

第 110 回 日本眼科学会総会 特別講演 I

実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) の
トランスレーショナルリサーチ

白井 正彦

東京医科大学眼科学教室

要 約

ヒトぶどう膜炎の実験モデルである S 抗原や光受容体間レチノイド結合蛋白質 (IRBP) で免疫した実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) の諸病態, すなわち ① 眼所見と病理組織学的所見, ② 抗網膜抗原抗体の存在, ③ 網膜抗原に対する白血球遊走阻止, ④ 共通の網膜抗原, ⑤ 好中球の異常, ⑥ ヘルパー T タイプ 1 (Th 1) 細胞優位な免疫反応, がぶどう膜炎を有する Behçet 病のそれらときわめて類似していることを検証した。この EAU のモデルは, Behçet 病を標的としたトランスレーショナルリサーチを行うのに適切であり, 三つの新たな治療戦略を考えた。すなわち, 1) 免疫抑制薬の眼局所投与, 2) Th 1 細胞の抑制, 3) 制御性免疫細胞の活性化・促進, である。これらの戦略に基づいて, 将来 Behçet 病のぶどう膜炎治療に実用化される可能性がある EAU の抑制実験を行った。その戦略の一番目は EAU の硝子体へ FK 506 の注入実験であり, EAU の

炎症を著しく抑制した。二番目として EAU の発症に関する Th 1 細胞の抑制であり, その一つである抗 IL-12 抗体の投与はサイトカイン療法として効果があり, もう一つの補助シグナル分子の阻害では, CD28 分子や inducible co-stimulator (ICOS) 分子の阻害によって EAU が著明に抑制された。三番目の実験は, EAU を抑制する制御性 T 細胞の活性化と移入実験であり, CD25⁺制御性 T 細胞の移入や神経ペプチド刺激抗原提示細胞の移入が EAU の発症を抑制することを検証した。

その結果, 将来, 実用化可能ないくつかのぶどう膜炎治療法が想定された。(日眼会誌 111: 137-159, 2007)

キーワード: 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎, トランスレーショナルリサーチ, Behçet 病, 自己免疫病, ぶどう膜炎, Th 1/Th 2 細胞

A Review

Translational Research with Experimental Autoimmune Uveoretinitis (EAU)

Masahiko Usui

Department of Ophthalmology, Tokyo Medical University

Abstract

Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) induced by immunization with retinal antigen (S-antigen or interphotoreceptor retinoid-binding protein; IRBP) serves as an animal model of human uveoretinitis. As the first stage, we demonstrated the similarities between EAU and ocular inflammation in Behçet's disease by investigating anti-retinal antibodies, leukocyte migration inhibition by retinal antigen, immunogenic antigens, aberrant functions of neutrophils, and dominant Th1 lymphocyte reaction. From these findings, we verified that EAU,

which is not associated with the systemic disorders observed in Behçet's disease, is an appropriate model for translational research targeting ocular inflammation. In the second stage, we set 3 therapeutic strategies for uveitis in Behçet's disease to be conducted in the translational research: 1) intraocular administration of an immunosuppressive drug; 2) inhibition of Th1 lymphocytes; and 3) activation of immunoregulatory cells. In strategy 1, our studies indicated that intravitreal injection of 10 µg of tacrolimus (FK 506) was not harmful to the ret-

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 白井 正彦
(平成 18 年 5 月 24 日受付, 平成 18 年 8 月 1 日改訂受理)

Reprint requests to: Masahiko Usui, M. D., Ph. D. Department of Ophthalmology, Tokyo Medical University,
6-7-1 Nishishinjuku Shinjuku-Ku Tokyo 160-0023, Japan

(Received May 24, 2006 and accepted in revised form August 1, 2006)

ina and was predominantly effective in suppressing ongoing EAU in rats. In strategy 2, two approaches were adopted to prevent differentiation of Th1 cells. One is anti-cytokine antibody therapy using anti-IL-12 monoclonal antibodies (mAb). The other is blockade of co-stimulatory signals, especially the ICOS-B7RP-1 pathway. Administration of anti-IL-12 mAb at the time of IRBP immunization completely inhibited development of EAU, and antagonistic anti B7RP-1 mAb suppressed the severity of EAU even when administered after development of EAU. In strategy 3, adoptive transfer of antigen presenting cells treated with a neuropeptide (vasoactive

intestinal peptide or calcitonin gene-related peptide) or CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppressed EAU.

We look forward to the day when therapies that are being developed in our translational research using EAU will become available for treating intraocular inflammation in Behçet's disease.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 111 : 137-159, 2007)

Key words : Experimental autoimmune uveoretinitis, Translational research, Behçet's disease, Autoimmune disease, Uveitis, Th 1/Th 2 cells

I はじめに

1910年にElschnigが、交感性眼炎は穿孔性眼外傷に伴って遊離された抗原物質の自己免疫によって発症すると提唱して以来¹⁾、ぶどう膜炎の発症における免疫反応の関与が研究されてきた。通常、疾患の発症機序や治療法を研究するには、モデル動物の確立が不可欠であり、ぶどう膜炎においても古くから実験的ぶどう膜炎の作製が試みられてきた。それらの中で免疫応答の結果として臓器特異的にぶどう膜炎を発症させることに初めて成功したのは、1949年のCollinsの報告²⁾であり、ぶどう膜抗原の接種によって実験的ぶどう膜炎が発症した。このような経緯から当初、ぶどう膜抗原を誘発抗原とした研究が行われたのは当然の成り行きであったが、その発症頻度に問題があった。

1965年にWackerら³⁾が網膜抗原に強いぶどう膜網膜炎惹起能があることを報告し、それまでのぶどう膜抗原による実験モデルの発症は、混入した網膜抗原による反応であることが示された。その後、網膜抗原であるS抗原や光受容体間レチノイド結合蛋白質(interphotoreceptor retinoid binding protein; IRBP)が精製され、これらを免疫強化剤である完全フロイドアジュバンド(complete Freund's adjuvant; CFA)とともに感受性の高い動物に免疫すると高頻度にぶどう膜炎が発症することが判明した。発症したこのぶどう膜炎は、実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(experimental autoimmune uveoretinitis; EAU)と名付けられ⁴⁾、ヒトぶどう膜炎の動物モデルとして用いられるようになった。

そこで、このEAUを用いた基礎的研究を中継して臨床に置き換え、臨床で診断や治療方法などの実用化に結びつけるトランスレーショナルリサーチを行い、難治性ぶどう膜炎の診療に寄与する研究を行ったので報告する。

表1 ヒトとマウスの主な免疫学的相違点

	マウス	ヒト
造血幹細胞のマーカー	<i>c-kit^{high}, flt-3⁻</i>	<i>c-kit^{low}, flt-3⁺</i>
末梢血中の好中球	10~25%	50~70%
末梢血中のリンパ球	75~90%	30~50%
皮膚・粘膜に多く局在するT細胞	γ/δ T細胞	α/β T細胞
T細胞上のMHCクラスII分子の発現	ない	ある

表2 実験的自己免疫性ぶどう膜炎(EAU)を惹起する2種類の網膜抗原

抗原名	S抗原	IRBP
分子量	48 kDa	140~145 kDa
局在	視細胞外節 松果体	視細胞間基質 松果体
出現機能	生後3日 光刺激の変換	胎生17日目 レチノイド輸送の担体

IRBP: 光受容体間レチノイド結合蛋白質

II EAU 誘発自己抗原と発症メカニズム

1. 実験動物

S抗原やIRBPのような網膜特異抗原の接種により惹起されるEAUは、Behçet病のぶどう膜炎をはじめとするヒト難治性ぶどう膜炎の動物モデルとして広く用いられてきた。トランスレーショナルリサーチでは実験動物モデルの作製が不可欠であり、マウスやラットのEAUは適切なヒトの疾患モデル動物として試用できる。

ところで、マウスの形態、寿命の他、生態は明らかにヒトとは異なり、免疫学的にもいくつかの違いが報告されている⁵⁾。その主なものを表1に示す^{6)~10)}。しかし、ヒトとマウスでは生物学的に多くの共通性もみられ、ヒトに続き、2002年にマウスのほぼ全遺伝子が解明され、ヒトとの相同性は99%以上、異なる遺伝子はせいぜい300程度であることが明らかになった¹¹⁾¹²⁾。したがっ

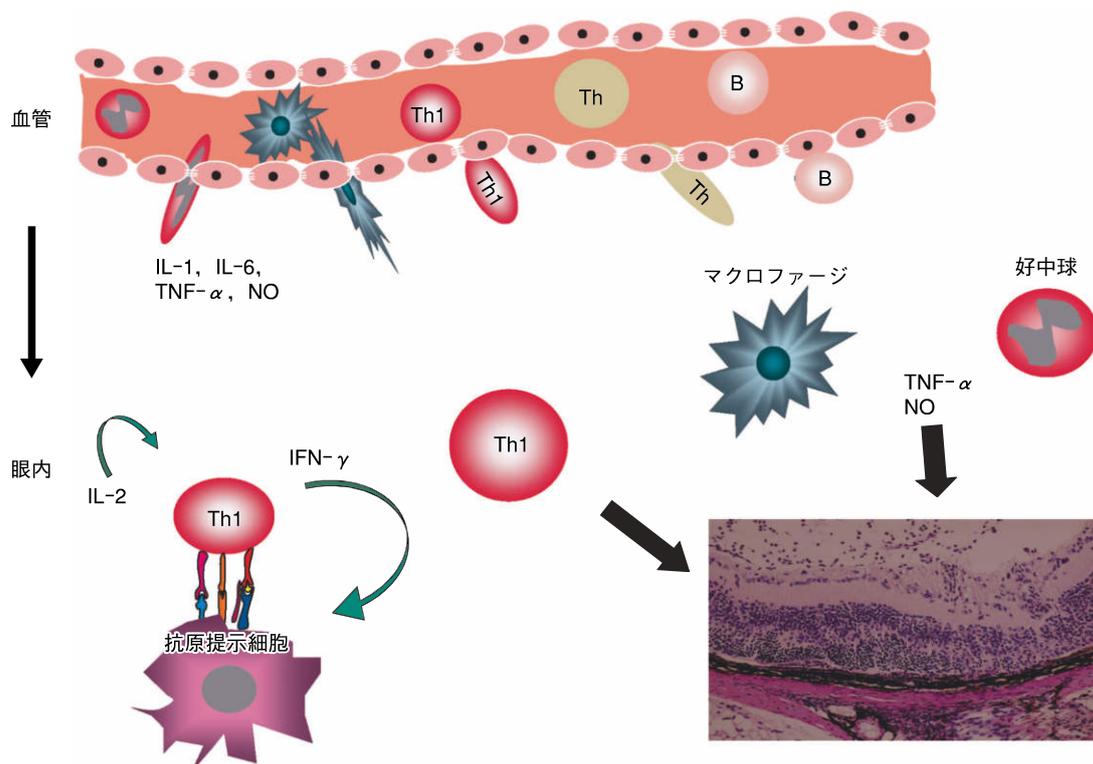


図 1 EAU の発症メカニズム (模式図)。

Th : ヘルパー T 細胞, B : B 細胞, IL : Interleukin, IFN : Interferon, TNF : Tumor Necrosis Factor, NO : nitric oxide

て、EAU と全く同一のヒトぶどう膜炎は存在しないが、マウスやラットの EAU は類似する病態を有しているので、ヒトぶどう膜炎に適した動物モデルと考えられる。

2. 網膜抗原と特性

網膜抽出液をゲル濾過すると、ぶどう膜炎惹起能を有する 2 つの可溶性分画が得られ、そのうちの 1 つの分画からは S 抗原が¹³⁾、そしてもう一つの分画からは IRBP が分離・精製された¹⁴⁾。このように精製された S 抗原と IRBP の間には、免疫学的な交叉反応はない。また、田中らが報告した A 抗原の実験は IRBP と同一のものであった^{15)~17)}。

表 2 に示すように、S 抗原は視細胞外節の形質膜と松果体に局在する分子量 48 kDa の蛋白質で、光エネルギーの情報交換に関与するとされている。一方、IRBP は視細胞内節で生成され、視細胞、網膜色素上皮および外境界膜に囲まれた光受容体間基質 (interphotoreceptor matrix ; IPM) に存在し、網膜色素上皮と視細胞外節との間でレチノイドの輸送における担体として働く機能をもつ。その分子量は 140~145 kDa で糖蛋白質であることが知られている¹⁸⁾。S 抗原と同様に松果体にも IRBP は存在している。発生学的にも S 抗原と IRBP の発現時期が異なり、IRBP は出生前から出現するのに対し、S 抗原は生後 3 日目より初めて現れる¹⁹⁾。

3. EAU の発症とその機序

これらの網膜抗原をマウス、ラット、モルモット、家兎、サルに CFA とともに免疫すると、抗原接種後およそ 10~14 日経過して、虹彩毛様体炎、網膜脈絡膜炎、網膜血管炎が発症する。この機序は CFA による抗原非特異的免疫反応と網膜抗原による抗原特異的免疫反応が惹起されることに始まる。抗原非特異的免疫反応はマクロファージ、好中球などの免疫担当細胞に担われ、これらの細胞は Interleukin (IL)-1, IL-6, Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) などのサイトカインと呼ばれる液性因子を産生し、血管の透過性亢進、炎症反応、他の免疫担当細胞の活性化を促すと考えられている^{20)~22)}。

一方、抗原特異的免疫反応は、マクロファージ、好中球の産生するサイトカインで活性化した樹状細胞などの抗原提示細胞、および T 細胞により担われる。活性化した抗原提示細胞が網膜抗原を取り込み、輸入リンパ管を介して免疫部位の所属リンパ節、または脾臓に達する²³⁾。取り込まれた抗原は、蛋白分解酵素でペプチドに分解され、主要組織適合抗原クラス II (MHC クラス II) 分子とともに、細胞表面に提示される。細胞表面に提示された網膜抗原ペプチド-MHC クラス II 分子複合体は、その複合体と特異的に結合することができる T 細胞受容体 (T cell receptor ; TCR) を有する CD 4 陽性ヘルパー T 細胞 (helper T ; Th 細胞) により認識される²⁴⁾²⁵⁾。網膜抗原ペプチド-MHC クラス II 分子複合体を

