

マウス毛様体色素上皮細胞による活性化 T 細胞抑制

杉田 直¹⁾, 二神 百合¹⁾, 堀江真太郎¹⁾, 油谷 浩幸²⁾, 望月 學¹⁾

¹⁾東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科眼科学教室,

²⁾東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス部門

要 約

目 的：眼色素上皮細胞は活性化 T 細胞を制御する性質をもつ。培養虹彩色素上皮や網膜色素上皮は T 細胞を抑制すると報告されているが、解剖学的にこれらと中間に位置する毛様体色素上皮 (CBPE) の免疫学的機能については不明である。本研究では、その CBPE の機能、特に活性化 T 細胞抑制について検討した。

方 法：正常 C57BL/6 マウスより CBPE と他の眼色素上皮細胞を樹立した。CBPE の T 細胞抑制能は細胞増殖試験、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) により検討した。他の眼色素上皮細胞との相違を、形態、細胞増殖能、マイクロアレイを用いた遺伝子発現にて比較検討した。

結 果：CBPE は有意に活性化 T 細胞を抑制していた。対照色素上皮細胞と比べて CBPE は細胞増殖能が強く、比較的早期にメラニン色素が消失し、敷石状の配列を示した。対照細胞と比較して、一部を除いてほとんど発現遺伝子は類似していた。

結 論：CBPE は強い活性化 T 細胞抑制機能をもつ。CBPE を含む眼内色素上皮細胞は眼の免疫抑制機構の中で重要な役割を担っていると考えられた。(日眼会誌 111 : 598—605, 2007)

キーワード：毛様体, 眼色素上皮細胞, T 細胞, 抑制

Murine Ciliary Body Pigment Epithelial Cells Inhibit Activation of T cells

Sunao Sugita¹⁾, Yuri Futagami¹⁾, Shintaro Horie¹⁾
Hiroyuki Aburatani²⁾, and Manabu Mochizuki¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology & Visual Science, Tokyo Medical and Dental University Graduate School of Medicine

²⁾Genome Science Division, Research Center for Advanced Science and Technology, University of Tokyo

Abstract

Purpose : Pigment epithelial (PE) cells cultured from the eye possess the novel property of suppressing T cells *in vitro*. Although cultured iris PE (IPE) and retinal PE (RPE) achieve suppression, the function of ciliary body PE (CBPE) is still unknown. We investigated whether CBPE can suppress the activation of T cells *in vitro*.

Methods : CBPE, IPE and RPE cells (controls) were established from normal C57BL/6 mice. T-cell activation was assessed by proliferative response and cytokine production, by ELISA. The expression of candidate genes on ocular PE was evaluated with oligonucleotide microarray, and PE proliferation and PE morphology were also evaluated.

Results : CBPE significantly suppressed T cell activation *in vitro*. Cell division of CBPE was much greater than in other PE, and the cells were confluent from an early phase. Microarray analysis showed that the expression of candidate genes in CBPE is similar to the expression in other PE cells.

Conclusions : CBPE fully suppress T cell activation. Thus, ocular pigment epithelial cells display inhibitory function in the immune privileged site. Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 111 : 598—605, 2007)

Key words : Ciliary body, Pigment epithelial cells, T cells, Suppression

I 緒 言

眼は全身から隔絶された特殊な免疫機構を有する 'Im-

mune privilege site' であると考えられている。この特殊な機構のため炎症や外来性抗原などから守られ、眼の透明性が維持されていると考えられている。この Im-

別刷請求先 : 113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45 東京医科歯科大学眼科学教室 杉田 直

(平成 18 年 12 月 22 日受付, 平成 19 年 2 月 8 日改訂受理) E-mail : sunaph@tmd.ac.jp

Reprint requests to : Sunao Sugita, M.D. Department of Ophthalmology & Visual Science, Tokyo Medical and Dental University Graduate School of Medicine, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

(Received December 22, 2006 and accepted in revised form February 8, 2007)

mune privilege を保持する調節機構に神経提細胞由来の眼色素上皮が深く関与している。この眼色素上皮は虹彩、毛様体、網膜の一連の連続する有色素上皮層で構成される。近年、眼色素上皮が T 細胞を抑制すること、特に虹彩色素上皮 (iris pigment epithelial cells : IPE) が細胞表面分子を利用して T 細胞を抑制し、さらに、網膜色素上皮 (retina pigment epithelial cells : RPE) が細胞表面分子に加えて可溶性分子によって T 細胞を抑制するということが報告されている^{1)~4)}。我々は、その眼色素上皮細胞を用いた抑制機構の分子機構を解明することを目的とし、眼色素上皮細胞と T 細胞の相互作用を免疫学的に解析した。前眼部に位置する IPE に構成的に発現されている副刺激分子 (co-stimulatory molecules) の B7-2 (CD86) が、活性化 T 細胞上の cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) に抑制シグナルを入れ、直接的に抑制していることを報告した^{5)~8)}。一方、後眼部に位置する RPE は、細胞接触だけではなく抑制性のサイトカインを産生することで、活性化 T 細胞を抑制していた⁹⁾。本研究では、解剖学的には IPE と RPE の中間に位置する毛様体色素上皮細胞 (ciliary body pigment epithelial cells : CBPE) が IPE や RPE と同様に、活性化 T 細胞抑制能を有するか、また、他の眼色素上皮細胞との違いを、形態観察、細胞増殖能、遺伝子発現で比較検討したので報告する。

