

## 第101回 日本眼科学会総会 宿題報告 III

## 眼の細胞生物学

## ぶどう膜炎の細胞生物学

中村 聡

横浜市立大学医学部眼科学教室

共同研究者

杉田美由紀, 猪飼 央子, 鳥山 聖子, 大野 重昭

研究協力者

水木 信久, 的場 博子, 石原 麻美, 新藤裕実子, 高野 昌代, 伊藤 典彦  
 石岡みさき, 八幡 信代, 木島 正哉, 鎌田 光二, 秦野 寛, 高野 雅彦  
 内尾 英一, 今井 由美, 佐々木隆敏, 山本 倬司, 田中 俊一<sup>1)</sup>, 奥田 研爾<sup>2)</sup>  
 磯田扶美子<sup>2)</sup>, 中沢 正年<sup>3)</sup>, 南 陸彦<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>横浜市立大学医学部第3内科学教室, <sup>2)</sup>横浜市立大学医学部細菌学教室, <sup>3)</sup>横浜市立大学医学部寄生虫学教室

## 要 約

ぶどう膜炎のあるベーチェット病18例について, T細胞の活性化とアポトーシスの様相を調べ, 動物モデルを使って抗サイトカイン療法の可能性を検討した. 活動性ぶどう膜炎のある患者のCD4陽性細胞のCD69陽性率は正常対照よりも有意に高く, 活性化状態にあると推定された. これはOKT-3刺激後に逆転し, 24時間後に患者群は対照群よりも有意に低値になった. CD4陽性細胞のFas抗原は, OKT-3刺激で対照群では有意に増加し, 患者群では増加がなかった. また, CD4陽性細胞のFasリガンドは, 刺激後対照群で有意に上昇し, 患者群では変化がなかった. この事実は, 患者T細胞はある程度に活性化された状態にとどまり, リンパ球を活性化するような刺激に対する応答性が低くなっていることを示すものである. さらに, 活性化したリンパ球にアポトーシスを誘導すると, 活動性ベーチェット病患者のT細胞はアポトーシス抵抗性であり, 活性化誘導型細胞死(AICD)が起こりにくい結果が得られた. 患者の可溶性Fas抗原の血清中濃度は, 正常対照に比べ有意に上昇し, 本病の免疫病態

の異常に関与していると考えられた. 炎症早期のラット実験的自己免疫性ぶどう膜炎(EAU)の組織に浸潤している細胞にTdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL)法で染色されるアポトーシスが観察され, 消炎寛解に至る過程に浸潤細胞のアポトーシスが関与していることが推定された. 免疫後の腫瘍壊死因子(TNF-alpha)産生が上昇するのに併せて投与した抗TNF-alpha抗体で, 炎症は濃度依存性に抑制された. 以上の所見から, ベーチェット病ではT細胞の活性化, ならびにアポトーシスとAICDの機序に異常があり, これが慢性炎症の原因になっていると推定された. 動物実験モデルから, TNF-alphaに対する抗体投与が有効であることが推測された. (日眼会誌 101: 975-986, 1997)

キーワード: ベーチェット病, 活性化誘導型細胞死, アポトーシス, 実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎, 抗TNF-alpha抗体

別刷請求先: 236 神奈川県横浜市金沢区福浦3-9 横浜市立大学医学部眼科学教室 中村 聡  
 (平成9年9月25日受付, 平成9年10月8日受理)

Reprint requests to: Satoshi Nakamura, M.D. Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken 236, Japan

(Received September 25, 1997 and accepted in October 8, 1997)



## Cell Biology in Endogenous Uveitis

Satoshi Nakamura

Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine

## Abstract

We studied the immune system in 18 cases of Behçet's disease with ocular involvement. The proportion of CD69+ cells in CD4+ cells was significantly higher in patients with active uveoretinitis than in normal controls ( $p < 0.01$ ). After OKT-3 stimulation of cultured cells, the proportion was significantly increased in controls ( $p < 0.01$ ) but not in patients. Fas-ligand positive cells in CD8+ cells in patients did not increase after OKT-3 stimulation. Thus, the T cells in patients were in an activated state *in vivo* but were not further activated by OKT-3 stimulation. Cultured lymphocytes of patients after OKT-3 activation and anti-Fas antibody stimulation showed that the T cells in the active stage of the disease were resistant to apoptosis and unlikely to undergo regression by activation-induced cell death (AICD). The mean level of soluble Fas antigen was significantly elevated in sera of patients with active uveoretinitis as compared with normal controls ( $p < 0.05$ ). TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL)-positive

infiltrating cells were present in the inflamed retina and the posterior chamber in experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in rats, suggesting the involvement of apoptosis of infiltrated cells in the regression of inflammation. Serum concentration of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) was significantly elevated after 9 days of immunization in rats ( $p < 0.02$ ). The inflammation score was suppressed by intravenous administration of anti-TNF-alpha antibody from days 7 to 14. It is concluded that intraocular inflammation in Behçet's disease is associated with activation of T cells and abnormality in apoptosis and AICD mechanisms. Systemic anti-TNF-alpha antibody promises to be of value in the treatment of the disease. (J Jpn Ophthalmol Soc 101 : 975-986, 1997)

**Key words:** Behçet's disease, Activation-induced cell death (AICD), Apoptosis, Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU), Anti-TNF-alpha antibody

## I 緒 言

免疫応答とは、微生物をはじめとする環境からの侵襲(非自己の抗原)を排除する目的で起こる一連の生体反応であり、個体が生存するために必要不可欠なシステムである。しかし、この反応は時に本来の目的から逸脱し、自身に害を及ぼすような効果を持つ場合がある。ぶどう膜炎は、この免疫応答の主として過剰な状態によって引き起こされると考えられ、本研究はこの問題を細胞生物学的に解析することを目的とする。

日本人に多い内因性ぶどう膜炎の一つであるベーチェット病は、古くは好中球の異常を基礎とする疾患であると考えられていたが、最近では炎症局所の病理組織の解析から、好中球の浸潤に先立ってリンパ球が出現することが知られている<sup>1)</sup>。すなわち、結節性紅斑や前房蓄膿などの形成に好中球が主に関与するとしても、実際にその病態が成立するためには、前段階としてリンパ球の活性化が起こっていると考えられる。これは、リンパ球の活性化の抑制が主要な作用であるシクロスポリンがベーチェット病に有効であることから推測されることである。したがって、ベーチェット病の病因、病態の解明にはリンパ球の免疫動態を解析することが重要であると考え

られる。

これまで、我々はベーチェット病の疾患感受性遺伝子についての研究成果を幾つか報告してきた。このうち最も新しい成果として、線維芽細胞や上皮細胞に発現し、 $\gamma\delta$ T細胞に抗原提示を行うとされる major histocompatibility complex (MHC) class I chain-related gene A (MICA) 遺伝子の偏りが見出された<sup>2)</sup>。ベーチェット病における  $\gamma\delta$ T細胞の関与については、これまで病因の候補の一つであるレンサ球菌との関わりについて報告<sup>3)4)</sup>しているが、細菌感染とそれに続く  $\gamma\delta$ T細胞の活性化は発症機転、あるいは発作の誘因として有力な候補であると考えている。

抗原提示細胞が Tリンパ球を活性化させる際に主要な役割を担うのが腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor-alpha, TNF-alpha)とインターロイキン-1(interleukin-1, IL-1)である。我々は以前、活動性のぶどう膜炎を有するベーチェット病患者の末梢血単球の TNF-alpha 産生能が亢進していること<sup>5)</sup>、免疫抑制剤の治療によりこれが低下することを報告<sup>6)</sup>した。これより単球とリンパ球のサイトカイン、特に TNF-alpha を介した相互作用がベーチェット病の病態形成に重要な役割を果たしているものと考えられる。また、内因性ぶどう膜炎の動物モデル



である experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) でも疾患感受性、病態形成にやはり TNF- $\alpha$  が関与していることを報告<sup>7)</sup>したが、その後、Caspi ら<sup>8)</sup>は免疫後早期に抗 TNF- $\alpha$  抗体を投与することで EAU の発症が抑制されることを報告し、ぶどう膜炎の抗サイトカイン療法についての展望を示している。

ベーチェット病のリンパ球に関する研究としては、ヘルパー T 細胞のサブセットに関する研究と表面抗原の発現の偏りについて報告してきた。ヘルパー T 細胞は、そのサイトカイン産生パターンから Th 1 と Th 2 の 2 つに分けられることが 1986 年 Mosmann ら<sup>9)</sup>により報告され、その後、これは相互に抑制的に働きながら免疫応答を制御し、病態を形成していることが明らかになってきた<sup>10)</sup>。我々は活動性ベーチェット病患者の末梢血リンパ球を細胞内のサイトカインを直接染色してフローサイトメータで解析し、ヘルパー T 細胞が Th 1 優位であることを明らかにした<sup>11)</sup>。また、この活性化したヘルパー T 細胞が、CD 25 などの活性化マーカーの発現の増強があるにもかかわらず、やはり活性化マーカーであり自身にアポトーシスを誘導する抗原である Fas 抗原の発現が不良であることを報告<sup>12)</sup>している。

これらの結果をもとに、我々はベーチェット病における T 細胞の活性化の様相とアポトーシスを誘導する刺激に対する感受性を調べ、慢性炎症病態の解明を試みるとともに EAU モデルを用いて抗サイトカイン療法の可能性について検討を加えた。

## II 対 象

1995 年 6 月から 1997 年 2 月までの 1 年 7 か月の間に横浜市大医学部附属病院眼科ぶどう膜炎外来を受診したベーチェット病患者のうち、活動性のぶどう膜炎、すなわち過去 6 か月間に 3 回以上眼発作を起こした 13 例と、6 か月以上眼発作を起こしていない非活動性 5 例、計 18 例を対象とした。症例の内訳は、男性 7 例、女性 11 例、平均年齢 37 歳で、厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班の診断基準に基づく病型分類では、完全型 5 例、不全型 13 例であった。また免疫抑制剤による治療は、活動性群では 10 例、非活動性群では 2 例が受けていた。また正常対照として、健康成人 10 例、男性 4 例、女性 6 例、平均年齢 32 歳を検索した。被験者については患者、対照ともに実験の内容について事前に十分な説明を行い、同意を得た。動物モデルはルイスラット 6～8 週齢の雄を用い、横浜市大医学部の動物実験規約に則って飼育し、実験を行った。

## III 方 法

### 1. 単核球の分離、培養

正常対照 6 例および活動性ベーチェット病患者 5 例から静脈血をヘパリン加採血し、比重遠心法で単核球を分

離した。この単核球の一部はそのまま表面抗原の解析をし(0 時間)、残りは 10% ウシ胎児血清添加 RPMI 1640 培養液(日研)により  $2 \times 10^6$  cells/ml に調整して 24 穴培養プレート(FALCON®, Becton and Dickinson)で 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 下で培養した。培養に当たっては単核球に対する刺激因子として、9  $\mu$ g/ml もしくは 1  $\mu$ g/ml の濃度で固相化した OKT-3(横浜市大医学部寄生虫学教室南 陸彦教授から供与)もしくは staphylococcal enterotoxin B (SEB) 900  $\mu$ g/ml (Sigma) を用い、24, 48, 72 時間の各時点で回収し、各種表面抗原の解析を行った。表面抗原のうち、Fas リガンドに関しては培養条件を OKT-3 (9  $\mu$ g/ml)、培養時間 24 時間のみで検討した。対照として、刺激因子を加えないで培養した系を用意した。

### 2. アポトーシスの誘導

正常対照 4 例、ベーチェット病活動性患者 3 例、非活動性患者 3 例それぞれから前項と同様に単核球を分離し、OKT-3 (9  $\mu$ g/ml) 刺激 24 時間後、抗 Fas 抗体 (100 ng/ml, clone-CH 11, MBL)、もしくは TNF- $\alpha$  (10 ng/ml, Boehringer Mannheim) を添加し、さらに 24 時間培養した後、アポトーシス細胞の有無を表面抗原の解析により検討した。

### 3. 表面抗原の解析

培養前後のリンパ球の表面抗原の解析にはフローサイトメータ (FACSCan®, Becton and Dickinson) を用いた。染色に用いたモノクローナル抗体は fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 Fas 抗体 (MBL)、phycoerythrin (PE) 標識抗 CD 69 抗体 (Becton and Dickinson) PerCP 標識抗 CD 4 抗体 (Becton and Dickinson)、PerCP 標識抗 CD 8 抗体 (Becton and Dickinson)、FITC 標識抗 Fas リガンド抗体 (MBL) である。また、アポトーシスの有無に関しては早期アポトーシス細胞の表面に発現するホスファチジルセリン<sup>13)</sup>に結合する annexin V<sup>14)</sup> (FITC 標識, R&D システムズ) を用いて検討した。染色方法は既報<sup>12)</sup>に準じ、annexin V については塩化カルシウム含有緩衝液を用いた。また、表面抗原の陽性率の検定には Mann-Whitney の U 検定を用いた。

### 4. 血清可溶性 Fas 抗原の測定

活動性患者 13 例および対照 10 例の末梢血から血清を分離し、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法 (sFas ELISA キット, MBL) で可溶性 Fas 抗原の濃度の測定を行った。検定は student t 検定を用いた。

### 5. EAU の作製

EAU 惹起能を有することが知られているペプチド R 14<sup>15)</sup> を用いて、既報<sup>7)</sup>に準じてラットの足蹠に完全フロインドアジュバントとともに免疫した。同時に百日咳菌死菌 (和光純菌)  $10^{10}$  個を尾静脈から注射した。

### 6. EAU の組織中のアポトーシス細胞の観察

免疫後 9 日目に眼球を摘出し、4% パラフォルムアルデヒドで固定し、TdT-mediated dUTP-biotin nick end



labelling (TUNEL)法<sup>16)</sup>で染色し、アポトーシス細胞の有無を観察した。

7. EAU ラットの *in vivo* TNF-alpha 産生能の測定

免疫2, 4, 7, 9, 11, 13, 15日後に50 µg/ラットの lypopolisaccharide (LPS) (Sigma)を尾静脈から注射し, 90分後に心腔採血して血清を分離し, ELISA 法で TNF-alpha 濃度を測定した(ラット TNF-alpha 測定キット, Genzyme). 検定は student t 検定を用いた. ラットは各群5~6匹を用いた.

8. 抗 TNF 抗体治療

ウサギ抗ラットポリクローナル TNF-alpha 抗体 (Centocor, USA の Dr. DJ Shealy から供与)を用いて, 免疫7日後から14日まで連日2.0, もしくは1.0 mg/ラットを尾静脈から注射し, 免疫14日目に眼球摘出し病理組織を観察した. 対照として, 生理食塩水を注射した群を用いた. ラットは対照群4匹, 抗体投与群は各群6匹とした. 摘出眼球の染色および炎症の重症度の評価は既報に準じた.

IV 結果

1. 培養に伴う表面抗原の変化

まず, CD 4 陽性細胞, CD 8 陽性細胞のリンパ球分画における割合は患者群, 対照群いずれも培養経過に伴って変化せず, 明らかな増加, あるいは減少は観察されなかった(図1, 2). 一方, CD 4 陽性細胞において, 早期活性化マーカーである CD 69 は, 正常対照では OKT-3 (9 µg/ml) 刺激により培養24時間後から有意に上昇(刺激前=5.82±3.6(平均値±標準偏差), 24時間=75.0±13.0, p<0.01)したのに比べ, ベーチェット病患者群では培養前は対照群よりも有意に高値(22.0±11.7, p<0.01)であったが, 非刺激の状態では減少し, 刺激系でも軽度上昇するにとどまり, 24時間以降対照群よりも有意に低値(45.4±9.7)となった(p<0.01)(図3). この傾向は CD 8 陽性細胞においてもみられ, 培養前値は有意差はないものの患者群で高く, 培養後は逆に対照群で高値となった(図4). また, 活性化マーカーでありアポトーシス関連抗原でもある Fas 抗原は培養前, CD 4 陽性細胞では患者群で軽度上昇していたが有意差はなく(図5), 一方 CD 8 陽性細胞では, 患者群(60.1±18.9)は対照群(23.0±6.9)に比べ有意に上昇していた(p<0.01)(図6). これは培養後, CD 4 陽性細胞の Fas 抗原は対照群では有意に増加(OKT-3 9 µg/ml 群, 刺激前=41.3±9.8, 24時間=60.4±10.2, p<0.01)するのに比べ, 患者群では明らかな増加がみられず, 24時間後には対照群の Fas 抗原陽性率が患者群よりも高くなっていった(図5). CD 8 陽性細胞でもこの傾向は同様で, 24時間以降対照群と患者群に差はみられなくなった(図6). なお, OKT-3 の濃度による差は, 対照群ではいずれの系もほぼ濃度依存性に表面抗原の変化があったのに比べ, 患者群では OKT-3 の高濃

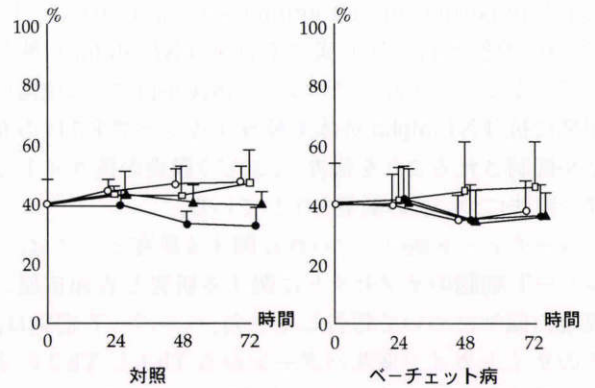


図1 CD 4 陽性細胞のリンパ球における割合. 平均値(%) + 標準偏差. 正常対照6例, 活動性ぶどう膜炎を有するベーチェット病患者6例. ○: 非刺激, □: staphylococcal enterotoxin B 900 µg/ml, ●: OKT-3 9 µg/ml, ▲: OKT-3 1 µg/ml

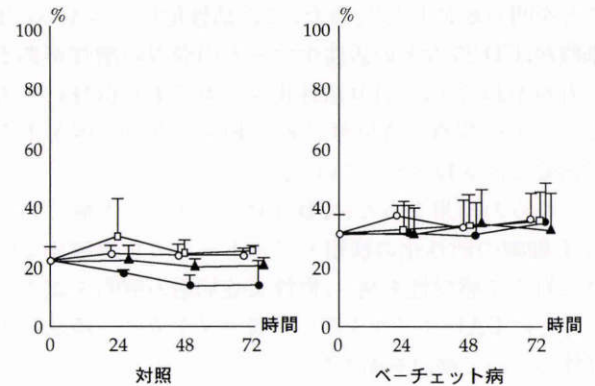


図2 CD 8 陽性細胞のリンパ球における割合. 平均値(%) + 標準偏差. 正常対照6例, 活動性ぶどう膜炎を有するベーチェット病患者6例.

