

ラット胎児胸腺の移植を受けたヌードマウスに発症した自己免疫性角膜炎の免疫病理学的検索

浅谷 哲也¹⁾, 村松 隆次¹⁾, 臼井 正彦¹⁾, 田口 修²⁾

¹⁾東京医科大学眼科学教室, ²⁾愛知県がんセンター研究所病理学第二部

要 約

目的: 異種胸腺を移植されたマウスには多臓器に自己免疫病が自然発症する。このマウスに発症する角膜炎が自己免疫病であるかの検討を行った。

方法: BALB/c ヌードマウスの腎被膜下に F 344 ラットの胎児胸腺を移植(ラット TG ヌードマウス)し観察を行った。摘出した角膜の組織学的, 免疫組織学的検索および角膜炎のトランスファー実験も行った。

結果: 組織像は単球や好中球の角膜実質表層への浸潤と著明な血管新生である。病変の発症に伴って, 血中には角膜上皮細胞や実質と特異的に反応する自己抗体の存在が間接蛍光抗体法により証明された。同時に, 角膜実質

や基底膜の周辺に免疫グロブリンや補体の沈着が観察された。この角膜炎は, 末梢の CD 4 陽性細胞の移入によって無処置ヌードマウスにトランスファーすることができた。

結論: 本研究から, ラット TG ヌードマウスに発症する角膜炎には自己免疫が関与し, 本モデルが自己免疫性角膜炎を自然発症する最初のモデルであることが証明された。(日眼会誌 105:143—148, 2001)

キーワード: 自己免疫性角膜炎, 抗角膜抗体, ヌードマウス, ラット, 異種胸腺移植

An Immunopathological Study of Autoimmune Keratitis in Nude Mice with Embryonic Rat Thymus Grafts

Tetsuya Asatani¹⁾, Ryuji Muramatsu¹⁾, Masahiko Usui¹⁾ and Osamu Taguchi²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Tokyo Medical University

²⁾Laboratory of Experimental Pathology, Aichi Cancer Center Research Institute

Abstract

Purpose: The purpose of the present study was to examine the keratitis detected in these mice after the xenogeneic thymus gland transplantation.

Methods: The thymus glands were collected from F 344 rat embryos and transplanted under the renal capsules of BALB/c nude mice (rat TG nude mice). Histological and immunohistological examinations and a transfer experiment of keratitis was also conducted.

Results: The histological image was characterized by the infiltration of mononuclear cells and neutrophils and the marked angiogenesis. The autoantibodies reacting specifically to corneal epithelial cells and corneal stroma were recognized in the blood. The deposits of immunoglobulins and

complements were simultaneously observed in the corneal stroma and around the basement membrane. Corneal lesions of rat TG nude mice were therefore successfully transferred into naive nude mice by host splenic CD 4 positive cells.

Conclusion: The present study demonstrated that autoimmunity was involved in the development of keratitis in rat TG nude mice and that these mice were the first animal models to develop autoimmune keratitis spontaneously. (J Jpn Ophthalmol Soc 105: 143—148, 2001)

Key words: Autoimmune keratitis, Anti-corneal antibody, Nude mice, Rat, Xenogeneic thymus transplantation

I 緒 言

ヒトにおける Mooren's ulcer で代表される角膜の潰瘍性病変は, 視力を損なう重篤な病変であり, 眼局在病変

として, あるいは全身性の自己免疫病に伴って発症する^{1)~5)}。このような眼病変の病態はほとんど明らかにされていないが, 多くの症例から自己免疫が関与していることが推測されている。それを裏付けるように角膜炎の

別刷請求先: 160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学眼科学教室 浅谷 哲也
(平成 12 年 2 月 7 日受付, 平成 12 年 8 月 15 日改訂受理)

Reprint requests to: Tetsuya Asatani, M.D. Department of Ophthalmology, Tokyo Medical University, 6-7-1 Nishi-shinjuku Shinjuku-ku Tokyo 160-0023, Japan