II 方 法

実験マウスの取り扱いには東京医科歯科大学動物実験委員会の承認に基づき行った。毛様体色素上皮細胞 (ciliary body pigment epithelial cells : CBPE) は、正常の C57BL/6 マウス (オス, 6~8 週, 日本クレア社) から眼球を摘出し、虹彩組織を取り出し、残りの前眼部組織から強膜とともに毛様体組織を切除し、酵素処理して 2 週間特殊な培地 (RPMI 1640, 10 mM HEPES, 0.1 mM nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10% fetal bovine serum (FBS) and 1×10^{-5} M 2-ME) で培養した。樹立した培養 CBPE を抗サイトケラチン抗体 (Clone P-CK-26, Sigma, MO, USA) を用いてフローサイトメトリーにより解析し、その 97% が陽性で色素上皮細胞であることを確認した。対照の眼色素上皮細胞として、虹彩色素上皮細胞 (iris pigment epithelial cells : IPE) と網膜色素上皮細胞 (retinal pigment epithelial cells : RPE) を用いた。これらの色素上皮細胞は培養用プレートで最長 2~3 週間培養し、継代せずに実験に使用した。

標的細胞となる活性化 T 細胞の樹立は以下の方法を用いた。C57BL/6 マウスの脾臓から脾細胞を取り出し、T 細胞分離カラム (MACS T cell isolation kits, 第一化学薬品) を用いて CD3 陽性 T 細胞 (pan-T cells), CD4 陽性 T 細胞 (CD4⁺ T cells), CD8 陽性 T 細胞 (CD8⁺

T cells) を採取した。これらの T 細胞を抗 CD3 抗体 (anti-mouse CD3 antibody, Clone 2C11, BD PharMingen, CA, USA) を用いて刺激し (活性化 T 細胞誘導), それぞれ樹立した CBPE と 72 時間共生培養した。また、別の方法として、mixed lymphocyte reactions (MLRs) を X 線照射した異種の脾細胞 (BALB/c マウス) と同種の脾細胞 (C57BL/6 マウス) を 96 時間共生培養することで、刺激・誘導した。これらの活性化 T 細胞はそれぞれ 96 well plate にて 2.5×10^5 cells/well の細胞数で使用した。CBPE の活性化 T 細胞抑制能の評価はサイミジン取り込み ($1 \mu\text{Ci/ml}$, cpm) による細胞増殖試験または ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) を用いた interferon (IFN)- γ 産生能 (測定キット, Biosouce, CA, USA) を用いて培養 7 日目, 14 日目, 21 日目に測定, 検討した。

CBPE 自身の細胞増殖能は、培養 7 日目, 14 日目, 21 日目の 3 回に分けてサイミジン取り込み試験 ($1 \mu\text{Ci/ml}$) にて検討した。付着している PE 細胞を剥がす目的で、0.25% トリプシン (Biowhitaker, MD, USA) 処理後に細胞を回収し、セルハーベスターにて測定した。なお、対照の色素上皮 (PE) 細胞には IPE を用いた。

CBPE の細胞形態は、培養 7 日目, 14 日目, 21 日目の 3 回に分けて培養し、カルチャースライド内 (cell culture slide, BD Biosciences, CA, USA) で培養し、光学顕微鏡を用いて観察した。また、対照の PE 細胞には IPE を用いた。

マイクロアレイは以下の方法を用いて検討した。それぞれ 3 種類の眼色素上皮細胞 (CBPE, IPE, RPE) から RNA を抽出し、電気泳動にて total RNA の量と質を確認した。その後ビオチンラベル化した cDNA プロブの作製, cDNA を合成, ビオチンラベル化した cDNA プロブとアレイ (Mouse genome 430 2.0, Affymetrix instruction ; CA, USA) 上に固定された cDNA をハイブリダイズした。cDNA チップをスキャナーで読み、デジタル化したイメージの解析を行った。それぞれのサンプル間 (CBPE 対 IPE, CBPE 対 RPE) で各遺伝子発現量比を検出した。これらのマイクロアレイのデータは GEO public database に登録した (Accession number : GSE5134)。

III 結 果

1. 毛様体色素上皮細胞の *in vitro* における活性化 T 細胞抑制能

抗 CD3 抗体を用いたマウス活性化 T 細胞の細胞増殖反応を、CBPE は *in vitro* において強く抑制した (図 1 A)。対照の眼色素上皮細胞 (IPE, RPE) でも抑制作用は認められたが、CBPE に比べて、培養 7 日目の比較的早期の抑制作用は弱かった。対照の眼色素上皮細胞は培養 14 日目, 21 日目の培養中期から後期に強く抑制した