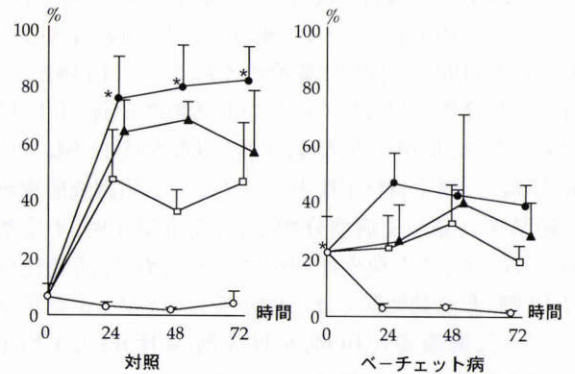


図3 CD 69 陽性細胞の CD 4 陽性細胞における割合. 平均値(%) + 標準偏差. 正常対照6例, 活動性ぶどう膜炎を有するベーチェット病患者6例. \*: p<0.01, OKT-3 9 µg/ml 群における対照-ベーチェット病患者比較.

度の系が高値を示す傾向があったものの, 対照群のような差はみられなかった. また, SEB による刺激の系も OKT-3 の系と反応の乖離はみられなかった.

Fas リガンドについては, CD 4 陽性細胞では OKT-3



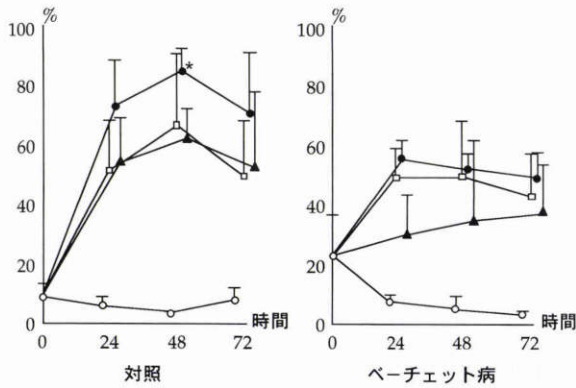


図4 CD69陽性細胞のCD8陽性細胞における割合。 平均値(%)±標準偏差。正常対照6例,活動性ぶどう膜炎を有するベーチェット病患者6例。 \* : p<0.01, OKT-3 9 μg/ml 群における対照-ベーチェット病患者比較。

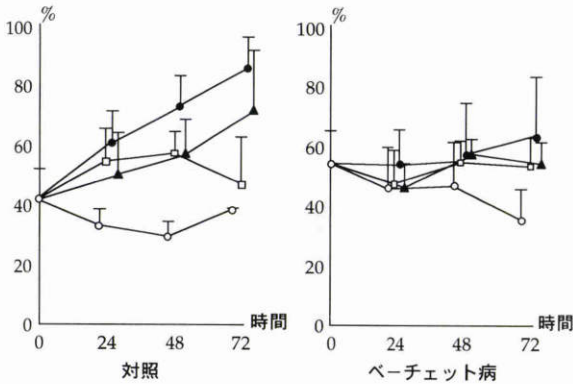


図5 Fas陽性細胞のCD4陽性細胞における割合。 平均値(%)±標準偏差。正常対照6例,活動性ぶどう膜炎を有するベーチェット病患者6例。

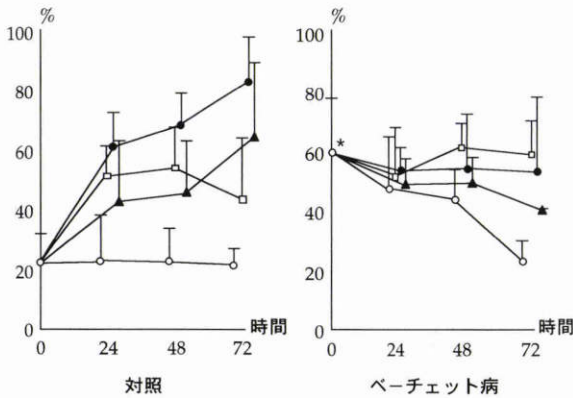


図6 Fas陽性細胞のCD8陽性細胞における割合。 平均値(%)±標準偏差。正常対照6例,活動性ぶどう膜炎を有するベーチェット病患者6例。 \* : p<0.01, 対照-ベーチェット病患者比較。

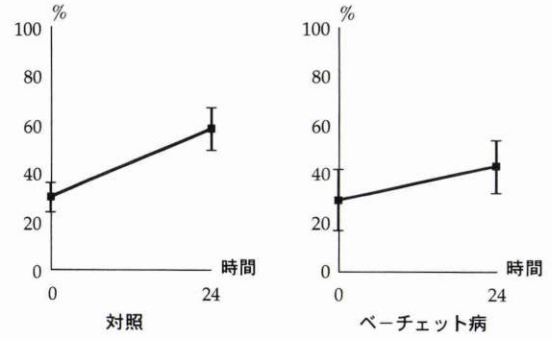


図7 Fasリガンド陽性細胞のCD4陽性細胞における割合。 平均値(%)±標準偏差。正常対照6例,活動性ぶどう膜炎を有するベーチェット病患者6例。 OKT-3 9 μg/ml による24時間刺激。

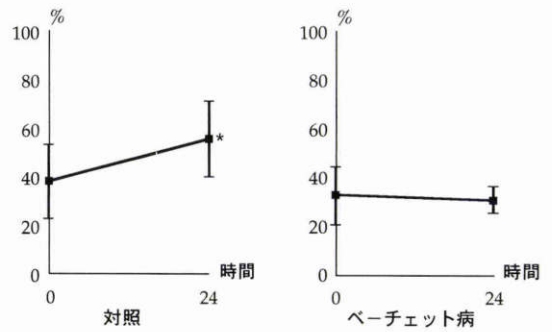


図8 Fasリガンド陽性細胞のCD8陽性細胞における割合。 平均値(%)±標準偏差。正常対照6例,活動性ぶどう膜炎を有するベーチェット病患者6例。 OKT-3 9 μg/ml による24時間刺激。 \* : p<0.01, 対照-ベーチェット病患者比較。

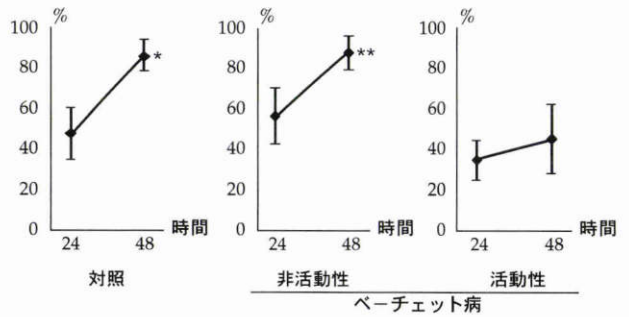


図9 抗Fas抗体によるCD4陽性細胞のannexin V陽性率の変化。 平均値(%)±標準偏差。正常対照5例,ベーチェット病患者活動性4例,非活動性4例。 OKT-3 9 μg/ml による24時間刺激後抗Fas抗体100 ng/mlを添加し24時間培養。 \* : p<0.01, \*\* : p<0.05. 群内24~48時間比較。

による刺激前後で対照群と患者群の陽性率に差はみられなかった(図7)。一方,CD8陽性細胞では対照群で24時間後に陽性率が上昇(54.6±15.6)したが,患者群(29.8±7.1)では変化がみられず,対照群のFasリガンド陽性率

は患者群よりも有意に高くなった(p<0.01)(図8)。

2. アポトーシスの誘導

OKT-3により24時間刺激した後抗Fas抗体存在下で24時間(計48時間)培養した系のCD4陽性細胞のannexin V陽性率は,対照群(24時間=45.9±15.1,48時



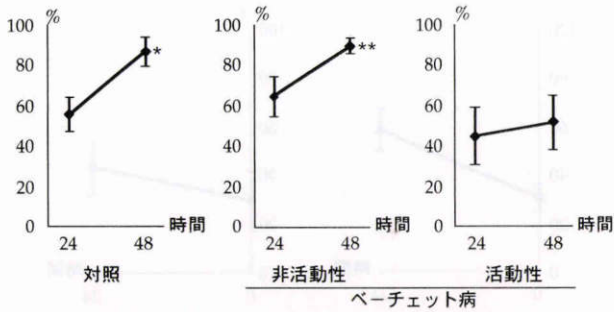


図10 抗 Fas 抗体による CD 8 陽性細胞の annexin V 陽性率の変化。

平均値 (%) ± 標準偏差. 正常対照 5 例, ベーチェット病患者活動性 4 例, 非活動性 4 例. OKT-3 9 μg/ml による 24 時間刺激後抗 Fas 抗体 100 ng/ml を添加し 24 時間培養.

\* : p < 0.01, \*\* : p < 0.05. 群内 24~48 時間比較.

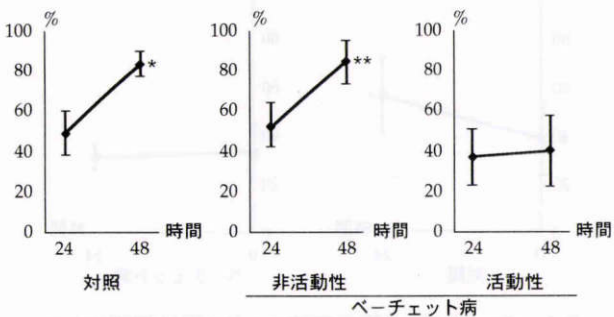


図11 TNF-alpha による CD 4 陽性細胞の annexin V 陽性率の変化。

平均値 (%) ± 標準偏差. 正常対照 5 例, ベーチェット病患者活動性 4 例, 非活動性 4 例. OKT-3 9 μg/ml による 24 時間刺激後 TNF-alpha 10 ng/ml を添加し 24 時間培養.

\* : p < 0.01, \*\* : p < 0.05. 群内 24~48 時間比較.

TNF-alpha : tumor necrosis factor-alpha

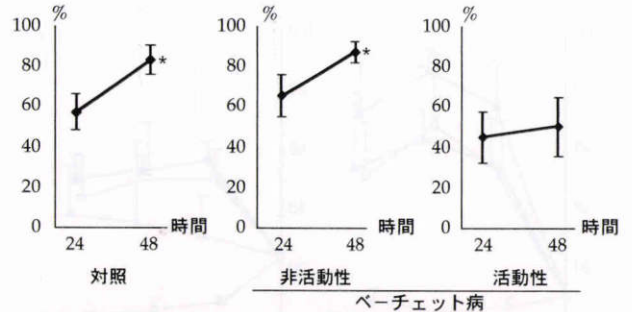


図12 TNF-alpha による CD 8 陽性細胞の annexin V 陽性率の変化。

平均値 (%) ± 標準偏差. 正常対照 5 例, ベーチェット病患者活動性 4 例, 非活動性 4 例. OKT-3 9 μg/ml による 24 時間刺激後 TNF-alpha 10 ng/ml を添加し 24 時間培養後.

早期 apoptosis 細胞の出現を annexin V 陽性率でみた.

\* : p < 0.01. 各群内 24~48 時間比較.

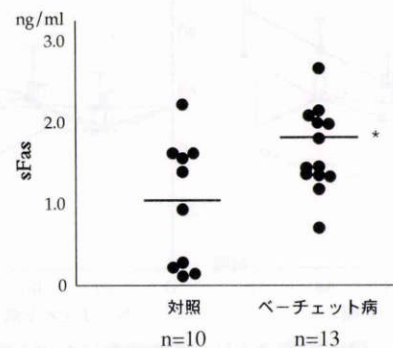


図13 血清中可溶性 Fas 抗原濃度。

正常対照 10 例, ベーチェット病患者活動性 13 例.

\* : p < 0.05.

sFas : soluble Fas antigen

間 = 83.0 ± 8.9, p < 0.01), 非活動性患者群 (24 時間 = 57.0 ± 11.3, 48 時間 = 85.0 ± 9.2, p < 0.05) でいずれも有意に上昇したが, 活動性患者群では有意な上昇はみられなかった (図 9). CD 8 陽性細胞も同様に, 対照群 (24 時間 = 54.1 ± 8.8, 48 時間 = 84.3 ± 7.1, p < 0.01) と非活動性患者群 (24 時間 = 62.2 ± 10.3, 48 時間 = 85.9 ± 3.0, p < 0.05) と有意に上昇したが, 活動性患者群では有意な上昇はみられなかった (図 10). これは, TNF-alpha とともに培養した系でも同様であった (図 11, 12).

### 3. 血清中可溶性 Fas 抗原濃度

活動性ベーチェット病患者の末梢血から分離した血清における可溶性 Fas 抗原の濃度 (1.72 ± 0.55, 平均値 ± 標準偏差) は, 正常対照 (1.05 ± 0.81) と比べ有意に上昇していた (p < 0.05) (図 13).

### 4. EAU 組織中のアポトーシス細胞の発現

免疫後 9 日目の組織において, 網膜 (図 14), あるいは毛様体付近の後房に浸潤している TUNEL 法陽性細胞がみられた (図 15).

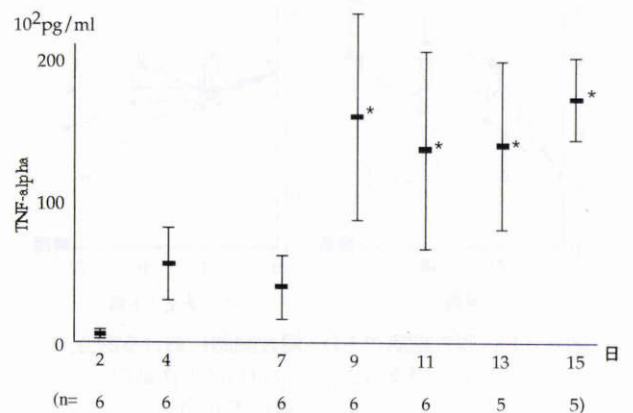


図16 EAU ラットの in vivo TNF-alpha 産生能。

平均 ± 標準偏差. 50 μg の LPS を尾静脈より注射し, 90 分後に心腔採血して血清を分離, ELISA 法で TNF-alpha 濃度を測定した.

\* : p < 0.02, 免疫後 7 日の値と比較.

ELISA : enzyme-linked immunosorbent, TNF-alpha : tumor necrosis factor-alpha



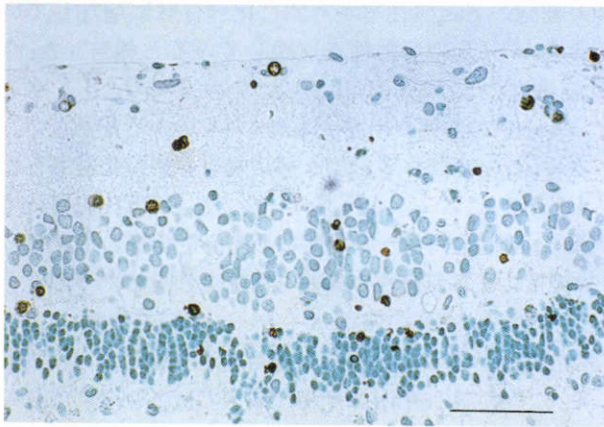


図14 EAUの網膜とアポトーシス.

