



図 4 Ribonuclease protection assay (RPA)法によるケモカインレセプターのスクリーニング。大きさの異なる複数のプローブを用いることで1サンプル中の複数の mRNA の定量を行う方法。同種異系角膜移植後の移植片拒絶眼で、CCR1 mRNA, CCR2 mRNA および CCR5 mRNA が過剰発現している。
① 正常マウス眼, ② 同種同系角膜移植後マウス眼, ③ 同種異系角膜移植後の移植片生着眼, ④ 同種異系角膜移植後の移植片拒絶眼

は角膜移植後早期から発現しており²⁹⁾、CCR1 のリガンドの RANTES, macrophage inflammatory protein (MIP) 1a も術後早期から発現していることから²⁹⁾、CCR1 というレセプターは効果相のみならず抗原提示、認識相にも関与しながら拒絶反応発生にかかわっているものと考えられる。

Ⅲ ヒト角膜に存在する免疫担当細胞の存在と角膜移植後免疫反応にかかわる可能性

1. ヒト角膜に存在する免疫担当細胞

マウスに関しては角膜移植モデルを用いた検討から上述のような機序が明らかになってきているが、ヒトの角膜においてはそもそも抗原提示能をもった細胞が正常の角膜に存在するのか、最近進歩した各種細胞マーカーを用いて系統立った研究は報告されていない。もちろんマウスモデルでのような機能解析をヒトで行うことはできないが、ヒトの角膜に存在している抗原提示能をもつ細胞をまず明らかにすることでマウスモデルでの現象がヒ

トにも当てはまる可能性があるか否かが明らかになる。そこでまず各種の白血球マーカーを用いて角膜に存在する白血球の同定、分類を試みた。結果としてヒト角膜上皮層には、3つのフェノタイプからなる未熟樹状細胞が³⁰⁾、角膜実質層には、樹状細胞、マクロファージを含めた単球系細胞が³¹⁾、結膜下にはマクロファージ系細胞を中心とした細胞³²⁾が構造的に分布していた。

2. ヒト角膜実質免疫担当細胞の分布メカニズム

無血管の正常角膜実質における白血球がどのようにして分布するのかは明らかでない。しかし分化した白血球が角膜で自己複製することは考えにくく、周辺部の血管から遊走してくることに疑問の余地はないと考えられた。そこで角膜実質細胞と上皮細胞が何らかのケモカインを産生し、特異的ケモカインレセプターをもつ白血球を角膜の中央部まで集めているとの仮説を立てた。まずヒト角膜実質細胞と単球系細胞を分離してそれぞれの細胞を検討するため、米国アイバンクの研究用角膜実質から磁気ビーズによる細胞の分離を行った。方法は、角膜実質を一晩コラゲナーゼ処理して細胞成分を採取した。磁気ビーズ付き抗 CD45 抗体を反応させ、ヒト角膜実質細胞と白血球を分離した。次にヒト角膜実質単球系細胞のケモカインレセプター mRNA の発現を検討するため、multiplex polymerase chain reaction (PCR) システムを用いて多数のケモカインレセプターの中から発現しているケモカインレセプターを検討したところ、ヒト角膜実質単球系細胞は CCR2 mRNA と CCR7 mRNA を発現していることが明らかになった³³⁾。またこれらの細胞は、免疫細胞化学的に抗 CCR2 抗体陽性であったことから、CCR2 が角膜実質中の細胞分布を決定する候補因子と考えられた。CCR2 は CCL2 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) ケモカインのレセプターであるので、今度は角膜実質・上皮細胞が、CCR2 の走化性因子の CCL2 (MCP-1) を発現するかどうかを検討した。結果としてヒト角膜実質細胞、ヒト角膜上皮細胞は、CCL2 (MCP-1) mRNA を発現し、フローサイトメーターでも角膜実質・角膜上皮細胞が CCL2 (MCP-1) 蛋白質を発現していることが明らかとなった³³⁾。

そこで角膜由来の細胞がもつケモカイン・ケモカインレセプターが実際に機能しているかを明らかにするため、ボイデン・チャンパーによる走化性の検討を行った。CCL2 (MCP-1) に対するヒト角膜実質の CD45 (汎白血球マーカー) 陽性細胞の走化性を検討したところ、ヒト角膜実質の CD45 陽性細胞は有意に CCL2 (MCP-1) に対して走化性を示した (図 5A)。次にヒト角膜実質細胞の培養上清に対するヒト角膜実質の単球系細胞の走化性を同じくボイデン・チャンパーによって検討した。ヒト角膜実質細胞培養上清に対して有意に高い走化性を示したヒト角膜実質の単球系細胞は、抗 CCL2 (MCP-1) 抗体を加えたヒト角膜実質細胞培養上清に対しては走化性が