(Received February 7, 2000 and accepted in revised form August 15, 2000)

部位や隣接する結膜の組織学的検索から好中球, 形質細胞やリンパ球の浸潤が報告⁴⁾⁶⁾されている. このような患者の病変部には免疫グロブリン (IgG) や補体の沈着も観察されており, さらに, 患者の血中には角膜や結膜上皮と反応する抗体が確認されている^{1)~3)7)~12)}. また, 角膜の慢性病変をもつ患者においては, 可溶性の角膜抗原に対する細胞性免疫反応も報告³⁾¹³⁾されている.

このようなヒトの難治性角膜病変をさらに解析するためには, 類似した病態を有する動物モデルが存在すれば

大変有用である. ところで, マウスの胸腺を新生児期の生後2~4日で摘出する (NTx マウス) と多発性に臓器局在性の自己免疫病が自然発症する¹⁴⁾. 障害を受ける主な臓器は, 卵巣, 精巣, 前立腺, 胃, 甲状腺や唾液腺である. このモデルマウスは, ヒトの早発性閉経症, 男性不妊, 溶血性貧血を伴う胃炎, 橋本甲状腺炎やシェーグレン症候群の解析に成果をあげてきている. NTx マウスと同等かあるいはより激しい病変の発症が, 腎被膜下にラットの胎児胸腺の移植を受けることにより免疫能を獲得したヌードマウス (ラット TG ヌードマウス) に観察することができる¹⁵⁾¹⁶⁾. 興味あることは, このマウスには角膜にも炎症反応が観察される. 我々が知る限りにおいては, 自己免疫性の角膜炎を自然発症するモデル動物の報告はない. 本研究ではラット TG ヌードマウスに発症する角膜炎が自己免疫病であることを明らかにするとともに, ヒトの病変との類似性について検討したので報告する.

表1 TG ヌードマウスにおける角膜炎の発症

胎児胸腺	月齢	匹数	角膜炎発症マウス (%)
-	8	10	0(0)
F344 ラット	3	12	7(58.3)
	5	15	14(93.3)
	8	15	15(100)
NZB マウス	8	10	0(0)
BALB/c マウス	8	10	0(0)

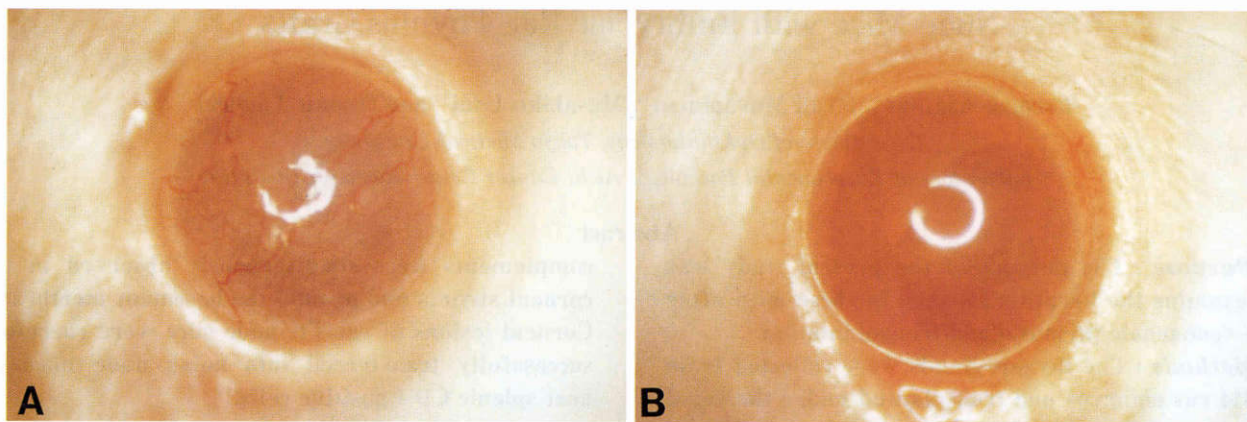


図1 実体顕微鏡で観察した7か月齢マウスの角膜.