網膜浸潤細胞がTUNEL陽性となっている。視細胞、神経節細胞等は染色されていない。バーは25 $\mu$ m。  
EAU: experimental autoimmune uveoretinitis  
TUNEL: TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling

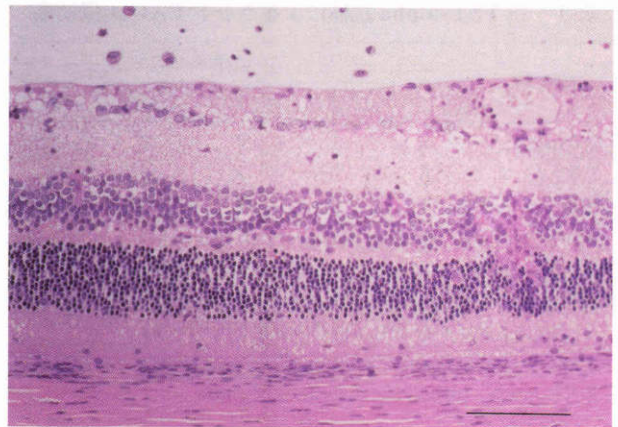


図18 EAUに対する高濃度抗TNF-alpha抗体治療効果.

免疫7日後から14日まで抗TNF-alpha抗体2.0mg/日連日投与。  
14日後に眼球摘出し固定後HE染色。  
細胞浸潤は軽微で、網膜剥離はみられない。バーは50 $\mu$ m。

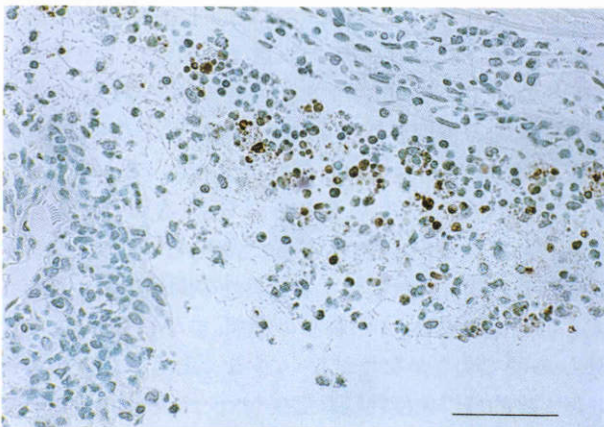


図15 EAUの虹彩毛様体とアポトーシス.

後房浸潤細胞がTUNEL陽性となっている。虹彩、毛様体細胞が染色されていない。バーは25 $\mu$ m。

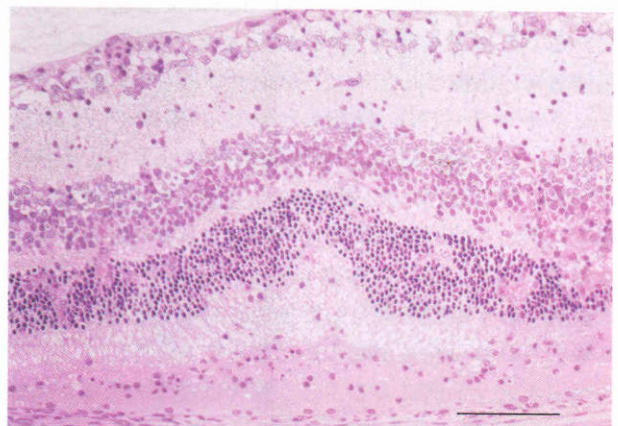


図19 EAUに対する低濃度抗TNF-alpha抗体治療効果.

免疫7日後より14日まで抗TNF-alpha抗体1.0mg/日連日投与。  
14日後に眼球摘出し固定後HE染色。  
中等度の細胞浸潤と網膜剥離がみられる。バーは50 $\mu$ m。

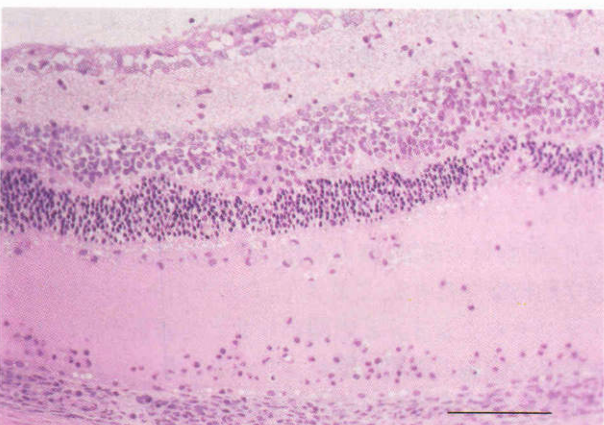


図17 EAUの網膜浸潤細胞.

免疫7日後から14日まで生理食塩水100 $\mu$ l/日連日投与。  
14日後に眼球摘出し固定後ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色。  
著しい細胞浸潤と、網膜剥離がみられる。バーは50 $\mu$ m。

### 5. EAUラットの *in vivo* TNF-alpha 産生能

LPS刺激後の血中TNF-alpha濃度は免疫2日(743 $\pm$ 240, 平均値 $\pm$ 標準偏差), 4日(5,570 $\pm$ 2,670), 7日(4,090 $\pm$ 2,220)と軽度上昇し, さらに9日以降は, 9日(15,900 $\pm$ 7,320), 11日(13,700 $\pm$ 70,401), 13日(14,000 $\pm$ 6,080), 15日(16,700 $\pm$ 3,250)と, 免疫7日に比べ有意に上昇した( $p < 0.02$ ) (図16)。

### 6. 抗TNF-alpha抗体治療

LPS刺激後の血中TNF-alpha濃度の推移をもとに, 免疫7日目から14日目まで連日抗TNF-alpha抗体を投与したところ, EAUの炎症のスコアは2.0mg/日群で対照群に比べ抑制がみられたが, 1.0mg/日群では軽度



表1 抗TNF-alpha抗体によるラットEAU治療効果

投与量	n	炎症スコア*1			
		0	1	2	3
2.0 mg/日*2	6	1	4	1	0
1.0*2	6	0	1	3	2
対象	4	0	0	0	4

\*1: 網膜病変を細胞浸潤, 網膜剥離の有無などから0-3の4段階に評価した<sup>7)</sup>.

\*2: 免疫7日後から14日後まで連日ウサギ抗ラットTNF-alphaポリクローナル抗体を尾静脈より注射

EAU: experimental autoimmune uveoretinitis

TNF-alpha: tumor necrosis factor-alpha

抑制されるにとどまった(図17~19, 表1).

## V 考 按

我々はこれまでベーチェット病の免疫反応を司るサイトカインについては, 活動性のぶどう膜炎を有する患者において血清中のinterferon-gammaが有意に上昇していること<sup>17)</sup>, 末梢血単球のTNF-alpha産生能が亢進していることなどを報告<sup>5)</sup>してきた. また他の研究者から, 免疫異常の指標としてリンパ球のサブセットの変化やナチュラルキラー(NK)細胞についての報告<sup>18)19)</sup>もある. ベーチェット病の病因, 病態形成機序には未だに不明の点が多いが, これまでの研究から, 炎症性サイトカインの産生亢進とリンパ球の反応性の異常が基礎にあると考えられる. 一方で, 近年の動物モデルの研究から, 炎症細胞は活性化して役割を果たした後にアポトーシスを起こして除去される可能性が明らかとなってきた<sup>20)</sup>.

ベーチェット病によるぶどう膜炎は慢性の炎症が持続し, これに急性の発作性炎症が加わって組織に重篤な障害を与え視力予後を不良なものとする. この慢性の炎症病態を形成しているベーチェット病の炎症細胞と通常の活性化した炎症細胞とは同じようにアポトーシスを起こすのであろうか. また, 種々の刺激に対する反応は通常の細胞と同様に起こるのであろうか. これらの問題を検討するために, 本研究ではまず活動性ベーチェット病患者の免疫担当細胞のうち, CD4陽性細胞とCD8陽性細胞について刺激に対する反応性を解析した. まず, 刺激前の表面抗原の陽性率については患者のCD4陽性細胞のCD69陽性率が有意に上昇し, また有意差を持つには至らないが, CD8陽性細胞でも上昇がみられることから, T細胞は活性化状態にあることが確認された. また, やはり活性化マーカーであるFas抗原についてはCD4陽性細胞では有意差はないがやや上昇, CD8陽性細胞では有意に上昇していた. これは既報<sup>12)</sup>の通りであった. Fas抗原はTNF/nerve growth factor(NGF)受容体ファミリーに属する細胞表面抗原で, 活性化した細胞に表出し, アポトーシスを誘導するシグナルを細胞内に伝える. Amasakiら<sup>21)</sup>は全身性紅斑性狼瘡(SLE)患者のCD45

RO<sup>+</sup>細胞のFas陽性率が対照に比べ有意に増加していることがSLEの活動性を反映していると報告した. 今回の我々の結果との相違は, そのままSLEとベーチェット病の病態の相違に関連するものかも知れない.

次に, この細胞をT細胞全般に対する活性化刺激となるOKT-3と, スーパー抗原の一つであるSEBを用いて刺激し, 活性化マーカーの陽性率の変化を解析した. OKT-3は濃度による反応性の違いを検証するために2濃度を設定し, またSEBの系はベーチェット病の病態にT細胞の特定のVβが関わっているか否かをみるために設定した. この刺激の結果, まず健康成人では各刺激に応じてCD69, Fasいずれも24時間後には有意に上昇したことから, 通常のT細胞はCD4陽性, CD8陽性いずれも今回の条件における刺激によって活性化されることが明らかとなった. 一方, 活動性ベーチェット病患者群では刺激前の活性化マーカーの陽性率は対照群よりも高い傾向にあったにもかかわらず, 24時間の時点で同等もしくは有意に低くなっていた. これは, 患者のT細胞が既にある程度活性化されているが, それ以上は活性化されにくい状態になっている, ということである. すなわち, 患者リンパ球はある程度活性化された状態にとどまり, 通常の刺激に対する応答性はむしろ低くなっていると考えられる. この現象は, 対照, 患者ともにOKT-3の濃度依存性にみられることから, 対照とした健康成人とベーチェット病患者の間に刺激に対する応答性の閾値の違いが存在する可能性は低い. また刺激の種類, すなわちOKT-3とSEBの間で明らかな差がなく, 少なくともこの反応の違いが実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)などで報告<sup>22)</sup>されているようなSEBに反応する特定のVβのT細胞に依存するものでもないと考えられる.

次にベーチェット病の免疫病態をT細胞のアポトーシスという見地から解析した. 多細胞生物においては細胞の生と死の均衡が適切に調節されることが必要である. 計画的細胞死(programmed cell death)は, 虚血などによって起こる偶発的な細胞死である壊死(necrosis)とは区別され, 細胞の生と死の調節を行う機序を担うものである. アポトーシス<sup>23)</sup>は, この計画的細胞死の一形態であり, 細胞質の凝縮, 核の濃縮, DNAの断片化などの形態学的特徴を有する. これまで, このアポトーシスはネガティブセレクションとの関わりなどが報告<sup>24)</sup>され, 広く免疫系の細胞の調節に関わっていると考えられている. アポトーシスを司るシグナルを伝達する分子であるFas抗原とFasリガンドの作用についての代表的研究として, Owen-Schaubら<sup>25)</sup>はIL-2による活性化の有無によらず, リンパ球にはFas抗原が発現しているが, 活性化した細胞のみが抗Fas抗体によりアポトーシスを起こしたと報告している. またSudaら<sup>26)</sup>は活性化した脾細胞と胸腺細胞にFasリガンドが発現し細胞傷害性に働



くとしている。そして近年、活性化誘導型細胞死(AICD)という概念が免疫応答を終息させる機序として注目されている<sup>27)</sup>。今回の結果では、Fas抗原については既報<sup>12)</sup>のようにCD4陽性細胞における発現がCD8陽性細胞に比べて不良であり、Fasリガンドの発現はOKT-3刺激により患者、対照ともCD4陽性細胞では有意に増強するが、CD8陽性細胞では対照群のみ増強がみられ、患者群では明らかな変化がみられなかった。またFasリガンドは、活動性ぶどう膜炎を有するベーチェット病患者のCD8陽性のリンパ球で発現が抑制されていて、これとCD4陽性細胞のFas抗原の発現が不良であることと併せて、Fas/Fasリガンドの協調によるアポトーシスの系が働きにくくなっている可能性が明らかになった。

次に、OKT-3刺激後24時間の時点、すなわち対照群のT細胞は活性化され、ベーチェット病患者でもCD69陽性率でみる限り最も活性化を受けている状態でアポトーシス誘導能を有する抗Fas抗体あるいはTNF-alphaによりアポトーシスがどの程度誘導されるか、という問題について、アポトーシス細胞の割合をannexin Vを用いて検討した。annexin Vは初期のアポトーシス細胞の細胞膜上に出現するホスファチジルセリンに結合することが知られ<sup>13)14)</sup>、やはりアポトーシスの検討で用いられるヨウ化プロピジウム(PI)に比べ、より早期のアポトーシス細胞が検出されるという利点がある。これは、アポトーシスの進行とともにCD4など、他の細胞表面抗原の検出が困難になることから、T細胞のサブセットごとのアポトーシスの様態を解析するのにも適していると考えられる。この検討は、対象を活動性ぶどう膜炎を有するベーチェット病患者だけでなく、眼発作の6か月以上みられない非活動性の症例についても併せて行った。その結果、正常対照と非活動性ベーチェット病患者ではOKT-3による活性化の後、アポトーシス誘導因子である抗Fas抗体<sup>28)</sup>、TNF-alpha<sup>29)</sup>のいずれの刺激によってもannexin V陽性細胞の割合が有意に上昇し、明らかなアポトーシスの誘導がみられた。しかし、活動性ぶどう膜炎を有する患者群ではannexin Vの陽性率に明らかな変化はなく、この患者リンパ球はこれらの刺激を受けてもアポトーシスに陥りにくいことが明らかとなった。Manganら<sup>30)</sup>はTh1細胞の産生するサイトカインは単球のアポトーシスを抑制すると報告している。我々の以前の解析結果<sup>11)</sup>でもベーチェット病の活動性症例はTh1優位であったが、ベーチェット病における単球のアポトーシスとTNF-alpha産生亢進との関わり、そして、このTNF-alphaとT細胞のアポトーシス抵抗性が互いにどのように影響を及ぼしているか、今後の研究課題であると考えている。

一方、細胞にアポトーシスを誘導するFas-Fasリガンドの系は主に細胞表面に発現する抗原として解析されているが、近年分子生物学的な解析から膜貫通部を持たな

いFas抗原、すなわち可溶性Fas抗原の存在が明らかになり、例えばSLE患者で上昇がみられ、この存在がリンパ球のアポトーシスを阻害している可能性がある」と報告<sup>31)</sup>されている。そこで、我々は血清中の可溶性Fas抗原濃度を検討し、ベーチェット病患者で有意に上昇していることを明らかにした。可溶性Fas抗原のアポトーシスの系に対する関与には未だ不明の点が多いが、今回我々が観察した一連の免疫病態の異常は可溶性Fas抗原の血清中濃度異常を含むものであることが判明した。

以上の結果から、一般にベーチェット病のぶどう膜炎は数年から数十年にわたって活動性を持続し、視機能を障害してゆくが、この病態形成機序の一つとして、活性化リンパ球のアポトーシス抵抗性、すなわちAICDを介した自律的な消炎が起きにくいことがあるものと考えられる。

なお、今回の一連の実験では厚生省の診断基準に基づく病型別、あるいは免疫抑制剤による治療の有無による差を検討していないが、これはこれまで我々が報告してきた実験結果から、免疫応答の違いはこれらの要素によらず、ぶどう膜炎発作の頻度に相関するものと考えられるからである。

では、慢性炎症を起こしているベーチェット病患者T細胞が活性化、アポトーシスの両者について通常のT細胞とは異なる反応を示すと仮定して、逆に通常の急性炎症を起こす眼炎症(ぶどう膜炎)では、これまでに報告されている炎症細胞のアポトーシスは同様に起こるのか、という点をラットのEAUを用いて検討した。EAUは一般にラットでは免疫後10~12日後に炎症の極期を加え、その後、消炎寛解することが知られているが、今回EAU組織中のアポトーシス細胞の発現をみると、炎症早期に既に浸潤細胞はアポトーシスを起こしていることが明らかとなった。やはり、自己免疫疾患のモデルであるEAEではミエリン特異的T細胞が中枢神経系を急性に障害し、数日で寛解に至る。Schmiedら<sup>32)</sup>はこの寛解期の病変部に浸潤しているT細胞の49%がアポトーシスを起こしていたことから、炎症細胞の局所からの消退がアポトーシスによるものである可能性を指摘している。さらに、Tabiら<sup>33)</sup>はこのアポトーシスが特に疾患の発症に関与する特定のT細胞クローンに対して選択的に起こっていることを細胞移入実験により証明した。現在、我々はこのアポトーシスの様相が、炎症の慢性化によって異なったものになるか否かを明らかにするため、EAUの慢性化モデルの作製を試みている。

次に、ベーチェット病の治療を考えた場合、シクロスポリンによる治療効果はよく知られているが、日常臨床の場でシクロスポリンによっても炎症を抑制できず、ぶどう膜炎の発作を繰り返す例が未だに多く存在する。このような例では末梢血単球のTNF-alpha産生能が亢進していることを我々は以前に報告<sup>5)</sup>した。このTNF-alpha



