

第 111 回 日本眼科学会総会 宿題報告Ⅲ

眼の感染と免疫

眼炎症と自然免疫

園田 康平

九州大学大学院医学研究院眼科学分野

共同研究者

石橋 達朗

大島 裕司, 脇岡 邦明, 藤本 武, 吉村 武, 張 含, 趙 英準, 佐藤 孝太, 宮原千佳子

向野利一郎, 管原 美香, 高原三千代

畑 快右, 上野 暁史, 吉川 洋, 中村 隆彦, 吉田 茂生, 江内田 寛, 池田 康博

宮崎 勝徳, 野田 佳宏, 望月 泰敬, 他教室員一同

(九州大学大学院医学研究院眼科学分野)

園田 祥三, 山下 敏史, 内野 英輔, 坂本 泰二(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科眼科学分野)

山田 潤, 羽室 淳爾, 木下 茂(京都府立医科大学眼科)

島田 宏之, 中静 裕之, 湯沢美都子(日本大学駿河台病院眼科)

吉村 昭彦(九州大学生体防御医学研究所免疫制御学分野)

竹田 潔(大阪大学大学院医学系研究科免疫制御学)

吉田 裕樹(佐賀大学医学部分子生命科学講座)

立花 克郎(福岡大学医学部解剖学)

丸山 一雄, 鈴木 亮(帝京大学薬学部生物薬剤学)

要 約

免疫反応は大きく特異性の高い T/B リンパ球を中心とした「獲得免疫」と、特異性は低いもののより早期に反応する「自然免疫」に分類される。我々は、特にぶどう膜炎(内眼炎)および加齢黄斑変性などの脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization: CNV)を原因とする病態(本稿では脈絡膜新生血管病と呼ぶ)と自然免疫に焦点を当て研究を行った。

ぶどう膜炎患者硝子体手術で得られたサンプルで、網羅的炎症性サイトカイン・ケモカインの解析を行った。リンパ球に作用する液性因子ではなく、interleukin (IL)-6, IL-8, monocyte chemoattractant protein (MCP-1) といった好中球, マクロファージに作用するケモカインの上昇を認めた。実際のぶどう膜炎で自然免疫系細胞が重要な起炎症細胞であることが示唆された。好中球機能を活性化させるサイトカインとして、近年 IL-17 が注目されている。実験的ぶどう膜炎は、従来はもっぱら T helper (Th)1 リンパ球が媒介すると考えられてきたが、病態後期にはむしろ抗原特異的 IL-17 産生

T 細胞の関与が大きくなることが判明した。

CD1 拘束性 natural killer T (NKT) 細胞は自然免疫系を構成する多機能細胞で、生体内の糖脂質に反応して眼炎症をさまざまな形で修飾する。我々はレーザー誘導 CNV 形成における NKT 細胞の役割について検討した。NKT 細胞欠損マウスでは対照マウスと比較して眼内 vascular endothelial growth factor (VEGF) 産生が低下し、CNV 形成が阻害された。一方、NKT 細胞の人工リガンドである α -ガラクトシルセラミドを C57BL/6 マウスの硝子体腔内に投与しても、VEGF 産生と CNV 形成は抑制された。NKT 細胞は生体内リガンドでは CNV 形成を助長する一方で、人工リガンドの投与により逆に病態抑制にも作用しうることが判明した。また同じくレーザー誘導 CNV 形成において、脈絡膜血管に潜伏感染している肺炎クラミジアが、Toll-like receptor を介して網膜色素上皮細胞からの液性因子産生を誘発し、CNV 形成を促進する可能性を示した。

実際の脈絡膜新生血管病臨床病態では CNV からの出

別冊請求先: 812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1 九州大学大学院医学研究院眼科学分野 園田 康平
(平成 19 年 11 月 14 日受付, 平成 20 年 1 月 7 日改訂受理)

Reprint requests to: Koh-Hei Sonoda, M. D. Department of Ophthalmology, Graduate School of Medical Science, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-Ku, Fukuoka 821-8582, Japan

(Received November 14, 2007 and accepted in revised form January 7, 2008)

血後に生じる黄斑部の癬痕治癒過程に関与する炎症反応も重要である。加齢黄斑変性患者由来の黄斑下増殖組織には多数のマクロファージが浸潤している。そこで CNV 出血後の炎症細胞集簇を想定し、マウス腹腔滲出細胞(大部分は活性化マクロファージ)を網膜下に注入することで、網脈絡膜癬痕モデルを作製した。抗 IL-6 抗体全身投与により、本モデルの網膜癬痕は減少した。抗 IL-

6 抗体は、硝子体腔注射+局所超音波照射によりさらに病巣部に有効にデリバリーすることが可能であった。今後、生物製剤を組み合わせた癬痕化抑制治療に発展する可能性を見出した。(日眼会誌 112 : 279—298, 2008)

キーワード：自然免疫, ぶどう膜炎, 加齢黄斑変性, 網膜癬痕化, ドラッグデリバリーシステム

A Review

The Association of Ocular Inflammation and Innate Immune Response

Koh-Hei Sonoda

Department of Ophthalmology, Graduate School of Medical Science, Kyushu University

Abstract

Immune response has been divided into innate immunity and acquired immunity. We focused on the role of innate immunity during the formation of uveitis and choroidal neovascularization (CNV)-related diseases.

To carry out a comprehensive analysis of ocular inflammatory responses in patients with uveitis, vitreous fluid was analyzed using a microbead-based multiplex ELISA system. We found that cytokines which were related with innate immunity were elevated, but cytokines which were related with acquired immunity were not. We also found that the role of IL-17 was to produce Th17 cells in the chronic phase of experimental uveitis.

Next, we investigated the role of the natural killer (NK) T cells which restrict CD1 and participate in the innate immune response in laser-induced experimental CNV. We studied the CNV formation in two independent NK T cell-deficient strains of mice, CD1 knockout (KO) mice and α 18 KO mice, and found that both KO mice showed significant reduction of the effects of experimental CNV. After laser treatment, both CD1 KO mice and α 18 KO mice showed a decrease in the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in retina and cho-

roid.

Interestingly, intravitreal inoculation of α galactosylceramide (α GalCer), which is the ligand of NK T cells, inhibited CNV in C57BL/6 mice. Collectively, we conclude that NK T cells play an important role in forming CNV as one of the inducers of VEGF. Because NK T cells bear the potential to regulate immune response, α GalCer might activate NK T cells differently to produce angiostatic factors and have a therapeutic potential *in vivo*.

During the clinical process of CNV-related diseases, not only CNV formation, but also subretinal scarring is thought to be another important step. We thus established the experimental model of subretinal scarring by injecting peritoneal exudating macrophages into the subretinal space. This scarring was inhibited by inoculation of anti-IL-6 antibody and micro bubbles into the vitreous cavity following low power ultrasound treatment through the cornea. Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 112 : 279—298, 2008)

Key words : Innate immunity, Uveitis, Age-related macular degeneration, Retinal scarring, Drug deliver system

I 緒 言

眼は免疫学的に特別な機能的閉鎖臓器で、「免疫特権部位 (immune privileged site)」といわれる¹⁾。免疫特権は、そもそも生体が備えた自己防御機構である。通常の免疫炎症反応が起こってはかえって組織障害・機能障害が強くなるような臓器で、その機能を守るために存在する恒常性維持機構と解釈できる。しかしいったん限度を超えた炎症が起こると、免疫特権機構は失われ、まるで

ボールが坂道を転がり落ちるように眼炎症は増悪する。過剰な炎症は視機能障害に直結する。一度ダメージを受けた眼組織は、その機能回復が困難である。眼の免疫炎症反応をよりよくコントロールするためには、以上の眼の特殊性を念頭に置く必要がある。

免疫反応は大きく T リンパ球を中心とした「獲得免疫」と、より早期に反応する「自然免疫」に分類される(表 1)。前者は高等生物でのみみられるが、後者はあらゆる生物に共通する根幹的免疫系であり、①感染防御

表 1 自然免疫と獲得免疫

	自然免疫	獲得免疫
存在する種	無脊椎動物～脊椎動物まで	脊椎動物のみ
担当細胞	好中球 マクロファージ 樹状細胞 NK・NKT細胞	B細胞 T細胞
認識	感染微生物特有のパターン	特異的抗原

NK細胞：natural killer細胞，NKT細胞：natural killer T細胞。

の第一線で作用し、②次に引き続く生体反応の方向性を決める、という役割を担っている。自然免疫系は感染症に加え、外傷、腫瘍、老廃物除去、創傷治癒、移植などさまざまな局面で、生体の恒常性維持に寄与する。自然免疫細胞群はさまざまな眼疾患の重要な起炎症細胞であるにもかかわらず、眼炎症との関連はこれまで十分に解析されてこなかった。近年、いわゆる「自然免疫」を担うマクロファージ・natural killer T(NKT)細胞・ $\gamma\delta$ 型 T細胞などが眼の恒常性・透明性維持に不可欠な存在であることが認知されつつある²⁾³⁾。

眼炎症疾患というと、一般に急性期ぶどう膜炎(内眼炎)や角膜移植拒絶反応などを思い浮かべる。いずれも Tリンパ球を中心とした「獲得免疫」が初期にかかわる病態である(狭義の眼炎症疾患)。一方、「自然免疫」は感染症、術後炎症、外傷、糖尿病網膜症、腫瘍などの病態に密接に関連している。言い換えると多くの眼疾患は広義の眼炎症疾患と捉えることもできる。我々は宿題報告を行うにあたって、ぶどう膜炎に加えて、広義の眼炎症疾患という観点から、加齢黄斑変性などの脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization: CNV)を原因とする疾患(本稿では便宜上、「脈絡膜新生血管病」と呼ぶ)を取り上げることとした。上記2疾患において、特に自然免疫細胞の役割に焦点を当て、以下の研究を行った。

II 慢性期ぶどう膜炎(内眼炎)と自然免疫

1. 慢性・遷延化ぶどう膜炎患者免疫炎症関連液性因子

ぶどう膜炎の原因は、自己免疫疾患など全身疾患に合併するものや、細菌・ウイルス・寄生虫感染によるものなどさまざまである。他の部位の炎症と同様、眼局所でのサイトカイン・ケモカイン発現はぶどう膜炎発症に深く関与している。しかし現在のところ、どのようにこれらサイトカイン・ケモカインがネットワークを形成し実際のぶどう膜炎成立にかかわるのか不明な点が多い。実験動物レベルでは急性期炎症やぶどう膜炎発症機序が論じられることが多い。しかし、実際医療機関を受診する患者で、本当にフレッシュな眼炎症があることはむしろまれである。ぶどう膜炎は慢性疾患であり、幾度も眼炎症発作を繰り返したり慢性的に眼炎症が持続することに

より初期の炎症は修飾され、独特の臨床像を呈する。なかでも繰り返す Behçet 病発作、遷延型原田病などは臨床的に問題になる。

我々は急性期ぶどう膜炎ではなく、上記慢性期炎症の解析を行うことにした。硝子体腔は前房と比較して眼内液の房水によるターンオーバーが遅い。また、硝子体が存在するため、起炎症分子をトラップし、眼炎症慢性化病態に関与する可能性を考えた。ゆえに慢性期ぶどう膜炎で硝子体手術を行った患者の硝子体液の解析を行った。

対象は 2005 年 9 月～2006 年 8 月の期間に九州大学病院で慢性ぶどう膜炎で硝子体手術を施行した 21 例である。いずれも眼炎症が慢性的に持続したために黄斑浮腫や硝子体混濁などの合併症のため視力低下した症例で、急性眼内炎や急性網膜壊死などの急性病態を呈する症例は除外した。対照群は他に合併症のない黄斑円孔、黄斑上膜 58 例とした。手術開始時に硝子体液を採取し、採取した硝子体液 10 μ l を phosphate buffered saline (PBS) で 10 倍希釈した後、ルミネクス[®]を用いて液性因子の濃度を多症例同時測定した。ルミネクス[®]とは少量のサンプルから最大 100 項目の測定を同時に行える蛍光マイクロビーズアレイシステムである。特徴はプレートの代わりにマイクロビーズを用いて、各々のビーズ表面に固定された抗体と、それぞれが認識する抗原が結合する。フローサイトメーターでビーズ表面蛍光量を測定することで定量的な解析が可能である。スクリーニング項目はサイトカイン：11 因子 [interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α]、ケモカイン：7 因子 [IL-8, eotaxin, interferon γ -inducible protein (IP)-10, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-1 β , RANTES)、増殖因子：5 因子 [epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)]、計 23 因子を同時解析した。その結果、当初当然上昇すると考えていた TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 といったリンパ球に作用するサイトカインはほとんど検出されない一方で、IL-6, IL-8, MCP-1 といった好中球、マクロファージに作用するケモカインの上昇を認めた。実際の内眼炎で自然免疫系細胞が重要な起炎症細胞であることが示唆された。

これまで急性期ぶどう膜炎・前房水で炎症性サイトカインを測定した報告はある。特に代表的 T helper (Th)1 サイトカインである IFN- γ 濃度について、Takase らは上昇することを報告している⁴⁾。例えばヘルペス性虹彩毛様体炎 (n=3) 157.4～3,555.6 pg/ml, 急性網膜壊死 (n=5) 2,566.5～5,712.4 pg/ml であった。今回の我々の測定下限は 50 pg/ml であり、同時に測定した陽性対

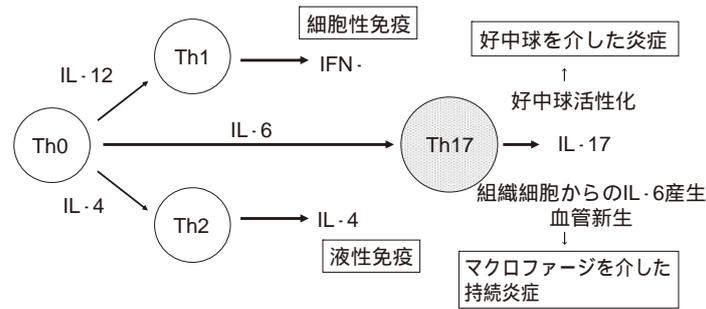


図 1 Interleukin(IL)-17 産生能をもつヘルパー T 細胞(Th17 細胞).