- A: ラット TG ヌードマウスに発症した角膜炎. 角膜表層の不整と血管新生が著明に観察される.
B: マウス (NZB) TG ヌードマウスの角膜では病変は観察されない.

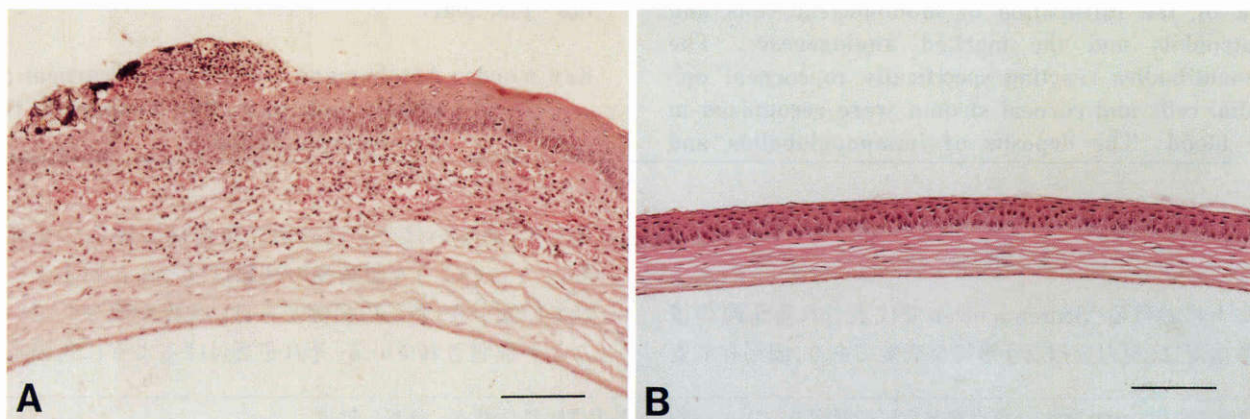


図2 7か月齢マウスの角膜組織像〔ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色〕.

- A: ラット TG ヌードマウスの角膜で上皮の肥厚や角質化, 実質のリンパ球浸潤が観察される.
B: マウス (NZB) TG ヌードマウスの角膜の組織像であるが正常の所見を呈している.
バーは 60 μ m