の作用を抑制することが治療に結び付く可能性を検討するために、ラットのEAUモデルを用いてTNF-alphaの産生能と、抗体による治療効果について検討した。我々は以前TNF-alpha産生能の遺伝的差異とEAUの疾患感受性が関わっていること、TNF-alphaの投与によってEAUが重症化することを報告<sup>7)</sup>している。今回、まずラットのEAUの免疫から発症に至るまでのTNF-alpha産生能を*in vivo*で検討したところ、免疫後早期、induction phaseと考えられる時期に軽度の上昇がみられたが、後期、effector phaseと考えられる時期には著しく上昇し、早期に比べ有意差がみられた。EAUにおける抗TNF-alpha抗体の投与効果については既に報告<sup>8)</sup>があるが、そこでは免疫後早期の投与は有効であったが、後期の投与では炎症を抑制できなかった。すなわち、抗原によるprimingを抑制することで発症の予防はできたが、治療はできなかったとしている。しかし、今回の我々のTNF-alpha産生能の測定結果から、問題は後期の著しいTNF-alpha産生能の上昇に対して十分な抗体が投与されるか否か、という点にあると考えられたため、投与量を増やして後期に連日投与したところ、濃度依存性に炎症の抑制効果がみられた。すなわち、抗TNF-alpha抗体は炎症に対して十分量を投与されれば治療効果を発揮することが明らかとなった。抗TNF抗体による炎症性疾患の治療については既に慢性関節リウマチ<sup>34)</sup>やクローン病<sup>35)</sup>について報告されているが、今回の我々の動物モデルの結果と、これまでのTNF-alpha産生能に関する研究結果から、ベーチェット病のぶどう膜炎治療についても有効である可能性が強く示唆される。

以上、我々のこれまでの研究結果に今回の結果を併せて考察すると、活動性ぶどう膜炎を有するベーチェット病においてはリンパ球はTh1細胞優位であり、慢性の活性化状態にあること、TNF-alphaの産生能が亢進していること、Fas-Fasリガンドの発現系に異常があること、AICDが起きにくいことが明らかとなった。因みに、TNF-alphaは本来アポトーシスを誘導する作用が知られているが、ベーチェット病においてはTNF-alphaの産生能が亢進しているにもかかわらずアポトーシスが起きにくい。これは、TNF-alphaを始めとする炎症性サイトカインに慢性的に暴露された結果、応答性が悪くなっているのか、それとも何らかの理由でアポトーシスが起きにくいいため、アポトーシスを起こさせようとTNF-alphaの産生が逆に亢進してしまうのか、という全く異なる2つの仮説が考えられる。これは、現在予定しているEAUの慢性化モデルの解析、あるいは抗TNF-alpha抗体によるベーチェット病の治療において投与後のリンパ球のアポトーシスの動態を観察することで明らかになるであろう。そしてその結果、アポトーシスを制御する機序が解明され、Th1細胞を抑制する、Th2細胞を誘導する、活性化した炎症性細胞のアポトーシスを誘導する、な

どこれまでとは全く異なるベーチェット病治療への新しいアプローチが生まれるものと期待される。

稿を終えるに当たり、宿題報告の機会を与えて下さいました日本眼科学会評議員各位に心から感謝いたします。

本研究の一部は文部省科学研究費基盤研究B 08457466, C 08672030, 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班の援助を受けて行ったことを付記します。

#### 文 献

- 1) James JD: Behçet's disease. In: Fitzpatrick TB, et al (Eds): Dermatology in General Medicine. McGraw-Hill, New York, 1239-1244, 1987.
- 2) Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama Y, et al: Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong association of six GCT repetitions with Behçet disease. Proc Natl Acad Sci USA 94: 1298-1303, 1997.
- 3) 大野重昭, 中村 聡, 杉田美由紀, 田中俊一, 奥田研爾: ベーチェット病における $\gamma\delta$ T細胞の活性化と連鎖球菌抗原. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 平成4年度研究業績集, 107-109, 1993.
- 4) 西田朋美: 新型連鎖球菌(*Streptococcus sanguis* KTH-1株)抗原刺激によりベーチェット病患者に特徴的に見られる $\gamma\delta$ +CD8+T細胞サブセットの増殖性免疫応答. 横浜医学 45: 535-545, 1994.
- 5) 中村 聡, 杉田美由紀, 田中俊一, 大野重昭: ベーチェット病患者における末梢血単球の*in vitro* tumor necrosis factor-alpha産生能. 日眼会誌 96: 1282-1285, 1992.
- 6) Nakamura S, Sugita M, Tanaka S, Ohno S: Enhanced production of *in vitro* tumor necrosis factor-alpha in Behçet's disease. In: Dernou-champs JP, et al (Eds): Recent Advances in Uveitis. Kugler Publications, Amsterdam/New York, 71-74, 1993.
- 7) Nakamura S, Yamakawa T, Sugita M, Kijima M, Ishioka M, Tanaka S, et al: The role of tumor necrosis factor-alpha in the induction of experimental autoimmune uveoretinitis in mice. Invest Ophthalmol Vis Sci 35: 3884-3889, 1994.
- 8) Sartani G, Silver PB, Rizzo LV, Chan C-C, Wiggert B, Mastorakos G, et al: Anti-tumor necrosis factor alpha therapy suppresses the induction of experimental autoimmune uveoretinitis in mice by inhibiting antigen priming. Invest Ophthalmol Vis Sci 37: 2211-2218, 1996.
- 9) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 136: 2348-2357, 1986.
- 10) Keane MA, Nickell SP: Role of IL-4 and IFN-gamma in modulation of immunity to *Borrelia burgdorferi* in mice. J Immunol 155: 2020-2028,



- 1995.
- 11) 杉 央子, 中沢正年, 中村 聡, 南 陸彦, 大野重昭: ベーチェット病における CD4 陽性 T 細胞サブセットの解析. 日眼会誌 101: 335-340, 1996.
  - 12) Nakamura S, Sugita M, Matoba H, Tanaka S, Isoda F, Ohno S: Insufficient expression of Fas antigen on helper T cells in Behçet's disease. Br J Ophthalmol 80: 174-176, 1996.
  - 13) Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J Immunol 148: 2207-2216, 1992.
  - 14) Vermes I, Haanen C, Steffens NH, Reutelingsperger C: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods 184: 39-51, 1995.
  - 15) Sanui H, Redmond TM, Hu LH, Kuwabara T, Margalit H, Cornette JL, et al: Synthetic peptides derived from IRBP induce EAU and EAP in Lewis rats. Curr Eye Res 7: 727-735, 1988.
  - 16) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben SS: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 119: 493-501, 1992.
  - 17) Fujii N, Minagawa T, Nakane A, Kato F, Ohno S: Spontaneous production of gamma-interferon in cultures of T lymphocytes obtained from patients with Behçet's disease. J Immunol 130: 1683-1686, 1983.
  - 18) Suzuki Y, Hoshi K, Matsuda T, Mizushima Y: Increased peripheral blood gamma delta+ T cells and natural killer cells in Behçet's disease. J Rheumatol 19: 588-592, 1992.
  - 19) Onder M, Bozkurt M, Gurer MA, Gulekon A, Sezgin P, Imir T: Natural cellular cytotoxicity in Behçet's disease. J Dermatol 21: 239-243, 1994.
  - 20) Pender MP, Nguyen KB, McCombe PA, Kerr JF: Apoptosis in the nervous system in experimental allergic encephalomyelitis. J Neurol Sci 104: 81-87, 1991.
  - 21) Amasaki Y, Kobayashi S, Takeda T, Ogura N, Jodo S, Nakabayashi T, et al: Up-regulated expression of Fas antigen (CD95) by peripheral naive and memory T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus (SLE): A possible mechanism for lymphopenia. Clin Exp Immunol 99: 245-250, 1995.
  - 22) Brocke S, Gaur A, Piercy C, Gautam A, Gijbels K, Fathman CG, et al: Induction of relapsing paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by bacterial superantigen. Nature 365: 642-644, 1993.
  - 23) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26: 239-257, 1972.
  - 24) Jenkinson EJ, Kingston R, Smith CA, Williams GT, Owen JJ: Anti-induced apoptosis in developing T cells: A mechanism for negative selection of the T cell receptor repertoire. Eue J Immunol 19: 2175-2177, 1989.
  - 25) Owen SL, Yonehara S, Crump WL 3rd, Grimm EA, Crump WL: DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement. Cell Immunol 140: 197-205, 1992.
  - 26) Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S: Molecular cloning and expression of Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. Cell 75: 1169-1178, 1993.
  - 27) Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, et al: Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. Nature 373: 441-444, 1995.
  - 28) Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, et al: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell 66: 233-243, 1991.
  - 29) Wang J, Stohlman SA, Dennert G: TCR cross-linking induces CTL death via internal action of TNF. J Immunol 152: 3824-3832, 1994.
  - 30) Mangan DF, Mergenhagen SE, Wahl SM: Apoptosis in human monocytes: Possible role in chronic inflammatory disease. J Periodontol 64: 461-466, 1993.
  - 31) Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, et al: Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. Science 263: 1759-1762, 1994.
  - 32) Schmieid M, Breitschopf H, Gold R, Zischler H, Rothe G, Wekerle H, et al: Apoptosis of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence for programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain. Am J Pathol 143: 446-452, 1993.
  - 33) Tabi Z, McCombe PA, Pender MP: Antigen-specific down-regulation of myelin basic protein-reactive T cells during spontaneous recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis: Further evidence of apoptotic deletion of autoreactive T cells in the central nervous system. Int Immunol 7: 967-973, 1995.

34) Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, et al: Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Arthritis Rheum* 36: 1681—1690, 1993.

35) van Dullemen HM, van Deventer SJH, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GNJ, et al: Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 109: 129—135, 1995.



## 第101回 日本眼科学会総会 宿題報告IV

## 眼の細胞生物学

## 網膜の変性・再生のメカニズムの解明と臨床応用への展望

梶原 一人

スタンフォード大学医学部神経生物学教室/慶應義塾大学医学部眼科学教室

協同研究者

岡野 栄之, 金子由樹子, 篠崎 尚史, Eric M Shooter, 高橋 伸子

樋田 哲夫, 平形 明人, 福田 稔(50音順)

## 要 約

網膜視神経障害による失明に対する治療法の確立には、失われた網膜神経細胞を補った上で機能的シナプスを作らせ、さらに中枢との連絡を回復させなければならない。このための基礎知識を得ることを目的として、成体でもほぼ完全な網膜再生が起こるアカハライモリを用いて、網膜変性・再生のメカニズムを解析した。眼球摘出・再移植後の網膜変性過程では、アポトーシスによる神経網膜の変性と貪食による変性細胞の処理、貪食細胞の挙動について詳述した。これに引き続き網膜再生過程においては、神経前駆細胞の誕生について、リボ核酸(RNA)結合タンパクである Musashi の発現について解析するとともに、前神経遺伝子群のクローニングと発現パターンの解析を行った。これらの結果から、網膜色素上皮細胞の増殖が起こると間もなく娘細胞に Musashi が発現さ

れ、網膜神経細胞の分化程度に応じた一部の前神経遺伝子(proneural gene)が発現されることが明らかとなった。網膜色素上皮細胞から網膜神経細胞への分化転換に必要な遺伝子群を明らかにすることにより、哺乳類などの高等脊椎動物にも網膜再生を起こさせるための基礎的知識や、網膜移植を成功させるための基礎的知識が得られるものと考えられた。(日眼会誌 101:987-1000, 1997)

キーワード：アカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*), 分化転換(transdifferentiation), 不均等分裂, Musashi, 前神経遺伝子(proneural gene)

## Elucidation of the Mechanism of Retinal Degeneration and Regeneration and the Prospects for its Clinical Application

Kazuto Kajiwara

Department of Neurobiology, Stanford University School of Medicine

Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine

## Abstract

In order to obtain the basic knowledge necessary to develop therapeutical intervention for blindness due to the damaged retina and optic nerve, the mechanism of retinal degeneration and regeneration in an amphibian model, *Cynops pyrrhogaster*, was studied. In the retinal degenerative process

following enucleation and reimplantation of the eye ball, evidence was found for active cell death of neural retinal cells. As the degeneration proceeded, Musashi, an ribonucleic acid (RNA)-binding protein, started its expression in the daughter cells of proliferating retinal pigment epithelium (RPE)

(平成9年8月18日受付,平成9年8月25日受理)

Reprint requests to: Kazuto Kajiwara, M.D. Department of Neurobiology, Fairchild Building, D 225, Stanford, CA 94305 USA

(Received August 18, 1997 and accepted August 25, 1997)



cells. messenger RNA (mRNA) expression of proneural genes with basic helix-loop-helix motif was then detected in the newly developing retina. These results suggest that transdifferentiation of RPE cells to neural retina involves at least partial cascade, if not entirely, of neural induction from uncommitted ectodermal tissue. Search for genes that are required for transdifferentiation of RPE cells to neural retinal cells, in addition to those mentioned above, will provide the basic knowledge

for successful retinal transplantation and retinal regeneration in higher vertebrates. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 987-1000, 1997)

**Key words:** Redbelly newt (*Cynops pyrrhogaster*), Transdifferentiation, Asymmetric cell division, Musashi, Proneural gene

## I 緒 言

網膜視神経疾患では神経細胞が障害され、多くの場合、それは不可逆的な変化として恒久的な視機能の低下・消失を残す。特に変性疾患の場合は原因さえ不明なものが多く、予防法確立のために、まずその原因を解明することは急務である。近年の分子生物学的研究手法の発達と数多くの研究者の努力により、網膜色素変性<sup>1)~15)</sup>と類縁疾患<sup>16)~21)</sup>を含む一部の遺伝性網脈絡膜変性疾患<sup>22)~29)</sup>、停止性夜盲<sup>30)~34)</sup>、視神経症<sup>35)</sup>、緑内障<sup>36)</sup>の原因遺伝子が明らかにされてきた。神経細胞に恒久的な機能障害や進行性の変性をもたらすこれらの疾患のうち、これまでに原因遺伝子が同定された代表的疾患を表1にまとめた。この中には多遺伝子性疾患<sup>12)13)</sup>も含まれており、診断は必ずしも容易ではないが、原発緑内障のように慢性進行性であり、かつ治療法の存在する疾患に対して、原因遺伝子

の究明は非常に直接的な意義がある。すなわち、軽症または全く無症状である罹患者を遺伝子診断によって早期発見することができれば、従来の治療法を駆使することにより、長期視機能予後という観点からすれば治療成績は著しく向上すると考えられるからである。しかし、網膜視神経の変性疾患には有効な治療法がなく、進行予防という点では将来の遺伝子治療に望みが掛かるが、現在のところ残念ながら遺伝子診断は直接的に治療法には結びつかない。また、予防的治療法が存在しても、神経細胞が二度と再生しない細胞である限り、神経細胞が障害を受ける疾患では、失われた視機能を回復するという根本的治療は存在し得ない。

このような疾患に対して根治的治療を考えるとすれば、三つの重要な目標を達成しなければならない。すなわち、①失われた網膜神経細胞を何らかの形で補うこと、②新しい神経細胞がシナプスを介したネットワークを

表1 神経細胞に機能障害や変性を来す代表的な遺伝性眼疾患の原因遺伝子

原因遺伝子座	タンパク産物の機能	表現型
rhodopsin	フォトトランスダクション	常染色体優性遺伝型網膜色素変性症 <sup>1-7)</sup> 常染色体劣性遺伝型網膜色素変性症 <sup>10)</sup> 常染色体優性遺伝型先天停止性夜盲 <sup>30)</sup>
peripherin/RDS	視細胞外節円盤構造タンパク	常染色体優性遺伝型網膜色素変性症 <sup>8-9)</sup> 常染色体優性遺伝型白点状網膜炎 <sup>16)</sup> 常染色体優性遺伝型黄斑部変性症 <sup>17-20)</sup> 二遺伝子性網膜色素変性症 <sup>12-13)</sup>
ROM 1	視細胞外節円盤構造タンパク	二遺伝子性網膜色素変性症 <sup>12-13)</sup>
$\beta$ -PDE	フォトトランスダクション	常染色体劣性遺伝型網膜色素変性症 <sup>11)</sup> 常染色体優性遺伝型先天停止性夜盲 <sup>31)</sup>
$\alpha$ -PDE	フォトトランスダクション	常染色体劣性遺伝型網膜色素変性症 <sup>14)</sup>
$\alpha$ -cGMP-gated channel protein	フォトトランスダクション	常染色体劣性遺伝型網膜色素変性症 <sup>15)</sup>
$\alpha$ -rod transducin	フォトトランスダクション	常染色体優性遺伝型先天停止性夜盲 <sup>32)</sup>
ATP-binding cassette (ABC) transporter	細胞内輸送	Stargardt 病 <sup>21)</sup>
Arrestin (S-antigen)	フォトトランスダクション	小口病 <sup>33)</sup>
Rhodopsin kinase	フォトトランスダクション	小口病 <sup>34)</sup>
CHM	細胞内輸送	コロイデレミア <sup>27)</sup>
myosin type VII	鞭毛運動	Usher 症候群 <sup>28-29)</sup>
OTA	アルニチン・アミノトランスフェラーゼ	脳回転状網脈絡膜委縮 <sup>22-23)</sup>
Norrie gene	ムチン?	ノリエ病 <sup>24-26)</sup>
mitochondrial DNA	酸化的りん酸化	Leber 視神経症 <sup>35)</sup>
TIGR	(不明)	若年性緑内障と原発性開放隅角緑内障 <sup>36)</sup>