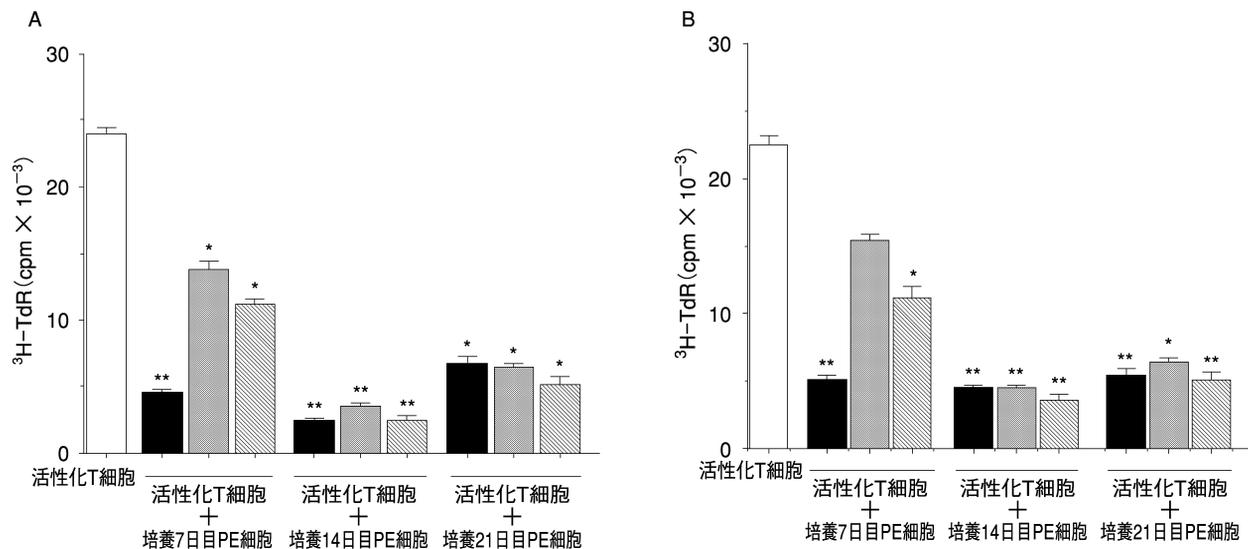


図1 *In vitro*における毛様体色素上皮細胞(CBPE)のT細胞抑制能。

ターゲットの活性化T細胞は(A)T細胞に抗CD3抗体(anti-mouse CD3 antibody: 1 μg/ml)を加えて72時間で刺激・誘導したもの、(B)Mixed lymphocyte reactions(MLRs)はX線照射した異種の脾細胞(BALB/cマウス)と同種の脾細胞(C57BL/6マウス)を96時間共生培養することで、刺激・誘導したものを使用した。3種類それぞれの眼色素上皮細胞〔CBPE、虹彩色素上皮細胞(IPE)、網膜色素上皮細胞(RPE)〕の活性化T細胞抑制は細胞増殖試験で評価した。白色の棒グラフは活性化T細胞(PE細胞なし)で陽性コントロールとして使用し、他の結果と有意差検定を行った。

□: PE細胞なし, ■: CBPE細胞, ▒: IPE細胞, ▨: RPE細胞. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.005$ (t検定)。

(図1A)。また、mixed lymphocyte reactions(MLRs)を用いて誘導した活性化T細胞でも同様に、CBPEは培養の早い時期(培養7日目)から強い抑制を示した(図1B)。この強い抑制は培養中期～後期になっても維持されていた。これらの結果より、CBPEは他の眼色素上皮細胞と同様強い活性化T細胞抑制能をもつことが明らかとなった。次に、抗マウスCD3抗体を用いた活性化T細胞の産生するサイトカインの変化について検討した。測定したサイトカインはTh1サイトカインのIFN-γで、図2に示すように、CBPEは活性化T細胞の産生するTh1サイトカインを有意に抑制していた。これらはいずれの培養時期のCBPEでも有意にサイトカイン産生抑制を示していた。

図3に示すように、培養14日目にCBPEを回収し、single cellにして、細胞数依存的に抗CD3抗体で処理したT細胞に加えたところ、5,000個以上のCBPE細胞に依存して有意な活性化T細胞抑制作用を示した(図3A)。次に、CBPEが抑制するT細胞のphenotypeを検討した。CBPEは、CD8陽性活性化T細胞(図3C)よりもCD4陽性活性化T細胞(図3B)を少ない細胞数で有意に抑制していた。

2. 毛様体色素上皮細胞の*in vitro*における細胞分裂能

CBPEは他の色素上皮細胞より培養早期から強いT細胞抑制能を示していたので、CBPE自体の*in vitro*における細胞分裂能について検討した。培養7日目に

は、対照のIPEと比べてCBPEはサイミジンの取り込みが有意に高かった(図4)。培養14日目、培養21日目にはCBPE自身の細胞増殖能がIPEに比べてその差が顕著になった(図4)。光学顕微鏡による形態学的検査では、培養7日目のCBPEはメラニン色素の豊富な細胞が散在し、培養14日目にはその細胞が癒合し、メラニン色素が消失していた(図5)。一方、IPEは、培養7日目ではCBPE同様の形態を示したが、培養14日目では細胞が増殖し癒合してきているがメラニン色素が豊富であった(図5)。CBPEの培養14日目には、完全に癒合(コンフルエント)細胞となり、色素を含んだ細胞は周辺部にわずかに認められる程度となった。培養14日目、培養21日目ともに敷石状配列を示し、明らかにIPEとは異なる形態を示した。