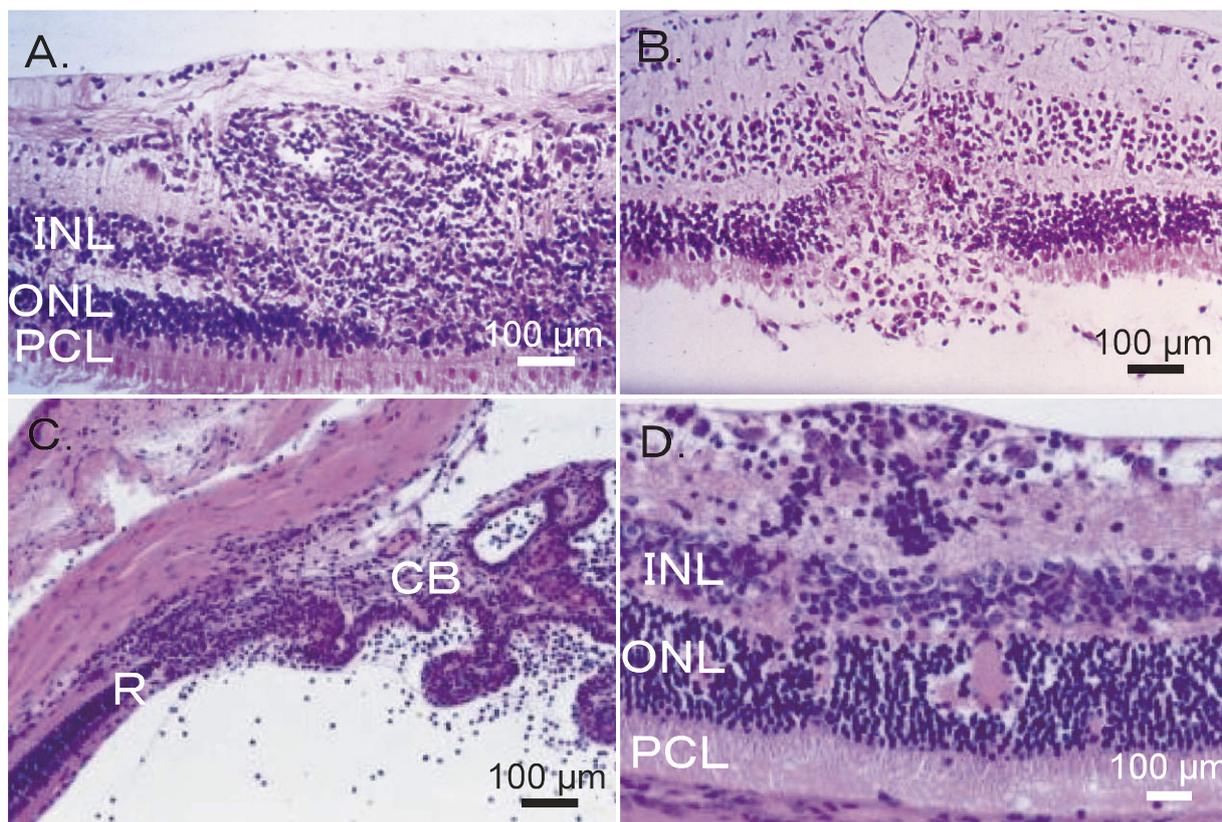


図 2 サル, ラットにみられる EAU の病理組織像。

A, B: サルにおける EAU のヘマトキシリン・エオジン染色所見。網膜血管炎および網膜全層への炎症性細胞浸潤(A), 炎症による視細胞層の破壊像(B)がみられる。C, D: ラットにおける EAU のヘマトキシリン・エオジン染色所見。前房, 毛様体, 前部硝子体中への炎症性細胞浸潤(C), 網膜血管炎(D)がみられる。

INL: 内顆粒層, ONL: 外顆粒層, PCL: 視細胞層, CB: 毛様体, R: 網膜

認識した Th 細胞は活性化し, 分化・増殖する²⁶⁾。リンパ節, または脾臓にて分化, 増殖した網膜抗原ペプチド特異的 Th 細胞は, 輸出リンパ管, 血管を介して眼内に浸潤し, 眼内に局在するマイクログリアなどの抗原提示細胞が提示する網膜抗原ペプチド-MHC クラス II 分子を認識することにより再活性化し, Interferon (IFN)- γ などのサイトカインを産生する²⁰⁾²⁷⁾²⁸⁾。眼内に浸潤した好中球, マクロファージも IL-1, TNF- α などを産生し²⁰⁾, これらのサイトカインにより眼内で炎症が惹起され, また, マクロファージから産生される nitric oxide (NO) などにより眼内組織の障害が引き起こされる²⁹⁾ (図 1)。

III EAU と Behçet 病のぶどう膜炎との類似点

実験動物モデルの EAU と全く同じ病態を呈するヒトぶどう膜炎は存在しない。また, EAU では全身症状は起きないが, 眼炎症は Behçet 病のぶどう膜炎に類似する点がある。

1. 眼症状と病理学的所見

EAU の病態をラットやサルで観察した報告をみる

と³⁰⁾³¹⁾, 網膜血管炎を伴うぶどう膜網膜炎が惹起されており, 病理学的にはぶどう膜や網膜, 特に網膜血管, 視細胞層に炎症反応が強く生じ, 最終的には視細胞が破壊され, 網膜の荒廃が認められる (図 2)。一方, ヒトのぶどう膜炎の中で網膜血管炎を主体とする代表的な疾患は Behçet 病であり (図 3), 病理学的所見も EAU と極めて似ている。また, EAU でも Behçet 病でも前房中の浸潤細胞は好中球が多く³²⁾, 特に, 再発性前房蓄膿性虹彩炎は後者における特徴の一つである。したがって, 口腔内アフタ, 結節性紅斑様皮疹, 陰部潰瘍などの全身症状を伴わない点は異なるが, EAU と Behçet 病のぶどう膜炎には類似した眼所見が認められた。

2. 抗網膜抗原抗体の存在

EAU では抗原接種後 10 日前後から眼炎症が発症し, 14 日ないし 16 日でピークとなり以後漸次消退する (図 4)。抗網膜抗原抗体は 14 日ないし 21 日ごろから上昇はじめる, 4 週ごろピークとなりその後炎症の推移とともに減少する³³⁾。

一方, ヒトのぶどう膜炎患者の血清中に, EAU の抗原が局在する視細胞外節に対する自己抗体があるか否かについて坂井らが検討した論文がある (表 3)。それによ

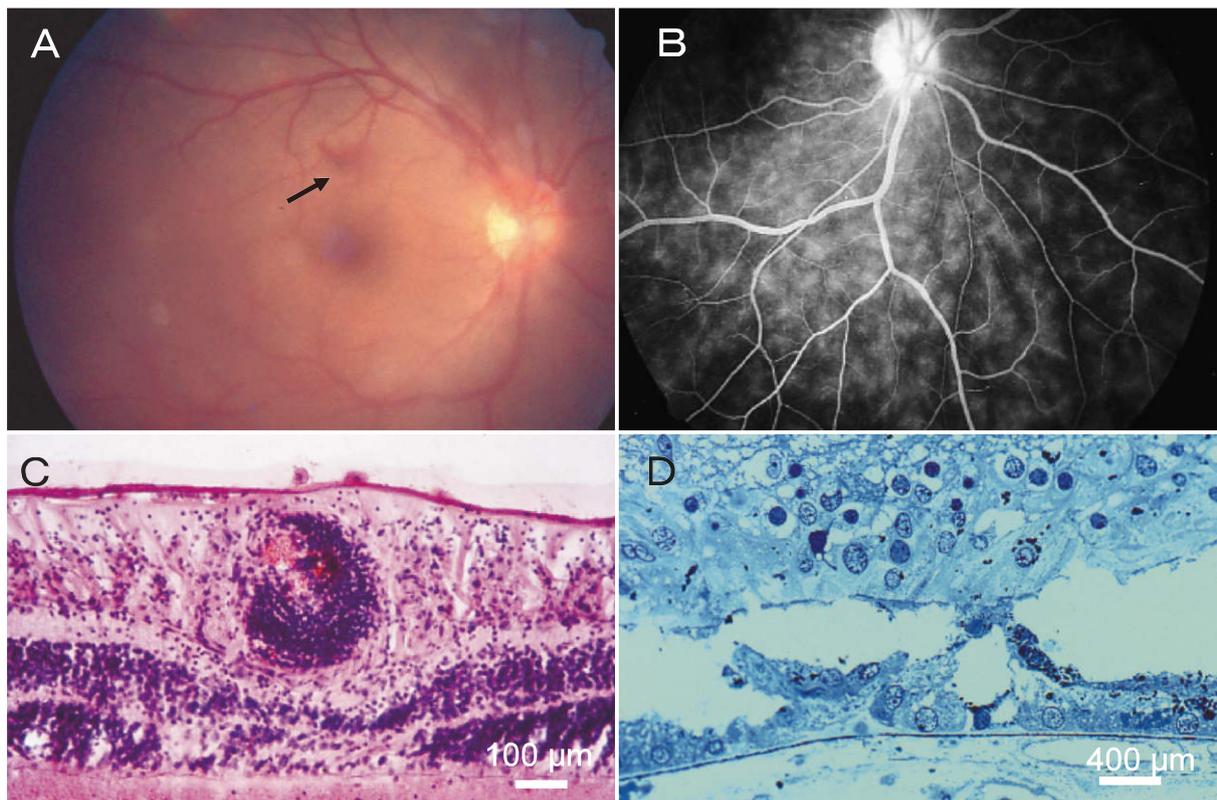


図 3 Behçet 病ぶどう膜炎における網膜病変と病理組織像。

A：カラー眼底所見。びまん性の硝子体混濁，出血斑(矢印)がみられる。B：蛍光眼底造影所見。網膜血管炎に伴うびまん性の蛍光漏出がみられる(A, B は同一症例ではない)。C：病理組織所見(ヘマトキシリン・エオジン染色)。網膜血管炎，網膜全層に及ぶ炎症性細胞浸潤を認める(猪俣 孟先生のご好意により提供)。D：病理組織所見(トルイジンブルー染色)。網膜視細胞層の破壊・消失が認められる(C, D は同一症例ではなく A, B と異なる)。

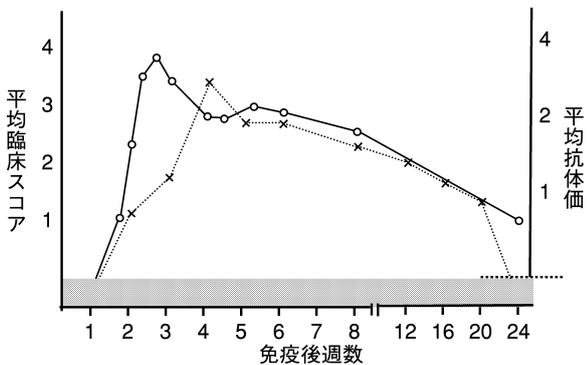


図 4 EAU における病態，抗網膜抗原抗体の推移。

○—○：臨床スコア，×---×：抗網膜抗原抗体
(文献 33 より許可を得て改変，転載)

ると，Behçet 病では 21 人中 4 人(19%)，Vogt-小柳-原田病では 15 人中 1 人(6.7%)，サルコイドーシスでは 6 人中 1 人(16.7%)の患者に抗視細胞外節抗体が認められた³⁴⁾。したがって，EAU と Behçet 病には抗網膜抗原抗体が存在する。

3. 網膜抗原に対する白血球遊走阻止

S 抗原に対する白血球遊走阻止試験を行った EAU の

表 3 各種ぶどう膜炎患者血清中にみられる抗視細胞外節抗体

疾患	例数	陽性(陽性率%)		
		1:5 以上	1:1	計
Behçet 病	21	2(9.5)	2(9.5)	4(19.0)
Vogt-小柳-原田病	15	0	1(6.7)	1(6.7)
サルコイドーシス	6	0	1(16.7)	1(16.7)
ヘルペス性虹彩炎	3	0	0	0
水晶体過敏性眼内炎	1	0	0	0
P-S 症候群	1	0	0	0
同定不能ぶどう膜炎	17	1(5.9)	7(41.2)	8(47.1)
網膜剝離	5	0	1(20.0)	1(20.0)

(文献 34 より許可を得て改変，転載)

報告では，免疫後 1 週後に遊走阻止率はピークとなり，その後比較的急峻に低下し 6 週後には正常域に戻る。一方，Behçet 病患者では(表 4)，健常者と比較して S 抗原に対する白血球の遊走阻止率は有意に強く，特に眼炎発作期で著明に亢進していることが明らかになった³⁵⁾。このように EAU と Behçet 病は網膜抗原に対する白血球遊走阻止率においても同様の結果が認められた。

表 4 S 抗原に対する Behçet 病ぶどう膜炎患者の白血球遊走試験

	サンプル数	MI(%)	陽性数	t 検定
Behçet 病	29	87.3±10.8	10	p<0.0005
発作期	9	79.0± 8.4	7	p<0.000005
寛解期	20	91.0± 9.7	3	n.s.
健常人	18	96.3± 6.7		

Positive<average MI of normal individuals-2 SD=82.9.
n. s. : not significant (p>0.05), MI : migration index
(文献 35 より許可を得て改変, 転載)

4. 共通の網膜抗原

近年開発されたプロテオミクスと呼ばれる新しい手法を用いて, Behçet 病患者の特異的網膜抗原の同定を行った。方法を概説すると, マウスの網膜から凍結融解法にて蛋白質を抽出し, 二次元電気泳動にかけ, 泳動後のゲルをニトロセルロース膜に転写した後, これに Behçet 病患者(13 名)と健常人(15 名)の血清を反応させた。発色されたスポットを患者群, 健常人群で比較し, 患者群で 4 例以上かつ健常人群で 1 例以下, または患者群で 3 例かつ健常人群で 0 例であった陽性のスポットを, Behçet 病患者血清中の自己抗体が認識する網膜抗原として選出した。そして, 該当する蛋白スポットをゲルから切り出し, 質量分析装置(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry : MALDI-TOF MS), MASCOT(Matrix Science, London, UK)によりその蛋白質を同定した。6 個のスポットが抗原候補として選出され, そのうちの 3 個が解析可能であった。その結果を表 5 に示す。3 個の蛋白質のうち 2 個は, S 抗原(Behçet 病で 30.8% 陽性³⁶⁾, 健常人では陽性なし)と alpha-enolase(Behçet 病で 30.8% が陽性であり, 健常人は 6.7% 陽性³⁷⁾であり, これまでに Behçet 病の自己抗原として報告されている蛋白質であった。抗原候補の蛋白質として同定した蛋白質の中に, 既報の自己抗原が含まれているということは, 二次元電気泳動とウェスタンブロッティングを組合わせたプロテオミクスによるアプローチは, 自己抗原の同定に有用であることを示している。

今回検出された最後の一つの蛋白質は, selenium binding protein であり, Behçet 病で 23.1% が陽性であった。この蛋白質は健常人にはみられず, 新たに同定された Behçet 病の自己抗原と考えられた。また, selenium binding protein が他の自己免疫病の抗原として報告されたことも現在までのところない。解析できなかった 3 つのスポットは, スポットの濃度が薄いため同定に至らなかった。これら 3 つの蛋白質は二次元ウェスタンブロッティングの発色も弱いため, 自己抗原性は弱いと考えられた。

5. 好中球の異常, 特にアポトーシスの異常について

ラット EAU 眼の病理所見をみると, 前房, 虹彩毛様

表 5 プロテオミクスにより同定された網膜抗原候補蛋白質

同定蛋白質	二次元 WB 陽性率	
	健常人 (n=15)	Behçet 病 (n=13)
S 抗原	0%	30.8%
alpha-enolase	6.7%	30.8%
selenium binding protein	0%	23.1%

WB : ウェスタンブロッティング

体, 網膜とその視細胞層に浸潤する炎症細胞のうち好中球の占める頻度が多い。そこで, ラットを網膜抗原で免疫した後, 抗好中球抗体を投与すると, EAU の発症が抑制されることを土方らが報告し³²⁾, EAU の眼炎症発現に好中球の役割が大きいことを明らかにした。

一方, Behçet 病では, 病変部位に好中球とリンパ球の強い浸潤があり, 眼局所で生じる前房蓄膿中には多数の好中球が認められる³⁸⁾。また, 末梢血の好中球を用いた研究では, 健常人に比べ好中球の遊走能や活性酸素産生能が Behçet 病で亢進していること³⁹⁾をはじめ, サイトカインに対する反応性の低下, さらにサイトカインの産生亢進がみられるなど⁴⁰⁾⁴¹⁾, Behçet 病患者における好中球の機能異常が指摘されてきた。これらの研究に基づいて, Behçet 病のぶどう膜炎治療として好中球遊走能を抑制するコルヒチンの投与や好中球を除去する療法(顆粒球除去療法)が行われ, このぶどう膜炎の発作回数を減少させ, 治療効果があることを報告している⁴²⁾。

このように EAU と Behçet 病では眼炎症の発現に好中球の関与が大である。一般に, 好中球の生体内寿命は 1~2 日であるにもかかわらず, このような病態発現に関与することから, EAU と Behçet 病患者における好中球の細胞死(アポトーシス)の感受性について検討した。

1) EAU の好中球アポトーシス

EAU の炎症前, 眼炎症期, 眼炎症寛解期における好中球のアポトーシスに抑制がみられるか否かについて検討した。実験方法の概要は, ヒト IRBP ペプチドアミノ酸残基 1~20 位(以後ヒト IRBP と略す)で C 57 BL/6 マウスを免疫すると, 免疫後 14 日目頃から EAU の炎症が誘発され, 21 日目以降に炎症が徐々に消退する⁴³⁾。そこで, 免疫前, 免疫後 14 日目と 35 日目にマウスを屠殺し, その脾臓から好中球を分離しアポトーシスについて実験した。採取した好中球を *in vitro* で 12 時間, リポポリサッカライド(LPS)刺激下または非刺激下で培養し, AnnexinV-Cy 5 Apoptosis Detection Kit で染色した後, アポトーシス細胞を解析した。その結果, EAU における好中球アポトーシスは眼炎症消退期の免疫後 35 日目で, 免疫前, 免疫後 14 日目と比較して統計学的に有意にアポトーシスが抑制されていた(図

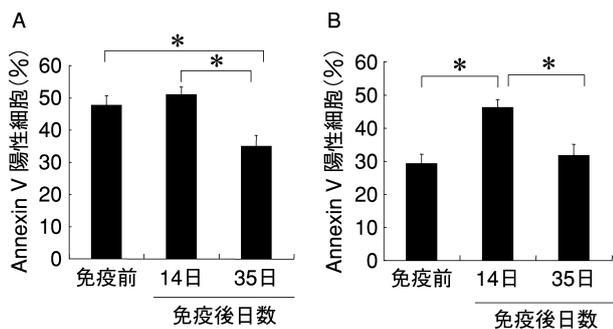


図 5 EAU 発症マウスにおける好中球アポトーシス解析.