形成し、最終的に中枢との接続を回復すること、③回復したネットワークを通じて、中枢が利用することのできる有用な視覚情報として入力信号を統合して送受信するシステムを回復することである。単純な網膜神経細胞の移植によっても第一の目標だけは達成されるが、移植細胞が移植先でシナプスを介したネットワークを形成せず、二番目以降の目標は達せられない。何故ならば、神経細胞は細胞分裂と分化という過程の中で隣接あるいは遠隔の他の神経細胞との役割分担を明確に確立しながらお互いを認識し合い、シナプスを介してネットワークを形成し、さらに不要な情報を与えるネットワークを除去して有用な情報だけを残す洗練されたシステムを発達の過程で構築して行くからである。したがって、①の目標は②、③の目標と切り離して考えることはできず、個体発生に極めて近い状況を再現することができなければ、これらすべてを達成することはできないのである。しかし、高度に機能分化した眼球組織の中であって、神経網膜だけにそのような現象を起こさせることは可能なのであろうか。

イモリやサンショウウオなどの一部の両生類では、成体においても神経網膜を切除、または変性させることにより、新しい神経網膜組織を再生させることができる。この現象は、非神経細胞である網膜色素上皮細胞(RPE)からすべての神経網膜細胞が作られる分化転換(trans-differentiation)<sup>37)</sup>という極めて稀な現象であるとともに、これら限られた種に固有に見られる現象であり、これらの種が下等だからという単純な理由では説明できない(より下等な種でも、同様な現象を見ることはできない。また、魚類においては、rod precursor cell という細胞が網膜周辺部で継続的に分裂し眼球の成長に伴って神経網膜の容積を補っているが、神経網膜自体が失われれば新しい神経細胞を作ることはできず、全く異なる現象と考えられている)。この再生は、形態学的な再生にとどまらず、機能的な再生であり、上記のすべての目標を達成して視機能を回復する。したがって、ここに見られる網膜再生のメカニズムを解明することは、成体において網膜の個体発生を再現させる、すなわち機能的な再生を起こさせるためには何が必要なのかという疑問に答えることになり、不可逆的な網膜視神経障害に対する治療法開発に有用な基礎的知識を与えるものと考えられる。

これらの一部の両生類における網膜の再生という現象は一世紀以上昔から知られていた<sup>38)</sup>。多くの研究が1950年代から70年代にかけて行われたが(Stone<sup>39)40)</sup>、Keefe<sup>41)~44)</sup>ら)、新しく作られる神経網膜細胞の起源についての論争が一段落した後は、このモデルが神経発生学や生物学のテーマとして扱われることが非常に少なくなった。それは、同じ両生類でもアフリカツメガエルのように純系に近い状態で飼育することが難しく、遺伝的に異質な動物を用いなければならぬことから遺伝学上の

アプローチが困難であることに起因し、このことは、その後の分子生物学を用いた研究を大変難しくした。現在でも、アカハライモリやこれに近い種の遺伝子DNA配列の登録数は数えるほどに過ぎず、また当種の神経系で用いることのできる抗体も非常に少ない。「材料(実験動物)の手に入りやすさ」、「均一性」、「道具(抗体やDNAプローブ)の充実性」という条件からすれば、研究者が対象とするには無理の多い動物である。しかしながら成体においても、すべての網膜神経細胞が失われた後に、新しい神経細胞が作られ網膜が再生するという現象は、これら非常に限られた動物種にしかみられない現象である以上、神経発生学的学問上の興味からばかりでなく、失明救済という眼科学上の研究対象として、この動物モデルは我々眼科医にとって非常に重要な意味を持つ。

今回、アカハライモリ(*Cynops pyrrhogaster*)の成体を用いて、網膜再生過程とそれに先行する変性過程の変化を検討した。変性過程については、RPEによる変性網膜細胞の処理に関して形態学的観察を中心に行った。網膜再生過程については、RPEから網膜神経細胞の前駆細胞が作られる時期において、前駆細胞の誕生に深く関わっていると思われるリボ核酸(RNA)結合タンパクであるMusashiの発現を検討した。また、上述の研究方法論上の困難を少しずつでも埋め合わせて行くため、再生過程の眼球の相補性デオキシリボ核酸(cDNA)ライブラリーの作製により、将来の各種遺伝子のクローニングの準備を整え、実際に神経前駆細胞特異的遺伝子である前神経遺伝子(proneural gene)に属するいくつかの遺伝子のクローニングに成功し、その発現パターンの解析に取りかかった。本稿では、これらの研究過程から得られた基礎的結果を報告し、考察を加えた。

## II 実験方法

組織切片の作製：アカハライモリ成体を0.3% MS-222により麻酔し、片眼を摘出後直ちに再移植した。正常眼および、一定時間経過後(術後2, 5, 8, 10, 12, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90日)の眼球を同様の方法で摘出後、4%パラホルムアルデヒドで4°C一晩または1.25%グルタルアルデヒドで3時間固定後、パラフィンまたはエポキシ樹脂包埋し、6μmまたは1μm厚の切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色およびトルイジンブルー染色標本を用いて光学顕微鏡観察を行った。

免疫組織化学：上記と同様の方法で眼球を摘出後、液体窒素でオキシテトラサイクリン(OTC)中に冷凍し、-80°Cで保存した。12~16μmの凍結切片を作製し、4%パラホルムアルデヒドで10分間固定し、1×リン酸緩衝液(PBS)で10分間3回洗浄した。10%ヤギ血清処理(30分)、1×PBS洗浄(10分間3回)後、ラット抗マウスMusashiモノクローン抗体(H Okano)を4°Cで16時



間反応させた(1:100).1×PBS洗浄(10分間3回)後,抗ラットフルオレセイン・イソチオシアネイト(FITC)二次抗体(Boehringer Mannheim)を室温で1時間反応させた(1:250).1×PBS洗浄(10分間3回)後,蛍光顕微鏡(Nikon)で観察した.

ゲノム DNA ラダーの検出:正常および術後1,2,3,4,6日の各5眼球を摘出し,液体窒素中で乳鉢を乳棒を用いてホモゲナイズ後,DNA ZOL(GIBCO)と9,000 rpm×15分遠沈によってDNAを抽出後,100%エタノールによって沈澱させた.10 mM Tris-HCl(pH 7.6)/1 mM Ethylene diamine tetraacetic acid(1×TE)により約1 mg/mlに溶解後,1%アガロースゲル上で電気泳動し,エチジウムブロマイドで染色し観察した.

cDNA ライブラリーの作製:正常および術後20日と30日のアカハライモリ眼球から Pharmacia 社のプロトコールに従って得たメッセンジャーRNA(mRNA)の5 μgを鋳型とし,oligo d(T)プライミングによりλZAP Express フェージをベクターとしてcDNAライブラリーを作製した(Stratagene 社のプロトコールに従った).

cDNA プロブの作製:ラット,マウス,アフリカツメガエル<sup>45)</sup>の *neurogenin* 遺伝子 bHLH(basic helix-loop-helix)領域のアミノ酸配列(センス側:KTRRVKA,アンチセンス側:NYIWALS)を基にそれぞれ *Bam* HI と *Eco* RI 制限酵素認識配列を付加した完全縮重プライマー1対をデザインした.上記の術後20日と30日の眼球cDNAライブラリーを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により下記の条件でアカハライモリの *neurogenin* 相同遺伝子の bHLH 領域を増幅した:混合溶液総量 50 μl 中にテンプレート DNA 20 ng/μl,各プライマー2.0 pM,dNTP(各0.2 mM),1.5 mM MgCl<sub>2</sub>,50 mM KCl,20 mM Tris-HCl(pH 8.6),0.1 mg/ml BSA,10% DMSO(dimethyl-sulfoxide),0.1 μl AmpliTaq(Perkin Elmer Cetus 社)(変性温度 94°C×30秒,アニーリング温度 55°C×30秒,伸長温度 72°C×30秒,35 サイクル後,72°C×10分間で伸長を終了).増幅産物を *Bam* HI と *Eco* RI によって切断後,3%アガロース・ゲル電気泳動により単離し,RPCカラム(Schleicher & Schuell 社)により精製後,pBlueScript SK(-)をベクターとしてライゲーションを行った(Takara 社 DNA Ligation Kit Ver. 1 のプロトコールに従った).通常の Blue/White selection により陽性と思われるクローンを無作為に選び,DNA mini preparation を行って,サブクローニングした PCR 産物について T3, T7 プライマーを用いて dideoxy 法により塩基配列を確認した(United States Biochemical 社のプロトコールに従った).

プロブの放射性同位元素による標識:上記 PCR 条件に,以下の変更を加えて標識を行った.鋳型 DNA として,上記クローンのうち *neurogenin* 相同アミノ酸配列

をもつものを 2 ng/μl 用いた.dNTP 混合液からは dCTP を削除し,反応液中に 100 μCi の α-<sup>32</sup>P dCTP を加えた.また,サイクルは 20 回で終了した.反応終了後, MicroSpin Column(Pharmacia 社)により未反応の放射性同位元素を除去した.

ライブラリー・スクリーニング:術後20日と30日の眼球ライブラリーから合計100万クローンを上記プロブを用いてスクリーニングした(Stratagene 社のプロトコールに従った).陽性クローンに対し,さらに2回の単離を行い,最終的に陽性と判断されたクローンは *in vivo* excision によりプラスミドとして切り出した(Stratagene 社のプロトコールに従った).

cRNA プロブの作製:長さが約1 kb となるように適当な制限酵素でプラスミド・クローンを直鎖化し,Boehringer Mannheim 社のプロトコールに従って digoxigenin 標識センス,アンチセンスの cRNA プロブを作製し,1%アガロース・ゲル上で確認した.

*In situ* hybridization:免疫組織化学の項で述べた方法で眼球切片を準備,固定後,アセチル化(0.15 M NaCl, 1.5% トリエタノールアミン,0.3% 無水酢酸混合溶液,室温 10分)を行い,1×PBS で洗浄後,42°C で prehybridization(1時間),hybridization(16時間)を行った.Prehybridization,hybridization とともに以下の溶液組成のものを 50% ホルムアミド混合液として用いた:1.2 M NaCl,20 mM Tris-HCl(pH 7.6),2% BSA,2 mM EDTA,20% dextran sulfate,0.05% sodium pyrophosphate,0.04% Ficoll(type 400),0.04% polyvinylpyrrolidone,0.1 mg/ml Yeast total RNA,0.1 mg/ml Yeast tRNA,0.2 mg/ml サケ精巢 DNA,0.1 mg/ml poly(dA),0.02 mg/ml DTT.

発色反応:hybridization 終了後,55°C の 1×SCC 溶液(50% ホルムアミド)中で洗浄し(20分4回),さらに室温 TBS 溶液(0.1 M Tris-HCl pH 7.5,0.15 M NaCl)中で10分間洗浄後,ブロッキングと抗 digoxigenin 抗体反応を行った.ブロッキングには TBS 溶液に 3% BSA,0.3% Triton X-100 を混合し,また,抗原抗体反応には BSA 濃度を 1% に落としアルカリフォスファターゼ標識抗 digoxigenin 抗体(Boehringer Mannheim 社)を希釈濃度 1:5,000 で混合し,4°C で 16 時間反応させた.TBS 溶液で 10 分間 3 回洗浄後,アルカリ緩衝液(0.1 M Tris-HCl pH 9.5,0.1 M NaCl,50 mM MgCl<sub>2</sub>)中で 0.45% Nitroblue tetrazolium(NBT),0.35% 5-bromo-

表2 眼球摘出・再移植後の過程

1. 急速な網膜変性
2. 網膜色素上皮細胞の増殖
3. 神経前駆細胞の誕生
4. 神経前駆細胞から神経細胞への分化
5. 網膜層構造形成の完了



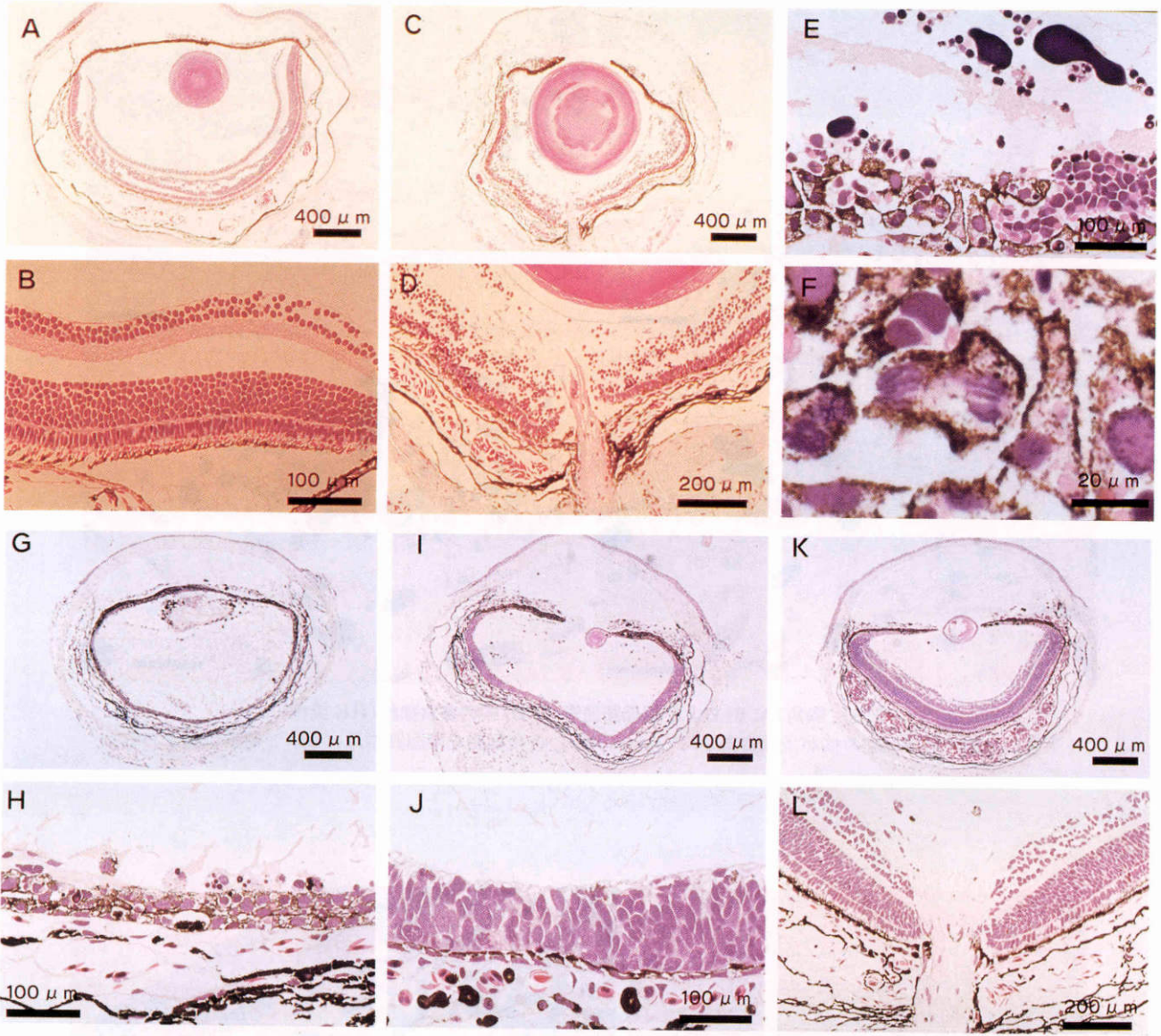


図1 眼球摘出・再移植後の網膜変性・再生過程の組織学的変化(ヘマトキシリン・エオジン, HE染色).

A, B: 正常アカハライモリ眼球. C, D: 術2日後. 急速な神経網膜の変性が見られる. 神経節細胞層はほとんど消失し内顆粒層も多くの細胞が変性している. E, F: 術10日後. RPEは極性を失い増殖を開始している. G, H: 術20日後. RPEの増殖が進み4層から5層構造となっている. I, J: 術30日後. この時期増殖中のRPEは急速に色素を失いはじめ, 神経網膜への分化が始まっているものと考えられる. しかし, 最下層ではまだ細胞分裂が続いており, さらにその下には豊富な色素を含み本来のRPEの形態を取り戻した細胞が, 平坦な一層を形成している. 虹彩からは水晶体が再生してきている. K, L: 術40日後. 網膜特有の層構造が発達し, 視神経も明瞭に確認される. この時期神経網膜の層構造はほぼ完成するが, 正常網膜よりも厚く, 視機能はまだ回復していない. このあと余分な神経細胞が間引かれて正常な厚さに収束し, さらに20~30日かかって中枢との接続が整い, 視機能が回復する.