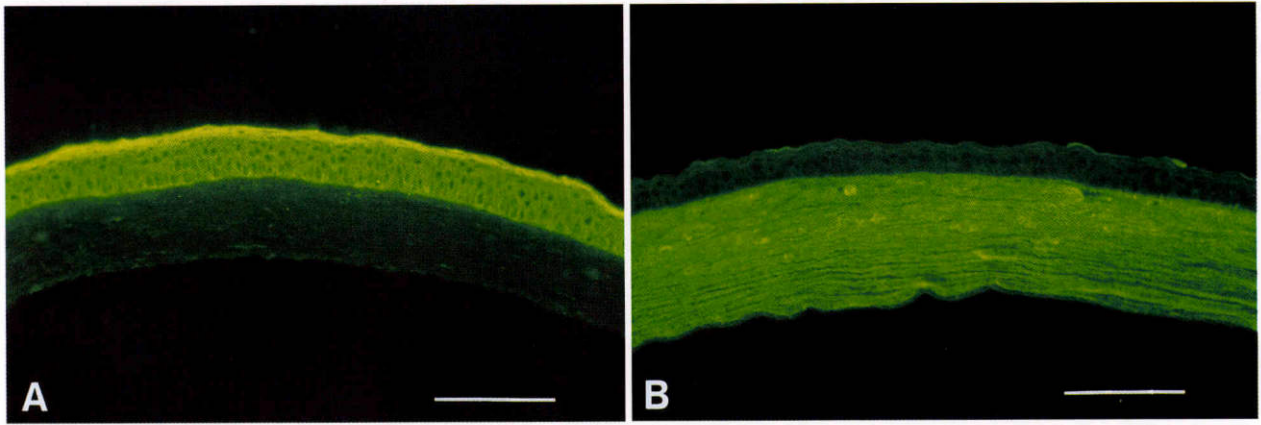


図3 正常マウス角膜を標的とし、ラット TG ノードマウスの血清を用いて施行した間接蛍光抗体法。上皮細胞(A)と実質中(B)に特異染色が観察される。血清の希釈はそれぞれ 640 倍である。バーは 60 μm

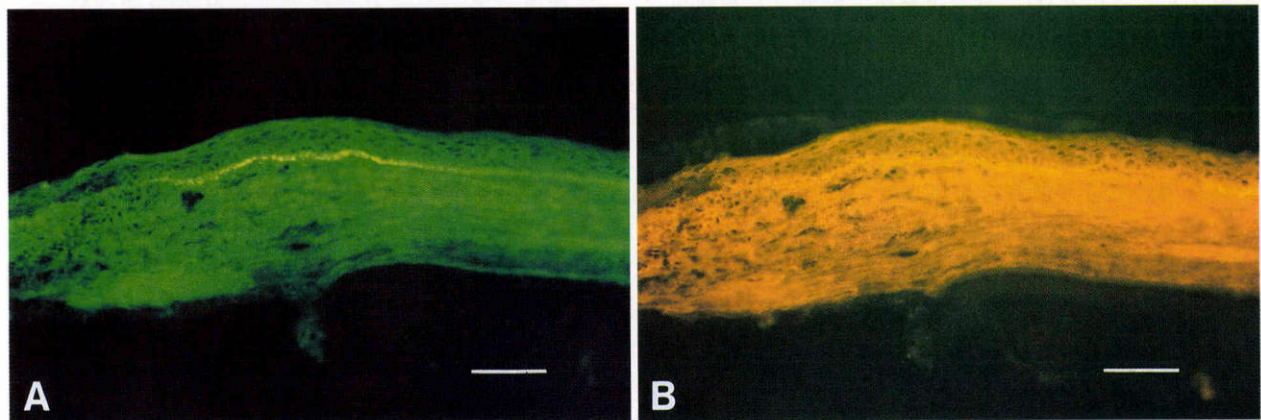


図4 ラット TG ノードマウスの角膜炎発症部位における免疫グロブリン(A)と補体(B)の沈着。同一切片を fluorescein isothiocyanate (FITC) (A)とローダミン(B)で二重染色した。バーは 60 μm

II 実験方法

1. モデル動物の作製

4 週齢雌の BALB/c ノードマウス(Charles River Japan)の腎被膜下に胎児胸腺 2 葉を移植した(TG ノードマウス)。胎児胸腺は胎齢 15 日の F 344 ラットと胎齢 14 日の NZB マウス(静動協)および BALB/c マウスから採取した。手術はすべてジエチルエーテル麻酔下で行った。動物は愛知県がんセンターの specific pathogen free (SPF) 動物室で飼育し、生後 3, 5 か月あるいは 7 か月齢で屠殺した。飼育と屠殺は当センターにおける動物実験の内規に従って行った。

2. 実体顕微鏡での観察と組織学的な検索

ジエチルエーテル麻酔下で実体顕微鏡を用いて角膜上皮の状態、実質の濁りや新生血管の有無を観察した。屠殺時には心臓から直接採血を行い、血清を分離し、蛍光抗体間接法や enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) のために凍結保存した。眼球などの組織はブアン液で

固定し、パラフィン包埋後、切片にしてヘマトキシリン・エオジン(HE)で染色した。一部の組織は凍結し、免疫組織化学染色用に保存した。

3. 免疫組織化学

角膜を凍結切片とした後にアセトン固定し、リン酸緩衝液(PBS)で洗浄後、ローダミンを標識した抗マウス IgG 抗体(Cappel, Durham, NC)と fluorescein isothiocyanate (FITC) を標識した抗マウス C 3 抗体(Cappel)で二重染色して、蛍光顕微鏡で IgG と補体の沈着の有無を観察した。