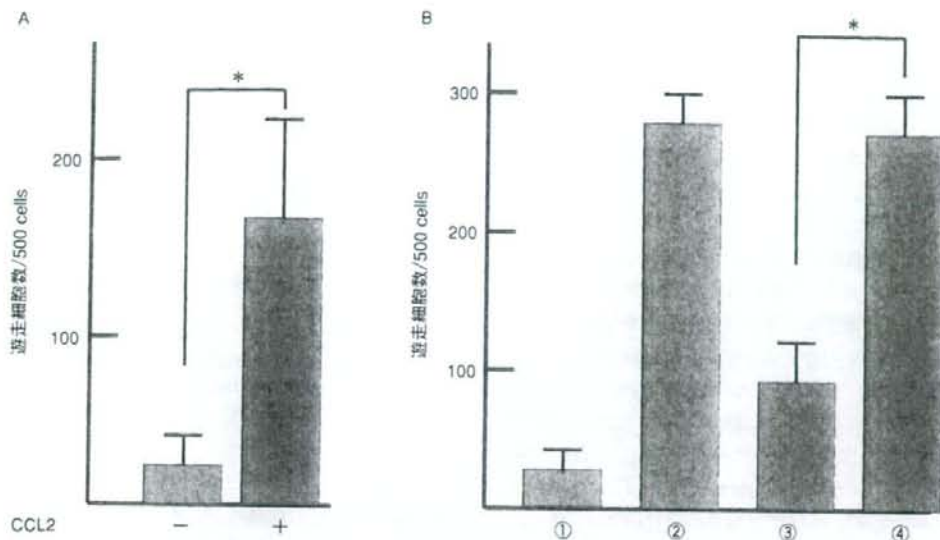


図5 ボイデン・チャンバーによる走化性の検討。

ボイデン・チャンバーは、ケモカインなどの走化性因子がどの程度の細胞を移動させるかをみることで走化性を定量的に評価する方法。A: ヒト角膜実質由来 CD45 (汎白血球マーカー) 陽性細胞の CCL2 (MCP-1) に対する走化性。CCL2 (MCP-1) は、CCL2 (MCP-1) を反応させない場合に比べて有意にヒト角膜実質由来 CD45 陽性細胞を遊走させた。B: ヒト角膜実質細胞の培養上清に対するヒト角膜実質由来 CD45 陽性細胞の走化性。以下の4つの溶液の走化性を検討した。① Mediumのみ、② ヒト角膜実質細胞培養上清、③ ヒト角膜実質細胞培養上清+抗 CCL2 抗体、④ ヒト角膜実質細胞培養上清+対照抗体。ヒト角膜実質細胞培養上清に対して有意に高い走化性を示したヒト角膜実質由来 CD45 陽性細胞は、抗 CCL2 (MCP-1) 抗体を加えたヒト角膜実質細胞培養上清に対しては走化性が低下している。*: $p < 0.01$ 。

低下し、対照 IgG を加えたヒト角膜実質細胞培養上清に対しては、ヒト角膜実質細胞培養上清と同程度の走化性を示した (図 5B)。以上の機能解析から、単球系細胞がヒト角膜実質中に分布するメカニズムに CCL2-CCR2 が関与している可能性が考えられた。

3. ヒト角膜の免疫担当細胞による直接認識の可能性
抗原認識パターンには2つある。それは移植片中のドナー由来の組織適合抗原 (major histocompatibility, MHC) 分子を直接 T 細胞レセプターが認識する「直接認識」とレシビエント抗原提示細胞によって処理された抗原ペプチドがレシビエント MHC によって提示され、T 細胞レセプターに認識される「間接認識」の2つである。通常の臓器移植では臓器自体に MHC 陽性細胞が多数存在しているため直接認識が中心とされているが、角膜移植では角膜自体に MHC 陽性の細胞がほとんど存在しないとされていたこともあり間接認識が中心であろうと考えられていた³⁴⁾。しかし、マウス角膜の中央部でも抗原提示能をもつ細胞が存在することが報告された⁶⁾⁻⁸⁾。そのため角膜に存在する MHC 分子をもった細胞を直接 T 細胞が認識する「直接認識」によるパターンもありうるのではないかと考えられるようになってきた。実際にマウス角膜移植後には頭部リンパ節でドナー角膜由来の MHC クラス II 陽性の樹状細胞が検出され、抗原の直接



図6 ヒト角膜上皮、実質由来 CD45 陽性細胞の CCR7 mRNA の発現。

CD45 陽性磁気ビーズで分離した白血球と各組織由来細胞の CCR7 mRNA の発現を reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により検討した。すべてのサンプルで house keeping gene の GAPDH は検出された。ヒト角膜上皮、実質ともに CD45 陽性磁気ビーズで分離した白血球に CCR7 mRNA を発現している。