IL-6 で誘導, IL-23 で拡大される. また, Th17 細胞は従来の Th1, Th2 細胞が産生する interferon(IFN)- γ , IL-4 に負に制御される. 局所 IL-17 産生が亢進し, 好中球浸潤や tumor necrosis factor(TNF)- α , IL-6 などの炎症性サイトカイン産生, 血管新生などが誘導され, 慢性期における炎症反応を形成しているものと考えられる.

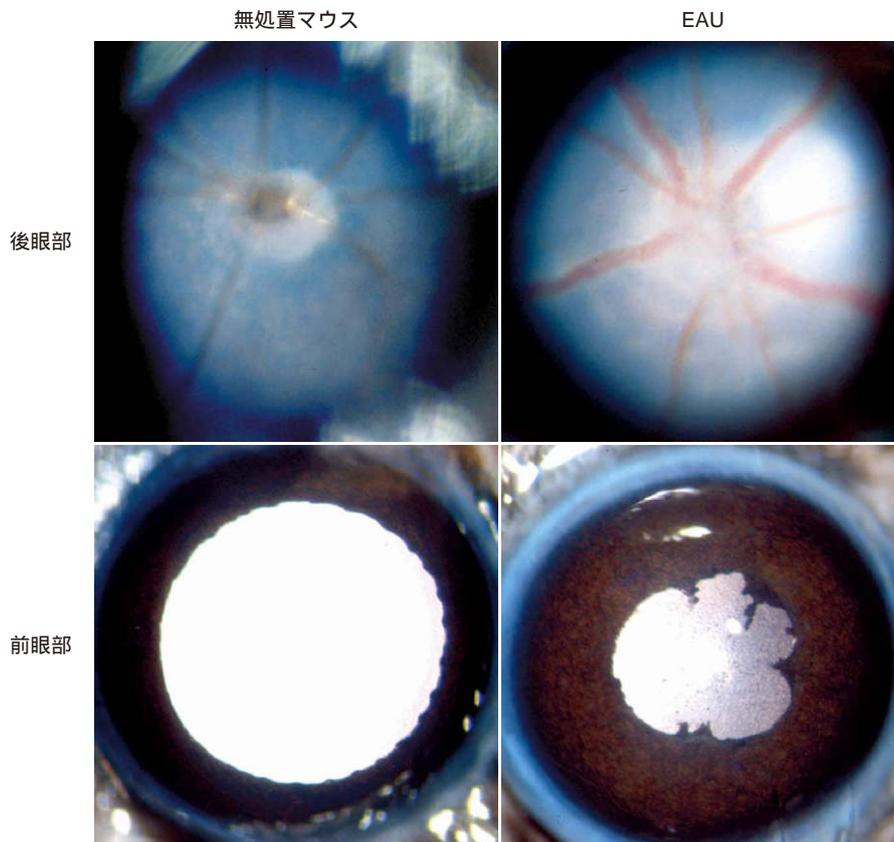


図 2 マウス実験の自己免疫性ぶどう膜炎(EAU)の前眼部および眼底写真.

左が無処置マウス, 右: 実験的の自己免疫性ぶどう膜炎マウス. 虹彩後癒着, 視神経腫張, 網膜滲出斑, 網膜血管炎など, ヒトと同様の眼炎症をマウスで再現できる.

(文献 3 より許可を得て転載)

照はきちんと同定されていた. それでも検出限界以下と測定された結果から, (測定上の問題ではなく)やはり慢性期硝子体液では, 急性期ぶどう膜炎・前房水と比較して IFN- γ 濃度が低いといえる. 慢性期ぶどう膜炎では急性期と異なる液性因子が動いている可能性がある.

2. IL-6 と IL-17 を産生する細胞(Th17 細胞)の解析

これまでぶどう膜炎は, IL-2, IL-12, IFN- γ を基軸にした Th1 細胞によって媒介されると信じられてきた.

一方, IL-4, IL-5, IL-13 を基軸とした Th2 はアレルギー反応を媒介すると同時に Th1 の対極としてぶどう膜炎に抑制的に作用するとされてきた. しかし, 我々の慢性期ぶどう膜炎硝子体液の解析では, 主要 Th1 サイトカインである IL-2, IFN- γ いずれも検出されないことから, 少なくとも慢性期においては Th1 と一線を画して考えなければならないことを示唆した.

近年, 免疫学の分野で IL-17 を産生する T リンパ球

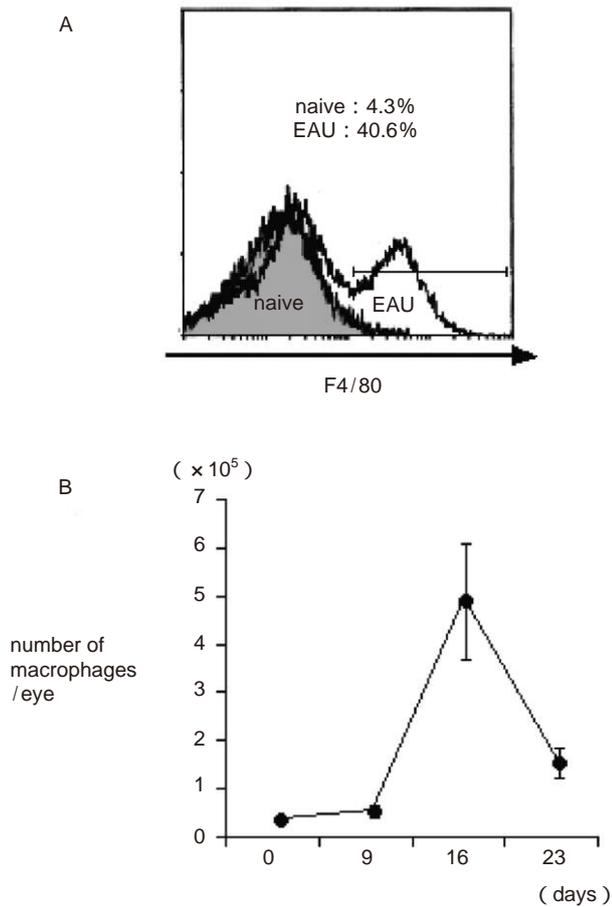


図 3 マウス EAU の眼内浸潤細胞フローサイトメトリーによる解析。

A: 横軸 F4/80 はマクロファージマーカー. B: 眼内浸潤マクロファージ数(1 眼あたり)の経時変化. 無処置眼ではほとんど検出されないマクロファージが, 免疫 16 日目では眼内浸潤細胞の 40% あまりも浸潤している. 実験的自己免疫性ぶどう膜炎は, きっかけは T リンパ球によって始まるが, 実際に炎症媒介するのはマクロファージなどの抗原非特異的な自然免疫系細胞である. (文献 3 より許可を得て転載)

が注目されている(図 1). IL-17 はもともと好中球の活性化・遊走に関与する因子とされてきたが, リンパ球がそのソースとなりさまざまな炎症を媒介する. そのような細胞は Th17 細胞と定義され, 従来の Th1 や Th2 細胞とは全く異なる細胞集団として認知されつつある⁵⁾. 興味あることに Th17 細胞は Th1, Th2 細胞が産生する IFN- γ , IL-4 によってその産生が負に制御される^{6,7)}. 我々は, 慢性期には Th17 細胞が拡大することにより IL-17 産生が亢進し, 好中球浸潤や TNF- α , IL-6 などの炎症性サイトカイン産生, 血管新生などにより, おそらく慢性期における炎症反応を形成しているものと考えた.

実験的自己免疫性ぶどう膜炎(experimental autoimmune uveitis: EAU) は, interphotoreceptor binding protein(IRBP)や S 抗原などの網膜抗原を実験動物に免疫することでぶどう膜炎を発症させるモデルである⁸⁾.

IRBP1-20 ペプチドをマウスに用いた場合, 免疫後 10 日目から発症し, 16 日で炎症最大となる(図 2). 眼炎症の程度は眼底検査による臨床スコアと, 組織学的検討によって評価される⁹⁾. 従来 EAU はもっぱら Th1 リンパ球が媒介する自己免疫疾患と考えられてきたが, リンパ球以外にも多数のマクロファージが眼内に浸潤する(図 3). また我々は炎症極期でも, 抑制性の T 細胞マーカーである Foxp3 と CD25 を同時発現する細胞分画が眼球内に認められることを見出した(図 4). 炎症誘導細胞と同時に, それを抑制する生体のホメオスタシス機構も解析できる優れたモデルである.

我々は EAU における Th17 細胞を中心に機能解析を行った. 免疫後 14 日目には眼球内に IL-17 を産生する CD4 陽性の T 細胞分画が確認された(図 5). 確かに Th17 細胞が EAU 発症に関与しうると考えられた. 次に IL-17 ノックアウトマウス(n=25)と同系統対照マウス(C57BL/6 マウス, n=26)での EAU を経時的に比較観察した. IL-17 ノックアウトマウスにおいても 10 日目前後から対照マウスと全く同程度の眼炎症が観察された. 組織学的検討でも両群間に細胞成分の違いや組織破壊の程度の差は確認されなかった. 興味あることに 19 日目を過ぎて回復期に入ってから 30 日前後まで, IL-17 ノックアウトマウスは有意に眼炎症の回復が早いことが確認された. 組織学的検討でも検眼鏡スコアと同様の事象が確認された.

Th17 は transforming growth factor (TGF)- β と IL-6 で誘導, IL-23 で拡大される^{6,7)}. 我々はヒトぶどう膜炎におけるスクリーニングの結果も踏まえ, 慢性期ぶどう膜炎の増悪因子として IL-6 に注目した. IL-6 は組織細胞やマクロファージ・樹状細胞などから産生され, あらゆる炎症時に共通して上昇する. いわば炎症の起点ともなるサイトカインである. IL-6 ノックアウトマウスを用いて, 同様に対照マウスと EAU 臨床経過を観察した. 結果は IL-17 ノックアウトマウスと同様に, 発症初期炎症は差がないが, 19 日過ぎてから眼炎症の回復が早かった. 同時に行ったリンパ節 T 細胞の IRBP 抗原特異的サイトカイン産生能では, IL-6 ノックアウトマウスでは確かに IL-17 産生がほとんど抑制されていることを確認した. IL-6 ノックアウトマウスでは確かに Th17 細胞が誘導されていなかった.

IL-17, IL-6 ノックアウトマウスを用いた Th17 細胞機能阻害実験に加えて, 我々は Th17 細胞機能増強実験を行った. Th17 細胞は Th1, Th2 細胞が産生する IFN- γ , IL-4 によってその産生が負に制御される^{6,7)}. ゆえに EAU 誘導後, IFN- γ , IL-4 中和抗体を投与することで Th17 細胞の分化が促進される. 事実両抗体を投与したマウスでは, リンパ球からの IL-17 産生が増強されていた. 抗 IFN γ 抗体 + 抗 IL-4 抗体投与後の EAU は, 誘導相では対照抗体投与群と比較して眼炎症に差がみら

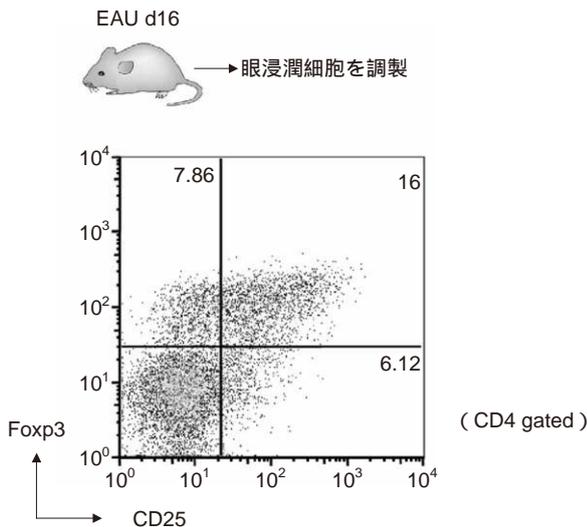


図4 マウス EAU の眼内浸潤 CD4 陽性 T 細胞のフローサイトメトリーによる解析.