C 57 BL/6 マウスを免疫前, ヒト IRBP で免疫後 14 日目と 35 日目に屠殺し, その脾臓から好中球を分離, 無刺激(A), またはリポポリサッカライド(LPS)刺激下(B)で 12 時間培養後, Annexin V 染色によりアポトーシス細胞を解析した. *は統計学的有意差(Sheffe's F test, $p < 0.05$)を表す. A(無刺激): 炎症消退期(免疫後 35 日目)に好中球のアポトーシスは有意に抑制されていた. B(LPS 刺激下): 免疫前の好中球アポトーシスは抑制されたが, EAU 発症マウスの好中球アポトーシスは抑制されていなかった.

5). LPS 刺激により免疫前, すなわち正常マウスの好中球アポトーシスは抑制されたが, 免疫後のマウスのアポトーシスは抑制されていなかった. しかし, LPS 刺激下でも免疫後 35 日目の好中球アポトーシスは免疫後 14 日目の好中球のそれに比較して有意に抑制されていた.

2) Behçet 病患者の好中球アポトーシス

眼症状をもつ Behçet 病患者 29 名, 健常人 15 名から承諾書に同意を得た後, 末梢血を採取し, 好中球を分離し, *in vitro* で培養した. 培養開始後 12 時間目に EAU の実験と同様に Annexin V で染色し, Annexin V 陽性細胞をアポトーシス細胞とした. 好中球のアポトーシス細胞の割合を, 眼炎症発作期の Behçet 病, 寛解期の Behçet 病, 健常人の 3 群間で比較したところ(図 6), 寛解期の Behçet 病患者の好中球アポトーシスは, 健常人のそれと比較して有意に抑制されていた. 発作期の Behçet 病患者と健常人との間に差は認められなかった. LPS 刺激により好中球のアポトーシスはどの群でも抑制されたが, 寛解期の Behçet 病患者好中球アポトーシスはさらに抑制されていた. このことから, 眼炎症寛解期における Behçet 病患者好中球のアポトーシスに対する抵抗性は, 好中球の活性化に依存するものではないことが示された. また, 同一 Behçet 病患者(9 名)で発作期, 寛解期における好中球のアポトーシスの状態をそれぞれ測定したところ, すべての患者で, 寛解期の方が発作期より好中球のアポトーシスが抑制されており(図 7), 両群間において有意差がみられた($p = 0.007$). 興味深いことに, 寛解期の Behçet 病患者の好中球アポ

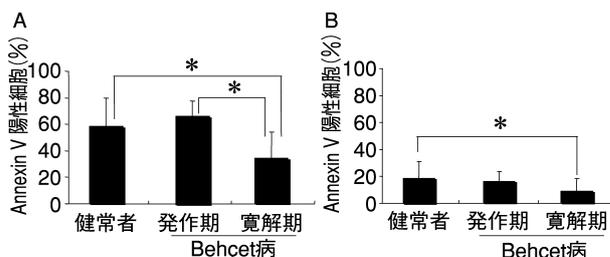


図 6 Behçet 病患者末梢血好中球のアポトーシス解析. 眼炎症発作期の Behçet 病患者, 眼炎症寛解期の Behçet 病患者, 健常人から末梢血を採取し, 好中球を分離, 無刺激(A), または LPS 刺激下(B)で 12 時間培養後, Annexin V 染色によりアポトーシス細胞を解析した. *は統計学的有意差(Sheffe's F test, $p < 0.01$)を表す. A(無刺激): Behçet 病眼炎症寛解期で好中球は, 発作期, 健常人よりアポトーシスが抑制されていた. B(LPS 刺激): LPS 刺激のため 3 群すべてで好中球のアポトーシスは無刺激のものより抑制されていたが, Behçet 病眼炎症寛解期の好中球が他の 2 群に比べ, 最もアポトーシスが抑制されていた.

トーシスを測定した日から次の発作が起きるまでの期間と好中球アポトーシスとの間に相関がみられるか否か検討したところ(図 8), 両者には正の相関があり, 有意差をもって認められた($r = 1.84, p = 0.03$). つまり, 寛解期における好中球アポトーシスが抑制されていればいるほど, 次の眼炎症発作までの期間が短いことが判明した.

6. Th 1 優位な免疫反応

Th 細胞は, その産生するサイトカインにより機能が異なり, 少なくとも 2 つのサブセットに分類され得ることが知られている⁴⁴⁾(図 9). Th タイプ 1 細胞(Th 1 細胞)は IL-2, IFN- γ , TNF- β を産生し, 遅延型過敏反応に関与するのに対して, Th タイプ 2 細胞(Th 2 細胞)は, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 を産生し, アレルギー性疾患に関与し, 互いに拮抗作用を有する. 他の自己免疫病の動物モデルと同様に, EAU は Th 1 細胞により惹起されることが報告されている^{45)~47)}. そこでマウス EAU における Th 1, Th 2 細胞が産生するサイトカインの経時的变化について検討した⁴³⁾(図 10). Th 1 サイトカインである IFN- γ は IRBP 免疫後 1 週目から EAU の発症とともに産生がみられ, 眼炎症の重症度に従い免疫後 2 週目にピークに達し, その後は減少した. 一方, Th 2 サイトカインである IL-4 は, 免疫後 4 週目から産生がみられ, 眼炎症が消退傾向を呈した免疫後 6 週目にピークに達し, 徐々に減少した. このような眼炎症時の Th 1 細胞優位なサイトカイン産生が Behçet 病患者においてもみられるか否かについて末梢血 T 細胞における mRNA の発現をオリゴマイクロアレイで網羅的に解析した. 東京医科大学倫理委員会で認可された承諾書に同意が得られた眼炎症発作期の Behçet 病患者 8

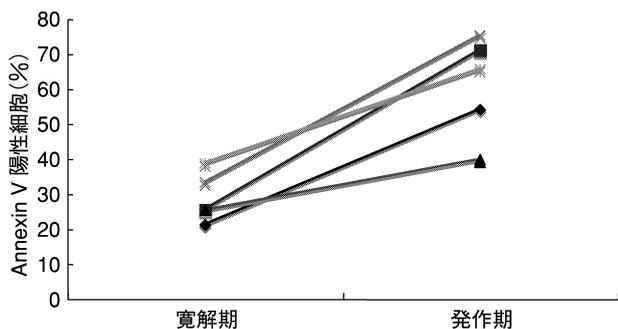


図 7 同一 Behçet 病患者の異なる病期における末梢血好中球アポトーシス解析.

9名の同一 Behçet 病患者から眼炎症発作期と眼炎症寛解期の2回、末梢血好中球を採取し、12時間無刺激で培養後、Annexin V 染色によりアポトーシス細胞を解析した。すべての Behçet 病患者で、発作期に比べ寛解期の方が、好中球のアポトーシスは低値であった ($p < 0.05$)。

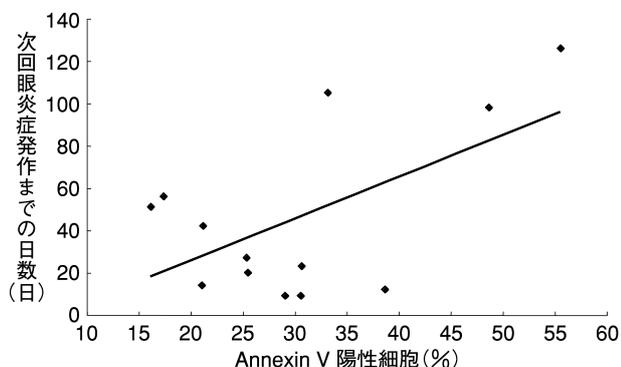


図 8 寛解期 Behçet 病患者の末梢血好中球アポトーシスと次回発作までの期間.

眼炎症寛解期 Behçet 病患者における末梢血好中球の Annexin V 陽性細胞の割合と採血日から次回眼炎症発作までの日数の相関を解析した。その結果、好中球アポトーシスの値と次回眼炎症発作までの期間との間に正の相関が認められた ($r = 1.84$, $p < 0.05$)。

名、眼炎症寛解期の患者8名、健常者7名の末梢血から単核球を分離し、mRNA を抽出後、約2万個の遺伝子発現を測定可能な Code Link Bioarray (Amersham Biosciences®) を用いて解析した。その結果、Th1 サイトカインである IFN- γ mRNA の発現は眼炎症発作期の Behçet 病患者で亢進しておらず、また Th2 サイトカインである IL-4, IL-6, IL-10 mRNA の発現も、各群間で差が認められなかった(図11)。

先に述べたように、Th1細胞とTh2細胞ではその産生するサイトカインにより機能が異なるが、その生体内遊走を司る液性因子、ケモカインもいくつかを除いては異なることが知られている(図12)。代表的なものとして、Th1細胞は、ケモカイン受容体に CXCR3 と CCR5 を発現し、CXCR3 は CXCL9, CXCL10 と結

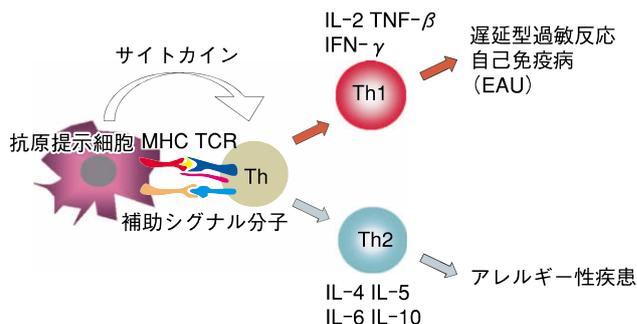


図 9 ヘルパーT細胞(Th細胞)の分化.

活性化した Th 細胞は、Th1 細胞と Th2 細胞の少なくとも2つに分類される。Th1 細胞は IL-2, IFN- γ , TNF- β を産生し、1型糖尿病、慢性関節リウマチなどの自己免疫病、遅延型過敏反応に関与するのに対して、Th タイプ2細胞(Th2細胞)は、IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 を産生し、アレルギー性疾患に関与する。他の自己免疫病の動物モデルと同様に、EAU は Th1 細胞により惹起されることが報告されている。

TCR: T細胞受容体, MHC: 主要組織適合抗原

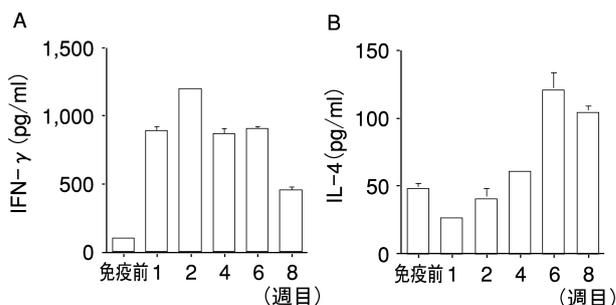


図 10 EAU における Th1, Th2 サイトカインの経時的変化.

C57BL/6マウスをIRBPで免疫後、1, 2, 4, 6, 8週目にマウスを屠殺しIRBP刺激に対するT細胞のIFN- γ , IL-4産生を測定した。A: Th1 サイトカインである IFN- γ は、IRBP 免疫後1週目からEAUの発症とともに産生がみられ、眼炎症の増悪とともに免疫後2週目にピークに達し、その後減少している。B: Th2 サイトカインである IL-4 は、免疫後4週目から産生がみられ、眼炎症が消退傾向を呈した免疫後6週目にピークに達し、徐々に減少する。(文献43より許可を得て改変、転載)

合することにより、CCR5はCCL3, CCL4, CCL5と結合することによりその生体内遊走は促進される。一方、Th2細胞はケモカイン受容体にCCR3とCCR4を発現し、CCR3はCCL5, CCL11, CCL15と結合することにより、またCCR4はCCL17と結合することにより、Th2細胞の遊走が促進される。IRBP免疫後のマウスの後眼部におけるケモカインの発現を解析すると、Th1細胞遊走促進ケモカインであるCXCL10, およびその受容体であるCXCR3の優位な発現が確認された⁴⁸⁾。サイトカインは炎症局所で働くのに対

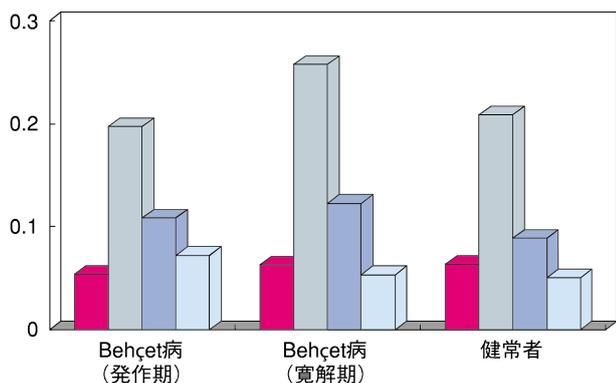


図 11 Behçet 病末梢血 T 細胞における Th 1, Th 2 サイトカイン mRNA 発現解析.

眼炎症発作期の Behçet 病患者, 眼炎症寛解期の患者, 健常者の末梢血から単核球を分離し, mRNA を抽出後, Code Link Bioarray (Amersham Biosciences®) を用いて遺伝子発現解析を行った. その結果, Th 1 サイトカインである IFN- γ , Th 2 サイトカインである IL-4, IL-6, IL-10 とともに各群間で差は認められなかった.

■ : IFN- γ , □ : IL-4, ■ : IL-6, □ : IL-10

し, ケモカインはより遠隔的に働き, Th 1, Th 2 の病態理解に適していると考えられる. そこで, Behçet 病患者の末梢血を用いたマイクロアレイデータにおける Th 1, Th 2 ケモカイン mRNA 発現をみると, CCL 3, CXCL 10 および CXCR 3 の mRNA 発現レベルは Behçet 病患者で強く, 特に CXCL 10 mRNA は眼炎症発作期で最も強く, 次いで眼炎症寛解期の Behçet 病患者に認められ, 最後が健常者の順となり (図 13), 眼炎症に伴う Th 1 の優位性が Behçet 病においても確認された.