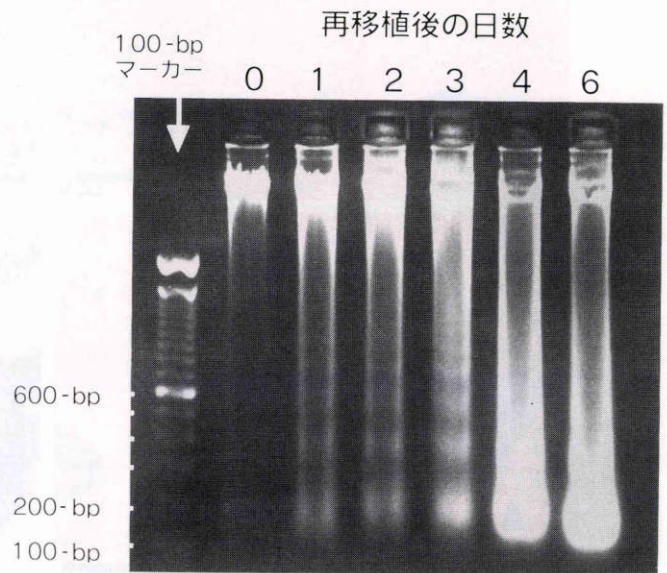


図2 デオキシリボ核酸(DNA)の断片化. 術翌日から, 約180-bpの整数倍の大きさに断片化されたゲノムDNAが, いわゆるDNA Ladderとなって現れている.



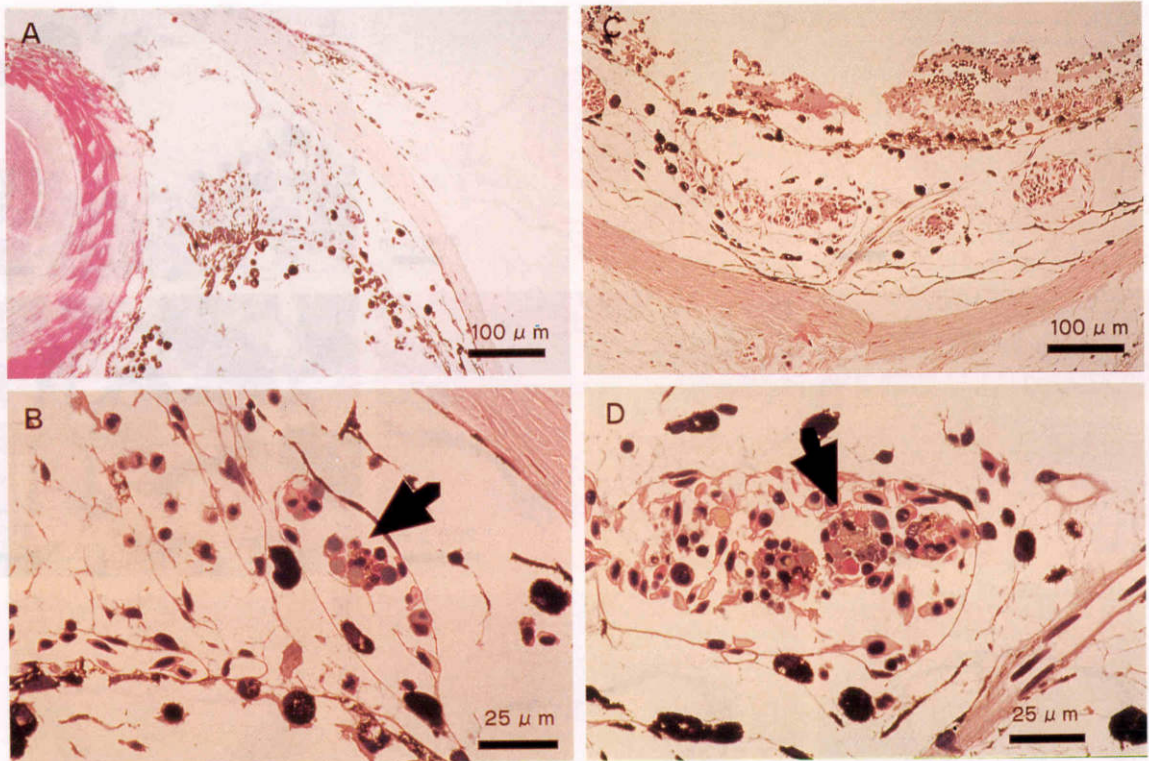


図3 隅角(A, B)および脈絡膜血管(C, D)中の貪食細胞(HE染色).  
変性した神経網膜細胞の核が多数貪食されている(矢印). 貪食細胞の細胞質にはメラニン顆粒が認められる.

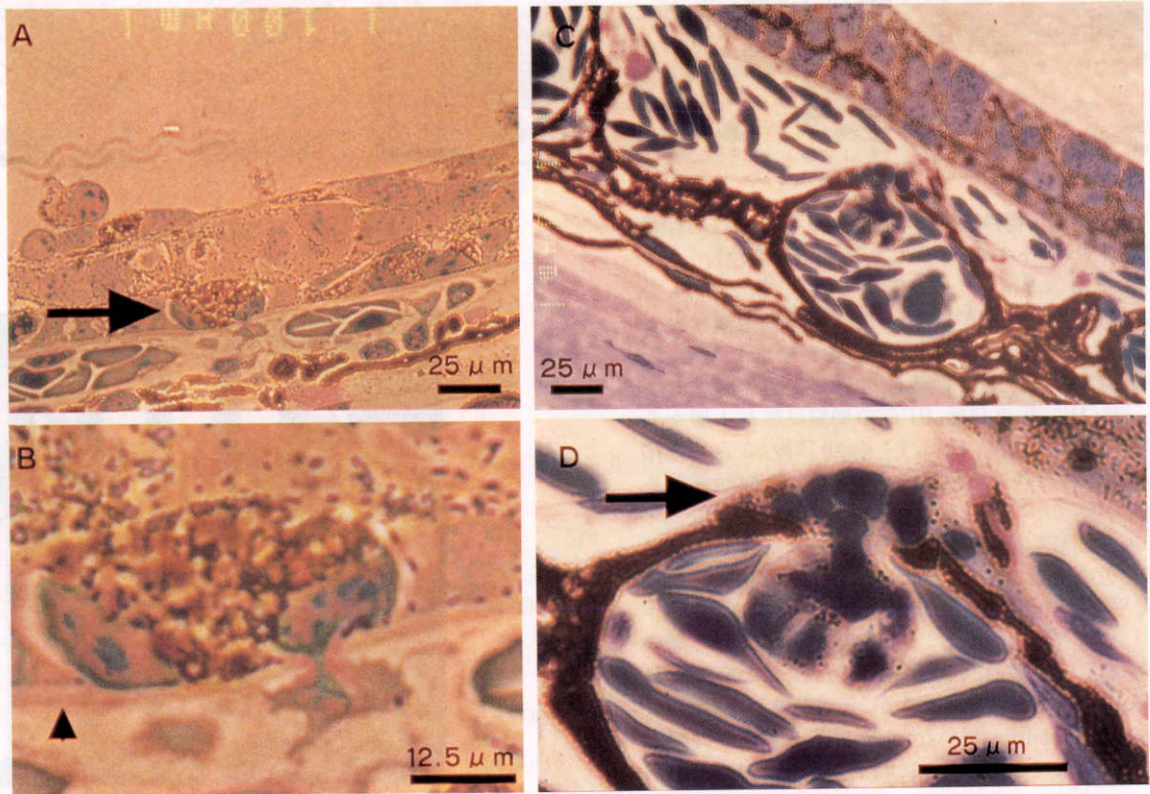


図4 貪食細胞の移動(トルイジンブルー染色).  
A, B: メラニン顆粒陽性の細胞が Bruch 膜を貫通している. C, D: Bruch 膜下に出た貪食細胞は, 脈絡血管内皮細胞の間隙から細胞体のほぼ半分を血管内に侵入させている. 矢印: 貪食細胞. 矢じり: Bruch 膜.



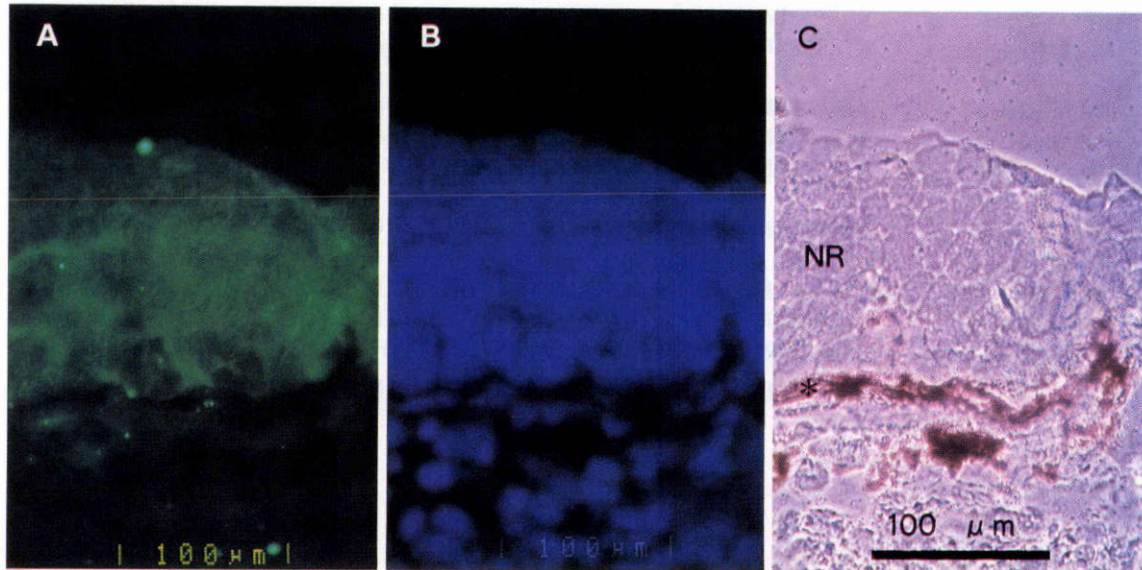


図5 網膜再生過程における Musashi タンパクの発現(術後35日)。

A: Musashi 抗原は増殖中の新しい神経網膜側(NR)のみに局在し(FITC陽性),最下層の網膜色素上皮細胞(RPE)(\*)には認められない。B: Hoechst 核染色。C: 位相差顕微鏡写真。

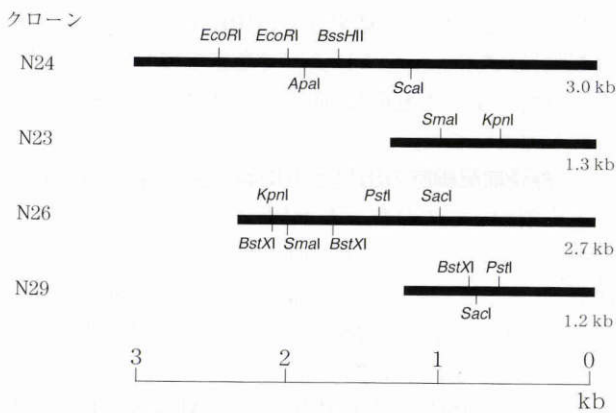


図6 4種類の遺伝子の制限酵素地図(重複してクローニングされたものについては,最長の相補性デオキシリボ核酸(cDNA)を示してある)。左側が5'端,右側が3'端を示す。

4-chloro-3-indolyl-phosphate toluidinium salt (BCIP)により発色を行った。

### III 結果

#### 1. 網膜変性過程に見られるアポトーシスとRPEによる変性細胞の処理

両生類に見られる網膜の再生過程は,その種によって微妙な時間的差異がある。そこでまず,アカハライモリにおける再生過程の組織学的概略を検討した。眼球摘出・再移植後の主な変化は,表2のごとくにまとめることができる。また,その典型的な形態像として,正常および術後2, 10, 20, 30, 40日の網膜再生過程を図1に示す。術後2日から,神経網膜の急速な変性が明瞭に観察される。その後もこの変性は急速に進み,10~12日でほとんどの神経網膜由来の細胞は変性し,RPEによって貪食される。

RPEはこの網膜変性に伴って次第に極性を失い始めるとともに細胞増殖を開始する。術後10日には明瞭な分裂像を呈するようになり,次第に多層構造をとり始める。術後20日頃には4~5層となるが,このころRPEはまだ多くのメラニン顆粒を保持している。30日後になるとこれらのメラニン顆粒は急速に失われ始めるが,最下層の細胞は色素を失うことなく,次第に細胞体の高を縮ませ始め,RPE本来の平坦な形態を取り戻して行く。術後40日前後で網膜特有の層構造はほぼ完成するが,細胞の数は正常に比べはるかに多く,神経網膜は厚い。その後,次第に細胞数を減らして本来の厚さに戻る。

初期の神経網膜の急速な変性は虚血による壊死と考えるにはあまりに急速であるため,細胞死プログラムによる能動的細胞死が疑われた。いわゆる programmed cell deathの判断基準として最も重要なゲノムDNAのラダリングの検出を試みたところ,典型的な階段上のバンドがアガロース電気泳動上に確認された(図2)。このDNAの断片化は,TUNEL(TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)法によっても検出でき,またアポトーシスを支持するアポトーシス小体も観察された。これらの事実から,初期の急速な神経細胞変性は虚血による壊死ではなく,主にアポトーシスによる能動的な変性であると考えられた。

変性した神経網膜の細胞はRPEに貪食される(その他のマクロファージ様の細胞の関与も否定はできない)。貪食細胞は増殖中のRPEの層中にも認められ,また硝子体中にも多数遊走している。メラニン顆粒を豊富に持ったこれらの貪食細胞は,眼内に長く留まることはなく,変性した神経網膜細胞の消失とともに眼内から消失する。これらの細胞が眼外へ出るとすれば,隅角または脈



	< basic >< Helix 1 >< Loop >< Helix 2 >	
Newt N24	KTRRL <u>K</u> ANNRERNRMHNLNSALDT <u>L</u> RG <u>V</u> LPAN <u>P</u> EA <u>A</u> PD <u>T</u> RLTKIETLRFAYNYIWALSET	
XNGNR-1a	KTRRVKANNRERNRMHNLNSALDSLREVLPSLPEDA	KLTKIETLRFAYNYIWALSET
XNGNR-1b	KTRRVKANNRERNRMHHLNYALDSLREVLPSLPEDA	KLTKIETLRFAYNYIWALSET
Mouse NGN	RSRRVKANDRERNRMHNLNAALDALRSVLPSPDDT	KLTKIETLRFAYNYIWALET
Newt N26	K <u>V</u> RRQKANARERNRMHDL <u>N</u> SALDNLKVVPCYSKTQ	KLSKIETLRLAKNYIWALSET
Mouse NeuroD	KLRRQKANARERNRMHDLNAALDNLKVVPCYSKTQ	KLSKIETLRLAKNYIWALSEI
Mouse NeuroD2	KLRRQKANARERNRMHDLNAALDNLKVVPCYSKTQ	KLSKIETLRLAKNYIWALSEI
Mouse NeuroD3	RSRRVKANDRERNRMHNLNAALDALRSVLPSPDDT	KLTKIETLRFAYNYIWALET

図7 クローン N 24 と N 26 の bHLH 領域のアミノ酸配列, および各種動物の *neurogenin*, *neuroD* の bHLH 領域を比較して示す。

下線部は, 他種と異なるアミノ酸を示す. Newt N 24 と N 26 : クローニングされたアカハライモリ bHLH 遺伝子, XNGNR-1 : *Xenopus neurogenin-related gene*, Mouse NGN : mouse *neurogenin*.