EAU 免疫後 16 日目に眼球摘出し、コラゲナーゼ処理して眼内浸潤細胞を分離する。細胞は CD4 (T 細胞マーカー)、CD25 (抑制性 T 細胞マーカー)、Foxp3 (抑制性 T 細胞マーカー) で 3 重染色を行った。図の右上の CD25/Foxp3 共陽性の分画が抑制性 T 細胞である。

れないが、19 日目以降の回復相の眼炎症が遷延化することが判明した。

以上の結果から IFN- γ 産生性 Th1 細胞は、ぶどう膜炎発症に重要だが、時間経過とともにその関与は低下し、Th17 細胞中心の炎症へシフトすると考えられた。最近、Th17 とヒトぶどう膜炎に関して Amadi-Obi らもその関与を報告している¹⁰⁾。IL-6 によって誘導される Th17 細胞は、ぶどう膜炎の慢性持続化に関与している可能性がある。

Ⅲ 脈絡膜新生血管形成と自然免疫

1. 眼炎症疾患としての脈絡膜新生血管病

脈絡膜新生血管は黄斑部に生じやすく、これによる黄斑疾患は重篤な視力低下を来す。代表的疾患に、加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration: AMD)、強度近視、中心性滲出性脈絡網膜症などがある。特に AMD は欧米での中途失明原因の第一位であり、近年日本でも増加している。今後高齢化社会進行に伴い、患者数増加への対応とその quality of life & vision 向上が課題である。

近年、脈絡膜新生血管病は老化を基盤とした慢性炎症によって発症すると考えられるようになってきた。事実これまで AMD と慢性炎症の関連を示したさまざまな報告がなされている。特に自然免疫細胞のひとつであるマクロファージとの関連は 1990 年代初頭から報告されている^{11)~14)}。また実験的 CNV 形成における免疫・炎症反応の関与について、近年マクロファージとの関連

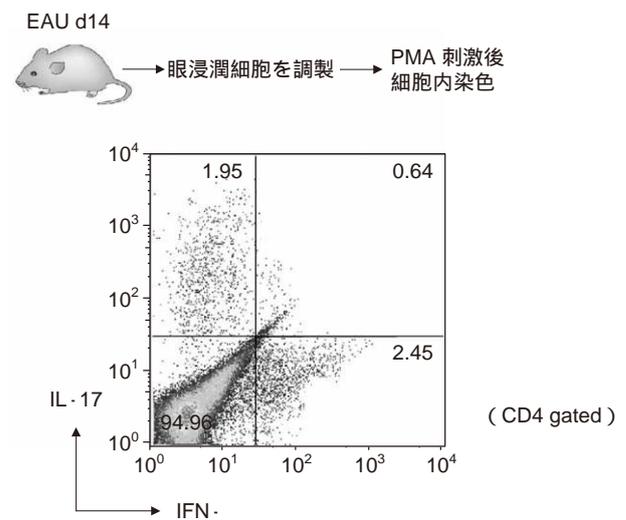


図5 マウス EAU の眼内浸潤 CD4 陽性 T 細胞産生サイトカインのフローサイトメトリーによる解析.

EAU 免疫後 14 日目に眼球摘出し、コラゲナーゼ処理して眼内浸潤細胞を分離する。細胞は CD4 (T 細胞マーカー) で染色後、phorbol myristate acetate (PMA) 刺激しその後細胞壁に小隙を空け、細胞内の IL-17、IFN- γ の染色を行った。眼球内に IL-17 産生するが IFN- γ 産生が認められない Th17 細胞 (左上分画) が浸潤していることが分かる。

や¹⁵⁾¹⁶⁾、補体系の関連を示す報告^{17)~20)}や、アミロイド β が原因となる炎症²¹⁾や、老化に伴う局所炎症²²⁾などの発表がなされている。これらはいずれも CNV 形成と炎症の関与を示したものである。我々は特に自然免疫細胞群と CNV 形成過程に興味を持ち、以下の実験を行った。

2. CNV 形成と CD1 拘束性 NKT 細胞

CD1 拘束性 natural killer T (NKT) 細胞は自然免疫系を構成する多機能細胞で、CD1 分子上に提示された生体内糖脂質に反応して、数時間以内に炎症をさまざまな形で修飾する²³⁾。T 細胞レセプターと NK 細胞マーカーを同時に発現するものの、従来の NK 細胞、T 細胞とは全く異なる細胞で、免疫系の上流で引き続き反応をさまざまな形で制御する。NKT 細胞の最もユニークな点は生体反応の局面において炎症促進にも抑制にも働きうるということである²³⁾。例えば感染症、腫瘍などではその拡大抑制のため局所炎症を促進させる一方で²⁴⁾²⁵⁾、移植後や自己免疫疾患では過剰な炎症を抑制して免疫寛容を導く役割がある²⁶⁾²⁷⁾。我々は実験的レーザー誘導 CNV 形成における NKT 細胞の役割について検討した。

網膜外層から脈絡膜にかけて強い傷害を加えると、CNV が起こることが知られている²⁸⁾。我々は C57BL/6 マウスの網膜外層から脈絡膜部分をレーザー照射で破壊し、実験的 CNV モデルを作製した。14 日後に CNV の形成を免疫組織学的、および蛍光色素注入後の脈絡膜フラットマウントにより確認した¹⁶⁾。またレーザー照射後経時的に眼球摘出し、網脈絡膜の細胞を分離してフロー

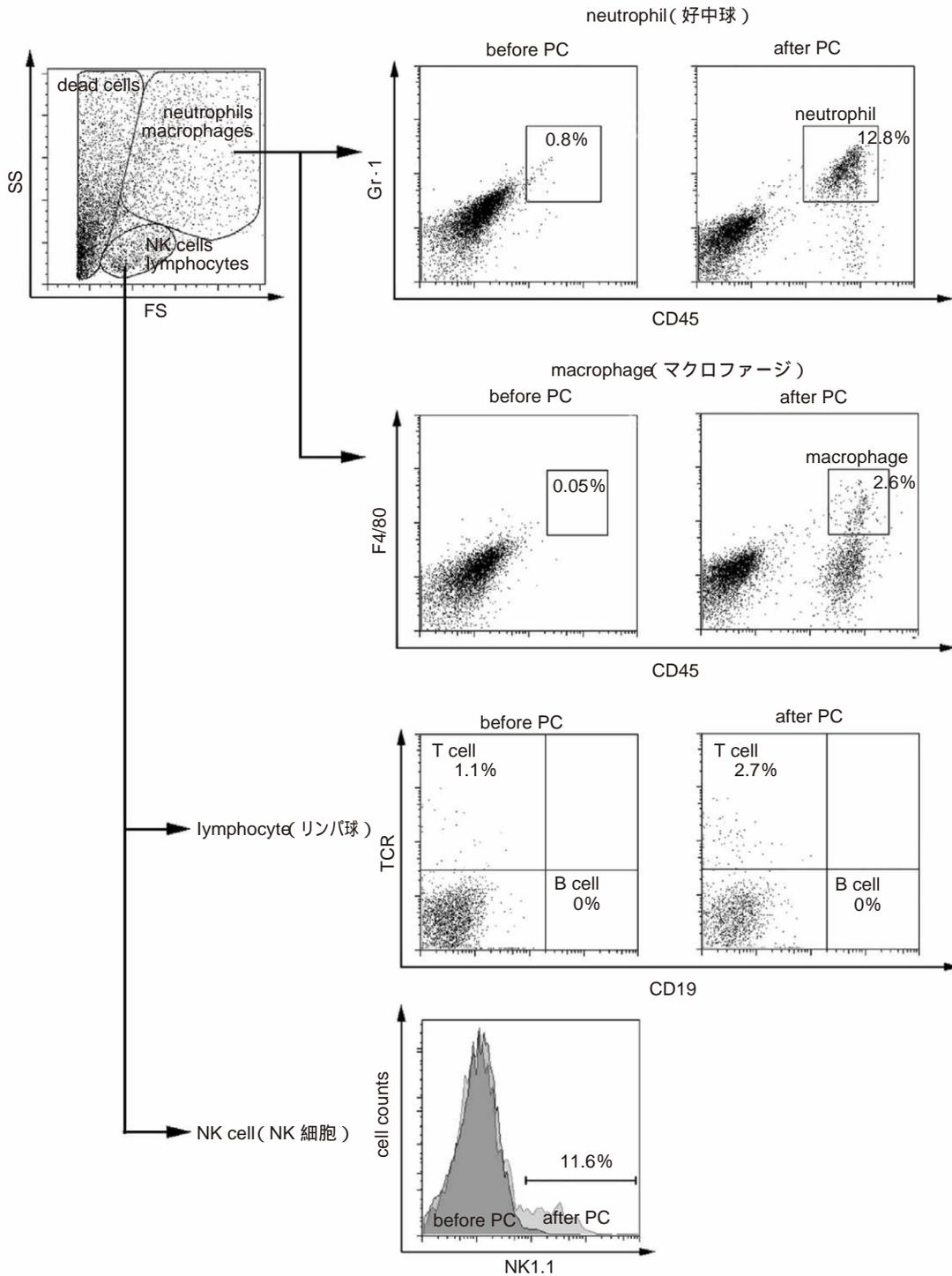


図 6 実験的脈絡膜新生血管(CNV)モデルにおける眼内浸潤細胞のフローサイトメトリーによる解析。眼内浸潤細胞の同定例。CD45：汎骨髄由来細胞マーカー，Gr-1：好中球マーカー，F4/80：マクロファージマーカー，TCRβ：Tリンパ球マーカー，CD19：Bリンパ球マーカー，NK1.1：natural killer(NK)細胞マーカー，PC：レーザー照射。フローサイトメトリーで各細胞分画がきちんと同定できる。(文献 29 より許可を得て転載)

サイトメトリーで眼浸潤マクロファージの数を調べることができる(図 6)。実験的 CNV 形成には自然免疫系のマクロファージ，好中球，NK 細胞が関与する(図 7)。同じ自然免疫系に属する NKT 細胞の関与も十分考えられた。

NKT 細胞に表出されている T 細胞レセプターは *Vα14/Jα281* という特異的な構造をもち，これは NKT 細胞マーカーとして用いられる²³⁾。レーザー照射後，眼内 *Vα14* mRNA の発現を real-time polymerase chain reaction(PCR)で測定した結果，照射後 24 時間で増加

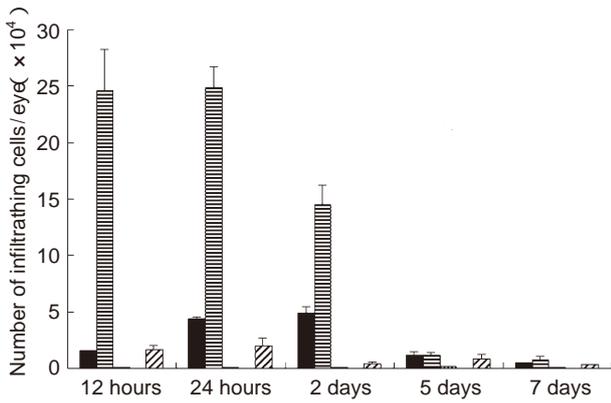


図 7 実験的 CNV モデルにおける眼内浸潤細胞のフローサイトメトリーによる解析。マクロファージ, 好中球, T リンパ球, B リンパ球, NK 細胞の 1 眼あたりの浸潤細胞数の経時変化。実験的 CNV 形成には自然免疫系のマクロファージ, 好中球, NK 細胞が関与する。獲得免疫系の T リンパ球, B リンパ球はほとんど眼内に同定されない。■: マクロファージ, ▨: 好中球, ▤: T リンパ球, ▥: B リンパ球, ▧: NK 細胞。
(文献 29 より許可を得て転載)