以上の結果から, EAU には Behçet 病のぶどう膜炎

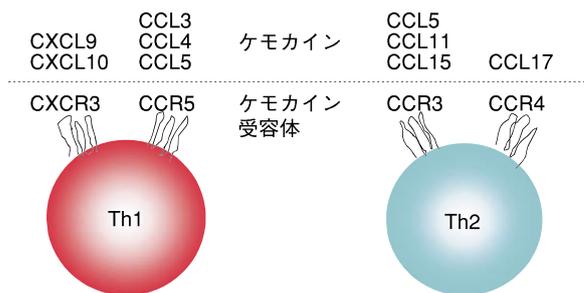


図 12 Th 1, Th 2 細胞の遊走にかかわるケモカイン, およびケモカイン受容体.

にみられる下記の病態, すなわち, ① 眼所見と病理学的所見, ② 抗網膜抗原抗体の存在, ③ 網膜抗原に対する白血球遊走阻止, ④ 共通の網膜抗原, ⑤ 好中球の異常, ⑥ Th 1 優位な免疫反応, の項目において類似点があることが明らかになった. したがって, EAU は Behçet 病のぶどう膜炎を標的としたトランスレーショナルリサーチに適したモデルであると考えた.

IV EAU を用いた新たな治療法の開発

Behçet 病のぶどう膜炎に対する効果的治療法の開発を目的として, ① 全身的な副作用を最小限にする免疫抑制薬の眼内投与, ② ぶどう膜網膜炎の発症に関与する Th 1 細胞の抑制, ③ ぶどう膜網膜炎を抑制する制御性細胞の活性化という 3 つのアプローチをテーマに EAU の発症に対する抑制実験を行った.

1. 免疫抑制薬 (タクロリムス: FK 506) の硝子体内投与

タクロリムスは, その作用機序として T 細胞の細胞

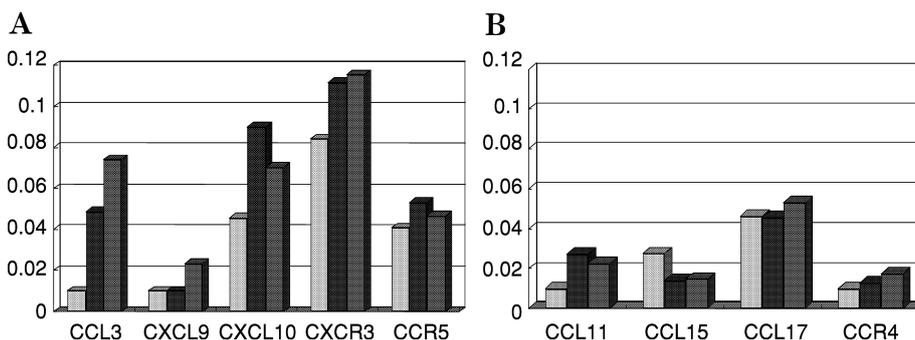


図 13 末梢血 T 細胞の Th 1・Th 2 ケモカイン, ケモカイン受容体遺伝子発現の解析.

眼炎症発作期の Behçet 病患者 (Behçet 病発作期) 8 名, 眼炎症寛解期の Behçet 病患者 (Behçet 病寛解期) 8 名, 健常者 7 名の末梢血 T 細胞における遺伝子発現解析をマイクロアレイにより行った. A: Th 1 ケモカイン, ケモカイン受容体の遺伝子発現. CCL3, CXCL 10, および CXCR 3 の発現が眼炎症発作期, 寛解期の Behçet 病患者で特に強く, 健常者により強く発現している Th 1 ケモカイン遺伝子はみられない. B: Th 2 ケモカイン, ケモカイン受容体の遺伝子発現. 全体に発現は弱く, CCL 11 は Behçet 病患者群においてより強く発現しているが, CCL 15 の発現は健常者の方に強く, 整合性はみられなかった.

□ : 健常者, ■ : Behçet 病 (発作期), ■ : Behçet 病 (寛解期)

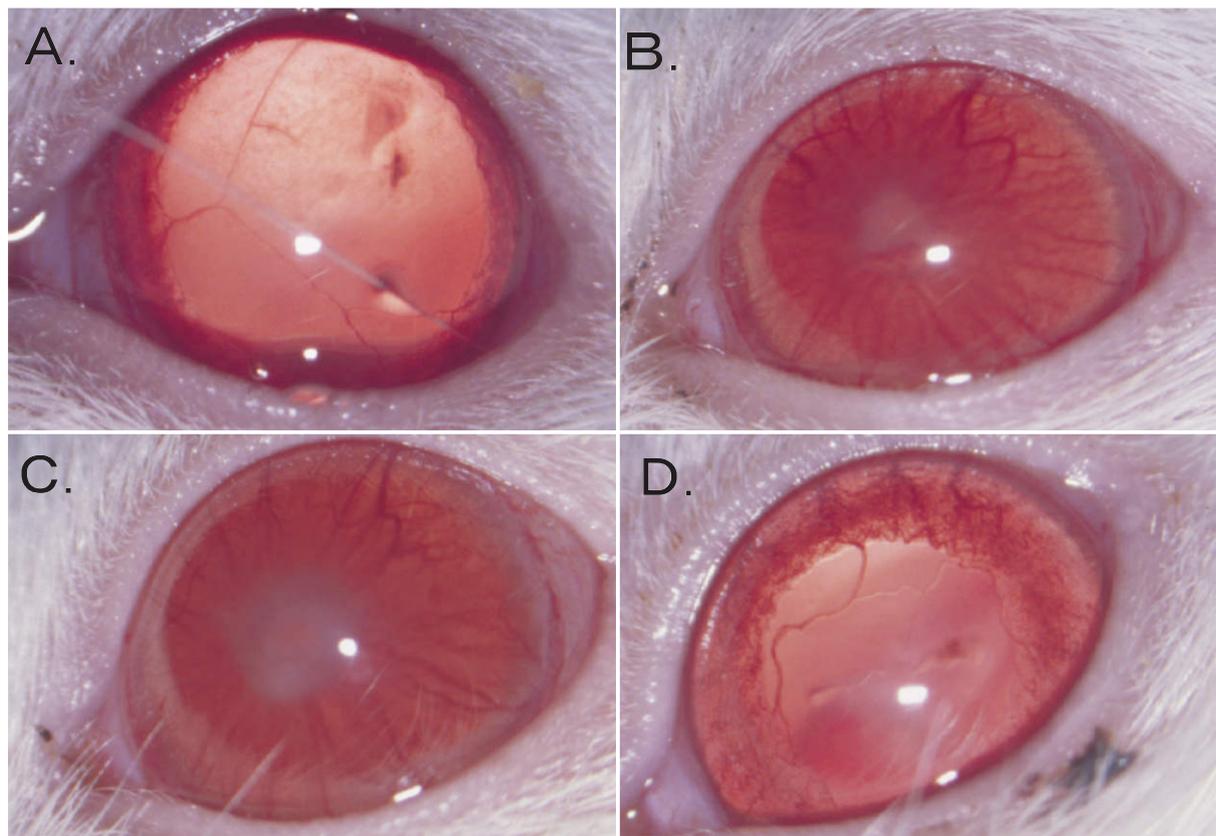


図 14 タクロリムス硝子体内投与ラットのEAU前眼部所見.

Lewis ラットの足底部に IRBP を免疫後、12 日目にタクロリムス $10 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ を左眼の硝子体内に投与した。免疫後 14 日目の (A) 無処置眼, (B) 免疫のみ眼, (C) 免疫+基剤硝子体内投与眼, (D) 免疫+タクロリムス硝子体内投与眼の前眼部所見を示している。免疫のみ, あるいは基剤を投与した群では瞳孔領にフィブリンの析出, 全周の虹彩後癒着を認めたが, タクロリムス $10 \mu\text{g}$ 硝子体内投与群ではフィブリンの析出はみられず, 明らかな虹彩後癒着も認められなかった。(文献 56 より許可を得て改変, 転載)

質内に存在する FK 結合蛋白質 (FK binding protein, FKBP) と結合し, FK 506-FKBP 結合体が T 細胞の核内で IL-2 産生に関する mRNA の発現を制御し, その結果 T 細胞の機能が抑制されるといわれている⁴⁹⁾⁵⁰⁾。臓器移植における拒絶反応の抑制や種々の自己免疫疾患の治療に幅広く使用され, EAU に対する抑制効果についても報告されている⁵¹⁾⁵²⁾。しかし, 日本で行われた難治性ぶどう膜炎に対するタクロリムスの治験では, 腎機能障害や神経症状, 胃腸症状などの副作用の発現頻度が高く, 未だヒトぶどう膜炎に対し臨床応用に至っていないのが現状である⁵³⁾。このようなタクロリムスの全身的な副作用をできる限り回避し, 眼局所的に抗炎症効果を誘導する試案として, 硝子体内にタクロリムス徐放用プラグの留置実験が報告され, 結核菌の免疫により誘発される家兎のぶどう膜炎が抑制された⁵⁴⁾。我々もまた, ウシ血清アルブミン (BSA) で免疫し, 硝子体に BSA を注入することにより誘発した家兎の実験的ぶどう膜炎が, タクロリムスの硝子体内投与で眼内組織に影響を与えず抑制されることを認めた⁵⁵⁾。これらの結果を踏まえ, 上記のようなぶどう膜炎だけではなく, 網膜に強い炎症所

見を呈する EAU においてもタクロリムスの硝子体内投与が有効であるか否かについて検討した⁵⁶⁾。Lewis ラットの足底部にウシ IRBP の R 14⁵⁷⁾ペプチド (ペプチドアミノ酸残基 1169~1191 位) $0.2 \mu\text{g}$ を CFA とともに免疫し, 12 日目にタクロリムス $10 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ を左眼の硝子体内に投与した。対照には基剤のみを投与した。細隙灯顕微鏡検査による前眼部炎症所見について比較したところ (図 14), 免疫のみ, あるいは基剤を投与した群では瞳孔領にフィブリンの析出, 全周の虹彩後癒着を認めたが, タクロリムス硝子体内投与群ではフィブリンの析出はみられず, 明らかな虹彩後癒着も認められなかった。さらに基剤投与群と比較してタクロリムス投与群では前眼部炎症スコアが有意に低値であった (図 15)。免疫後 14 日目の EAU 病理組織学的所見においても, 基剤投与群では前眼部, 後眼部ともに炎症性細胞の著明な浸潤や網膜血管炎, 網膜視細胞層の著しい破壊が観察されたが, タクロリムス投与群では炎症性細胞の浸潤は軽微であり, 網膜の層構造は保たれ, 有意な病理組織スコアの軽減がみられた (図 16)。タクロリムス非投与眼の右眼は, 免疫のみ群と同様の炎症を呈し, EAU の抑制はみ

られなかった。次に、免疫後 14 日目の摘出眼球から水晶体を除去し、眼内の炎症性サイトカイン、IFN- γ および TNF- α を ELISA 法にて測定したところ、基剤投

与眼と比較してタクロリムス投与眼では IFN- γ 、TNF- α ともに有意に低値であった(図 17)。また、R 14 免疫後 12 日目にタクロリムスおよび基剤を硝子体内投与後、R 14(1 mg/20 ml/rat)をラットの耳介皮下に接種し、その 48 時間後に遅延型過敏反応を測定することにより、タクロリムス硝子体内投与による全身免疫系への影響についても検討を行った。その結果、タクロリムス硝子体内投与群においては R 14 に対する遅延型過敏反応がみられ、基剤投与群との間に有意差はみられなかった(図 18)。以上の結果から、タクロリムスの硝子体内投与は全身の免疫系を抑制せず、眼局所の炎症性サイトカインの産生を制御することにより EAU を軽症化すると考えられた。

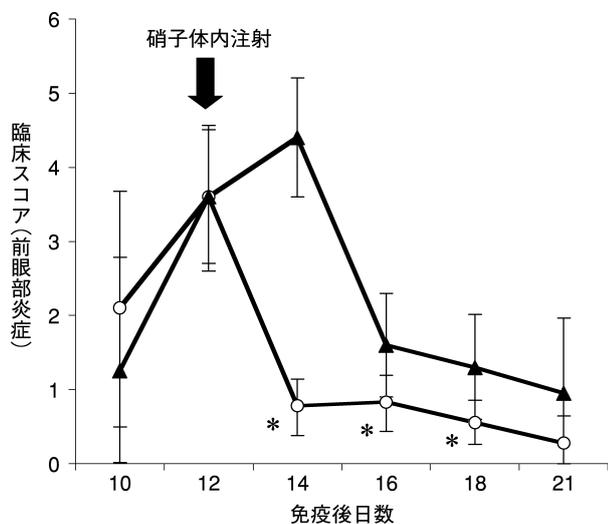


図 15 タクロリムス硝子体内投与ラットの EAU 前眼部スコアの経時的変化。

タクロリムス投与群では基剤投与群に比べ前眼部炎症スコアは有意に抑制されていた。

*は統計学的有意差(Mann-Whitney U test にて $p < 0.05$)を表す。

—▲—: 基剤投与群, —○—: タクロリムス投与群 (文献 56 より許可を得て改変, 転載)

2. ぶどう膜網膜炎の発症に関与する Th 1 細胞(悪玉細胞)の抑制

先にも述べたように、Th 細胞は抗原提示細胞との相互作用により Th 1 または Th 2 細胞に分化するが、その分化を制御するファクターに抗原提示細胞から産生されるサイトカインおよび補助シグナル分子があることが知られている。

1) サイトカインによる制御

IL-12 は樹状細胞、マクロファージから産生されるサイトカインであり、その産生は IFN- γ の刺激により促進され、Th 1 細胞分化を誘導することが知られている⁵⁸⁾⁵⁹⁾。EAU の発症を惹起する T 細胞は Th 1 タイプ

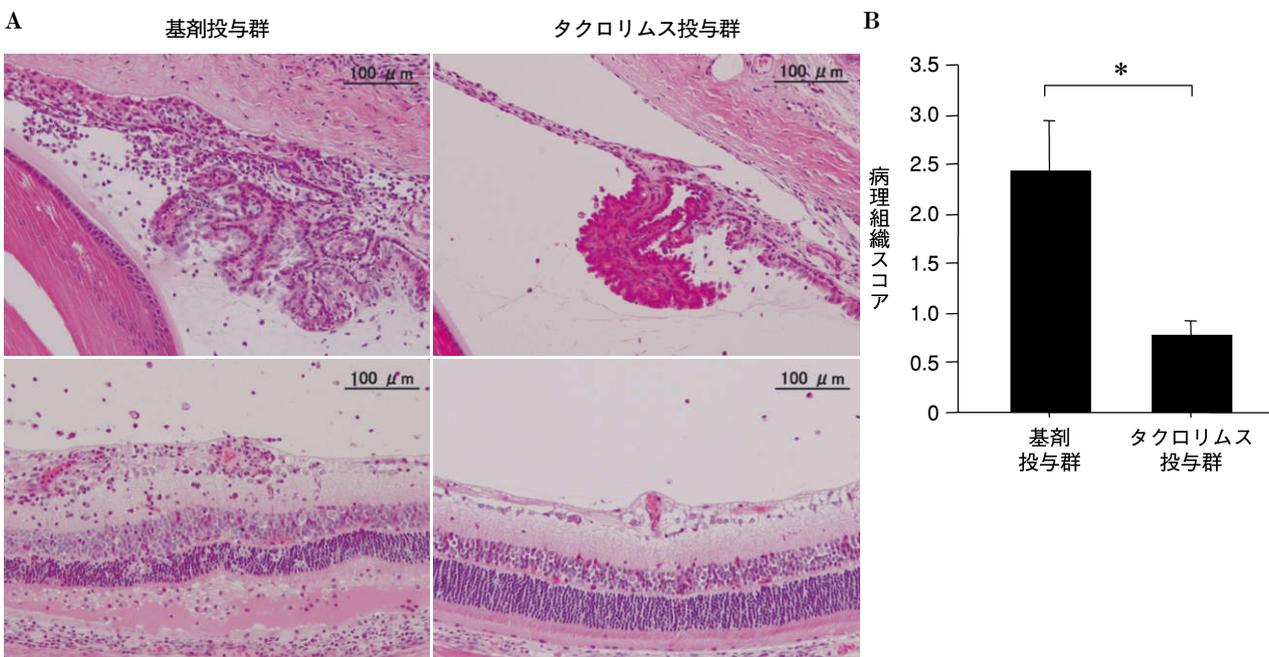


図 16 タクロリムス硝子体内投与ラットの EAU 病理組織像および病理組織スコアの比較。

A: 基剤投与群では前眼部、後眼部ともに炎症性細胞の著明な浸潤や網膜血管炎、網膜視細胞層の著しい破壊が観察されるが、タクロリムス 10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ 投与群では炎症性細胞の浸潤は軽微であり、網膜の層構造は保たれている。B: タクロリムス 10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ 投与群では基剤投与群に比べ、有意な病理組織スコアの軽減がみられた。*は統計学的有意差(Mann-Whitney U test にて $p < 0.05$)を表す。(文献 56 より許可を得て改変, 転載)