4. 間接蛍光抗体法

正常 BALB/c マウスの角膜を凍結切片とし、アセトン固定後に PBS で洗浄し、PBS で 40 倍希釈したマウスの血清と反応させ、PBS で再洗浄した後に FITC 標識抗マウス IgG 抗体(Cappel)と反応させた。この特異反応を蛍光顕微鏡で観察した。

5. 抗体の吸収試験

角膜と反応する抗体の特異性を観察するために血清の

吸収試験を行った。正常マウスの角膜、肝臓あるいは皮膚のホモジェネートをアセトンで固定後、PBS でよく洗浄した。PBS で 40 倍希釈した血清と等量のホモジェネートをよく攪拌し、37°C で 30 分間インキュベートした。遠心分離した上清を用いて間接蛍光抗体法を行い、抗体の特異性を検討した。

6. 角膜可溶性蛋白質の作製

正常 BALB/c マウスの眼球から角膜を採取し、10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) および 0.25 M 蔗糖添加緩衝液を加えてホモジェネート後、700 xG で 10 分間遠心し、上清を採集した。これを 7,000 xG で 10 分間遠心してその上清を回収し、さらに、これを 100,000 xG で 60 分間遠心して、得られた上清を角膜可溶性蛋白質とした。

7. ELISA

角膜可溶性蛋白質を 20 µg/ml に希釈して 96 穴の ELISA 用プレートに入れ、一昼夜冷蔵庫で静置させ角膜抗原をプレートにコートした。マウスの血清を 2 倍希釈により 200~3,200 倍まで希釈し、一次抗体としてプレートに添加した。そして、二次抗体にはペルオキシダーゼ標識の抗マウス IgG 抗体 (Cappel) を用いた。O-フェニレンジアミンを用いてその酵素を発色させ、吸光度 492 nm で測定した。

8. 抗角膜抗体の投与

角膜に対して反応する自己抗体をもつラット TG スードマウスの血清 (ELISA で 1,600 倍以上の抗体価を有する血清をプール) 100 µl を無処置 BALB/c スードマウスの腹腔に週 2 回、4 週間投与した。最終投与から 3 日後に屠殺して角膜の組織学的な検討を加えた。

9. 脾細胞の移入

TG スードマウスの脾細胞 (2×10^7) を 4 週齢の無処置雌スードマウスの腹腔に移入し、2 か月後に屠殺して組織学的な検討を加えた。注射する脾細胞は無処置群と、抗 CD4 あるいは抗 CD8 モノクローナル抗体とウサギ補体により、CD4 あるいは CD8 陽性細胞を削除した群を用いた。

III 結 果

1. 実体顕微鏡による角膜の観察

TG スードマウスの角膜は、異種である F344 ラット胎児胸腺移植後 2 か月で上皮に不整がみられ、血管の新生と角膜実質の混濁が観察された (表 1)。これらの病変は胸腺移植後 4 か月でさらに著しくなった (図 1 A, 表 1)。この病変は両側性に必発し、慢性の経過をとった。対照として用いた異系 NZB マウスや同系 BALB/c の胎児胸腺の移植を受けたマウス TG スードマウスには、このような症状はなかった (図 1 B, 表 1)。

2. 角膜の組織学的観察

ラット TG スードマウスの角膜には上皮の肥厚や角質化があり、同時に実質にリンパ球や好中球の浸潤が観察

された (図 2 A, B)。また、上皮直下の実質には炎症所見と血管新生が高頻度に観察された (図 2 A, 表 1)。同系や異系の胎児胸腺の移植を受けたマウス TG スードマウスの角膜には形態学的な異常はなかった (図 2 B, 表 1)。