がみられた。これは眼球内に NKT 細胞が浸潤していることを示す。次に 2 つの異なる NKT 細胞ノックアウトマウスを用いて CNV 形成を解析した。CD1 ノックアウトマウスは NKT 細胞への抗原提示がないため、NKT 細胞の分化・増殖ができず、Ja281 ノックアウトマウスはそもそも NKT 細胞をもたない。いずれの NKT 細胞ノックアウトマウスでも CNV 形成が抑制され(図 8), 眼球内での VEGF 産生は蛋白質レベルでも核酸レベルでも低下していた(図 9)。

さらに *in vitro* で解析のため、我々は眼球内で潤沢に CD1 分子を表出している網膜色素上皮細胞 (retinal pigment epithelial cell : RPE) と NKT 細胞の共培養システムを構築した。RPE はマウスから分離培養後、長期継代せずに脾臓由来 NKT 細胞と共培養すると、上清中に VEGF が測定される。しかし、抗 CD1 抗体を上清中に加え、RPE と NKT 細胞の結合阻害を行うと VEGF 産生は抑制された。以上の結果から、眼球内に浸潤した NKT 細胞は CNV を形成するための VEGF の供給源となる可能性が示された。

次に我々は NKT 細胞をリガンドで生体内強制的刺激することを試みた。α-ガラクトシルセラミド (alpha-galactosylceramide, αGalCer) は、海綿の成分から見つ

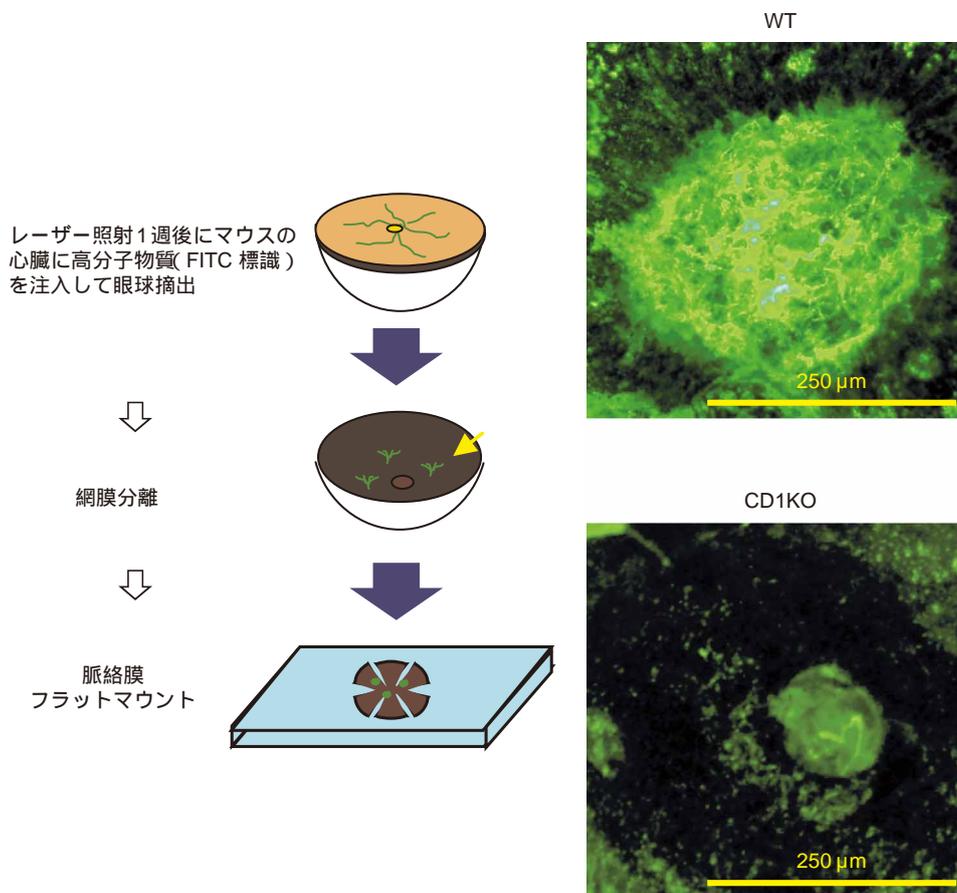


図 8 CD1 ノックアウト (KO) マウスでは、NKT 細胞が分化増殖できない。このマウスでは実験的 CNV 形成が抑制される。WT : 野生型マウス

かった糖脂質で NKT 細胞を生体内で活性化し各種サイトカイン産生を誘導することが知られていた²³⁾。そこでレーザー照射直後に α -ガラクトシルセラミド硝子体腔内投与を行った。当初 α -ガラクトシルセラミド硝子体腔内投与により、生体内での VEGF 産生が増加し CNV が増悪するであろう、と考えていたが、結果は反対に α -ガラクトシルセラミド投与により CNV 形成・VEGF 産生が抑制されるというものであった。上述 *in vitro* の実験系でも VEGF は α -ガラクトシルセラミド添加で抑制された。

一連の実験を通して、① NKT 細胞は CNV 形成過程に関与しうる、② NKT 細胞の機能は、人工リガンドにより変化する、ということが分かった。NKT 細胞の最もユニークな点は生体反応の局面において炎症促進にも抑制にも働きうるということであるが、CNV でもおそらく眼球内に存在するリガンドの種類によって異なる局面で異なる作用を示しうるのであろう(図 10)。このことから、今後 α -ガラクトシルセラミドは CNV 抑制目的で、局所投与薬として臨床応用できる可能性もあると考えられる。

3. 自然免疫細胞と活性化網膜色素上皮細胞：感染誘導モデルを用いて

自然免疫系が最もその真価を発揮するのが感染症である。自然免疫細胞は Toll-like receptor (TLR) を介して、微生物共通のパターンで感染微生物をすばやく認識する³⁰⁾。感染症と CNV 関連疾患の検索を行った結果、興味ある事実を発見した。肺炎クラミジア (*C. pneumo-*

niae) は呼吸器感染症の代表的・一般的起炎菌で、成人の半数以上は抗体を保有しているごく一般的な微生物である。偏性細胞内寄生生物で、生きた細胞内でのみ増殖する。AMD 患者では肺炎クラミジア抗体レベルの上昇が認められ³¹⁾、また滲出型 AMD 9 例のうち 4 例において組織学的に肺炎クラミジアが認められたという³²⁾。

CNV 形成に重要と考えられるのが RPE である。RPE はいったん活性化されるとさまざまなケモカイン・サイトカインを産生し、集簇した好中球やマクロファージを

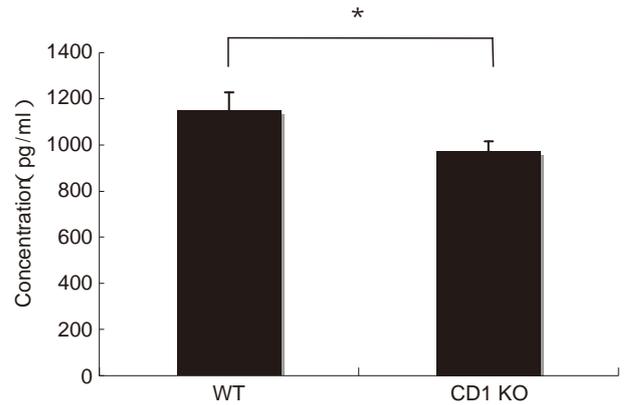


図 9 CD1 ノックアウト(KO)マウスにおける眼内液の vascular endothelial growth factor (VEGF) 濃度 (ELISA). KO マウスでは実験的 CNV 形成が抑制され、レーザー照射 24 時間後の眼内 VEGF 濃度が低下している。* : p<0.05.

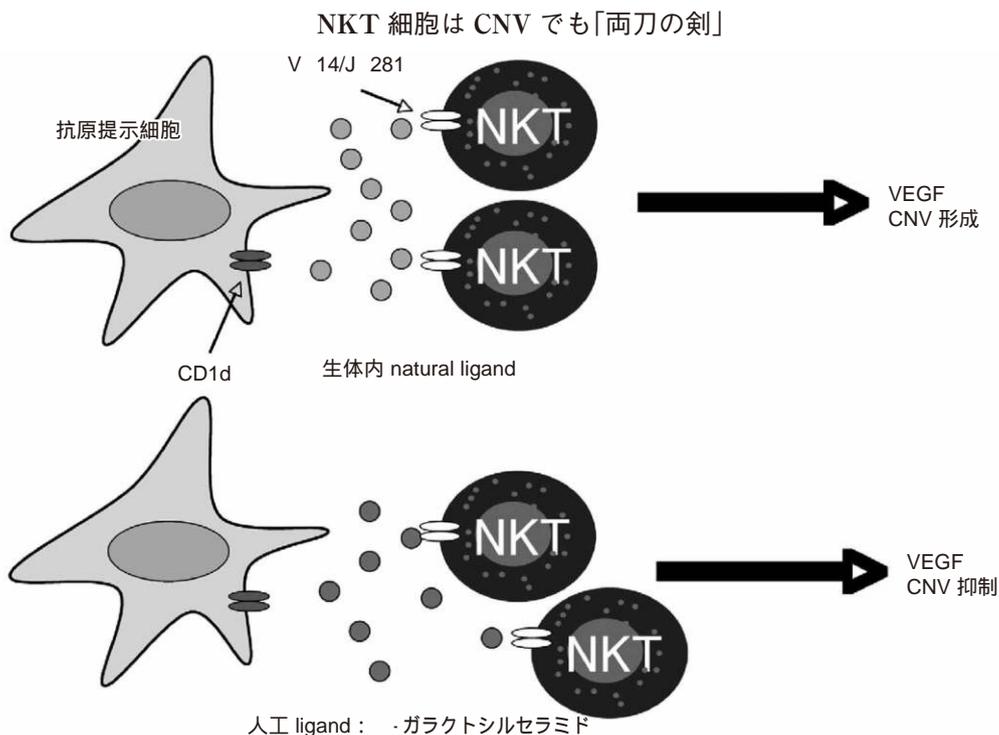


図 10 実験的 CNV モデルでの NKT 細胞の役割.

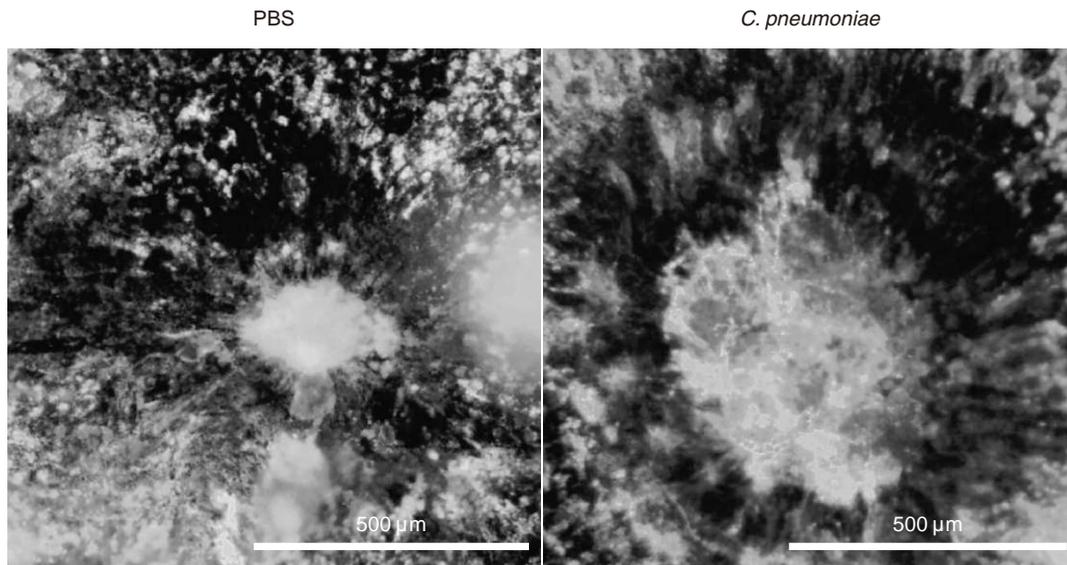


図 11 肺炎クラミジア(*C. pneumoniae*)成分硝子体腔内注入による実験的 CNV 増強効果。
PBS : phosphate buffered saline.