3. マイクロアレイを用いた毛様体色素上皮細胞の遺伝子発現

これまでの結果および以前のいくつかの報告から³⁵⁾⁶⁾、CBPEはIPEやRPEなどの他の色素上皮細胞と比べて*in vitro*で多少異なる機能を有している可能性が考えられたので、マイクロアレイ法を用いて、CBPEと対照のPE細胞との遺伝子レベルでの発現の違いがあるかどうかを検討した。培養14日目のCBPE、IPE、RPEのRNAを抽出し、Mouse GeneChip® (Mouse genome 430 2.0)にビオチンラベル化したcRNAを結合させ、蛍光染色後、シグナル検出、データ解析を行った。まず、総遺伝子約45,100の中で、シグナル値が有意な値

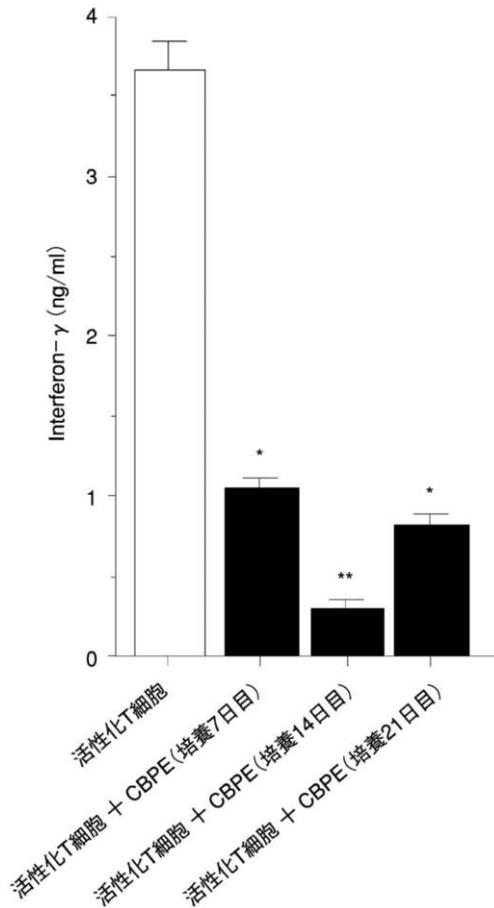


図 2 毛様体色素上皮細胞(CBPE)の T 細胞サイトカイン産生抑制。
 ターゲットの活性化 T 細胞は図 1 A の方法で樹立した。色素上皮(PE)細胞による抑制は活性化 T 細胞の産生するサイトカイン(48 時間培養上清)で評価した。白色の棒グラフは活性化 T 細胞(CBPE 細胞なし)で陽性コントロールを示す。* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.005$ (t 検定)。