3. 間接蛍光抗体法と ELISA

正常マウスの角膜を標的として、TG スードマウスの血清を用いて間接蛍光抗体法を行った。角膜に炎症があるラット TG スードマウスのすべての血清が角膜上皮あるいは実質と反応した (図 3 A, B)。多くの血清では両者と反応する抗体を有していた。それぞれの標的 (上皮と実質) と反応する抗体の強さは各血清により異なり、およそ 7 割 (25/36) は上皮、3 割 (11/36) は実質と強く反応した。抗体価の測定を ELISA で行った。その結果、病変発症マウスの血清は全例とも 200 倍希釈で陽性であった。さらに 400, 800, 1,600, 3,200 倍の希釈によっても陽性であった血清の頻度は、それぞれ 94, 75, 50, 25% あった。

これらの抗体の特異性を検討するために、いくつかの臓器を用いて抗体の吸収試験を行った。肝臓あるいは皮膚のホモジェネートと血清とのインキュベーションによって抗体価に影響を与えることはなかったが、角膜のそれとのインキュベーションでは抗体価は完全に消失した。角膜に炎症反応がないラット TG スードマウスでは、角膜と反応する抗体は産生されていなかった。また、マウス TG スードマウスにおいては同様の抗体産生はなかった。

4. 免疫組織化学

角膜炎を発症したマウスの角膜を凍結切片として、病変部に IgG や補体の沈着があるか否かを検討した。その結果、角膜実質全体に、中でも特に上皮直下の実質に強い IgG と補体の沈着が観察された (図 4 A, B)。ラット TG スードマウスの角膜でも、発病していない例では免疫沈着物は観察されなかった。また、マウス TG スードマウスの角膜にも免疫沈着物は観察されなかった。

5. 角膜炎のトランスファー

病変が自己免疫性であることを明らかにするために、角膜炎が発症しているラット TG スードマウスの血清あるいは脾細胞を無処置スードマウスの腹腔に注入した。表 2 に示したように、抗角膜抗体を含む血清を注射されたレシピエントマウスの角膜には組織学的に異常はなかった。一方、脾細胞を注入されたレシピエントマウスにはドナーと同様の角膜病変が観察された。そして脾細胞中の CD4 陽性細胞を削除しておく、病変はトランスファーされないことから (表 2)、CD4 陽性細胞がエフェクターであることが明らかとなった。

IV 考 按

今回の研究において、ラット TG スードマウスに発症する角膜炎には自己免疫が関与し、そして、本モデルマウスが自己免疫性角膜炎を自然発症する最初のモデルであることが証明された。この病変は両側性に必発すると

表 2 無処置ヌードマウスへの角膜病変のトランスファー

投与群	匹数	角膜炎発症マウス (%)
抗角膜血清	5	0(0)
無処置脾細胞	5	4(80)
CD4 細胞削除脾細胞	5	0(0)
CD8 細胞削除脾細胞	5	4(80)

血清と脾細胞は角膜炎を発症しているラット TG ヌードマウスから採取した。

もに慢性の経過をたどり、組織学的には血管新生と角膜実質におけるリンパ球や好中球の浸潤が顕著である。一方、同時に確認された涙腺炎の結果、角膜上皮の角質化の進行が観察された。また、血清学的にも病変を発症したラット TG ヌードマウスの血清には、角膜の上皮細胞や実質と特異的に反応する高力価の自己抗体が存在する。さらに、免疫組織化学的検索により角膜炎の実質、特に基底膜の周囲には IgG や補体の沈着が観察され III 型アレルギーの様相を呈している。このような所見は、ヒトにおける Mooren's ulcer などの角膜炎の報告¹⁾⁴⁾⁶⁾⁷⁾⁹⁾¹¹⁾¹²⁾と類似性が高い。Mooren's ulcer 発症の患者には胃や甲状腺などと反応する自己抗体も検出されている²⁾⁵⁾。ラット TG ヌードマウスにも同様の自己抗体が検出され、甲状腺炎、胃炎や副腎炎などの自己免疫病が発症する¹⁵⁾¹⁶⁾。さらに、角膜炎のトランスファー実験で、抗角膜抗体を含む血清を注射されたレシピエントマウスの角膜には組織学的に異常はなく、脾細胞を注入されたレシピエントマウスにドナーと同様の角膜病変が観察され、また脾細胞中の CD4 陽性細胞を削除すると病変はトランスファーされないことから、エフェクター細胞が CD4 陽性リンパ球であることが明らかとなった。このことは角膜と特異的に反応する自己抗体の検出と併せて、このモデルの角膜炎が自己免疫で発症していることを強く推定する結果である。これらはラット TG ヌードマウスが自己免疫の関与したヒト角膜炎の発症機序解析に有用なモデルであることを示すものである。