活性化し、必要以上の組織破壊をもたらす原因となる²¹⁾²²⁾。RPE は貪食能を有し、ほとんどすべての TLR を表出し感染微生物を認識しうる点では、自然免疫細胞と通じる点がある。RPE は、TLR4 を介して Lipopolysaccharide(LPS)に反応する³³⁾。また RPE は、TLR1-7, 9, 10 を発現し、眼内免疫反応に関与している³⁴⁾。RPE は TLR を介して微生物を認識しうる(RPE は「自然免疫細胞的」に働かう)。

我々はクラミジア死菌が直接 RPE を活性化する可能性を念頭に、感染を契機とした CNV 形成のメカニズムの解析を行った。まずレーザー誘導 CNV モデルで、レーザー照射直後に硝子体腔内に肺炎クラミジア抗原を注入したところ、CNV が悪化することを見出した(図 11)。次に試験管内で肺炎クラミジア抗原による RPE 刺激を行った。C57BL/6J マウス摘出眼球より RPE を分離し 12 日間培養後、培養液中に肺炎クラミジア抗原を加えて刺激した。一定時間後、細胞溶解液を real-time PCR で各種サイトカイン産生能を検討した。肺炎クラミジア抗原濃度依存性に IL-6, VEGF 産生が上昇したが、対照の LPS 刺激で上昇する TNF- α は肺炎クラミジア抗原刺激では上昇しなかった。また Myeloid differentiation primary response protein(Myd)88 ノックアウトマウス由来の RPE を使用すると、肺炎クラミジア刺激で IL-6, VEGF 産生がみられないことから、肺炎クラミジアの RPE に対する反応は TLR の重要なシグナル分子である Myd88 を介して行われていることが判明した。

前提として加齢による Bruch 膜の脆弱化(脈絡膜-網膜境界の加齢変化)がある個体では、脈絡膜血管に潜伏感染している肺炎クラミジアが、TLR を介して RPE に

認識され、RPE からの液性因子産生が起こり CNV 形成を促進すると考えた(図 12)。

IV 脈絡膜新生血管病に伴う 網脈絡膜癒痕形成と自然免疫

1. 脈絡膜新生血管病と網脈絡膜癒痕化

AMD に代表される実際の脈絡膜新生血管病の臨床病態は、発症前期(ドルーゼンなど)→発症期(CNV 形成・小出血など)→活動期(出血、滲出)→癒痕期(黄斑部癒痕、他)というように進行する。従来の CNV に関する研究はその形成機序に関するものが多いが、実際の臨床病態では CNV からの出血後に生じる黄斑部の癒痕治療過程にかかわる炎症反応も重要である。近年、CNV 形成過程を抑制するものとして硝子体腔へのベバシズマブなどの抗 VEGF 抗体硝子体腔内投与、また既に形成された CNV に対してはバルテポルフィンを用いた光線力学的療法などの新しい治療が始まり、一定の治療効果が認められている。しかし、新治療の著効時期は発症前期・発症期にほぼ限定される。多くの患者は黄斑部出血後視力が低下し初めて病気に気がつくのであるが、既に視力回復という観点からは回復が難しい時期にさしかかっている。組織癒痕化が始まると、最新治療をもってしても「CNV は治療しても視力は回復しない」ということになる。

脈絡膜新生血管病の治療ターゲットとして、CNV からの出血・滲出後に生じる黄斑部の機能障害(癒痕治療)過程も重要と考えられる。仮に網膜下出血を起こしても、それに対して起こる必要以上の免疫炎症反応を制御できれば、黄斑部組織破壊を最小限に止めることができよう。我々は宿題報告を行うにあたり、CNV の形成病

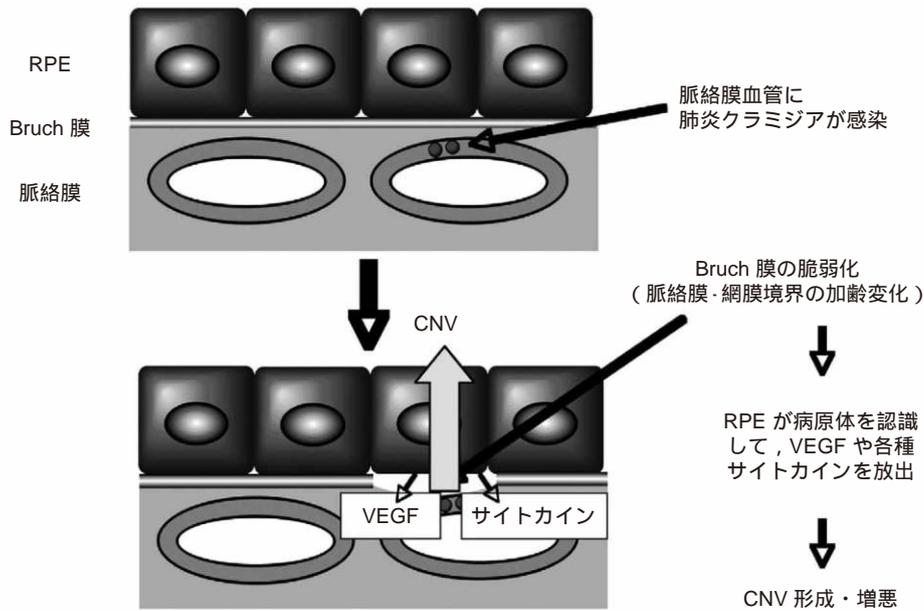


図 12 肺炎クラミジアによる CNV 形成仮説.

前提として加齢による Bruch 膜の脆弱化(脈絡膜-網膜境界の加齢変化)がある個体では、脈絡膜血管に潜伏感染している肺炎クラミジアが、TLR を介して RPE に認識され、RPE からの液性因子産生が起こり CNV 形成を促進する。RPE：網膜色素上皮細胞。

態に加えて、CNV からの血液成分の出血・滲出により二次的に形成される網脈絡膜癒痕病態に興味を持ち、自然免疫細胞との関連を中心に解析することにした。

2. 網脈絡膜癒痕モデルの作製

上記の観点から、我々は最初にマウス網脈絡膜癒痕モデルの作製を試みた。AMD 患者由来の黄斑下増殖組織には多数のマクロファージが浸潤している^{35)~37)}。ゆえに癒痕形成に重要とされる活性化型マクロファージ(具体的にはチオグリコレート誘導マウス腹腔滲出細胞)をマウス網膜下に注入することで、検眼鏡的にも、また組織学的にもヒトに類似した局所癒痕を再現できるのではないかと考えた。

網脈絡膜癒痕モデルの作製・評価は下記の手順で行った(図 13)。

① マウス眼底後極部に、1 か所レーザー強凝固を行う。この際 Bruch 膜を破壊する程度の強凝固とする。これにより脈絡膜からの炎症細胞浸潤を可能にすると同時に、網膜下にエアバブルを生じさせる。

② 毛様体扁平部から 33 ゲージ針を刺入し、網膜下にチオグリコレート誘導腹腔マクロファージを注入する。

③ レーザーで生じたエアバブルが網膜刺入創をシールするため、直後に注入細胞が硝子体内に播種するのを防ぐ。また、網膜光凝固も行っていることになるため、数時間で網膜刺入創は閉鎖する。

④ 7 日後に脈絡膜フラットマウントを作製する。網脈絡膜癒痕組織は通常、脈絡膜側に付着する。

⑤ グリオシスマーカーである抗 glial fibrillary acidic protein(GFAP)抗体で免疫染色する。脈絡膜に付着した

癒痕組織が可視化されるので、その部分の面積測定を ImageJ[®]で行う(図 14)。

癒痕組織とそれに混在するグリオシスは、本来は網膜・脈絡膜構成細胞の変化である。しかし、網膜と脈絡膜を分離する際に脈絡膜側に付着し、GFAP 染色により容易に可視化できた。脈絡膜フラットマウントは網膜と比較して伸張性が低いため、安定した面積測定が可能であった。以上の理由で、脈絡膜フラットマウントを用いた上記の方法が本モデルの定量的評価法として現時点で最適と考えられた。

3. 網脈絡膜癒痕治療における自然免疫細胞の役割

本モデルではマクロファージ注入後 7 日目に、検眼鏡的にヒトに類似した局所癒痕を再現できた。また組織学的にも癒痕部に一致して構成細胞が紡錘形になり、この部分は筋線維芽細胞のマーカーである α -平滑筋アクチン(α -smooth muscle actin, α -SMA)で染色された。我々は活性化型マクロファージを中心に局所に誘導される免疫・炎症機序が網脈絡膜癒痕化に関与するか確認するために、副腎皮質ステロイド薬全身投与の影響を検討した。網膜下マクロファージ注入後、1 日おきにデキサメサゾン 1 μ g/g の腹腔内投与を行ったところ、網脈絡膜癒痕組織は著明に減少した。網脈絡膜癒痕が基本的に炎症反応を介して形成されていることが再確認された。

活性化型マクロファージには還元型と酸化型が存在することが知られている³⁸⁾。還元型と酸化型ではそのサイトカイン産生が大きく異なる。例えば還元型マクロファージでは IL-12 上昇・IL-6 低下であるが、酸化型では IL-12 低下・IL-6 上昇である。還元型と酸化型は

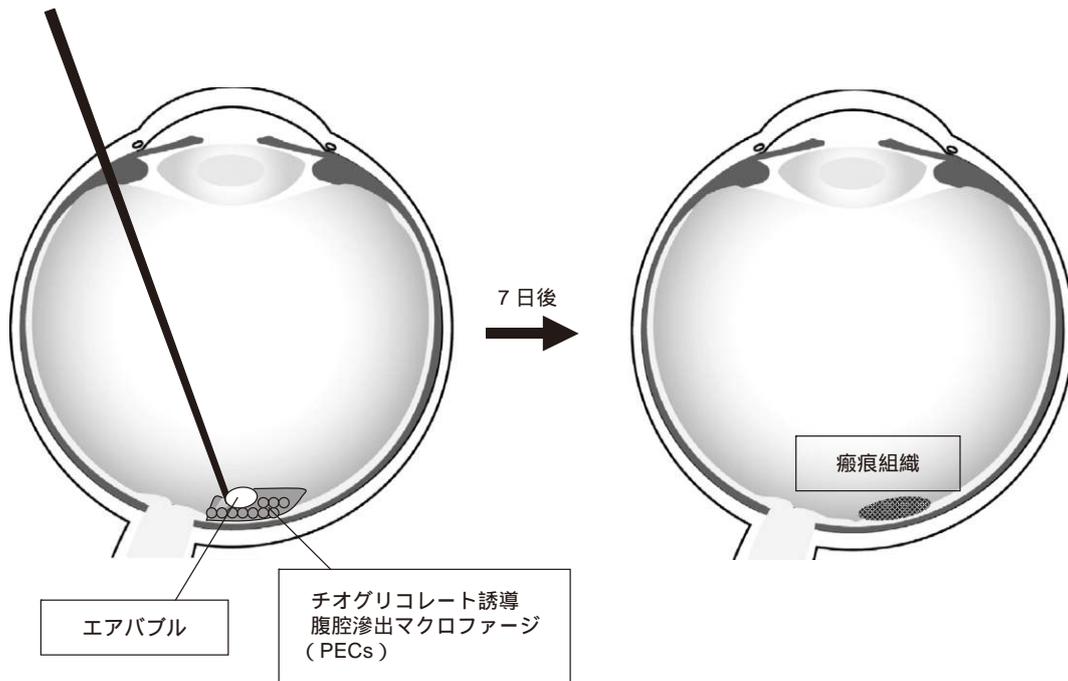


図 13 網膜下瘢痕モデルの作製法.

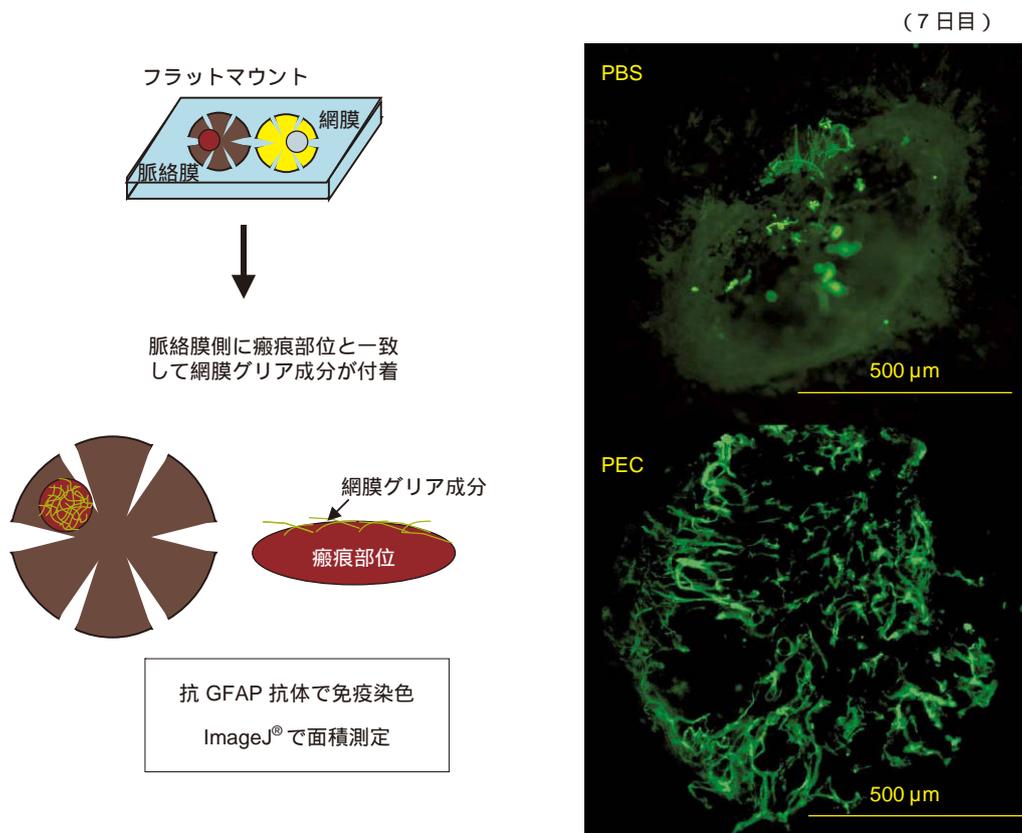


図 14 網膜下瘢痕モデルの作製の評価法.