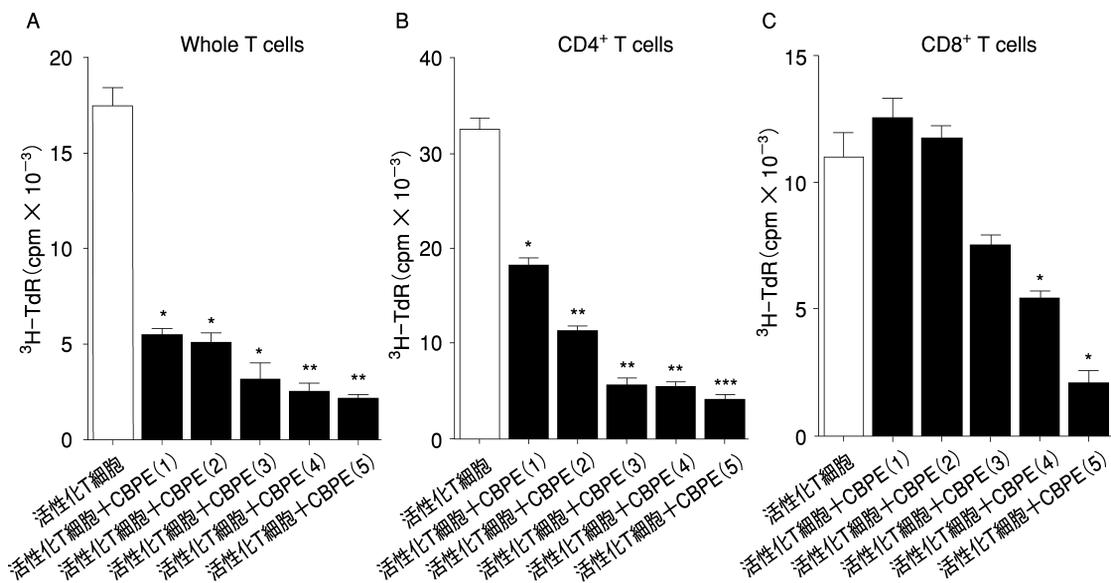


図 3 毛様体色素上皮細胞(CBPE)の細胞数依存的活性化 T 細胞抑制。

CBPE の細胞数を 5 段階に分けて活性化 T 細胞抑制能について評価した。CBPE(1)–5,000, CBPE(2)–10,000, CBPE(3)–20,000, CBPE(4)–30,000, CBPE(5)–40,000 cells/well。白色の棒グラフは活性化 T 細胞のみで、CBPE 細胞なしの陽性コントロールを示す。活性化 T 細胞は、(A) Whole T cells, (B) CD4⁺ T cells, (C) CD8⁺ T cells の 3 パターンで分離し、ターゲット T 細胞として使用した。
 * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.005$ (t 検定)。

(50以上)を示したのは、CBPEで13,999、IPEで15,073、RPEで12,069であった。以前より眼に関連があると報告がある代表的な分子で、PE細胞に有意な発現を認めた遺伝子を表1にまとめた。その代表分子の選択は既報¹⁾を参考に行った。これらの中で、免疫抑制機能をもつ代表的な分子はtransforming growth factor β

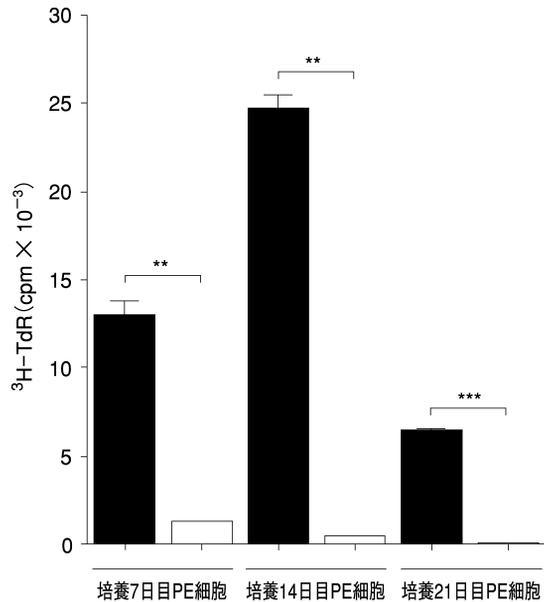


図4 毛様体色素上皮細胞(CBPE)の *in vitro* における細胞分裂能。

培養7日目、14日目、21日目にそれぞれCBPEをトリプシンにて回収し、そのCBPE自身の増殖能についてサイミジン取り込み試験にて検討した。対照にはIPEを用いた。■:CBPE細胞, □:IPE細胞。

** : $p < 0.005$, *** : $p < 0.0005$ (t検定)。

(TGF β)1~3, latent TGF β binding protein-2,3,4 (LAP-2,3,4), TGF β レセプター I~III (TGF β RI~III), トロンボスポンジン(TSP-1, TSP-2)とそのレセプター(CD47=IAP), 前房水で同定され免疫抑制機能をもつとされる神経ペプチド系では calcitonin gene-related peptide(CGRP)のみが発現していたが、 α -melanostimulating hormone(α -MSH), vaso-active intestinal peptide(VIP), somatostatinなどは発現していなかった。また眼内の補体調節分子ではCD59 aだけが発現しており、NK活性抑制作用がある macrophage migration inhibitory factor(MIF)も高いシグナル値を示した。マウスIPEで発現があるCD86やCD80の副刺激分子は、その発現はあるもののシグナル値のレベルは低かった。また、眼内炎症抑制機構で重要とされるCD95 ligand(CD95 L, FasL)はPE細胞では発現はしていなかった。上記に示した多くの抑制性分子の発現の強さは3種類のPE細胞間で有意な差はなく、いずれも高いシグナル値を示していた。サイトカイン系では、interleukin(IL)-6, IL-18, interleukin 1 receptor antagonist(IL-1 Ra)などわずかしか発現がなかったが、サイトカインレセプターは多種類の発現が認められた(表1)。さらに、これらのPE細胞はケモカインの遺伝子発現が多数あり、炎症の抑制だけではなく、炎症の惹起にも関与している可能性が示唆された。MHCに関しては、class Iの発現はあるものの、通常の状態ではclass IIの発現はなかった。その他、細胞外マトリックス関連分子 metalloproteinase(MMPs)や tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP), a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin motif