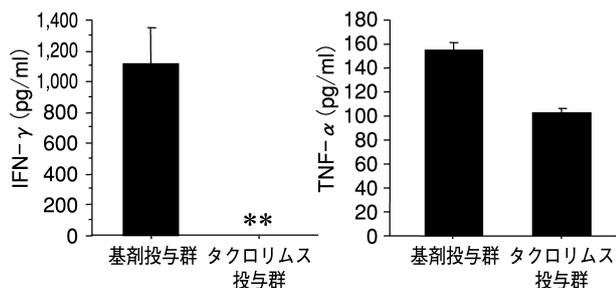


図 17 タクロリムス硝子体内投与ラットの眼局所における炎症性サイトカイン(IFN- γ , TNF- α)産生。タクロリムス投与群では基剤投与群と比較して IFN- γ , TNF- α ともに有意に低値であった(Student's t test にて $p < 0.05$)。 ** ; 検出感度以下 (文献 56 より許可を得て改変, 転載)

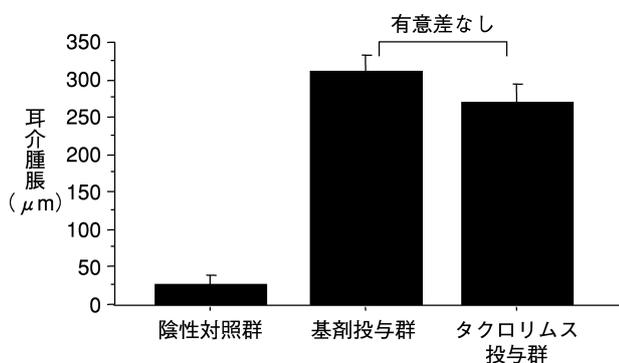


図 18 タクロリムス硝子体内投与ラットの接種抗原に対する遅延型過敏反応。無処置群(IRBP で免疫を行っていないラット), および IRBP 免疫後 12 日目に基剤またはタクロリムスの硝子体内投与を行った群に対して, IRBP を耳介皮下に接種し, 遅延型過敏反応を測定した。基剤投与群とタクロリムス投与群との間に有意差は認めなかった。(文献 56 より許可を得て改変, 転載)

であることから^{45)~47)}, IL-12 の作用を阻害する中和抗体を投与することにより IRBP の免疫による EAU の発症を抑制できるか否かについて検討を行った。B 10.A マウスに IRBP を強化免疫し, 同時に抗 IL-12 抗体を 1 mg 投与し, 30 日後に EAU の発症を観察した。その結果, 抗 IL-12 抗体を投与しなかった対照群のマウスでは, IRBP の免疫により 13 匹中 9 匹(69%)に EAU の発症が病理組織学的にみられたのに対して, 抗 IL-12 抗体投与群では 12 匹中 0 匹(0%)と EAU の発症は完全に抑制されていた⁶⁰⁾(表 6)。また, IRBP の刺激に対する T 細胞の産生サイトカインを測定したところ, 抗 IL-12 抗体投与群では対照群と比較して, Th 1 サイトカインである IL-2, IFN- γ 産生が低下し, Th 2 サイトカインである IL-5 産生が増加していた(表 7)。この結果から, 抗 IL-12 抗体の投与により, IRBP 反応性 Th 細胞が Th 1 細胞優位の状態から Th 2 細胞優位に生体内で

表 6 抗 IL-12 抗体投与による EAU の抑制

	対照群	抗 IL-12 抗体投与群
発症率	9/13*	0/12

* : EAU 発症数/IRBP 免疫数
(文献 60 より許可を得て改変, 転載)

表 7 IRBP 刺激に対する抗 IL-12 抗体投与マウス脾臓 T 細胞のサイトカイン産生

pg/ml	Th 1		Th 2	
	IL-2	IFN- γ	IL-4	IL-5
対照群	306.5	341.9	<50	39.0
抗 IL-12 抗体投与群	33.0	<10	<50	195.9

(文献 60 より許可を得て改変, 転載)

シフトし, EAU の発症が抑制されたと考えられた⁶⁰⁾。

2) 補助シグナル分子の阻害

Th 細胞と抗原提示細胞の相互作用は, 抗原刺激の他に数多くの細胞表面分子を介したシグナルにより調節され, このようなシグナルは総称して補助シグナル分子と呼称されている⁶¹⁾⁶²⁾(図 19)。

i) CD 28 分子

CD 28 分子は恒常的に T 細胞表面上に発現しており, 抗原提示細胞上の補助シグナル分子である B 7-1, B 7-2 と結合して T 細胞活性化を促すことが知られた最も重要な補助シグナル分子である。これを EAU で検証するために, CD 28 分子を欠損させたマウスに, ヒト IRBP で免疫しても EAU の発症はほとんど認められない(図 20)。この現象は抗 B 7-1 抗体の投与によって EAU の抑制がみられたという我々の報告⁶³⁾からも理解することができる。

ii) ICOS 分子

1999 年に新たに発見された補助シグナル分子, inducible co-stimulator (ICOS) は⁶²⁾⁶⁴⁾⁶⁵⁾, CD 28 と比較して抗原刺激を受けたことのない T 細胞上にはほとんどその発現がみられず, 活性化に伴って発現が上昇することから, ICOS を介したシグナルは疾患の誘導期よりもむしろ発症期において重要であると考えられている。EAU においてこの事実が認められるかを調べるために, IRBP ペプチドで免疫後 21 日目の EAU 発症眼における浸潤 CD 4⁺T 細胞の ICOS 発現状態を観察したところ, ほとんどすべての浸潤 CD 4⁺T 細胞上に ICOS の発現が認められた⁶⁶⁾(図 21)。そこで, IRBP ペプチドで免疫したマウスに抗 B 7-related protein-1 (B 7 RP-1) 抗体を用いて, ICOS-B 7 RP-1 を介した補助シグナルを阻害することにより, EAU をその活動期で抑制できるか否かについて検討した。抗 B 7 RP-1 抗体を投与されたマウスでは, アイソタイプ IgG を投与された対照群と比較して, 検眼鏡的にも病理組織学的にも有意差を

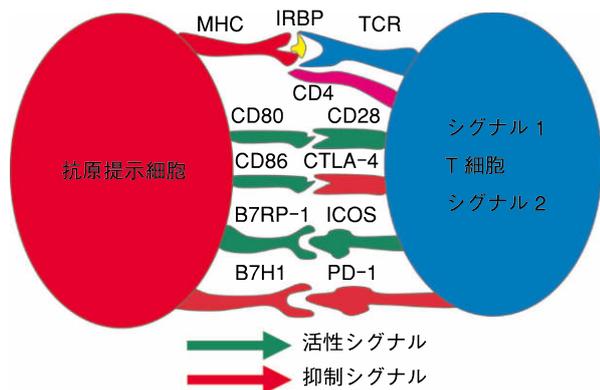


図 19 種々の補助シグナル分子。

抗原提示細胞と T 細胞間の免疫反応は、種々の補助シグナル分子により調節されている。CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4, ICOS : inducible co-stimulator, B7RP-1 : B7-related protein-1, PD-1 : programmed death-1, B7H1 : B7 homologous protein-1

もって EAU が抑制された(図 22)。続いて、T 細胞の網膜抗原(ヒト IRBP)刺激に対する増殖反応、サイトカイン産生について解析したところ、抗 B7RP-1 抗体投与マウスにおける T 細胞増殖反応、Th1 サイトカインである IFN- γ の産生は著しく抑制され、Th2 サイトカインである IL-10 の産生は有意に促進されていた(図 23)。これらの結果から、ICOS を介した補助シグナルは EAU の発症期における Th1 細胞の活性化に関与し、ICOS シグナルの阻害は EAU が活動期にあっても炎症を抑制することが示された。

次に、眼炎症のある活動期 Behçet 病患者末梢血 CD4⁺T 細胞上の ICOS の発現をフローサイトメトリーにて解析したところ、ICOS の発現強度および頻度がともに健常人と比較して有意に上昇しており(図 24)、マイクロアレイを用いた mRNA 発現解析では、CD28, cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4(CTLA-4), ICOS, programmed death-1(PD-1)などの種々の補助シグナル分子の中でも ICOS mRNA が最も強く発現していた(表 8)。このような Behçet 病患者末梢血 T 細胞における ICOS の強度の発現は *in vitro* の concanavalin A(ConA)刺激下でも同様であったことから(図 24, 表 8)、この ICOS の発現増強は、眼炎症の程度によるものではなく、疾患そのものの特徴であると考えられた。したがって、Behçet 病の治療に ICOS 分子の阻害が有効である可能性が大であると考えられる。

3. ぶどう膜網膜炎を抑制する制御性細胞(善玉細胞)の活性化

1) CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞の移入

免疫系は、生体を侵襲しようとするさまざまなウイルス、細菌、異物を認識し、排除する一方、自己の組織に対してはその免疫応答を“負”に制御するメカニズムに

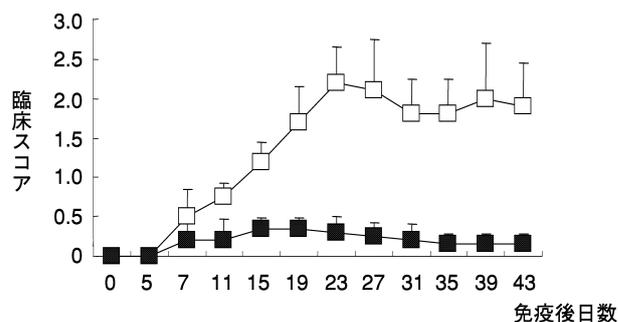


図 20 CD28 ノックアウトマウスにおける EAU。

CD28 ノックアウトマウスおよびその野生型マウス(C57BL/6)を IRBP で強化免疫し、免疫後 5 日目より 4 日ごとに EAU 臨床スコアを顕微鏡で評価した。免疫後 11 日目より野生型では EAU の発症がみられ、臨床スコアも徐々に重症化していったのに対して、ほとんどの CD28 ノックアウトマウスで EAU の発症はみられなかった。

□ : 正常マウス, ■ : CD28 ノックアウトマウス

より、生体の恒常性が維持されている。ある種の T 細胞にはこのように免疫応答を負に制御する機能があり、制御性 T 細胞と名付けられ、これまでに数種の制御性 T 細胞が報告されている。近年、その中でも特に注目されているものに CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞(CD25⁺制御性 T 細胞)がある⁶⁷⁾⁶⁸⁾。CD25 とは IL-2 受容体 α 鎖のことであり、通常の T 細胞は活性化されたときのみ IL-2 受容体を発現するのに対して、この制御性 T 細胞は恒常的に IL-2 受容体 α 鎖を発現し、マウス末梢血 Th 細胞全体の 5~10% を占めるといわれている。ヒトの末梢血中においても類似した制御性 T 細胞の存在が報告され⁶⁹⁾⁷⁰⁾、自己反応性 T 細胞と接触することにより抑制作用を示し、I 型糖尿病、多発性硬化症ではその機能異常が報告されている⁷¹⁾⁷²⁾。

一般に、CD25⁺制御性 T 細胞は胸腺で成熟し、生後 3 日目から末梢に出現することから⁷³⁾、実験では B6A(C57BL/6×A/J)マウスの胸腺を生後 3 日目に摘出し、抗 CD25 抗体投与によりさらにマウス生体内 CD25⁺制御性 T 細胞を除去した。その結果、甲状腺炎、胃炎、精巣炎、卵巣炎の発症に加え、ぶどう膜網膜炎の発症が認められた⁷⁴⁾(表 9)。また、このぶどう膜網膜炎を発症した CD25⁺制御性 T 細胞除去マウスでは、その血清中に抗網膜抗原抗体がみられ、その T 細胞は S 抗原および IRBP の刺激によって増殖や IFN- γ 産生をすることが示された⁷⁴⁾(図 25)。そこで、反対に生体内の CD25⁺制御性 T 細胞を移入し増やすことにより EAU の発症をその活動期で抑制できるか否かを検討した。ヒト IRBP を C57BL/6 マウスに免疫した後、7 日目に無処置の正常マウスの脾臓から採取した CD25⁺制御性 T 細胞を静脈内投与し、15 日目、18 日目、21 日目に眼底検

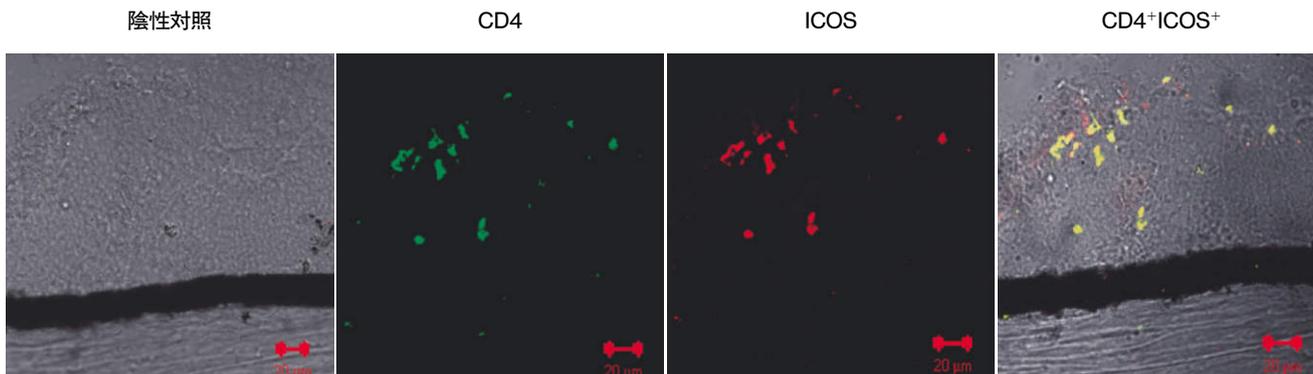


図 21 EAU を発症しているマウスの眼内浸潤 CD 4⁺T 細胞における ICOS 分子の発現。
IRBP 免疫後 21 日目に眼球を摘出し、凍結切片を作製後、CD 4-Fluorescein isothiocyanate (CD 4-FITC) および ICOS-Phycoerythrin (ICOS-PE) (およびこれらのアイソタイプコントロール抗体) を用いて二重染色を行った。眼内浸潤 CD 4⁺T 細胞のほとんどが ICOS 分子を発現している。(文献 66 より許可を得て改変、転載)