グリオシスマーカーである抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体で免疫染色する。脈絡膜に付着した瘢痕組織が可視化されるので、その部分の面積測定を ImageJ[®] で行う。瘢痕組織とそれに混在するグリオシスは、本来は網膜構成細胞の変化である。しかし、網膜と脈絡膜を分離する際に脈絡膜側に付着し、GFAP 染色により容易に可視化できる。

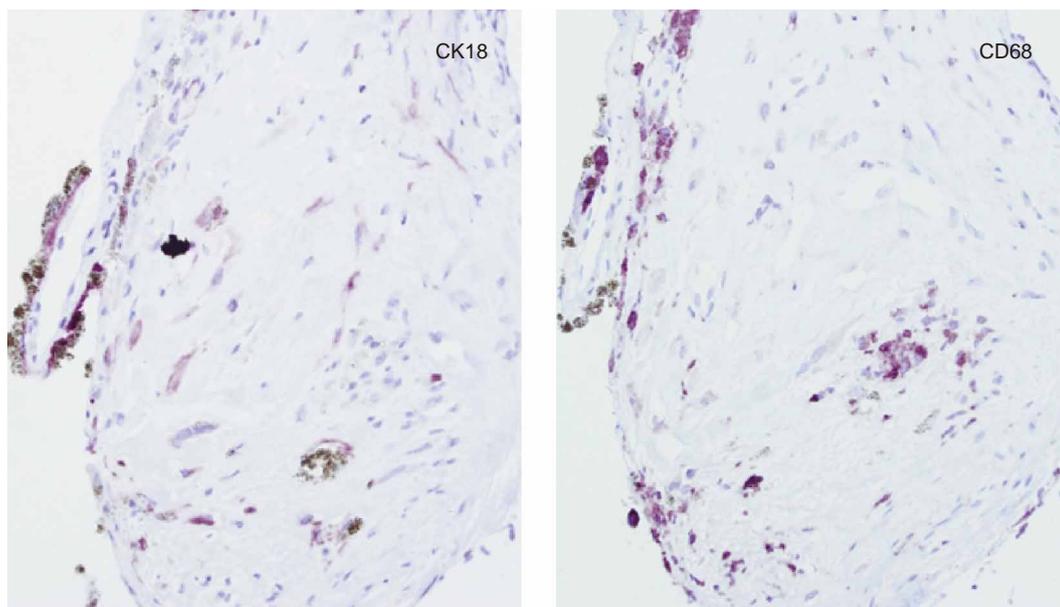


図 15 加齢黄斑変性(AMD)患者の網膜下増殖組織の免疫染色.

CK18: サイトケラチン (RPE マーカー), CD68: マクロファージマーカー. 増殖組織中には, マクロファージと RPE が混在する.

MCB 試薬による細胞内グルタチオン量で評価することができる. 興味深いことに, 注入直後の網膜内のマクロファージは還元型であるが, 網膜下の酸化ストレスにより, 徐々に酸化型へと変化していた. 還元型グルタチオン誘導剤として N-アセチル-L-シスチンやグルタチオン・モノエチルエステルなどを硝子体腔に注入することで, 瘢痕形成が抑制された. 網脈絡膜瘢痕化に, 酸化ストレス下でのマクロファージ機能変化が重要であることが示された.

マクロファージに加えて病態形成に重要と考えられるのが RPE である. AMD 患者網膜下増殖組織は, ① 増殖・遊走した RPE, ② マクロファージが混在していた (図 15). RPE は, 生理的条件下では視細胞の外節の食機能をはじめ神経網膜の環境を保持するのに重要である. 一方で, いったん炎症状態にシフトすると, 機能変化を生じ各種ケモカイン・サイトカインを産生し炎症反応を増強する. 事実マクロファージと共培養した RPE は細胞内 α -SMA が上昇し, 網膜下注入によって, 網膜下瘢痕形成に至ることが分かった (図 16). 本モデルでは, 注入したマクロファージと RPE が作用し合い, 瘢痕形成を誘導していると考えられた.

上述のように AMD 患者由来の黄斑下増殖組織には多数のマクロファージが浸潤している^{35)~37)}. マクロファージは MHC 関連分子や各種共刺激分子を介して, 抗原提示細胞としても機能する. 免疫染色を行うとマクロファージの局在に一致して, 多くの炎症性サイトカインが症例ごとにさまざまなレベルで同定された. なかでも IL-6 はどの症例にも共通して強発現していた. また

マウス網脈絡膜瘢痕モデルで, ルミネクス®を用いて眼内炎症性サイトカインのスクリーニング測定を行った結果, やはり IL-6 が上昇していた. そこで網脈絡膜瘢痕形成における IL-6 の役割を検証するために, マウス網脈絡膜瘢痕モデルで以下の 3 つの実験を行った. ① IL-6 ノックアウトマウス由来腹腔滲出細胞を用いて瘢痕化を誘導する, ② マクロファージ網膜下注入後に, 抗 IL-6 抗体全身投与する, ③ マクロファージ網膜下注入後に, IL-6 short interfering (si) RNA を硝子体腔注入する, という実験である. いずれもマクロファージ由来の IL-6 または二次的に局所で誘導される IL-6 を抑制する実験系である. 結果は IL-6 ノックアウトマウス由来マクロファージでは瘢痕化が起こりにくく, 抗 IL-6 抗体全身投与マウスおよび IL-6 siRNA 硝子体腔投与マウスは, 濃度依存性に網脈絡膜瘢痕化が抑制された. IL-6 は網脈絡膜瘢痕形成に重要なサイトカインであり, その機能抑制マウスでは瘢痕化が起こりにくいことが判明した.

V 脈絡膜新生血管病の新しい治療の試み

これまでの自然免疫と脈絡膜新生血管病のかかわりを, 病態機序を中心に解析してきた. これに加えて, 我々は治療を念頭に以下の研究を進めた. ここでも脈絡膜新生血管病の臨床病期を ① 発症前期・発症期と ② 活動期・瘢痕期に区別して, 我々の考える治療を述べる.

1. 発症前期・発症期: VEGF レセプターに対するワクチン療法

脈絡膜新生血管病の発症前期・発症期は, CNV 形成途中または形成されて間もない状態である. この時期に

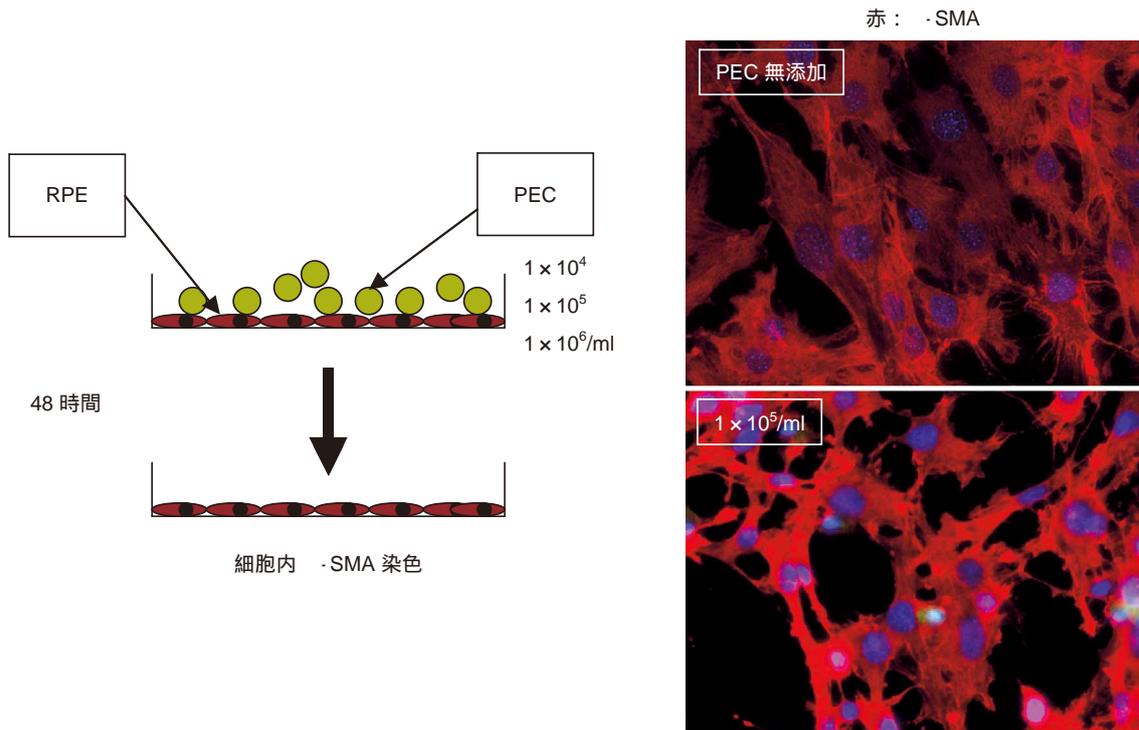


図 16 RPE における α -SMA 発現(PEC 共培養による影響).

マクロファージと共培養した RPE は細胞内 α -SMA が上昇し、同時に細胞形態も変化する。

α -SMA： α -平滑筋アクチン。

は CNV 形成予防、または小さいうちに退縮させる治療が有効である。最近の抗 VEGF 抗体硝子体腔注射やベルテポルフィンを用いた光線力学的療法はこの時期に有効であるが、免疫学的見地から異なるアプローチも可能である。近年、遺伝子治療技術の発展によりさまざまなウイルスベクター、リポソーム法、アンチセンス法などの遺伝子導入法(または病因遺伝子抑制法)が開発され、その有用性が確認されている。今後眼科領域で、遺伝子治療は有用なツールになる。ただし眼炎症部位に直接遺伝子を導入するのはリスクが大きく、眼科領域で遺伝子治療を行うには、そのデザインに工夫が必要となる。同じ遺伝子導入治療であってもいったん自然免疫系細胞に取り込ませることで、生体免疫反応自体を修飾して治療に使う可能性を考えた。

Niethammer らは 2002 年に VEGF レセプター遺伝子のひとつである *Fetal Liver Kinase 1 (Flk-1)* 遺伝子を組み込んだ非病原性サルモネラ菌によって、腫瘍内血管新生を抑制することで癌治療が可能なることを動物モデルで証明している(サルモネラを用いた Flk-1 ワクチネーション)³⁹⁾。サルモネラ菌は細胞内寄生性細菌であり、経口摂取すると腸管上皮の M 細胞に取り込まれて感染が成立する。腸管上皮 M 細胞はリンパ球感作のための特別な細胞である。パイエル板を覆う腸管上皮に存在する M 細胞は、細胞質が大きく陥凹し、そこに T リンパ球と抗原提示細胞を抱え込んでいる、いわば「腸管の小さな自然免疫系」である⁴⁰⁾。腸管から微生物を取り込

み、その微生物抗原特異的 T リンパ球を積極的に誘導することで生体防御反応に寄与している。サルモネラ菌に特定の遺伝子をあらかじめ導入し経口投与すると、M 細胞を介してサルモネラ菌に対して免疫反応を誘導するが、同時に導入されたサルモネラの内在抗原に対して細胞障害性 T リンパ球(CD8 陽性キラー T 細胞)を誘導する。つまり、サルモネラの M 細胞に取り込まれやすい性質を利用して、ワクチネーションを行うということである(図 17)。

VEGF レセプターには VEGF-R1 (FMS-like tyrosine kinase 1, Flt-1), VEGF-R2(Flk-1), VEGF-R3 などが知られている。なかでも Flk-1 は生体内で内皮細胞により特異的に発現し、Flk-1 発現抑制により腫瘍モデルの治療可能とする報告が出ている⁴¹⁾⁴²⁾。また、レーザー誘導 CNV 形成モデルで 7 日目に形成された CNV 部位に一致して、強い Flk-1 の発現が確認された。以上のことから、腫瘍モデルと同様に CNV モデルでも Flk-1 が本治療の有効な治療ターゲットになると考えた。プラスミドに組み込んだ *Flk-1* 遺伝子をあらかじめ病原性を失わせたサルモネラ菌に導入した。実験の対照として、*Flk-1* 遺伝子非導入のプラスミドを導入させた非病原性サルモネラ菌を用いた。非病原性サルモネラ菌をバクテリアとして用いるため、感染マウスは至って健康で、サルモネラ感染それ自体による下痢などの症状は全く観察されなかった。