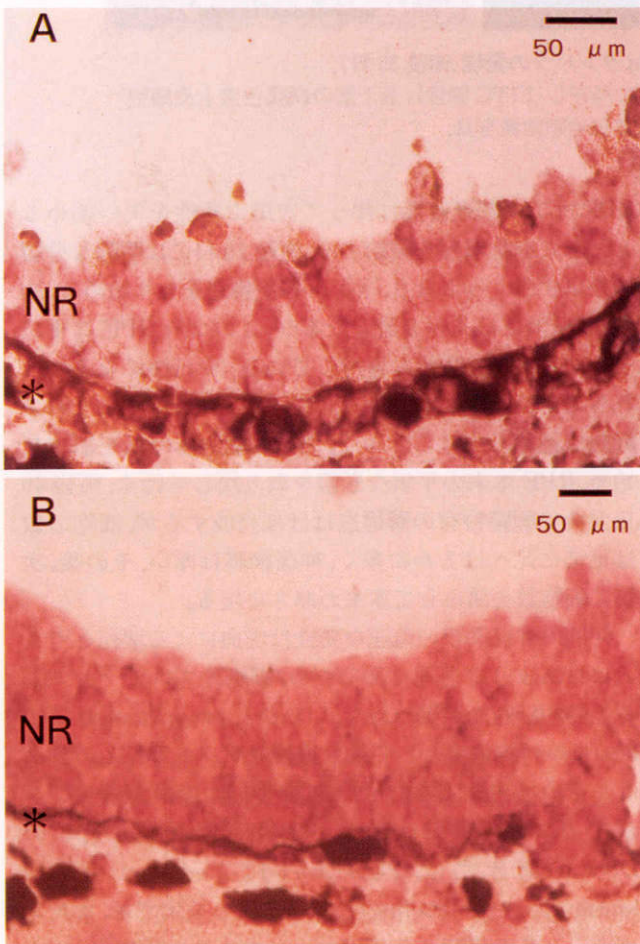


図8 クローン N 24 の術 30 日後(A)および 40 日後 (B)の発現パターン。

A : 個々の細胞により発現レベルに大きな差がある. これは, 網膜神経細胞の分化程度の差を反映しているものと考えられる. B : 層構造が構築される直前に相当する時期では, 内層での発現が減弱しており, これは神経節細胞の分化が完了に近づいたことを反映していると考えられた。

絡膜血管から静脈系へ入るものと考えられる. そこで, 隅角, 脈絡膜の血管を観察した. 隅角の線維柱帯に相当する

部位には, 変性網膜細胞を貪食したメラニン顆粒陽性の細胞が多数確認された(図3 A, B). また, 脈絡膜血管内にも全く同様な細胞が多数確認された(図3 C, D). さらに, 貪食細胞が Bruch 膜を通過し(図4 A, B), 脈絡膜血管内皮細胞の間隙を通過する像(図4 C, D)も確認することができた. これらの結果から, RPE 由来と思われる貪食細胞は, アポトーシスによって急速に変性した神経網膜を貪食によって処理し, 血管系を利用して眼外へ出るものと考えられた。

2. 神経前駆細胞の出現と不均等分裂関与の可能性

上皮細胞として分化した RPE から神経細胞としての網膜が作られる過程では, 網膜の各細胞に分化できる多機能な, そして細胞分裂能を有した神経前駆細胞が作られる必要がある. 再生過程における神経前駆細胞のマーカーとして, Musashi タンパクの発現を検討した. 術後 35 日の蛍光顕微鏡写真を図5 に示す. Musashi 抗原は増殖中の新しい神経網膜側のみに局在して認められ, その起源である最下層の RPE には求められなかった. 再生早期においても Musashi は RPE には認められず, 増殖した娘細胞のみに認められた. この結果から, もともとの RPE は神経前駆細胞とはなり得ず, 娘細胞がその後増殖して神経前駆細胞となるものと考えられた. Musashi タンパクは細胞の不均等分裂にも関係していると考えられ, 娘細胞のその後の分化過程はもとより, RPE から娘細胞が産み出される段階でも不均等分裂が関与している可能性が示唆された。

3. 再生過程 cDNA ライブラリー

術後 20, 30 日の cDNA ライブラリーは, とともに  $1.0 \times 10^9$  pfu/ml 以上の titer が得られ, 無作為に選んだ 10 クローンの挿入遺伝子断片の長さは, 2.0 kb 以上であった。

4. Proneural gene(前神経遺伝子)群のクローニングと発現パターンの検討

術後 20 日と 30 日の眼球 cDNA ライブラリーから, 各 50 万クローン(計 100 万クローン)をアカハライモリ



*neurogenin* の bHLH 領域の DNA 配列をプローブとしてスクリーニングを行った(方法参照), 強陽性 18 クローン, 弱陽性 36 クローンを得, このうち強陽性 8 クローンの解析を行った結果, 4 種類の遺伝子が存在することが明らかとなった(その制限酵素地図を図 6 に示す). そのうち, 解析の進んでいる二つのクローン, N 24 と N 26 の bHLH 領域を, 他種の *neurogenin*, *neuroD* 遺伝子の bHLH 領域との比較で図 7 に示す. クローン N 26 の bHLH 領域は, 他種の *neuroD* の同領域のアミノ酸配列と極めて近く, このクローンは *neuroD* 遺伝子のアカハライモリ相同遺伝子であると考えられた. クローン N 24 については, 既知の遺伝子の中では *neurogenin* との相同性が最も高かったが, loop 領域のアミノ酸が他種に比べ 3 個多く, また近傍のアミノ酸の種類も異なっており, *neurogenin* 遺伝子ファミリーに属する未だに報告のない未知の遺伝子である可能性が示唆された.

この 2 種類の遺伝子の mRNA の発現パターンを *in situ* hybridization により検討した. 両 mRNA とも術後 25 日頃から再生網膜に発現が認められた. その後, 40 日後まで再生中の神経網膜全層の細胞で発現が認められたが, それ以降網膜内層での発現は減弱した. クローン N 24 の術後 30 日および 40 日の発現パターンを図 8 に示す.

#### IV 考 按

##### 1. 眼球摘出・再移植後の神経網膜の変性と変性細胞の処理

イモリやサンショウウオでは, 強膜を切開して神経網膜を RPE から剝離して網膜全摘出を行うか, あるいは眼球摘出・再移植によって神経網膜を変性させると, RPE から新たな神経網膜全層が再生される. 後者の場合, 網膜の再生という現象に加えて, 眼組織には死滅した神経細胞の速やかな除去という作業が課せられる. 再生に先行する神経網膜の変性は眼球摘出・再移植による血管の切断, すなわち虚血によるものと考えられている<sup>46)</sup>が, 虚血による壊死で死滅した細胞は lysosomal enzyme, その他の毒性のある物質を周囲に放出するため, 他の眼組織, とりわけ新しい神経網膜を産み出す RPE に障害を与えないように, 変性細胞は限られた時間内に徹底して除去されなければならない. 実際, 当モデルにおける網膜変性は, 摘出眼球を培養液中で器官培養した場合に比べて極めて速く, むしろ能動的に起こっていることが予測された. すなわち, この網膜変性は programmed cell death に基づいて起こる現象と考え, アポトーシスの証拠を求めた. その結果, 図 2 に示す DNA の断片化がアガロース電気泳動上で証明されたことに加え, TUNEL 染色によってもこの断片化が陽性であり, さらにアポトーシス小体の存在, 電子顕微鏡による核濃縮なども認められて, この変性過程が虚血による壊死で

はなく, アポトーシスによるものであることを示すに十分な証拠が得られた(投稿準備中).

一般に, アポトーシスによって死滅した細胞は周囲の細胞, またはマクロファージによって貪食されることで除去される. 当モデルにおいても主に RPE によって貪食されている. Keefe<sup>42)43)</sup>も, この貪食は主に RPE によってなされるとしているが, 後期にはメラニンのみを処理する melanophage という細胞の存在を想定している. しかし, メラニン顆粒は病的状態で<sup>47)48)</sup>, あるいは加齢変化として<sup>49)</sup>しばしば autophagy によって RPE 自身によって細胞質内で自己消化されることが知られている. また, イモリの虹彩色素上皮細胞を *in vitro* で水晶体細胞に分化転換させる際にも, 上皮細胞内での autophagy が認められている<sup>50)</sup>. これまでの当研究過程では, RPE がメラニン顆粒を細胞外に放出してそれを再び貪食する melanophage のごとき細胞は全く認められなかった. また, *in vitro* での実験が示唆するように, 自己消化したメラニンを細胞外へ放出するような像も全く認められなかった. しかしながら, 変性した網膜細胞を貪食した細胞は, 術後 8~10 日以降急速に眼内での数を減らし始めている. これらの結果から, これらの貪食細胞は全身血流に入って眼外へ出ていることが疑われ, その流出口として隅角および脈絡膜血管系を詳細に観察した結果, 隅角および脈絡膜血管内に変性細胞の核を貪食した無数の遊走細胞を認めた(図 3). 図 4 に示したように, 硝子体腔内あるいは増殖中の RPE の層内の貪食細胞が遊走して Bruch 膜を貫通する像, 脈絡膜下へ出た貪食細胞が血管内皮細胞の間隙をぬって血管内へ侵入する像も捕らえることができ, また電子顕微鏡により Bruch 膜や血管内皮細胞との微細な関係も明らかにすることができ(投稿準備中), アポトーシス後の変性網膜細胞の処理の道筋が明らかとなった. ヒトの加齢変化としての drusen 形成には, RPE が Bruch 膜へ向かって発芽することが初期変化として関わっており<sup>49)</sup>, RPE には Bruch 膜の基底膜を破って侵入する能力が潜在的に備わっていると考えられるが, 血管内皮細胞を認識して全身血に入るといった報告はなく, これらの貪食・遊走細胞がすべて RPE で説明がつくかどうかを結論付けるためには, 生物学的マーカーを用いての詳細な検討を待たねばならないと考えられた.

##### 2. RNA 結合タンパク Musashi の発現と神経前駆細胞の誕生

個体における神経発生では, 神経前駆細胞または神経幹細胞の誕生が必須であり, RPE から新しい神経網膜が再生する過程においてもこの神経前駆細胞の誕生は不可欠である. RPE 増殖のきっかけは明らかに神経網膜の損失または変性であるが, 神経前駆細胞の誕生は細胞自律的に定められた運命であるのか, あるいは何らかの細胞外シグナルにより誘導されるのかは重要な問題である.



前者の例として、ショウジョウバエの外感覚器の不均等分裂に不可欠な Musashi タンパクの発現があげられる。ショウジョウバエの外感覚器は一つの感覚器前駆細胞 (sensory organ precursor, SOP) が不均等分裂を二度繰り返して 4 種類の異なる細胞に分化する。このうちの 2 種類は神経系の neuron と glia であり、残る 2 種類は shaft と socket と呼ばれる支持細胞である。Musashi 遺伝子の無発現変異体では、高率で neuron と glia が欠損し、通常より多くの shaft と socket 細胞が生まれるため、Musashi タンパクは神経系へ分化するための不均等分裂に関与するものと考えられている<sup>51)</sup>。マウス Musashi タンパクは 39 kD の RNA 結合タンパクで、中枢神経系の幹細胞とその娘細胞、すなわち分裂能を有する多機能な神経前駆細胞に特異的に発現し、分化して分裂能を失った細胞では、その発現が抑制されることから神経前駆細胞の特異的なマーカーと考えられる<sup>52)</sup>。ショウジョウバエとマウスでの研究結果から、哺乳類においても Musashi タンパクは、不均等分裂に関わる他の遺伝子あるいは他の神経特異的遺伝子の mRNA に結合して、標的 mRNA の安定性またはタンパクへの翻訳レベルを調節していることが類推されている。

図 5 に示すように、Musashi タンパクは最下層の RPE には発現せず、分裂中の娘細胞、すなわち網膜神経細胞の前駆細胞あるいは網膜芽細胞と呼ぶべき細胞に発現が認められた。同様の局在は、さらに早期の再生過程でも見られ、もともとの RPE 自身は神経前駆細胞とはなり得ず、細胞分裂によって娘細胞にのみその可能性が生じることが示唆された(投稿準備中)。ただし、RPE から娘細胞への分裂時に不均等分裂が関わっているかについては、今回の結果からのみでは結論できず、細胞外からのシグナルが関わっていることは否定できない。例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)は、神経前駆細胞を誘導または維持する機能が知られており<sup>53)</sup>。ニワトリ胎生では神経網膜切除後の硝子体腔内 bFGF 投与により神経網膜を誘導するという報告<sup>54)55)</sup>があり、アカハライモリにおける神経網膜変性後の RPE からの神経前駆細胞の誘導にも、bFGF 様の細胞外シグナルの関与を想定することには、何ら矛盾が生じない。これらの問題を検証するためには、Musashi 遺伝子の mRNA が娘細胞だけでなく、RPE 自身でも発現されているか否かを検討することと、再生初期の RPE などの眼組織中に bFGF あるいはその受容体の発現が見られるかを検討すること、さらに BrdU の pulse labeling などによって分化転換直前の RPE の細胞系譜の追跡を行うことが重要であると考えられる。

一般的に、分化転換が起こる場合には、まず脱分化過程を経て本来の分化した機能や形態が失われ、その後他の表現型の細胞の機能や形態を獲得する再分化過程が起こると考えられている。イモリの網膜再生過程において

も、RPE が上皮としての形質を捨てて多機能な細胞へといったん脱分化したのち神経系への細胞へと再分化して行くものと考えられている。しかし、本稿で検討したモデルにおける RPE は、神経網膜変性に伴う細胞増殖の段階で基底膜側・神経網膜側の明らかな極性が失われるものの、その後の大きな変化は増殖の結果生じた娘細胞側を中心にみられ、RPE は直ちにメラニン顆粒を増やすとともに平坦な単層構造に戻って行く。Musashi タンパクの発現が RPE 側に見られず、娘細胞側だけに認められたことも、RPE 自身の著明な脱分化よりは、RPE とは大きく形質が異なる娘細胞を産み出している可能性を示唆するものと考えられる。事実、マウス食道筋の発生過程で起こる平滑筋から横紋筋への分化転換では、平滑筋特異的なミオシン light chain を発現している細胞がその発現を停止することなく、横紋筋特異的ミオシン heavy chain を発現し始め、この分化転換過程にはほとんど脱分化過程が生じないことが示されている<sup>56)</sup>。分化・脱分化という現象自体が相対的なものであるので、指標とするものによってその程度の評価は異なるに違いないが、RPE の分化転換における脱分化の関与がどの程度のものか検討することは、網膜再生のメカニズムを知る上で重要である。現在、分化した RPE に特異的な抗原と神経前駆細胞特異的な Musashi を指標として、この問題を検討中である。

### 3. Proneural gene(前神経遺伝子)群の発現

上皮細胞として最終分化を遂げた RPE が、神経網膜という全く異なる集団へと分化をやり直す分化転換という極めて稀有な現象が起こるためには、神経組織を作るために必要な数多くの遺伝子を統合して働かせる、強力な「指揮官」が必要と考えられる。このような機能をもつ転写因子は筋組織で初めて明らかとなり<sup>57)</sup>、その後、様々な転写因子がクローニングされ、その機能が明らかにされたが、これらの転写因子に共通する特徴は、ベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス(bHLH)という共通のモチーフをもった DNA 結合タンパクであるということである。bHLH タンパクの機能は、HLH 領域を使って複数の転写因子同士で homodimer または heterodimer を作り、ベーシック領域を使って標的 DNA の E-box と呼ばれる特定の DNA 配列(CANNTG)に結合して、その遺伝子の発現を調節することである。近年、神経発生においても、筋組織の発生とよく似たシナリオが明らかとなってきた。すなわち、*neurogenin*<sup>45)</sup>と呼ばれる bHLH タンパクの発現が始まると、それより下流にある *neuroD*<sup>58)</sup>を含む bHLH に属する様々な転写因子がカスケードとして活性化され、そのそれぞれが神経細胞への分化に必要な多くの遺伝子を発現させて行くというのである。これらの bHLH は、ショウジョウバエの proneural gene(前神経遺伝子)群に相当する脊椎動物の遺伝子であると考えられており、これが正しいとすれば、



RPE から神経前駆細胞が作られる際には少なくとも部分的に同じカスケードが使われるであろうという仮説が成り立つ。この仮説に基づいて、網膜再生過程にある眼球組織より作製した cDNA ライブラリーから、bHLH をもつ遺伝子群をクローニングした。図7に示すように、この遺伝子群は *neurogenin/neuroD* ファミリーに属する転写因子と思われ、そのタンパク産物は下流の数多くの神経特異的遺伝子のエンハンサー領域に結合して、それらを選択的に発現させることにより「網膜の再生を指揮」しているものと考えられる。術後30日の再生網膜では、発現している細胞と発現していない細胞に明瞭な差があり、この差は神経としての分化程度の差を反映していると考えられた。術後40日では再生網膜全層に広く発現が見られたが、最内層では発現の減弱が認められた。これは、最も早期に分化する神経節細胞の分化が完了に近づいているに伴う発現抑制を反映しているものと考えられた。クローン N 24 と N 26 は、ほぼ同様の空間的発現パターンを示したが、時間的発現パターンとしては、N 26 は既に術後20~25日頃からわずかながら発現しているのに対して、N 24 はこの時期の発現がほとんど認められなかった。多くの bHLH 遺伝子が階層構造を成していることから考えると、N 26 は N 24 の上流にある遺伝子である可能性がある。しかし、今回 *in situ* hybridization に使用した cRNA プロブは約 1 kb と比較的長く、非特異的な塩基配列によると思われる高い背景発色が解釈を困難にしているとも考えられるので、複数のプロブを作り直して上記の点に関して再度検討する必要があると考えられた。

現在のところ、最も早期に神経細胞への運命を決定するのに必要な遺伝子が *neurogenin* と考えられているが<sup>45)</sup>、*neurogenin* 遺伝子の発現を調節している分子については何も明らかになっていない。*neurogenin/neuroD* よりも上流に他の転写因子が存在する可能性が高く、その転写因子も bHLH 型の遺伝子であることは十分考えられる。したがって、本研究のライブラリー・スクリーニング過程で、これまでにクローニングされている残りの遺伝子の解析を急ぐとともに、術後20日より以前の再生早期の cDNA ライブラリーを作製して同様なアプローチで bHLH 遺伝子のクローニングを行い、このカスケードの上流へ上流へと遡って、RPE から神経細胞への誘導を起こす最も重要な転写因子を同定する作業を始めている。