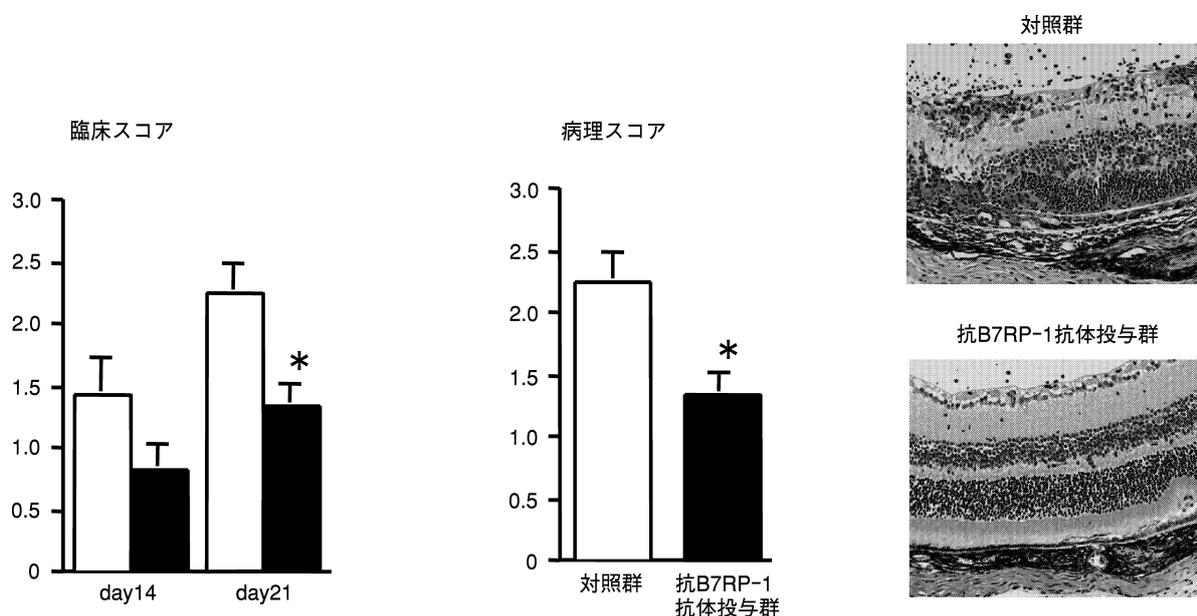


図 22 ICOS/B 7 RP-1 経路阻害による EAU の発症期での抑制。
C 57 BL/6 マウスを IRBP で免疫し、抗 B 7 RP-1 抗体とアイソタイプ対照抗体 (対照群) を免疫後 8 日目より免疫後 21 日目まで隔日 (400 μg) 腹腔内投与した。免疫後 14 日目と 21 日目に臨床スコアを顕微鏡にて観察し、免疫後 21 日目に病理組織学的な EAU の重症度を評価した。抗 B 7 RP-1 抗体投与群では対照群と比較して、臨床的スコア、病理スコアともに免疫後 21 日目で有意に抑制されていた。
□：対照群，■：抗 B 7 RP-1 抗体投与群，* は統計学的有意差 (Mann-whitney U test, p<0.05) を表す。
(文献 66 より許可を得て改変、転載)

査を行った。免疫のみ、または CD 25⁺制御性 T 細胞以外の CD 25⁻T 細胞を投与されたマウス群と比較して、CD 25⁺制御性 T 細胞を投与されたマウス群では EAU の有意な抑制効果が検眼鏡的にすべての観察日で認められた (図 26)。また、免疫後 21 日目にマウスを屠殺し、EAU の重症度を病理組織学的に評価したところ、検眼鏡所見の結果と同様に、CD 25⁺制御性 T 細胞投与群において EAU 発症率の低下、有意な炎症スコアの減少がみられた (図 27)。

次に、CD 25⁺制御性 T 細胞が既に活性化したヒト

IRBP 反応性 T 細胞の増殖、および Th 1 サイトカイン産生を抑制できるか否かについて *in vitro* で検討を行った。まず、ヒト IRBP で免疫後、14 日目に所属リンパ節である頸部リンパ節を採取し、ヒト IRBP の刺激下で無処置のマウスの CD 25⁻T 細胞または CD 25⁺制御性 T 細胞とともに共培養した。CD 25⁺制御性 T 細胞と共培養した群では T 細胞増殖反応は有意に抑制され、Th 1 サイトカインである IL-2 および IFN-γ 産生も著明に低下していた (図 28)。これらの結果から、CD 25⁺制御性 T 細胞は既に活性化している網膜抗原特異的 T

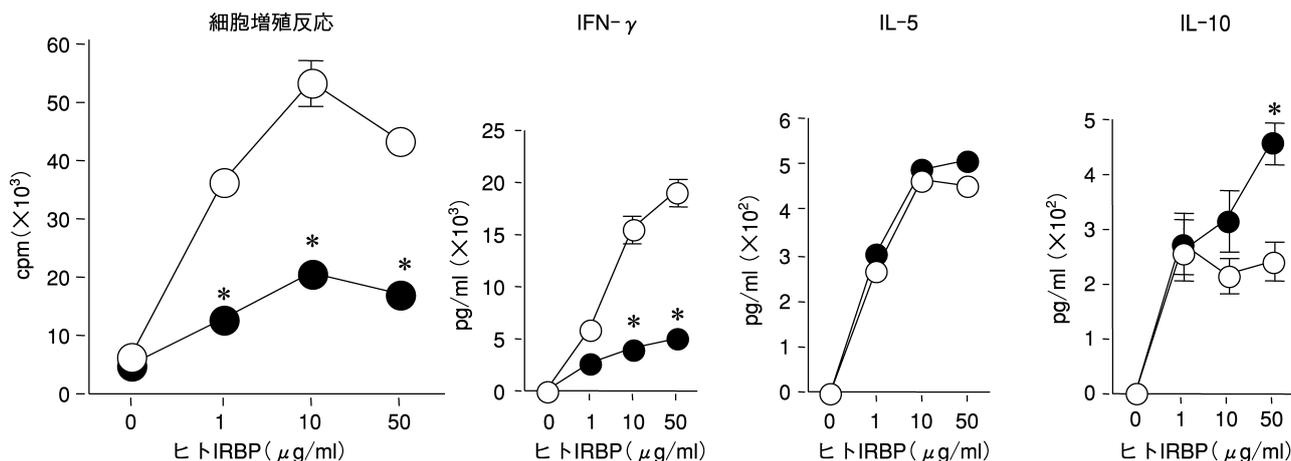


図 23 ICOS/B7 RP-1 経路を発症期に阻害した EAU マウスの T 細胞増殖反応とサイトカイン産生。免疫後 21 日目に眼周囲リンパ節を採取し、IRBP に対する T 細胞増殖反応、および IFN- γ 、IL-5、IL-10 産生を測定した。抗 B7 RP-1 抗体投与群ではアイソタイプ対照投与群と比較して、T 細胞増殖反応、IFN- γ 産生能が有意に抑制され、IL-10 産生能は有意に促進されていた。*は統計学的有意差(Mann-whitney U test, $p < 0.05$)を表す。—○—: 対照群, —●—: 抗 B7 RP-1 抗体投与群(文献 66 より許可を得て改変、転載)

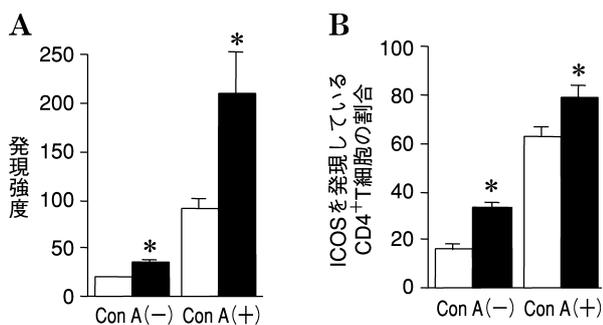


図 24 眼炎症発作期 Behçet 病患者末梢血 CD4⁺T 細胞における ICOS 分子の発現強度および割合。眼炎症発作期の Behçet 病患者および健康者から末梢血を採取し、T 細胞を分離、無刺激(ConA(-)), または ConA 刺激下(ConA(+))で 12 時間培養後、CD4-FITC、ICOS-PE にて染色し、フローサイトメトリーにより解析した。A: ICOS の発現が眼炎症発作期 Behçet 病患者で刺激の有無にかかわらず有意に増強していた。B: ICOS を発現している CD4⁺T 細胞の割合が眼炎症発作期 Behçet 病患者で刺激の有無にかかわらず有意に増加していた。*は統計学的有意差(Mann-whitney U test, $p < 0.05$)を表す。□: 健康者, ■: Behçet 病患者, ConA: Concanavalin A

表 8 眼 Behçet 病患者末梢血 T 細胞における種々の補助シグナル遺伝子の発現解析

補助シグナル分子	発現強度	
	刺激なし	刺激あり
ICOS	1.134	3.226
CD 40 L	0.274	0.031
4-1 BB	-0.004	2.151
CTLA-4	0.231	0.229
CD 28	-0.265	-1.125
CD 27	-1.382	-1.834
PD-1	-0.11	-0.167

ICOS: inducible co-stimulator, CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4, PD-1: programmed death-1

細胞に作用し、EAU をその活動期で抑制できることが示された。

2) 神経ペプチド刺激抗原提示細胞による EAU の抑制
眼内には、免疫学的恒常性を維持するための種々の機能が備わっている⁷⁵⁾。その一つとして、前房内に投与された抗原に対しては遅延型過敏反応および補体結合性 IgG 産生が特異的に抑制され、免疫反応を負に作用するメカニズム、前房関連免疫偏位(anterior chamber-

associated immune deviation: ACAID) がみられることが知られている⁷⁶⁾⁷⁷⁾。前房内に侵入した抗原は、虹彩、毛様体に局在するマクロファージ、樹状細胞などの抗原提示細胞に取り込まれ、線維柱帯から脾臓に達し、そこでその抗原に特異的な抑制性 T 細胞を誘導する⁷⁸⁾。このような眼内抗原提示細胞に特徴的な機能は⁷⁹⁾、前房水中に豊富に含まれる免疫制御物質によるためであり、腹腔マクロファージを前房水の存在下で抗原と培養後、静脈内投与すると、ACAID と同様な免疫反応が起こることも知られている。EAU に関しても、前房水の存在下で網膜抗原(IRBP)と培養された腹腔マクロファージを投与することにより EAU が抑制されることが示されている⁸⁰⁾。これまでに、transforming growth factor- β 2(TGF- β 2) や⁸¹⁾⁸²⁾、神経ペプチドの一種である calcitonin-gene related peptide(CGRP)⁸³⁾⁸⁴⁾、vaso-active intestinal peptide(VIP)⁸⁵⁾、 α -melano-stimulating hor-

表 9 CD 25⁺制御性 T 細胞除去マウスにおける臓器特異的自己免疫病の発症率

マウス (数)	自己免疫病を発症したマウス数 (%)				
	胃炎	涙腺炎	甲状腺炎	ぶどう膜網膜炎	前立腺炎
胸腺摘出マウス (25)	2 (8.0)	21 (84.0)	0	0	18 (72.0)
CD 25 ⁺ 制御性 T 細胞除去マウス (30)	20 (66.7)	30 (100)	4 (13.3)	6 (20.0)	30 (100)

(文献 74 より許可を得て改変, 転載)

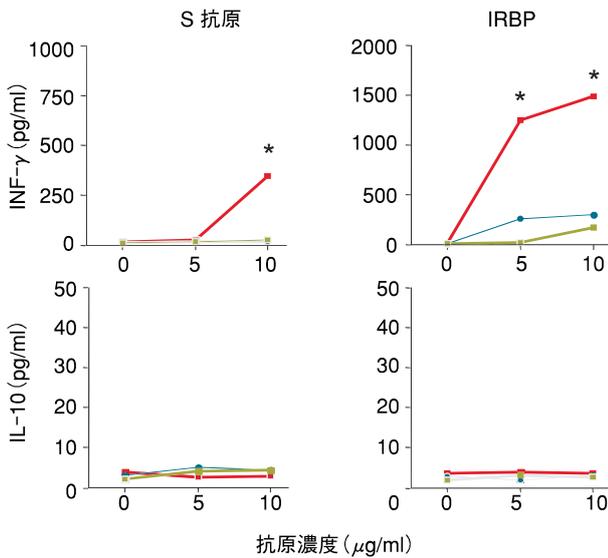


図 25 CD 25⁺制御性 T 細胞除去マウスにおける T 細胞の S 抗原, IRBP 刺激に対する IFN-γ, IL-10 産生能.

無処置の B6A [(C57 BL/6 x A/J)F1] マウス, 生後 3 日目に胸腺を摘出した B6A マウス, および CD 25⁺制御性 T 細胞除去マウスの脾臓から T 細胞を分離し, S 抗原または IRBP により刺激後, 培養上清中の IFN-γ, IL-10 濃度を ELISA により測定した. CD 25⁺制御性 T 細胞除去マウスの T 細胞は, S 抗原および IRBP の刺激により IFN-γ を産生したが, IL-10 産生はみられなかった. * は統計学的有意差 (Scheffe's F test, p < 0.01) を表す. (文献 74 より許可を得て改変, 転載)

— : 無処置マウス群, — : 胸腺摘出マウス群, — : CD 25⁺制御性 T 細胞除去マウス群

mone(α-MSH)⁸⁶⁾などが前房水中に存在することが報告されている. TGF-β2 に関しては, 抗原提示細胞の TGF-β 産生を促進し, IL-12 産生を抑制する作用があることが報告されているが⁸⁷⁾⁸⁸⁾, VIP, CGRP の作用については未だ明らかではない. そこで, 腹腔マクロファージを同様に抗原提示細胞として用い, VIP または CGRP の存在下でヒト IRBP と培養後, 静脈内投与することにより EAU の発症を抑制できるか否かについて検討した. まず, VIP の実験では, ヒト IRBP で免疫後, 同じ IRBP と共培養された抗原提示細胞を投与されたマウス群(対照群)において, 免疫後 3 週目に 10

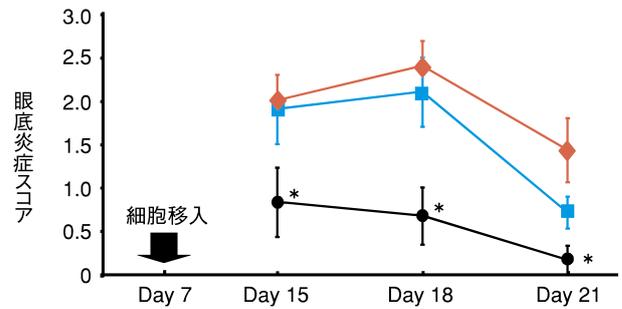


図 26 CD 25⁺制御性 T 細胞移入後における EAU の検眼鏡スコアの推移.

免疫のみ, または CD 25⁺制御性 T 細胞以外の CD25⁻ T 細胞を移入された群と比較して, CD 25⁺制御性 T 細胞を移入された群では, すべての観察日において眼底炎症スコアの有意な低下が認められた. * は統計学的有意差 (Mann-whitney U test, p < 0.05) を表す.

—■— : 免疫のみ群, —◆— : 免疫+CD 25⁺制御性 T 細胞以外の T 細胞移入群, —●— : 免疫+CD 25⁺制御性 T 細胞移入群

匹中 8 匹のマウスが EAU を発症したのに対し, VIP の存在下で IRBP と共培養された抗原提示細胞を投与されたマウス群(実験群)では, その発症率は 10 匹中 3 匹に低下し, 病理組織学的重症度も有意差をもって抑制されていた⁸⁹⁾(図 29). CGRP の実験に関しても, CGRP で培養していない抗原提示細胞を投与された対照群では, EAU 発症率が 70% であったのに対して, CGRP 刺激抗原提示細胞を投与された実験群ではその発症率は 30% に低下し, 重症度も有意に抑制されていた⁹⁰⁾(図 30). 次に, CGRP にはマクロファージの IL-10 産生を促進する作用があることから⁹¹⁾, CGRP 培養抗原提示細胞の移入による EAU の抑制には IL-10 の関与があるのではないかと考え, CGRP 培養抗原提示細胞をヒト IRBP 免疫マウスに注入後, IL-10 の免疫学的作用を阻害する抗 IL-10 抗体を投与した. その結果, EAU の発症率は 60% となり, 重症度の抑制も有意に解除されていた⁹⁰⁾(図 30). これらの結果から, CGRP や VIP などの免疫抑制作用をもつ神経ペプチドで刺激された抗原提示細胞は T 細胞を Th 1 細胞へと分化させず, その産生する IL-10 により免疫抑制機能をもった T 細胞へと分化させると考えられた.