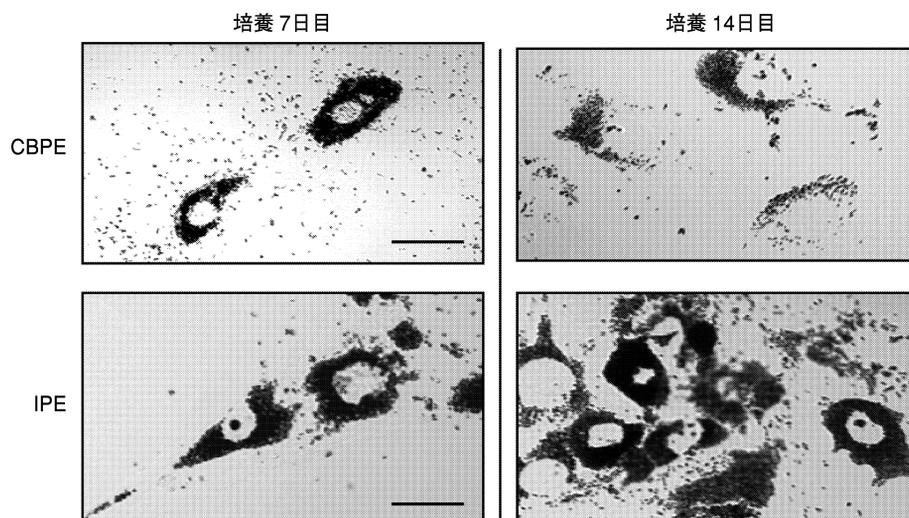


図5 毛様体色素上皮細胞(CBPE)の細胞形態の変化。

CBPEを培養7日目、14日目に顕微鏡にて観察、その対照にIPEを用いた。培養7日目のCBPEは、メラニン色素が豊富な細胞が散在し、IPEもCBPE同様の形態を示した。CBPE培養14日目にはその細胞が癒合し、メラニン色素が消失し、敷石状配列を示した(色素消失のため写真上は敷石状配列が不明瞭)。IPEは色素が豊富な細胞が残存している。写真内の横棒は、20 μm のサイズスケールを示す。

表 1 眼色素上皮細胞で高発現が認められた代表的な遺伝子のまとめ

Transforming growth factor(TGF) β 1	TGF β 2	TGF β 3
LAP*-2	LAP-3	LAP-4
TGF β receptor I	TGF β receptor II	TGF β receptor III
thrombospondin-1	thrombospondin-2	CD47
CD59 a	MIF**	CGRP***
Interleukin(IL)-6	IL-18	IL-1 receptor antagonist
IL-1 receptor	IL-4 receptor	IL-10 receptor
IL-11 receptor	IL-13 receptor	Type I IFN receptor
Interferon(IFN)- γ receptor	TNF**** receptor I	TNF receptor II
Chemokine(C-X-C)ligand 1	Chemokine(C-C)ligand 2	Chemokine(C-X-C)ligand 5
Chemokine(C-C)ligand 7	Chemokine(C-X-C)ligand 10	Chemokine(C-X-C)ligand 12
Chemokine(C-X-C)ligand 16	Histocompatibility 2, K, D, T resion(MHC-class I)	
matrix metalloproteinase(MMP)-2, 3, 11, 12, 14, 16, 19, 23, 24		
tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP)-1, 2, 3		
vascular endothelial growth factor(VEGF)-A, B, C		
a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin motif(ADAMTS)-1, 2, 5, 15		

培養 14 日目の CBPE, IPE, RPE の RNA を抽出し, Mouse GeneChip® (Mouse genome 430 2.0) にビオチンラベル化した cRNA を結合させ, 蛍光染色後, シグナル検出およびデータ解析を行った. 3 つの PE 細胞において GeneChip シグナル値が 100 以上の有意な値を示した代表的な遺伝子を提示した. *: latent transforming growth factor β binding protein, **: macrophage migration inhibitory factor, ***: calcitonin gene-related peptide, ****: tumor necrosis factor

表 2 毛様体色素上皮細胞の高発現遺伝子のまとめ: 虹彩色素上皮細胞との比較検討

probe set	accession number	遺伝子	GeneChip シグナル値		SLR*
			CBPE	IPE	
1417979_at	AF 291655	tenomodulin	1,973	1	10.0 X
1427168_a_at	AJ 131395	procollagen, type XIV, alpha 1	1,887	20	8.5 X
1448421_a_at	NM_025711	esporin	532	7	8.5 X
1446326_at	BB 150460	procollagen, type I, alpha 2	189	5	5.5 X
1418511_at	NM_019759	dermatopontin	223	5	5.2 X
1449388_at	NM_011582	thrombospondin 4	133	4	5.2 X
1456084_x_at	BB 5322202	fibromodulin	5,075	180	4.7 X
1420655_at	BB 229377	elastin	841	48	4.7 X
1415832_at	NM_007429	angiotensin II receptor, type 2	1,644	68	4.6 X
1418945_at	NM_010809	matrix metalloproteinase 3	2,585	132	4.2 X

培養 IPE と比較して CBPE に有意に高い発現があった代表的な遺伝子を示した ($p < 0.05$ and $SLR > 3.0$). Accession number はマイクロアレイにおける GenBank か TIGR database の accession number を意味している. *: Signal Log Ratio

表 3 毛様体色素上皮細胞の高発現遺伝子のまとめ: 網膜色素上皮細胞との比較検討

probe set	accession number	遺伝子	GeneChip シグナル値		SLR*
			CBPE	RPE	
1418028_at	NM_010024	dopachrome tautomerase	287	2	6.4 X
1448326_a_at	NM_013496	cellular retinoic acid binding protein I	132	3	4.3 X
1423859_a_at	AB 006361	prostaglandin D 2 synthase(brain)	1,436	107	3.5 X
1415861_at	BB 762957	tyrosinase-related protein 1	550	67	3.2 X

培養 RPE と比較して CBPE に有意に高い発現があった代表的な遺伝子を示した ($p < 0.05$ and $SLR > 3.0$). *: Signal Log Ratio

(ADAMTS)や vascular endothelial growth factor (VEGF) など血管新生に重要な分子も発現していた.