Flk-1 遺伝子導入サルモネラ菌感染マウスでは、レー

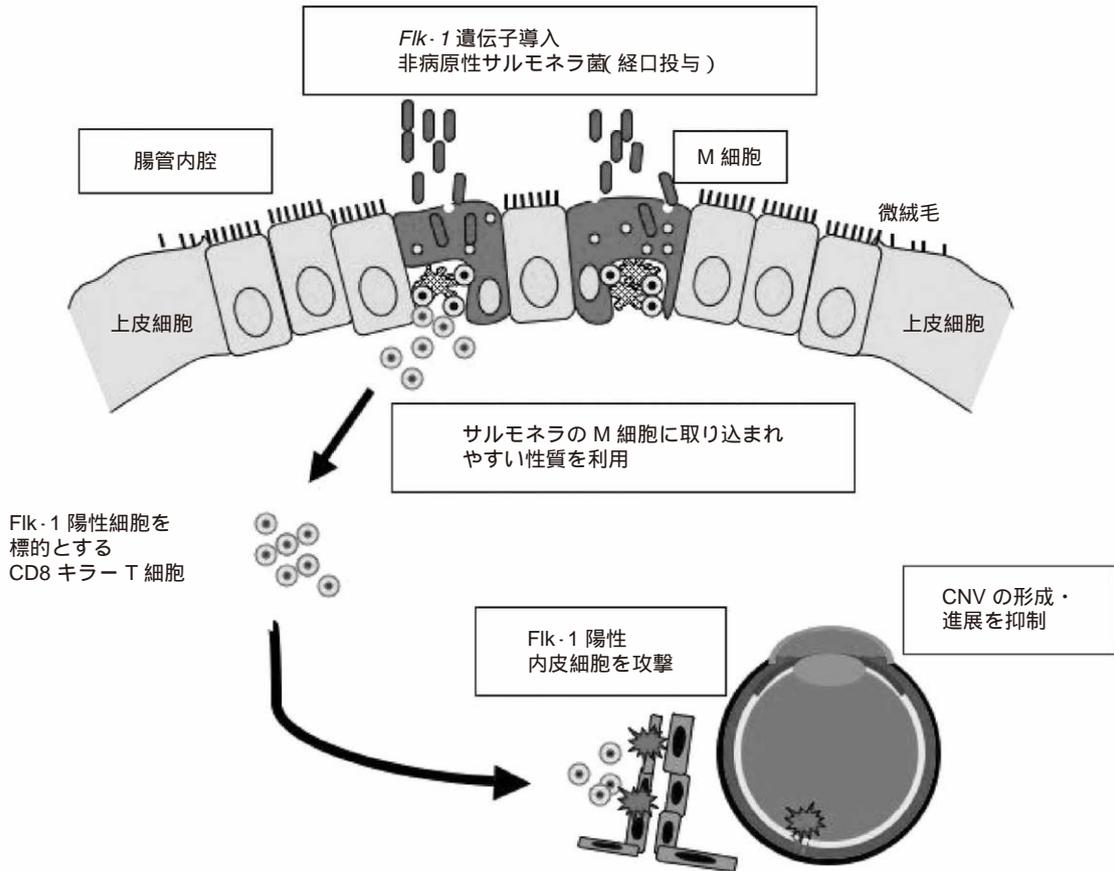


図 17 サルモネラ菌をベクターとして用いた Flk-1 ワクチネーション(概念図)。

サルモネラの M 細胞に取り込まれやすい性質を利用して、ワクチネーションを行う。誘導されるのは Flk-1 特異的な細胞障害性 T リンパ球(CD8 陽性)であり、Flk-1 密度の高い病的 CNV を選択的に攻撃する。

レーザー誘導 CNV が 7 日目まで有意に抑制された。免疫染色により、レーザー照射部位に一致して CD8 陽性 T リンパ球の集簇が確認された。一方、既存脈絡膜血管部位には CD8 陽性 T リンパ球の集簇はなかった。これは Flk-1 が病的新生血管で高密度に血管内皮細胞に発現されるためと考えられる。さらに抗 CD8 抗体全身投与によって、CD8 陽性 T 細胞を除去する実験を行った。予想どおり CD8 陽性 T 細胞を除去するとワクチン効果が減少したが、対照として CD4 陽性 T 細胞を除去してもワクチン効果は変わらなかった。このワクチン治療には同じ T リンパ球であっても CD4 陽性 T 細胞ではなく、細胞障害性をもつ CD8 陽性 T 細胞が重要であることが確認された。本法は一方でユニークな「眼遺伝子治療」であると考えている。つまり、① 遺伝子をサルモネラ菌を介して腸管上皮に導入するため(眼に直接導入しないため)、ベクター感染による眼炎症がなく、② 一般的ウイルスベクターではなく、抗菌薬の使える細菌がベクターであるため、遺伝子導入量・期間のコントロールが容易であり、③ 何より生体に自然に備わる免疫系を上手く利用した治療であるからである。

近年、Mochimaru らは樹状細胞に Flk-1 を付加することで、同様の免疫反応を惹起させ CNV 形成を抑制で

きることを発表した⁴³⁾。本研究と同様に今後の CNV 免疫治療の可能性を示すものであり、大変興味深い。

2. 活動期・瘢痕期治療：低エネルギー超音波+バブルリポソーム法を用いた網膜下抗体デリバリー

現在の脈絡膜新生血管病治療のフォーカスは前述の新生血管抑制に向いていると思われる。しかし、CNV からの出血・滲出から瘢痕化へと進行する時期では、既存治療のみでは効果に限界がある。脈絡膜新生血管病の治療ターゲットとして、CNV からの出血・滲出後に生じる黄斑部の機能障害(瘢痕治癒)過程も重要と考えられる。仮に網膜下出血を起こしても、それに対して起こる必要以上の免疫炎症反応を制御できれば、黄斑部組織破壊を最小限に止めることができよう。我々は既述のとおり、この時期の病態を念頭に置いたマウス網脈絡膜瘢痕モデルを作製した。この瘢痕過程をマウス抗 IL-6 抗体や siRNA で抑制することは可能であったが、臨床応用に向けた次の問題は、如何に効率的にこの抗体や siRNA を網膜下に輸送するか? というのではないかと考えた。効率的な伝達法が確立されれば、治療効果上がるのみならず、低濃度で投与回数も少なく済むため、全身および局所でのさまざまな副作用の軽減につながる。

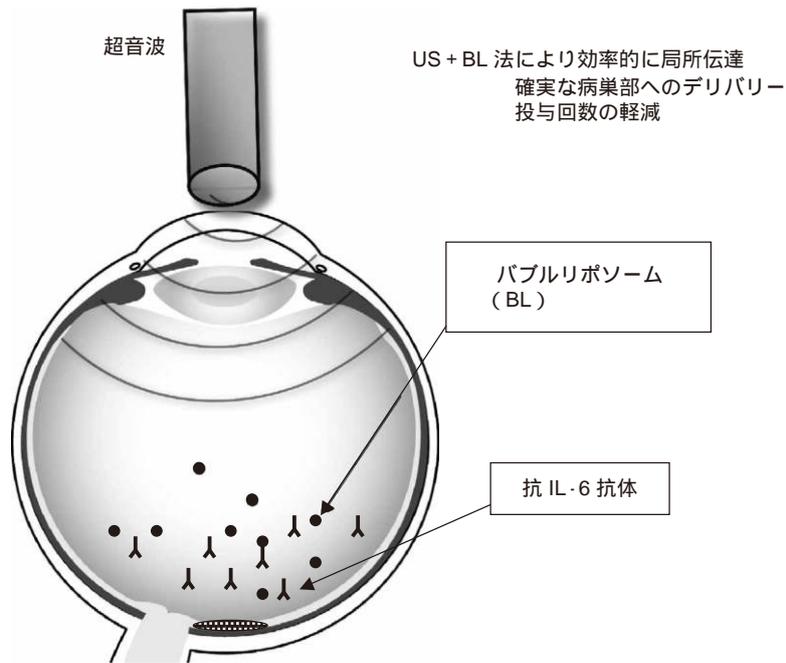


図 18 低エネルギー超音波(US)+バブルリポソーム(BL)法の眼科領域での有用性。

超音波を照射すると、キャビテーション効果で細胞膜構造が変化し、膜透過性が充進する。バブルリポソーム併用でこの効果が増強される。薬物、遺伝子、蛋白質などを細胞内へ効率的にデリバリー可能となる。眼球へは超音波を角膜上から照射できるメリットがある。抗 IL-6 抗体硝子体腔注射と US+BL 法併用により、効果的に網膜下に抗体を伝達できる。

抗 IL-6 抗体 + US

抗 IL-6 抗体 + US + BL

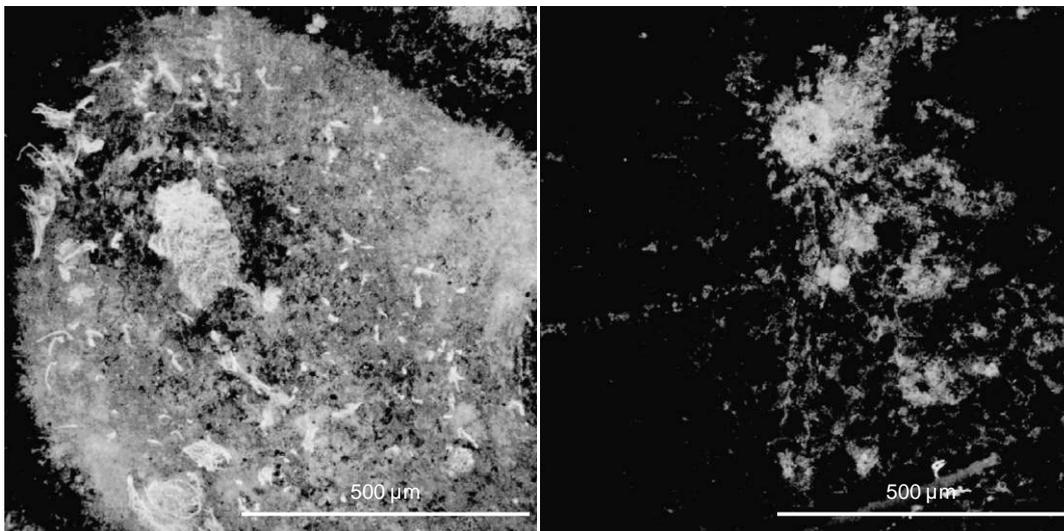


図 19 低エネルギー超音波+バブルリポソーム法による網膜瘢痕の抑制。

抗体と超音波のみでは効果が不十分であるが、バブルリポソーム(BL)を併用することで著明な抑制効果を発現する。

近年、低エネルギー超音波+バブルリポソーム法という細胞内・組織内物質伝達法が脚光を浴びている⁴⁴⁾⁴⁵⁾。既に循環器や泌尿器の分野で造影検査などに実用化されている技術である。超音波を照射すると、キャビテーション効果で細胞膜構造が変化し、膜透過性が充進する。バブルリポソームを併用することでこの効果が増強

される⁴⁶⁾。キャビテーション効果誘発に必要な超音波エネルギーは、通常の眼エコー検査の1/10程度であり、これによる組織障害はほとんどない。このシステムを有効に使うことで、細胞ダメージを最小限に薬物、遺伝子、蛋白質などを細胞内へ伝達することが可能である。網膜下に薬物を輸送しようとしたとき、硝子体腔に投与

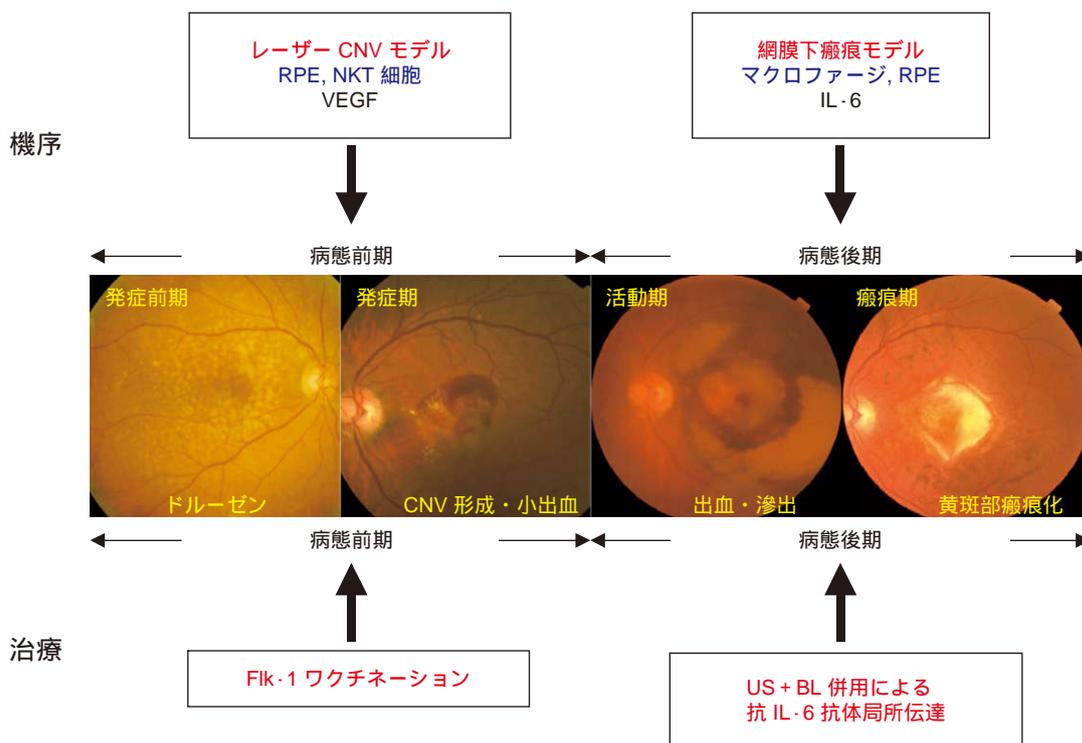


図 20 脈絡膜新生血管病と自然免疫.

