roles of microglia and immunological circumstance in onset and progression of retinal photoreceptor degeneration", OIST, Okinawa

August 2-4, 2019 The 2nd International Vision Symposia— Ocular Development, Neurodegeneration and Repair, *Roles of microglia and immunological circumstance in onset and progression of retinal photoreceptor degeneration*, Guangzhou, China

[3-3] 成果資料等 なし

【4】 今後の課題等

今後は現在までの成果を論文にまとめ、また興味深い表現型を示すマウスのラインについて、より深い分子基盤の解析を行う予定である。一方、マウスの系統に従ってフェノタイプが異なるという現象をどのように分子的に説明するのかは、現在では良いアプローチの手法がなく、検討すべき課題である。