CBPE と IPE を比べると, signal log ratio(SRL; シグナル値を比べた倍率)が 3.0 以上で, かつ $p < 0.05$ の

有意差があった発現分子は 1,086 個であった. つまり両群間の遺伝子は発現があった総遺伝子中 92% が同じであり, 遺伝子レベルでの発現分子は類似していることが判明した. 表 2 に IPE と比べて CBPE で高発現であっ

た代表的な遺伝子を示す。これらの遺伝子の中で、tenomodulin (TeM), thrombospondin 4 (TSP-4), matrix metalloproteinase 3 (MMP-3)などは眼内に発現の報告がある^{10)~12)}。この中で、シグナル値が最も高かったfibromodulinはlatent TGF β binding protein同様のTGF β の活性化分子の一つとして報告がある¹³⁾。CBPEとRPEを比べると、signal log ratioが3.0以上で、かつ $p < 0.05$ の有意な差を認めた遺伝子はわずか430個であった。つまり両群間の遺伝子は発現があった総遺伝子中97%が同じであり、IPEとの比較のときと同様の結果であった。表3にRPEと比べてCBPEで高発現を認めた代表的な遺伝子のまとめを示した。これらの提示した遺伝子の3つ、tyrosinase-related protein 1 (TRP-1), dopachrome tautomerase (Dct=TSP-2), cellular retinoic acid binding protein I (CRABP I)は分化マーカーとして重要な分子で、CBPEはRPEに比べて*in vitro*にて早い時期から分化している可能性が示唆された。

IV 考 按

毛様体は、前部ぶどう膜の一部で、虹彩と脈絡膜の間に位置する環状の組織で、その表面は毛様体無色素上皮と毛様体色素上皮の2層から成る上皮により覆われている。色素上皮層は、鋸状縁から網膜色素上皮に移行し、毛様体実質は非常に豊富な血管を有し、房水産生を司るが、それらは特に無色素上皮の役割が大きいとされている。一方、有色素上皮の大きな役割の一つに炎症抑制機構の存在が示唆されている。眼内炎症時、血管を通過して侵入してきたT細胞などの炎症細胞は、毛様体色素上皮に接触するときにさまざまな抑制分子からのシグナルを受け、非活性化T細胞や抑制T細胞へと変換されていると推測されている²⁾。しかし、炎症が強い、あるいは遷延化したりすると、その抑制機構が破綻し、炎症細胞は抑制シグナルを受けないまま眼内へ侵入し、眼内という小空間で局所性炎症が成立すると考えられる。本研究では、培養毛様体色素上皮細胞(CBPE)は、*in vitro*において強い活性化T細胞抑制能を有することを明らかにした。CBPEは活性化T細胞のTh1サイトカインのIFN γ 産生能や細胞増殖能を抑制し、炎症の惹起、増悪に最も重要とされるヘルパーT細胞のTh1細胞を特に強く抑制していることが示された。これらは眼局所での炎症の抑制に寄与すると考えられる。今回の結果と既報^{1)~9)}から総合的に考えると、虹彩、毛様体、網膜の一連の連続するこれらの有色素上皮層で構成される眼色素上皮層は、炎症細胞から眼組織を守る働きをもっていると推察される。

近年、虹彩色素上皮が細胞表面分子を利用して活性化T細胞を抑制し、網膜色素上皮は細胞接触に加えて可溶性分子を産生することでT細胞を抑制するというこ

とが報告されている^{1)~4)}。解剖学的にはこれらの中間に位置する毛様体色素上皮は、T細胞抑制機能は虹彩色素上皮と網膜色素上皮の両面をもつが³⁾、遺伝子レベルで構成的な発現分子をみると両者に非常に似ていることが今回の解析で判明した。しかし、*in vivo*で3つの色素上皮を観察しても形態的に異なり、さらにprimary cultureすると形態だけではなく、細胞分裂能や抑制能などが異なっていることが判明した。対照の細胞と比べてCBPE自身の増殖能が強く、比較的早い時期から分化・増殖する能力があると考えられた。