さまざまな病期で自然免疫が密接に関与する。病期を考えながら、既存治療と並行して新しい治療が必要であり、その開発が急がれる。

ただけではごく一部しか伝達されない。しかし眼球が外界に直接接しているため、低エネルギー超音波+バブルリポソーム法は、超音波を角膜上から照射できるメリットもあり⁴⁷⁾、眼での薬物輸送に適した方法ではないかと考えた。Green fluorescent protein (GFP) プラスミドを用いた予備実験では、網膜外顆粒層-視細胞層付近に GFP が導入されたため、脈絡膜新生血管病に対して治療効果が期待できた。

我々は抗 IL-6 抗体に加えてバブルリポソームを硝子体腔に注射したうえで、角膜上から網膜に向かって低エネルギー超音波を照射した(図 18)。興味あることに、抗体単独注入では癒痕抑制しえない濃度においても、低エネルギー超音波+バブルリポソーム法を併用すると、1 回投与のみで 7 日目の網脈絡膜癒痕が抑制された(図 19)。今後、生物製剤を組み合わせた癒痕化抑制治療に発展する可能性を見出した。

VI おわりに

ぶどう膜炎に加え、広義の眼炎症疾患という観点から脈絡膜新生血管病を取り上げ、特に自然免疫細胞の役割に焦点を当て研究を行った。ぶどう膜炎で急性期と慢性期では異なる機序で眼炎症が媒介されている可能性がある。脈絡膜新生血管病について、本研究では、これまでの眼局所炎症と自然免疫系の研究基盤をもとに、マウス網脈絡膜癒痕モデルを作製し、脈絡膜新生血管病の最終

的な予後不良原因である黄斑部機能障害・癒痕化抑制に向け、具体的な治療法確立を目指した。本研究で試みた治療を、従来の CNV 形成抑制治療や退縮治療と組み合わせることで、幅広いステージでの脈絡膜血管新生の治療が行えるようになるかもしれない(図 20)。

稿を終えるにあたり、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。本研究遂行にあたり、谷口 克先生(理化学研究所)、R. A. Reisfeld 先生(Scripps research Institute)、P. A. Campochiaro 先生(Wilmer Eye Institute)の御指導ならびにキリンビール株式会社、中外製薬株式会社各位の御協力に深謝いたします。本研究は、文部科学省科学研究費補助金(C16591757, B18390469)および財団法人高齢者眼疾患研究財団補助金により行われました。また九州大学眼科同門会の諸先生方に多大なるご援助をいただきました。

文 献

- 1) Streilein JW : Ocular immune privilege : therapeutic opportunities from an experiment of nature. Nat Rev Immunol 3 : 879—889, 2003.
- 2) Sonoda KH, Exley M, Snapper S, Balk SP, Stein-Streilein J : CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. J Exp Med 190 : 1215—1225, 1999.

- 3) **Sonoda KH, Sasa Y, Qiao H, Tsutsumi C, Hisatomi T, Komiyama S, et al** : Immunoregulatory role of ocular macrophages : the macrophages produce RANTES to suppress experimental autoimmune uveitis. *J Immunol* 171 : 2652—2659, 2003.
- 4) **Takase H, Futagami Y, Yoshida T, Kamoi K, Sugita S, Imai Y, et al** : Cytokine profile in aqueous humor and sera of patients with infectious or noninfectious uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 1557—1561, 2006.
- 5) **Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM** : Th17 : an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24 : 677—688, 2006.
- 6) **Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al** : A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6 : 1133—1141, 2005.
- 7) **Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al** : Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441 : 235—238, 2006.
- 8) **Gery I, Mochizuki M, Nussenblatt RB** : Retinal specific antigens and immunopathogenic process they provoke. *Prog Retinal Res* 5 : 75, 1986.
- 9) **Namba K, Ogasawara K, Kitaichi N, Matsuki N, Takahashi A, Sasamoto Y, et al** : Identification of a peptide inducing experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in H-2Ak-carrying mice. *Clin Exp Immunol* 111 : 442, 1998.
- 10) **Amadi-Obi A, Yu CR, Liu X, Mahdi RM, Clarke GL, Nussenblatt RB, et al** : TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med* 13 : 711—718, 2007.
- 11) **Killingsworth MC, Sarks JP, Sarks SH** : Macrophages related to Bruch's membrane in age-related macular degeneration. *Eye* 4 : 613—621, 1990.
- 12) **Curcio CA, Millican CL** : Basal linear deposit and large druzen are specific for early age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol* 117 : 3229—3239, 1999.
- 13) **Grossniklaus HE, Ling JX, Wallace TM, Dithmar S, Lawson DH, Cohen C, et al** : Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Mol Vis* 8 : 119—126, 2002.
- 14) **Kamei M, Yoneda K, Kume N, Suzuki M, Itabe H, Matsuda K, et al** : Scavenger receptors for oxidized lipoprotein in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 1801—1807, 2007.
- 15) **Sakurai E, Anand A, Ambati BK, van Rooijen N, Ambati J** : Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 3578—3585, 2003.
- 16) **Tsutsumi C, Sonoda KH, Egashira K, Qiao H, Hisatomi T, Nakao S, et al** : The critical role of ocular-infiltrating macrophages in the development of choroidal neovascularization. *J Leukoc Biol* 74 : 25—32, 2003.
- 17) **Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, et al** : Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308 : 385—389, 2005.
- 18) **Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA** : Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 308 : 421—424, 2005.
- 19) **Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, et al** : Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 308 : 419—421, 2005.
- 20) **Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, Sarma JV, Barnum SR, Lambris JD, et al** : Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 : 2328—2333, 2006.
- 21) **Yoshida T, Ohno-Matsui K, Ichinose S, Sato T, Iwata N, Saido TC, et al** : The potential role of amyloid beta in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *J Clin Invest* 115 : 2793—2800, 2005.
- 22) **Imamura Y, Noda S, Hashizume K, Shinoda K, Yamaguchi M, Uchiyama S, et al** : Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice : a model of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 : 11282—11287, 2006.
- 23) **Taniguchi M, Harada M, Kojo S, Nakayama T, Wakao H** : The regulatory role of V α 14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annu Rev Immunol* 21 : 483—513, 2003.
- 24) **Cui J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Toura I, et al** : Requirement for V α 14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 278 : 1623—1626, 1997.
- 25) **Tupin E, Kinjo Y, Kronenberg M** : The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 5 : 405—417, 2007.
- 26) **Seino KI, Fukao K, Muramoto K, Yanagisawa K, Takada Y, Kakuta S, et al** : Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 2577—2581, 2001.
- 27) **Sumida T, Sakamoto A, Murata H, Makino Y, Takahashi H, Yoshida H, et al** : Selective reduction of T cells bearing invariant V α 24J α Q antigen receptor in patients with systemic sclerosis. *J Exp Med* 182 : 1163—1168, 1995.
- 28) **Ishibashi T, Miki K, Sorgente N, Patterson R, Ryan SJ** : Effects of intravitreal administration of steroids on experimental subretinal neovasculariza-

- tion in the subhuman primate. *Arch Ophthalmol* 103 : 708—711, 1985.
- 29) **Tsutsumi-Miyahara C, Sonoda KH, Egashira K, Ishibashi M, Qiao H, Oshima T, et al** : The relative contributions of each subset of ocular-infiltrated cells in experimental choroidal neovascularization. *Br J Ophthalmol* 88 : 1217—1222, 2004.
 - 30) **Akira S, Takeda K, Kaisho T** : Toll-like receptors : critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2 : 675—680, 2001.
 - 31) **Ishida O, Oku H, Ikeda T, Nishimura M, Kawagoe K, Nakamura K** : Is Chlamydia pneumoniae infection a risk factor for age related macular degeneration? *Br J Ophthalmol* 87 : 523—524, 2003.
 - 32) **Kalayoglu MV, Bula D, Arroyo J, Gragoudas ES, D'Amico D, Miller JW** : Identification of Chlamydia pneumoniae within human choroidal neovascular membranes secondary to age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 243 : 1080—1090, 2005.
 - 33) **Elnor SG, Petty HR, Elnor VM, Yoshida A, Bian ZM, Yang D, et al** : TLR4 mediates human retinal pigment epithelial endotoxin binding and cytokine expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 4627—4633, 2005.
 - 34) **Kumar MV, Nagineni CN, Chin MS, Hooks JJ, Detrick B** : Innate immunity in the retina : Toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells. *J Neuroimmunol* 153 : 7—15, 2004.
 - 35) **Oh H, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, et al** : The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 1891—1898, 1999.
 - 36) **Dastgheib K, Green WR** : Granulomatous reaction to Bruch's membrane in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 112 : 813—818, 1994.
 - 37) **Seregard S, Algvere PV, Berglin L** : Immunohistochemical characterization of surgically removed subfoveal fibrovascular membranes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 232 : 325—329, 1994.
 - 38) **Yamada J, Maruyama K, Sano Y, Kinoshita S, Murata Y, Hamuro J** : Promotion of corneal allograft survival by the induction of oxidative macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 448—454, 2004.
 - 39) **Niethammer AG, Xiang R, Becker JC, Wodrich H, Pertl U, Karsten G, et al** : A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth. *Nat Med* 8 : 1369—1375, 2002.
 - 40) **Man AL, Prieto-Garcia ME, Nicoletti C** : Improving M cell mediated transport across mucosal barriers : do certain bacteria hold the keys? *Immunology* 113 : 15—22, 2004.
 - 41) **Strawn LM, McMahon G, App H, Schreck R, Kuchler WR, Longhi MP, et al** : Flk-1 as a target for tumor growth inhibition. *Cancer Res* 56 : 3540—3545, 1996.
 - 42) **Taraboletti G, Margosio B** : Antiangiogenic and antivasular therapy for cancer. *Curr Opin Pharmacol* 1 : 378—384, 2001.
 - 43) **Mochimaru H, Nagai N, Hasegawa G, Kudo-Saito C, Yaguchi T, Usui Y, et al** : Suppression of choroidal neovascularization by dendritic cell vaccination targeting VEGFR2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 4795—4801, 2007.
 - 44) **Wang X, Liang HD, Dong B, Lu QL, Blomley MJ** : Gene transfer with microbubble ultrasound and plasmid DNA into skeletal muscle of mice : comparison between commercially available microbubble contrast agents. *Radiology* 237 : 224—229, 2005.
 - 45) **Greenleaf WJ, Bolander ME, Sarkar G, Goldring MB, Greenleaf JF** : Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection. *Ultrasound Med Biol* 24 : 587—595, 1998.
 - 46) **Sonoda S, Tachibana K, Uchino E, Yamashita T, Sakoda K, Sonoda KH, et al** : Inhibition of melanoma by ultrasound-microbubble-aided drug delivery suggests membrane permeabilization. *Cancer Biol Ther* 6 : 1276—1283, 2007.
 - 47) **Sonoda S, Tachibana K, Uchino E, Okubo A, Yamamoto M, Sakoda K, et al** : Gene transfer to corneal epithelium and keratocytes mediated by ultrasound with microbubbles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 558—564, 2006.
-