胸腺の最も重要な機能は自己と非自己を正確に認識する T 細胞の教育である。この過程を正確に遂行するためには、胸腺上皮細胞を基盤とし、樹状細胞やマクロファージなどで構成される胸腺微小環境と前駆 T 細胞との相互作用が不可欠である。ヌードマウスに移植された後に発育したラット胸腺では、ドナー由来の細胞は胸腺上皮細胞のみで、他の細胞、例えば T 細胞、樹状細胞やマクロファージはホストの骨髄由来であることが報告¹⁵⁾されている。したがって、ラット TG ヌードマウスではホスト由来の T 細胞が免疫能を獲得し、SPF でない通常の飼育環境でも長期間生存できるが、しかしながら、多臓器に臓器局在性の自己免疫病が発症することが判明している¹⁵⁾。ラット TG ヌードマウスは細菌感染にも抵抗でき、外来抗原(羊赤血球や異系のリンパ球)にも十分反応すること

から、かなりの免疫能を獲得していることが推測される。このことは、異種の胸腺上皮を基盤として形成される胸腺微小環境でも、生存に必要なホスト T 細胞の免疫能は十分獲得されることを示している。さらに、最近、胎児胸腺をウサギ、ブタやウシから採取し、これらを用いて TG ヌードマウスを作製してもホスト T 細胞の免疫能が獲得されることが明らかになった¹⁷⁾。そして、ラットのみならず、他の動物の胎児胸腺を移植して作製された TG ヌードマウスにおいても臓器特異性自己免疫病が多発するのである。ところが、ラット TG ヌードマウスに発症する自己免疫病は発病前に同系正常マウスの脾細胞を注入しておくことで予防することができる¹⁸⁾。このことは、正常マウスの末梢には自己反応性の T 細胞を抑制する働きのあるサブプレッサー T 細胞が存在していることを推定しているとともに、ラット TG ヌードマウスではこの免疫系の制御に関連した T 細胞が欠如していることが考えられる。胸腺におけるサブプレッサー T 細胞の教育のためには、胸腺上皮細胞から T 細胞へ何らかの情報が送られていると考えられる。この情報は異系 NZB マウスの胸腺上皮細胞とホストの T 細胞との間では良好に伝わるので、NZB マウス TG ヌードマウスでは自己免疫病が発症しないと考えられる。ところが、F 344 ラットの胸腺上皮細胞では異種であるために、この情報がホストの T 細胞にうまく伝わらず、あるいはマウス T 細胞に必要な情報が欠如しているためにラット TG ヌードマウスではサブプレッサー T 細胞が教育されず、自己免疫病が発症するものと考えられる。

ラット TG ヌードマウスはヒト Mooren's ulcer などの発病原因が不明な角膜炎の研究に役立つモデルとして有益な情報を与えてくれると考えられる。今後、このモデルを用いて、角膜の上皮や実質における抗原の同定、発病機序の解析、さらに角膜炎の予防や治療法の開発に取り組む次第である。