マイクロアレイで毛様体色素上皮と他の眼色素上皮の発現遺伝子を比較すると、毛様体色素上皮で高発現を示す分子は、他の眼色素上皮細胞でも同様に高値を示した。主な分子をみてみると、従来いわれているように、免疫抑制分子、サイトカインレセプター、ケモカイン、血管新生抑制因子などが高発現していた。TGF β やTSP-1(TGF β 活性分子)は免疫抑制分子だけではなく血管新生抑制としても重要で、眼色素上皮細胞が産生するこれらの分子は眼内抑制機構で大切な役割を担っていると推測される。一方、TGF β やTSP-1は眼圧上昇効果も認め¹⁴⁾¹⁵⁾、炎症時では炎症抑制および高眼圧の二面性に関与していることが示唆される。興味深いことに、眼色素上皮細胞はいずれもケモカインの構成的な発現があり、炎症細胞を局所へ遊走、集積させているという抑制とは対極的作用も機能としてもっている可能性が考えられる。実際、網膜色素上皮がmonocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)やIL-8などの炎症に重要なケモカインを産生し、炎症の惹起や増殖膜形成に関与しているという報告がある¹⁶⁾。

以上まとめると、本研究により培養した毛様体色素上皮細胞が活性化T細胞を抑制すること、対照細胞と比べて細胞分化・増殖能が強いこと、形態観察では早期メラニン色素が消失し敷石状の配列を示していること、他の眼内色素上皮細胞と発現遺伝子は類似していることなどが明らかになった。

文 献

- 1) Streilein JW : Ocular Immune Privilege : Therapeutic opportunities from an experiment of nature. Nat Rev Immunol 3 : 879-889, 2003.
- 2) Yoshida M, Takeuchi M, Streilein JW : Participation of pigment epithelium of iris and ciliary body in ocular immune privilege. 1. Inhibition of T-cell activation *in vitro* by direct cell-to-cell contact. Invest Ophthalmol Vis Sci 41 : 811-82, 2000.
- 3) Ishida K, Panjwani N, Cao Z, Streilein JW : Participation of pigment epithelium of iris and ciliary body in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina

- suppress T cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Ocul Immunol Inflamm* 11 : 91—105, 2003.
- 4) **Zamiri P, Masli S, Kitaichi N, Taylor AW, Streilein JW** : Thrombospondin plays a vital role in the immune privilege of the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 908—919, 2005.
 - 5) **Sugita S, Streilein JW** : Iris pigment epithelium expressing CD86 (B7-2) directly suppresses T cell activation *in vitro* via binding to CTLA-4. *J Exp Med* 198 : 161—171, 2003.
 - 6) **Sugita S, Ng TF, Schwartzkopff J, Streilein JW** : CTLA-4⁺ CD8⁺ T cells that encounter B7-2⁺ iris pigment epithelial cells express their own B7-2 to achieve global suppression of T cell activation. *J Immunol* 172 : 4184—4194, 2004.
 - 7) **Sugita S, Ng TF, Lucus PJ, Gress RE, Streilein JW** : B7⁺ iris pigment epithelium (IPE) induce CD8⁺ T cells regulatory ; both suppress CTLA-4⁺ T cells. *J Immunol* 176 : 118—127, 2006.
 - 8) **Sugita S, Keino H, Futagami Y, Mochizuki M, Stein-Streilein J, Streilein JW** : B7⁺ iris pigment epithelial cells convert T cells into CTLA-4⁺, B7-expressing CD8⁺ regulatory T cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 5376—5384, 2006.
 - 9) **Sugita S, Futagami Y, Smith SB, Naggar H, Mochizuki M** : Retinal and ciliary body pigment epithelium suppress activation of T lymphocytes via transforming growth factor beta. *Exp Eye Res* 83 : 1459—1471, 2006.
 - 10) **Oshima Y, Shukunami C, Honda J, Nishida K, Tashiro F, Miyazaki J, et al** : Expression and localization of tenomodulin, a transmembrane type chondromodulin-I-related angiogenesis inhibitor, in mouse eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 1814—1823, 2003.
 - 11) **Carron JA, Hiscott P, Hagan S, Sheridan CM, Magee R, Gallagher JA** : Cultured human retinal pigment epithelial cells differentially express thrombospondin-1, -2, -3, and -4. *Int J Biochem Cell Biol* 32 : 1137—1142, 2000.
 - 12) **Alexander JP, Bradley JM, Gabourel JD, Acott TS** : Expression of matrix metalloproteinases and inhibitor by human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31 : 2520—2528, 1990.
 - 13) **Soo C, Hu FY, Zhang X, Wang Y, Beanes SR, Lorenz HP, et al** : Differential expression of fibromodulin, a transforming growth factor-beta modulator, in fetal skin development and scarless repair. *Am J Pathol* 157 : 423—433, 2000.
 - 14) **Fleenor DL, Shepard AR, Hellberg PE, Jacobson N, Pang IH, Clark AF** : TGFbeta 2-induced changes in human trabecular meshwork : implications for intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 226—234, 2006.
 - 15) **Flugel-Koch C, Ohlmann A, Fuchshofer R, Welge-Lussen U, Tamm ER** : Thrombospondin-1 in the trabecular meshwork : localization in normal and glaucomatous eyes, and induction by TGF-beta 1 and dexamethasone *in vitro*. *Exp Eye Res* 79 : 649—663, 2004.
 - 16) **Momma Y, Nagineni CN, Chin MS, Srinivasan K, Detrick B, Hooks JJ** : Differential expression of chemokines by human retinal pigment epithelial cells infected with cytomegalovirus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 2026—2033, 2003.
-