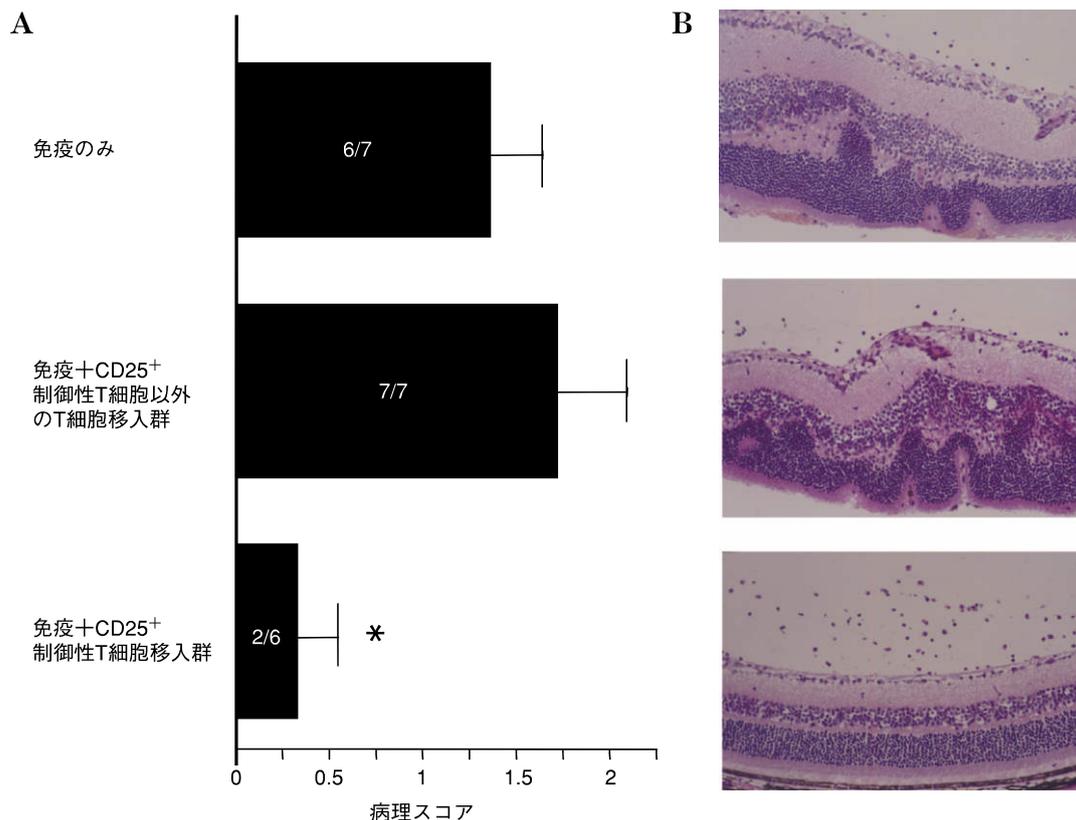


図 27 CD 25⁺制御性 T 細胞移入後における病理組織学的 EAU の発症率, 重症度スコア, およびその臨床像。

A: 免疫のみ群, 免疫+CD 25⁺制御性 T 細胞以外の T 細胞移入群, 免疫+CD 25⁺制御性 T 細胞移入群における病理組織学的 EAU の発症率, 重症度を示している。免疫+CD 25⁺制御性 T 細胞移入群では, 他群と比較して発症率が低く, 病理スコアは有意に軽減していた。* は統計学的有意差 (Scheffe's F test, $p < 0.01$) を表す。B: 各群において最も重症であった EAU の病理像。免疫+CD 25⁺制御性 T 細胞移入群では網膜の層構造が保たれている。

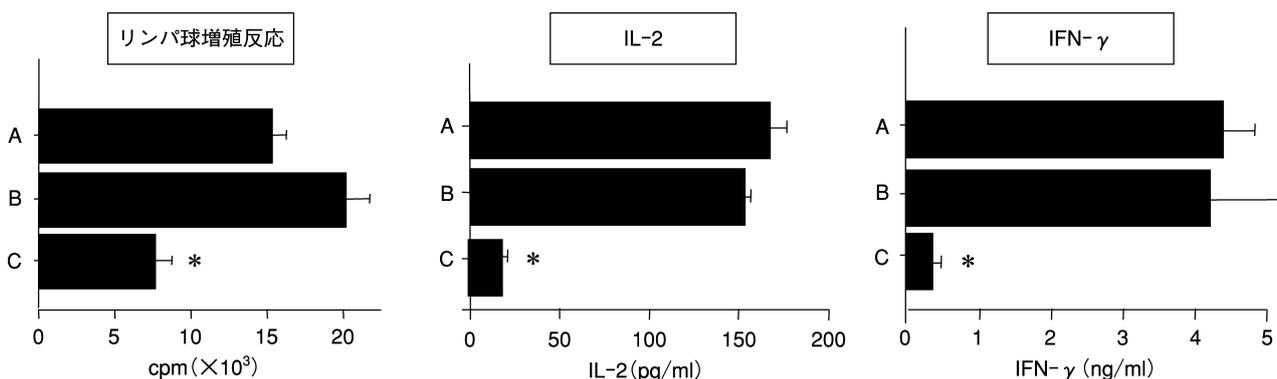


図 28 CD 25⁺制御性 T 細胞存在下でのリンパ球増殖反応, Th 1 サイトカイン産生。

CD 25⁺制御性 T 細胞と共培養した群では IRBP 反応性 T 細胞の増殖反応は有意に抑制され, Th 1 サイトカインである IL-2 および IFN-γ 産生も著明に低下していた。* は統計学的有意差 (Student's t test にて $p < 0.05$) を表す。

- A: 所属リンパ節細胞のみ
- B: 所属リンパ節細胞+CD 25⁺制御性 T 細胞以外の T 細胞
- C: 所属リンパ節細胞+CD 25⁺制御性 T 細胞

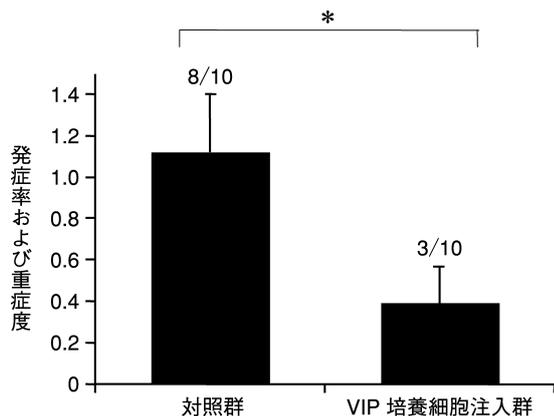


図 29 vaso-active intestinal peptide(VIP)培養抗原提示細胞の移入による EAU の抑制。

VIP(12 nM)と IRBP で一晩培養された C 57 BL/6 マウス由来の腹腔マクロファージ(抗原提示細胞)を IRBP による免疫時に投与されたマウス群(VIP 培養細胞注入群)では、その発症率は 10 匹中 3 匹に低下し、病理組織学的重症度も抑制されていた。*は統計学的有意差(Mann-Whitney U test, $p < 0.05$)を表す。(文献 89 より許可を得て改変、転載)

V おわりに

約半世紀をかけてヒトぶどう膜炎の動物モデルとして、網膜抗原の免疫による EAU が確立され、これを用いてぶどう膜網膜炎の病態が実験的に検証されている。EAU は全身症状を欠くもののヒトぶどう膜網膜炎のなかでは Behçet 病のぶどう膜炎にきわめて似ており、いくつかの病態や免疫反応にも類似性の存在が認められてきた。今なお原因や発症機序が不明で、かつ種々のヒトぶどう膜網膜炎のなかで最も失明する頻度が高い重篤な Behçet 病を解明し、克服する治療法を発見あるいは開発するには、EAU を用いるトランスレーショナルリサーチがきわめて適格な研究であると考えられる。したがって、今後もあらゆる角度から EAU の研究をさらに行い、難治性ぶどう膜炎を有する Behçet 病の治療に貢献しなければならない。

稿を終えるにあたり、本論文の作製にご協力いただいた順天堂大学医学部免疫学教室の奥村 康教授、秋葉久弥講師、聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター長の西岡久寿樹教授、加藤智啓助教授、日本赤十字社医療センター増田寛次郎院長、そして東京医科大学免疫学教室の水口純一郎主任教授、高田栄子講師、病理学教室黒田雅彦助教授に心から感謝し御礼を申し上げます。また、教室のぶどう膜炎研究班の諸先生と本特別講演の作成に参加し、実験および指導をした坂井潤一、後藤 浩、田中孝男、竹内 大、毛塚剛司、横井秀俊、藤盛圭太、慶野 博、鈴木 潤、塚原林太郎、大谷壮志、白井嘉彦、竹内 礼、服部貴明、大井桂子、奥貫陽子、山川直之の各氏に心から御礼を申し上げます。

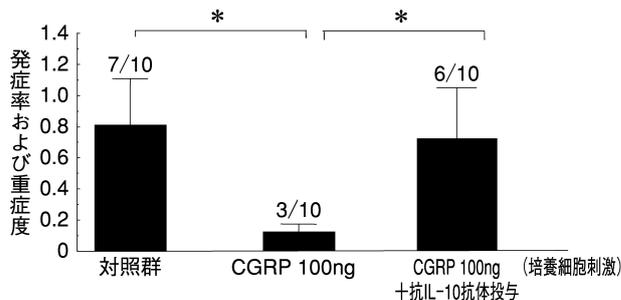


図 30 calcitonin-gene related peptide(CGRP)培養抗原提示細胞のEAU抑制効果、および抗IL-10抗体による阻害。

CGRP(100 ng/ml)と IRBP で一晩培養された C 57 BL/6 マウス由来の腹腔マクロファージを IRBP での免疫時に投与した。免疫後 3 週目で、CGRP と培養していない腹腔マクロファージを移入された対照群のEAU発症率は 70%であったのに対して、CGRP 培養細胞投与群では 30%と有意に低下し抑制されていた。しかし、免疫時に CGRP 培養腹腔マクロファージを投与後、4 日目に抗 IL-10 抗体 0.2 mg を腹腔内投与した群では、EAU 発症率は 60%となり、CGRP 培養細胞による抑制は有意に解除されていた。*は統計学的有意差(Mann-Whitney U test, $p < 0.05$)を表す。(文献 90 より許可を得て改変、転載)

文 献

- 1) **Elschnig A** : Studien, zur sympathischen ophthalmia. Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol 76 : 509—546, 1910.
- 2) **Collins RC** : Experimental studies on sympathetic ophthalmia. Am J Ophthalmol 32 : 1687—1699, 1949.
- 3) **Wacker WB, Lipton MM** : Experimental allergic uveitis : homologous retina as uveitogenic antigen. Nature 206 : 253—254, 1965.
- 4) **De Kozak Y, Usui M, Faure JP** : Experimental autoimmune uveoretinitis. Ultrastructure of chorioretinal lesions induced in guinea pigs by immunization against the outer rods of the bovine retina. Arch Ophthalmol 36 : 231—248, 1976.
- 5) **Mestas J, Hughes CC** : Of mice and not men : differences between mouse and human immunology. J Immunol 172 : 2731—2738, 2004.
- 6) **Doeing DC, Borowicz JL, Crockett ET** : Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. BMC Clin Pathol 3 : 3, 2003.
- 7) **Elbe A, Foster CA, Stingl G** : T-cell receptor alpha beta and gamma delta T cells in rat and human skin—are they equivalent? Semin Immunol 8 : 341—349, 1996.
- 8) **Barnaba V, Watts C, de Boer M, Lane P, Lanzavecchia A** : Professional presentation of antigen by activated human T cells. Eur J Immunol 24 : 71—75, 1994.

- 9) **Taams LS, van Eden W, Wauben MH** : Antigen presentation by T cells versus professional antigen-presenting cells(APC) : differential consequences for T cell activation and subsequent T cell-APC interactions. *Eur J Immunol* 29 : 1543—1550, 1999.
- 10) **Sitnicka E, Buza-Vidas N, Larsson S, Nygren JM, Liuba K, Jacobsen SE** : Human CD34⁺ hematopoietic stem cells capable of multilineage engrafting NOD/SCID mice express flt3 : distinct flt3 and c-kit expression and response patterns on mouse and candidate human hematopoietic stem cells. *Blood* 102 : 881—886, 2003.
- 11) **Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al** : Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409 : 860—921, 2001.
- 12) **Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, et al** : Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420 : 520—562, 2002.
- 13) **de Kozak Y, Sakai J, Thillaye B, Faure JP** : S antigen-induced experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Curr Eye Res* 1 : 327—337, 1981.
- 14) **Gery I, Wiggert B, Redmond TM, Kuwabara T, Crawford MA, Vistica BP, et al** : Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27 : 1296—1300, 1986.
- 15) 田中孝男, 高野 繁, 関 文治, 後藤 浩, 頼 徳治, 白井正彦 : 網膜 A 抗原による実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)について. *日眼会誌* 91 : 145—150, 1987.
- 16) 高村健太郎, 田中孝男, 白井正彦, 坂井潤一, 野中茂久, **Gery I, et al** : 網膜 A 抗原と Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein(IRBP)との同一性について. *日眼会誌* 91 : 827—832, 1987.
- 17) **Vistica BP, Usui M, Kuwabara T, Wiggert B, Lee L, Redmond TM, et al** : IRBP from bovine retina is poorly uveitogenic in guinea pigs and is identical to A-antigen. *Curr Eye Res* 6 : 409—417, 1987.
- 18) **Adamus G, Chan CC** : Experimental autoimmune uveitides : multiple antigens, diverse diseases. *Int Rev Immunol* 21 : 209—229, 2002.
- 19) 白井正彦 : 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎の発症機序について. Interphotoreceptor retinoid-binding protein を抗原とした実験モデルを中心に. *日眼会誌* 96 : 1580—1607, 1992.
- 20) **Luna JD, Chan CC, Derevanik NL, Mahlow J, Chiu C, Peng B, et al** : Blood-retinal barrier (BRB) breakdown in experimental autoimmune uveoretinitis : comparison with vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1 beta-mediated breakdown. *J Neurosci Res* 49 : 268—280, 1997.
- 21) **Ohta K, Yamagami S, Wiggert B, Dana MR, Streilein JW** : Chemokine gene expression in iris-ciliary body during experimental autoimmune uveoretinitis. *Curr Eye Res* 24 : 451—457, 2002.
- 22) **Dick AD, Forrester JV, Liversidge J, Cope AP** : The role of tumour necrosis factor(TNF-alpha) in experimental autoimmune uveoretinitis(EAU). *Prog Retin Eye Res* 23 : 617—637, 2004.
- 23) **Cravens PD, Lipsky PE** : Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. *Immunol Cell Biol* 80 : 497—505, 2002.
- 24) **Yano A, Schwartz RH, Paul WE** : Antigen presentation in the murine T-lymphocyte proliferative response. I. Requirement for genetic identity at the major histocompatibility complex. *J Exp Med* 146 : 828—843, 1977.
- 25) **Glimcher LH, Kim KJ, Green I, Paul WE** : Ia antigen-bearing B cell tumor lines can present protein antigen and alloantigen in a major histocompatibility complex-restricted fashion to antigen-reactive T cells. *J Exp Med* 155 : 445—459, 1982.
- 26) **McAdam AJ, Schweitzer AN, Sharpe AH** : The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4⁺ and CD8⁺T cells. *Immunol Rev* 165 : 231—247, 1998.
- 27) **Okada AA, Keino H, Suzuki J, Sakai J, Usui M, Mizuguchi J** : Kinetics of intraocular cytokines in the suppression of experimental autoimmune uveoretinitis by type I IFN. *Int Immunol* 10 : 1917—1922, 1998.
- 28) **Jiang HR, Lumsden L, Forrester JV** : Macrophages and dendritic cells in IRBP-induced experimental autoimmune uveoretinitis in B10 RIII mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 3177—3185, 1999.
- 29) **Hoey S, Grabowski PS, Ralston SH, Forrester JV, Liversidge J** : Nitric oxide accelerates the onset and increases the severity of experimental autoimmune uveoretinitis through an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol* 159 : 5132—5142, 1997.
- 30) **Nussenblatt RB, Kuwabara T, de Monasterio FM, Wacker WB** : S-antigen uveitis in primates. A new model for human disease. *Arch Ophthalmol* 99 : 1090—1092, 1981.
- 31) **Chan CC, Mochizuki M, Palestine AG, BenEzra D, Gery I, Nussenblatt RB** : Kinetics of T-lymphocyte subsets in the eyes of Lewis rats with experimental autoimmune uveitis. *Cell Immunol* 96 : 430—434, 1985.
- 32) 土方 聡, 坂井潤一, 白井正彦, 仙道富士郎 : 抗好中球抗体による実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎の抑制. *あたらしい眼科* 11 : 1291—1296, 1994.
- 33) **Usui M, Matsushima T, Nakayama S, Takano S, Sakai J** : Experimental autoimmune uveoretinitis(EAU) in guineapigs following one injection of autologous retinal antigen(ARA). *Internat*