文 献

- 1) Schaap OL, Feltkamp TEW, Breebaart AC: Circulating antibodies to corneal tissue in a patient suffering from Mooren's ulcer (ulcus rodens corneae). Clin Exp Immunol 5: 365—370, 1969.
- 2) Brown SI, Mondino BJ, Rabin BS: Autoimmune phenomenon in Mooren's ulcer. Am J Ophthalmol 82: 835—840, 1976.
- 3) Mondino BJ, Brown SI, Rabin BS: Cellular immunity in Mooren's ulcer. Am J Ophthalmol 85: 788—791, 1978.
- 4) Brown SI: Mooren's ulcer. Histopathology and proteolytic enzymes of adjacent conjunctiva. Br J Ophthalmol 59: 675—682, 1975.
- 5) Mondino BJ, Brown SI, Rabin BS: Autoimmune phenomena of the external eye. Ophthalmology 85: 801—817, 1978.

- 6) **Foster CS, Kenyon KR, Greiner J, Greineder DK, Friedland B, Allansmith MR** : The immunopathology of Mooren's ulcer. *Am J Ophthalmol* 88 : 149—159, 1979.
- 7) **van der Gaag R, Abdillahi H, Stilma JS, Vetter JC** : Circulating antibodies against corneal epithelium and hookworm in patients with Mooren's ulcer from Sierra Leone. *Br J Ophthalmol* 67 : 623—628, 1983.
- 8) **Kruit PJ, van der Gaag R, Broersma L, Kijlstra A** : Autoimmunity against corneal antigens. I. Isolation of a soluble 54 Kd corneal epithelium antigen. *Curr Eye Res* 5 : 313—320, 1986.
- 9) **Kruit PJ, Broersma L, van der Gaag R, Kijlstra A** : Clinical and experimental studies concerning circulating antibodies to corneal epithelium antigens. *Doc Ophthalmol* 64 : 43—51, 1986.
- 10) **John SL, Morgan K, Tullo AB, Holt PJJ** : Corneal autoimmunity in patients with peripheral ulcerative keratitis (PUK) in association with rheumatoid arthritis and Wegener's granulomatosis. *Eye* 6 : 630—636, 1992.
- 11) **Soylu M, Ersoz R, Erken E** : Circulating corneal epithelium antibodies and immune complexes in immunologic eye disorders. *Ann Ophthalmol* 25 : 231—237, 1993.
- 12) **Gottsch JD, Liu SH, Minkovitz JB, Goodman DF, Srinivasan M, Stark WJ** : Autoimmunity to a cornea-associated stromal antigen in patients with Mooren's ulcer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 1541—1547, 1995.
- 13) **Shore B, Leopold IH, Henley WL** : Cellular immunity in chronic ophthalmic disorders. 2. Leukocyte migration inhibition in diseases of the cornea. *Am J Ophthalmol* 73 : 62—67, 1972.
- 14) **Taguchi O, Takahashi T, Nishizuka Y** : Self-tolerance and localized autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2 : 576—581, 1990.
- 15) **Taguchi O, Takahashi T, Seto M, Namikawa R, Matsuyama M, Nishizuka Y** : Development of multiple organ-localized autoimmune diseases in nude mice after reconstitution of T cell function by rat fetal thymus graft. *J Exp Med* 164 : 60—71, 1986.
- 16) **Ichikawa T, Taguchi O, Takahashi T, Ikeda H, Takeuchi M, Tanaka T, et al** : Spontaneous development of autoimmune uveoretinitis in nude mice following reconstitution with embryonic rat thymus. *Clin Exp Immunol* 85 : 112—117, 1991.
- 17) **Maki K, Takahashi T, Ohno K, Morimoto T, Ikeda H, Takeuchi M, et al** : Autoimmune diseases developed in athymic nude mice grafted with embryonic thymus of xenogeneic origin. *Eur J Immunol*, in press
- 18) **Taguchi O, Takahashi T** : Mouse models of autoimmune disease suggest that self-tolerance is maintained by unresponsive autoreactive T cells. *Immunology* 89 : 13—19, 1996.