#### 4. 臨床応用への展望

冒頭で述べた通り、網膜視神経の障害に対して根治的治療を考えるとすれば、①失われた網膜神経細胞を何らかの形で補うこと、②新しい神経細胞がシナプスを介したネットワークを形成し、最終的に中枢との接続を回復すること、③回復したネットワークを通じて、中枢が利用することのできる有用な視覚情報として入力信号を統

合して送受信するシステムを回復する、という三つの目標を達成しなければならない。そして、この三つは通常切り離して考えることができないことも述べた。アカハライモリにみられる網膜の再生は、神経生物学で普通示す軸索の再生ではなく、失われた網膜神経細胞が RPE の分化転換によって補われ、しかも機能的なシナプスを作って中枢へと視覚情報を送ることができるたぐいまれな神経再生モデルであり、上記の三つの目標を完全に達成している。このような現象をヒトを含む他の動物に起こさせたいと考えたとき、このモデルにおける神経誘導のメカニズムを分子レベルで解明することは不可欠である。特に、RPE から神経前駆細胞が産み出される過程における初期の遺伝子発現が大きな鍵を握っているものと考えられる。本稿においては、これまでの研究過程の中から特に不均等分裂の関与と bHLH 型の転写因子の発現に焦点を絞ったが、この他にホメオボックス型の転写因子や細胞表面・細胞外シグナルの関与も重要であると考えられる。これらを網羅するための一つの方法として、再生過程に特異的に発現する遺伝子をクローニングする目的で、いわゆる subtractive hybridization と differential display 法を検討している。

アカハライモリに見られるような完全な網膜再生を起こさせることは究極の理想であるが、その分子メカニズムを明らかにしようとする研究過程の中で得られる知識は、網膜移植にも応用可能であると考えられる。神経網膜移植の最大の問題点は、移植細胞が移植先でシナプスを作らないことである。それには神経細胞の分化過程が大きく影響しており、例えば分化度の低い胎児の視細胞を移植しても、移植先の細胞の分化度が高くシナプス形成に応じなければ、情報交換は行われぬ。移植によって神経網膜を補うことを考える場合にも、これを成功に導くためには、移植に適した網膜細胞の分化・脱分化程度を遺伝子レベルで明らかにし、遺伝子レベルでの修飾を可能にすることが必須である。通常、個体発生の過程においては、胚葉を越えて多数の細胞がお互いに影響し合い、形態形成が行われる。眼球の場合も、神経外胚葉に加え、表皮外胚葉と中胚葉、神経堤由来の細胞の関与が大きい。したがって、網膜の発生を研究する場合にも、純粋に網膜の発生だけに必要な因子を扱うことは事実上不可能である。しかし、当動物モデルにおける神経網膜の再生は、神経網膜以外のすべての眼球構造は保たれたまま、神経網膜だけの発生を追うことができ、この意味では通常の網膜発生モデルに比べて焦点が絞りやすい。この点を生かして、これまでに述べた転写因子以外にも、細胞表面・細胞外シグナルを同定して、これらを組み合わせて修飾することにより、移植に適した分化程度の網膜を得ることが期待できる。

イモリという特殊な動物モデルを使うことによる研究上の不利益は大きいですが、上記の利点や網膜が再生する



という事実は、多大な労力と引き換えにそれに見合うだけの医学・科学上の知識を与えてくれるものと思われる。DNAプローブや抗体などの研究道具を地道に増やして行くことにより、その困難は克服できると考えられる。

この論文の要旨は、第101回日本眼科学会総会宿題報告で発表しました。本発表の機会を与えて下さいました日本眼科学会評議員の皆様ならびに小口芳久先生(慶應義塾大学医学部教授)に感謝申し上げます。本研究は、日本眼球銀行協会海外留学助成金、アジア地域眼科医研修基金、日本失明予防協会、上原記念財団リサーチフェローシップ、西眼科病院、株式会社ニデックの支援を受けました。また、ファルマシア・アプリケーション株式会社、参天製薬株式会社、ノボ ノルディスクファーマ株式会社より深い御理解をいただきました。下記の皆様からの慶應義塾大学医学部網膜再生研究への寄付に心より深謝いたします：慶應義塾大学医学部眼科学教室同窓会(原 裕、樋田富雄、原 孜、野崎道雄、秋山健一、大沢満雄、山田耕太郎、平川和夫、小澤博子、富田 香、尾羽澤大、渡邊静子、安達章子、松井久和、小向正純、酒井利彦、宇津見義一、高山東洋、本橋昭男、坪田一男、藤野 貞、天沼 宏、天沼恭子、野口昌彦、西 妙子、依田初栄、水口勇臣、脇泰三郎、森実秀子、大崎千壽、佐賀歌子、手代木由紀子、下山順司、小川葉子、佐藤静雄、武田和夫、敬称略・順不同)、患者さんおよびご家族(古矢利夫、山川助雄、林久美子、高村照郎、鹿島恵美子、池田烈也、中村善暁、長岡 保、小笠原三興、森谷玲子、小泉茂雄、柴田寿子、大窪融、田中晋作、中丸忠次、郷 明博、岩佐浩二、敬称略・順不同)、協力者(本橋孝彦、梶原将義、小山秀人、岩鶴睦子、井上邦夫、小林清吉、武末佳子、小林英二、小林久子、奈良迫ミチ、服部俊和、上原善雄・光子、宮田典男、西村考子、西村哲也、西村美保子、西村昭三、永瀧恵美子、永瀧喜三、倉橋雅夫、佐々木サタ、中川義野、坂本修子、順不同・敬称略)、日本アルコン、日本盲人専門家協会(池田敏郎会長)からは、スタンフォード大学医学部神経生物学教室に御寄付をいただきました。謹んで御礼申し上げます。実験用アカハライモリの捕獲・輸送に多大なご尽力をいただいた貴田正治氏(株式会社キダ商事)、飼育に協力いただいた梶原睦子氏に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Dryja TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandell DW, et al: A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 343: 364-366, 1990.
- 2) Hotta Y, Shiono T, Hayakawa M, Hashimoto T, Kanai A, Nakajima A, et al: Molecular biological study of the rhodopsin gene in Japanese patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 96: 237-242, 1992.
- 3) Fujiki K, Hotta Y, Hayakawa M, Sakuma H, Shiono T, Noro M, et al: Point mutations of rhodopsin gene found in Japanese families with autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP). *Jpn J Hum Genet* 37: 125-132, 1992.
- 4) Nakazawa M, Kikawa-Araki E, Shiono T, Tamai M: Analysis of rhodopsin gene in patients with retinitis pigmentosa using allele-specific polymerase chain reaction. *Jpn J Ophthalmol* 35: 386-393, 1991.
- 5) Hayakawa M, Hotta Y, Imai Y, Fujiki K, Nakamura A, Yanashima K, et al: Clinical features of autosomal dominant retinitis pigmentosa with rhodopsin gene codon 17 mutation and retinal neovascularization in a Japanese patient. *Am J Ophthalmol* 115: 168-173, 1993.
- 6) Shiono T, Hotta Y, Noro M, Sakuma T, Tamai M, Hayakawa M, et al: Clinical features of Japanese family with autosomal dominant retinitis pigmentosa caused by point mutation in codon 347 of rhodopsin gene. *Jpn J Ophthalmol* 36: 69-75, 1992.
- 7) Nakazawa M: A molecular biological study on retinitis pigmentosa. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 97: 1394-1405, 1993.
- 8) Kajiwara K, Hahn LB, Mukai S, Travis GH, Berson EL, Dryja TP: Mutations in the human retinal degeneration slow gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature* 354: 480-483, 1991.
- 9) Farrar GJ, Kenna P, Jordan SA, Kumar-Singh R, Humphries MM, Sharp EM, et al: A three-base-pair deletion in the peripherin-RDS gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 354: 478-480, 1991.
- 10) Rosenfeld PJ, Cowley GS, McGee TL, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP: A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nature Genet* 1: 209-213, 1992.
- 11) McLaughlin ME, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP: Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nature Genet* 4: 130-134, 1993.
- 12) Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP: Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science* 264: 1604-1608, 1994.
- 13) Dryja TP, Hahn LB, Kajiwara K, Berson EL: Dominant and digenic mutations in the peripherin/RDS and ROM1 genes in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 1972-1982, 1997.
- 14) Huang SH, Pittler SJ, Huang X, Oliverira L, Berson EL, Dryja TP: Autosomal recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the alpha subunit of rod cGMP phosphodiesterase. *Nat Genet* 11: 468-471, 1995.
- 15) Dryja TP, Finn JT, Peng YW, McGee TL, Berson EL, Yau KW: Mutations in the gene encoding the alpha subunit of the rod cGMP-gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10177-



- 10181, 1995.
- 16) **Kajiwara K, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP**: A null mutation in the human peripherin/RDS gene in a family with autosomal dominant retinitis punctata albescens. *Nature Genet* 3: 208–212, 1993.
  - 17) **Nichols BE, Sheffield VC, Vandenberg K, Drack AV, Kimura AE, Stone EM**: Butterfly-shaped pigment dystrophy of the fovea caused by a point mutation in codon 167 of the RDS gene. *Nature Genet* 3: 202–207, 1993.
  - 18) **Wells J, Wroblewski J, Keen J, Inglehearn C, Jubb C, Eckstein A**, et al: Mutations in the human retinal degeneration slow (RDS) gene can cause either retinitis pigmentosa or macular dystrophy. *Nature Genet* 3: 213–218, 1993.
  - 19) **Wroblewski JJ, Wells JA, Eckstein A, Fitzke F, Jubb C, Keen TJ**, et al: Macular dystrophy associated with mutations at codon 172 in the human retinal degeneration slow gene. *Ophthalmology* 101: 12–22, 1994.
  - 20) **Weleber RG, Carr RE, Murphey WH, Sheffield VC, Stone EM**: Phenotypic variation including retinitis pigmentosa, pattern dystrophy, and fundus flavimaculatus in a single family with a deletion of codon 153 or 154 of the peripherin/RDS gene. *Arch Ophthalmol* 111: 1531–1542, 1993.
  - 21) **Allikmets R, Singh N, Sun H, Shroyer NF, Hutchinson A, Chidambaram A**, et al: A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet* 15: 236–246, 1997.
  - 22) **Inana G, Totsuka S, Redmond M, Dougherty T, Nagle J, Shiono T**, et al: Molecular cloning of human ornithine aminotransferase mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1203–1207, 1986.
  - 23) **Mitchell GA, Brody LC, Looney J, Steel G, Suchanek M, Dowling C**, et al: An initiator codon mutation in ornithine-delta-aminotransferase causing gyrate atrophy of the choroid and retina. *J Clin Invest* 81: 630–633, 1988.
  - 24) **Berger W, Meindl A, van de Pol TJ, Cremers FP, Ropers HH, Doerner C**, et al: Isolation of a candidate gene for Norrie disease by positional cloning. *Nat Genet* 1: 199–203, 1992.
  - 25) **Chen ZY, Hendriks RW, Jobling MA, Powell JF, Breakefield XO, Sims KB**, et al: Isolation and characterization of a candidate gene for Norrie disease. *Nat Genet* 1: 204–208, 1992.
  - 26) **Meindl A, Berger W, Meitingner T, van de Pol D, Achatz H, Dorner C**, et al: Norrie disease is caused by mutations in an extracellular protein resembling C-terminal globular domain of mucins. *Nat Genet* 2: 139–143, 1992.
  - 27) **Cremers FP, van de Pol DJ, van Kerkhoff LP, Wieringa B, Ropers HH**: Cloning of a gene that is rearranged in patients with choroideremia. *Nature* 347: 674–677, 1990.
  - 28) **Weil D, Blanchard S, Kaplan J, Guilford P, Gibson F, Walsh J**, et al: Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* 374: 60–61, 1995.
  - 29) **Gibson F, Walsh J, Mburu P, Varela A, Brown KA, Antonio M**, et al: A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1. *Nature* 374: 62–64, 1995.
  - 30) **Dryja TP, Berson EL, Rao VR, Oprian DD**: Heterozygous missense mutation in the rhodopsin gene as a cause of congenital stationary night blindness. *Nat Genet* 4: 280–283, 1993.
  - 31) **Gal A, Orth U, Baehr W, Schwinger E, Rosenberg T**: Heterozygous missense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in autosomal dominant stationary night blindness. *Nat Genet* 7: 64–67, 1994.
  - 32) **Dryja TP, Hahn LB, Reboul T, Arnaud B**: Missense mutation in the gene encoding the alpha subunit of rod transducin in the Nougaret form of congenital stationary night blindness. *Nat Genet* 13: 358–360, 1996.
  - 33) **Fuchs S, Nakazawa M, Maw M, Tamai M, Oguchi Y, Gal A**: A homozygous 1-base pair deletion in the arrestin gene is a frequent cause of Oguchi disease in Japanese. *Nat Genet* 10: 360–362, 1995.
  - 34) **Yamamoto S, Sippel KC, Berson EL, Dryja TP**: Defects in the rhodopsin kinase gene in the Oguchi form of stationary night blindness. *Nat Genet* 15: 175–178, 1997.
  - 35) **Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM**, et al: Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242: 1427–1430, 1988.
  - 36) **Stone EM, Fingert JH, Alward WLM, Nguyen TD, Polansky JR, Sunden SLF**, et al: Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 275: 668–670, 1997.
  - 37) **Eguchi G, Kodama R**: Transdifferentiation. *Curr Opin Cell Biol* 5: 1023–1028, 1993.
  - 38) **Griffini L, Marchio G**: *La Riforma Medica* 5: 86–93, 1889.
  - 39) **Stone LS**: Neural retinal degeneration followed by regeneration from surviving retinal pigment cells in grafted adult salamander eyes. *Anat Rec* 106: 89–109, 1950.
  - 40) **Stone LS**: The role of retinal pigment cells in regenerating neural retinae of adult salamander eyes. *J Exp Zool* 113: 9–31, 1950.
  - 41) **Keefe JR**: An analysis of urodelian retinal regeneration. I. Studies of the cellular source of retinal regeneration in *Notophthalmus viridescens* utilizing <sup>3</sup>H-thymidine and colchicine. *J Exp Zool* 184: 185–206, 1973.
  - 42) **Keefe JR**: An analysis of urodelian retinal regeneration. II. Ultrastructural features of retinal regeneration in *Notophthalmus viridescens*.



- cens. *J Exp Zool* 184 : 207—232, 1973.
- 43) **Keefe JR** : An analysis of urodelian retinal regeneration. III. Degradation of extruded melanin granules in *Notophthalmus viridescens*. *J Exp Zool* 184 : 233—238, 1973.
  - 44) **Keefe JR** : An analysis of urodelian retinal regeneration. IV. Studies of the cellular source of retinal regeneration in *Triturus cristatus carnifex* using  $^3\text{H}$ - thymidine. *J Exp Zool* 184 : 239—258, 1973.
  - 45) **Ma Q, Kintner C, Anderson DJ** : Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87 : 43—52, 1996.
  - 46) **Hitchcock PF, Raymond PA** : Retinal regeneration. *Trends Neurosci* 15 : 103—108, 1992.
  - 47) **Burns MS, Tyler NK, Bellhorn RW** : Melanosome abnormalities of ocular pigmented epithelial cells in beagle dogs with hereditary tapetal degeneration. *Curr Eye Res* 7 : 115—123, 1988.
  - 48) **Feeney-Burns L, Mixon RN** : Development of amelanotic retinal pigment epithelium in eyes with a tapetum lacidum : Melanosome autophagy and termination of melanogenesis. *Dev Biol* 72 : 73—88, 1979.
  - 49) **Ishibashi T, Patterson R, Ohnishi Y, Inomata H, Ryan SJ** : Formation of drusen in the human eye. *Am J Ophthalmol* 101 : 342—353, 1986.
  - 50) **Yamada T, Dumont JN, Moret R, Brun JP** : Autophagy in dedifferentiating newt iris epithelial cells *in vitro*. *Differentiation* 11 : 133—147, 1978.
  - 51) **Nakamura M, Okano H, Blendy JA, Montell C** : Musashi, a neural RNA-binding protein required for *Drosophila* adult external sensory organ development. *Neuron* 13 : 67—81, 1994.
  - 52) **Sakakibara S, Imai T, Hamaguchi K, Okabe M, Aruga J, Nakajima K, et al** : Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev Biol* 176 : 230—242, 1996.
  - 53) **Johe KK, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay RDG** : Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* 10 : 3129—3140, 1996.
  - 54) **Park CM, Hollenberg MJ** : Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration *in vivo*. *Dev Biol* 134 : 201—205, 1989.
  - 55) **Park CM, Hollenberg MJ** : Induction of retinal regeneration *in vivo* by growth factors. *Dev Biol* 148 : 322—333, 1991.
  - 56) **Patapoutian A, Wold BJ, Wagner RA** : Evidence for developmentally programmed transdifferentiation in mouse esophageal muscle. *Science* 270 : 1818—1821, 1995.
  - 57) **Weintraub H** : The MyoD family and myogenesis : Redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75 : 1241—1244, 1993.
  - 58) **Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N, Weintraub H** : Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD , a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268 : 836—844, 1995.