- tional Congress of Ophthalmology, 23d : 1048—1051, 1978.
- 34) 坂井潤一, 関 文治, 臼井正彦 : ヒト葡萄膜炎における網膜外節の免疫原性. 日眼会誌 83 : 1179—1190, 1979.
 - 35) Sakai J, Seki F, Mitsuhashi M, Usui M. Leukocyte migration inhibition test (LMIT) in Behçet's disease with retinal soluble antigens. Third international symposium on the immunology and immunopathology of the eye : 294—297, 1985.
 - 36) Yamamoto JH, Minami M, Inaba G, Masuda K, Mochizuki M : Cellular autoimmunity to retinal specific antigens in patients with Behçet's disease. Br J Ophthalmol 77 : 584—589, 1993.
 - 37) Lee KH, Chung HS, Kim HS, Oh SH, Ha MK, Baik JH, et al : Human alpha-enolase from endothelial cells as a target antigen of anti-endothelial cell antibody in Behçet's disease. Arthritis Rheum 48 : 2025—2035, 2003.
 - 38) 嶋田孝吉, 矢尾板英夫, 鹿野信一 : Behçet 病患者房水中の白血球遊走活性. 日眼会誌 75 : 2100—2105, 1971.
 - 39) Sakane T, Takeno M, Suzuki N, Inaba G : Behçet's disease. N Engl J Med 341 : 1284—1291, 1999.
 - 40) 浅越康助, 笹田昌孝 : 病態形成と好中球機能異常. リウマチ科 17 : 578—581, 1997.
 - 41) 下山義博, 丘野光洋, 永渕裕子, 鈴木 登, 坂根剛 : ペーチェット病患者好中球における自発的サイトカイン産生. 炎症 20 : 157—164, 2000.
 - 42) Sonoda KH, Inaba S, Ariyama A, Kawano YI, Saniabadi A, Ishibashi T : Therapeutic neutrophil apheresis in patients with ocular Behçet disease. Arch Ophthalmol 123 : 267—269, 2005.
 - 43) Takeuchi M, Yokoi H, Tsukahara R, Sakai J, Usui M : Differentiation of Th 1 and Th 2 cells in lymph nodes and spleens of mice during experimental autoimmune uveoretinitis. Jpn J Ophthalmol 45 : 463—469, 2001.
 - 44) Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD, Mosmann TR : Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th 1 and Th 2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. J Exp Med 166 : 1229—1244, 1987.
 - 45) Caspi RR, Silver PB, Chan CC, Sun B, Agarwal RK, Wells J, et al : Genetic susceptibility to experimental autoimmune uveoretinitis in the rat is associated with an elevated Th 1 response. J Immunol 157 : 2668—2675, 1996.
 - 46) Tarrant TK, Silver PB, Chan CC, Wiggert B, Caspi RR : Endogenous IL-12 is required for induction and expression of experimental autoimmune uveitis. J Immunol 161 : 122—127, 1998.
 - 47) Sun B, Rizzo LV, Sun SH, Chan CC, Wiggert B, Wilder RL, et al : Genetic susceptibility to experimental autoimmune uveitis involves more than a predisposition to generate a T helper-1-like or a T helper-2-like response. J Immunol 159 : 1004—1011, 1997.
 - 48) Keino H, Takeuchi M, Kezuka T, Yamakawa N, Tsukahara R, Usui M : Chemokine and chemokine receptor expression during experimental autoimmune uveoretinitis in mice. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 241 : 111—115, 2003.
 - 49) Sawada S, Suzuki G, Kawase Y, Takaku F : Novel immunosuppressive agent, FK 506. *In vitro* effects on the cloned T cell activation. J Immunol 139 : 1797—1803, 1987.
 - 50) Hatanaka H, Kino T, Asano M, Goto T, Tanaka H, Okuhara M : FK-506 related compounds produced by Streptomyces tsukubaensis No. 9993. J Antibiot 42 : 620—622, 1989.
 - 51) Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataramman R, Jain A : FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. Lancet 2 : 1000—1004, 1989.
 - 52) Kawashima H, Fujino Y, Mochizuki M : Effects of a new immunosuppressive agent, FK 506, on experimental autoimmune uveoretinitis in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 29 : 1265—1271, 1988.
 - 53) Mochizuki M, Masuda K, Sakane T, Inaba G, Ito K, Kogure M, et al : A multicenter clinical open trial of FK 506 in refractory uveitis, including Behçet's disease. Japanese FK 506 Study Group on Refractory Uveitis. Transplant Proc 23 : 3343—3346, 1991.
 - 54) Sakurai E, Nozaki M, Okabe K, Kunou N, Kimura H, Ogura Y : Scleral plug of biodegradable polymers containing tacrolimus (FK 506) for experimental uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 44 : 4845—4852, 2003.
 - 55) Ishikawa T, Hokama H, Katagiri Y, Goto H, Usui M : Effects of intravitreal injection of tacrolimus (FK 506) in experimental uveitis. Curr Eye Res 30 : 93—101, 2005.
 - 56) Oh-i K, Keino H, Goto H, Yamakawa N, Murase K, Usui Y, et al : Intravitreal injection of Tacrolimus (FK 506) suppresses ongoing experimental autoimmune uveoretinitis in Rats. Br J Ophthalmol 91 : 237—242, 2007.
 - 57) Sanui H, Redmond TM, Kotake S, Wiggert B, Hu LH, Margalit H, et al : Identification of an immunodominant and highly immunopathogenic determinant in the retinal interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP). J Exp Med 169 : 1947—1960, 1989.
 - 58) Ma X, Trinchieri G : Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells. Adv Immunol 79 : 55—92, 2001.
 - 59) Moser M, Murphy KM : Dendritic cell regulation of TH 1-TH 2 development. Nat Immunol 1 : 199—205, 2000.

- 60) **Yokoi H, Kato K, Kezuka T, Sakai J, Usui M, Yagita H, et al** : Prevention of experimental autoimmune uveoretinitis by monoclonal antibody to interleukin-12. *Eur J Immunol* 27 : 641—646, 1997.
- 61) **Merwe PAvd, Davis SJ** : Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol* 21 : 659—684, 2003.
- 62) **Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH** : The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23 : 515—548, 2005.
- 63) **Fukai T, Okada AA, Sakai J, Kezuka T, Keino H, Usui M, et al** : The role of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 in mice with experimental autoimmune uveoretinitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237 : 928—933, 1999.
- 64) **Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, et al** : ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397 : 263—266, 1999.
- 65) **Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, et al** : T-cell co-stimulation through B7 RP-1 and ICOS. *Nature* 402 : 827—832, 1999.
- 66) **Usui Y, Akiba H, Takeuchi M, Kezuka T, Takeuchi A, Hattori T, et al** : The role of the ICOS/B7 RP-1 T-cell costimulatory pathway in murine experimental autoimmune uveoretinitis. *Eur J Immunol* 36 : 3071—3081, 2006.
- 67) **Sakaguchi S** : Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6 : 345—352, 2005.
- 68) **Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M** : Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains(CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155 : 1151—1164, 1995.
- 69) **Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G** : Ex vivo isolation and characterization of CD4⁺CD25⁺T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193 : 1303—1310, 2001.
- 70) **Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA** : CD4⁺CD25⁺ high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167 : 1245—1253, 2001.
- 71) **Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, et al** : Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 109 : 131—140, 2002.
- 72) **Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA** : Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199 : 971—979, 2004.
- 73) **Bagavant H, Thompson C, Ohno K, Setiady Y, Tung KS** : Differential effect of neonatal thymectomy on systemic and organ-specific autoimmune disease. *Int Immunol* 14 : 1397—1406, 2002.
- 74) **Takeuchi M, Keino H, Kezuka T, Usui M, Taguchi O** : Immune responses to retinal self-antigens in CD25(+)CD4(+)regulatory T-cell-depleted mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 1879—1886, 2004.
- 75) **Streilein JW, Takeuchi M, Taylor AW** : Immune privilege, T-cell tolerance, and tissue-restricted autoimmunity. *Hum Immunol* 52 : 138—143, 1997.
- 76) **Kaplan HJ** : Immune response to immunization via the anterior chamber of the eye. *J Immunol* 118 : 809—814, 1977.
- 77) **Streilein JW** : Immune regulation and the eye : a dangerous compromise. *FASEB J* 1 : 199—208, 1987.
- 78) **Wilbanks GA, Streilein JW** : Macrophages capable of inducing anterior chamber associated immune deviation demonstrate spleen-seeking migratory properties. *Reg Immunol* 4 : 130—137, 1992.
- 79) **Streilein JW** : Ocular immune privilege : therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat Rev Immunol* 3 : 879—889, 2003.
- 80) **Hara Y, Caspi RR, Wiggert B, Dorf M, Streilein JW** : Analysis of an in vitro-generated signal that induces systemic immune deviation similar to that elicited by antigen injected into the anterior chamber of the eye. *J Immunol* 149 : 1531—1538, 1992.
- 81) **Granstein RD, Staszewski R, Knisely TL, Zeira E, Nazareno R, Latina M, et al** : Aqueous humor contains transforming growth factor-beta and a small(less than 3500 daltons) inhibitor of thymocyte proliferation. *J Immunol* 144 : 3021—3027, 1990.
- 82) **Cousins SW, McCabe MM, Danielpour D, Streilein JW** : Identification of transforming growth factor-beta as an immunosuppressive factor in aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32 : 2201—2211, 1991.
- 83) **Stone RA, McGlenn AM** : Calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerves in human and rhesus monkey eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29 : 305—310, 1988.
- 84) **Wang F, Millet I, Bottomly K, Vignery A** : Calcitonin gene-related peptide inhibits interleukin 2 production by murine T lymphocytes. *J Biol Chem* 267 : 21052—21057, 1992.
- 85) **Taylor AW, Streilein JW, Cousins SW** : Immunoreactive vasoactive intestinal peptide contributes to the immunosuppressive activity of normal aqueous humor. *J Immunol* 153 : 1080—1086, 1994.
- 86) **Taylor AW, Streilein JW, Cousins SW** : Identifi-

- cation of alpha-melanocyte stimulating hormone as a potential immunosuppressive factor in aqueous humor. *Curr Eye Res* 11 : 1199—1206, 1992.
- 87) **Takeuchi M, Alard P, Streilein JW** : TGF-beta Promotes Immune Deviation by Altering Accessory Signals of Antigen-Presenting Cells. *J Immunol* 160 : 1589—1597, 1998.
- 88) **Takeuchi M, Kosiewicz MM, Alard P, Streilein JW** : On the mechanisms by which transforming growth factor-beta 2 alters antigen-presenting abilities of macrophages on T cell activation. *Eur J Immunol* 27 : 1648—1656, 1997.
- 89) **Keino H, Kezuka T, Takeuchi M, Yamakawa N, Hattori T, Usui M** : Prevention of Experimental Autoimmune Uveoretinitis by Vasoactive Intestinal Peptide. *Arch Ophthalmol* 122 : 1179—1184, 2004.
- 90) **Kezuka T, Takeuchi M, Keino H, Usui Y, Takeuchi A, Yamakawa N, et al** : Peritoneal Exudate Cells Treated with Calcitonin Gene-Related Peptide Suppress Murine Experimental Autoimmune Uveoretinitis via IL-10. *J Immunol* 173 : 1454—1462, 2004.
- 91) **Torii H, Hosoi J, Beissert S, Xu S, Fox FE, Asahina A, et al** : Regulation of cytokine expression in macrophages and the Langerhans cell-like line XS 52 by calcitonin gene-related peptide. *J Leukoc Biol* 61 : 216—223, 1997.
-

Comment : 大野 重昭

白井正彦教授は過去 35 年以上にわたり、一貫してぶどう膜網膜疾患の基礎研究、および臨床研究に従事してこられた日本を代表する世界的な研究者、そして臨床家である。その基礎研究分野では、若い頃にフランスに留学され、パリのオテルデュで de Kozak 教授とともに実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) の先駆的な実験を行い、世界に向けて発表された。一方、臨床研究でも Behçet 病や原田病をはじめ、日本に多発する内眼炎やぶどう膜網膜炎の病態解明、新規治療法の開発に取り組んでこられた。白井教授が並みのぶどう膜炎研究者と一番異なる点は、ご自身が卓越した網膜硝子体サージャンであり、ぶどう膜網膜疾患の治療にも常に手術治療を念頭においていることである。これは我々日本の眼炎症研究者が世界に誇るべきことである。

したがって、今回の特別講演ではそのライフワークのお仕事の成果を EAU のトランスレーショナルリサーチとして集大成され、私ども日本眼科学会会員に 21 世紀の分子免疫学の最新の知見を大変わかりやすく講演していただいた。その骨子はマウスの EAU を用いて詳細な分子免疫学的解析を行い、その成果を日本に多発する難治の Behçet 病に応用するという、大変夢のある、しかも近未来の Behçet 病治療戦略に直結するすばらしい講演であった。

とくに白井教授は EAU の新しい治療戦略として、① 本邦で開発された免疫抑制薬タクロリムスの硝子体内投与、② 抗 IL-12 抗体や補助シグナル阻害物質の投与、そして③ 制御性免疫細胞の活性化や促進、という 3 つの新データを世界に先駆けて報告された。これらの成績はいずれも免疫学の世界では現在最もホットなトピックスとして検討されているテーマばかりである。眼免疫学の研究でも、他の領域に伍してこのような最先端の研究が着実に進められていることは非常にうれしい限りである。おそらくは診療業務で超多忙な東京医科大学の眼科スタッフが、白井教授の陣頭指揮のもと、いつどのように実験する時間を見つけてこのような世界の最先端を行く基礎研究、臨床研究を行っておられるのか、本当に不思議であり、また頭の下がる思いでいっぱいである。

臨床、診療、手術、さらには学問、研究、教育などの日常業務以外でも、白井教授はあの誠実な独特のお人柄でいつも医療事故への対処や対外処理を一手に引き受けておられる。今後とも、ぶどう膜網膜炎で失明の恐怖におののいている世界中の多くの患者のために、トランスレーショナルリサーチを常に念頭におかれ、一層の臨床、研究に邁進していただきたいと心から願うものである。