認識も実際に起こっていることが示された³⁵⁾。角膜移植においてこのようなグラフトからホストに至る白血球の動態が直接証明されたことはこれまでになく興味深い。

そこでマウスで示された抗原の直接認識がヒトの角膜移植後にも起きる可能性があるのか否かを検討した。ヒトではもちろんマウスのような機能解析は不可能であるため、角膜上皮、実質に存在する抗原提示細胞がリンパ節に存在する CCL21/SLC や CCL19/ELC に対して遊走能をもつ、すなわち CCR7 を発現するのか、また上皮に存在する未熟樹状細胞が成熟樹状細胞化するかどうかを調べることで、ドナー角膜由来の細胞がホストのリンパ節に到達し抗原提示にかかわるのか否かを検討した。図 6 に示すようにヒト角膜から CD45 陽性磁気ビーズで分離した角膜上皮、実質由来の白血球は、CCR7 mRNA を発現していた。また同じく分離した角膜上皮の未熟樹状細胞では、活性型表面マーカーの CD40、CD86 は陰性であった。これを Tumor necrosis factor (TNF)- α (20 ng/ml) およびポ・ポリサッカライド (LPS, 100 ng/ml) で 3 日間培養刺激したところ CD40、CD86 陽性の成熟樹状細胞に変化した³⁰⁾。これらはまだ証拠として十分ではないが、ヒトの角膜においても角膜由来の抗原提示細胞が抗原の直接認識にかかわる可能性があることを示すものと考えられた。

IV マウス培養アロ角膜内皮細胞移植の免疫反応の特徴

1. 角膜内皮細胞移植

水疱性角膜症という角膜内皮細胞のみの障害に対してこれまで全層角膜移植が行われていた。これに対し最近、臨床、研究の分野で内皮細胞のみを移植しようという試みがなされてきている。臨床的には、角膜内皮に加えてごく薄い実質をドナー角膜より除去して同様に内皮細胞と実質を除去した水疱性角膜症眼に移植する方法、Descemet 膜のみを除去した角膜に移植する方法が行われている¹²⁾。研究の分野では、ヒト角膜内皮細胞の前駆細胞を注射で前房内へ入れてうづ伏せ姿勢を維持することで内皮面に貼り付ける方法、培養ヒト内皮細胞単独のシートを作製し、全層打ち抜いた角膜内皮に貼り付ける方法、薄いコラーゲンを Descemet 膜の代わりとしてその上に培養ヒト角膜内皮細胞を播種し、シートを作製する方法^{13)~18)}などが報告され、臨床応用目前と考えられる。しかしながら内皮細胞のみを移植するという術式は新しいもので、これまでアロ抗原をもつ内皮細胞のみを移植した場合の免疫反応に関する知見は明らかになっていなかった。そこでマウスの角膜内皮細胞のセルラインをマウス角膜の裏面に接着させ移植するモデルを作製し、マウスの全層移植モデルとの免疫反応の差を明らかにする検討を行った³⁶⁾。

2. マウス培養アロ角膜内皮細胞移植モデルの作製と拒絶反応発生率

まず 0.05% 塩化ベンザルコニウムを前房内へ注入し、ホストの角膜内皮細胞を除去することでホスト角膜が水

表 1 拒絶反応発生率(術後 6 週目)

群	眼数	拒絶反応発生率(%)
同系全層	14	0
同系内皮除去	13	0
アロ全層	19	74
培養アロ内皮	15	0
シャム手術	14	79

同系内皮除去群の 7 週目に移植片の浮腫改善例がみられたため、術後経過観察期間を 6 週間とした。培養アロ内皮群では 3 眼で透明性の維持できない眼があったが、組織学的に細胞浸潤を認めなかったため内皮細胞数減少による角膜浮腫とした。

慢性角膜症となる病態モデルをはじめて作製した。これは従来の正常マウス角膜に移植するモデルとは異なり、今回はじめて我々が行った臨床の水疱性角膜症に近いマウス角膜移植モデルである。次に不死化した培養マウス角膜内皮細胞(C3H マウス由来)を Pkh 染色し、内皮細胞を除去した BALB/c マウス角膜の Descemet 膜上に播種、遠心後、2 日間培養し、再構築角膜とした。これにより内皮細胞だけが C3H で実質と上皮が BALB/c マウス由来の角膜が作製できた。ホストはすべて水疱性角膜症の BALB/c マウス、グラフトは C3H マウス、BALB/c マウスおよびこれらのキメラ角膜を用いた。グラフトとして以下の 5 つを用いて全層角膜移植を行った

- ① ホストと同種同系の BALB/c マウス角膜を移植した同系全層群
- ② BALB/c マウスの角膜内皮除去角膜を移植した同系内皮除去群
- ③ ホストと同種異系の C3H マウス角膜を用いたアロ全層群
- ④ BALB/c マウスの角膜実質と上皮に培養 C3H 角膜内皮細胞を付着させ移植した培養アロ内皮群
- ⑤ C3H マウスの角膜実質と上皮に培養 C3H 角膜内皮細胞を付着させ移植したシャム手術群

拒絶反応発生の定義は、角膜実質の混濁のため虹彩血管の透視困難な状態としたが、角膜浮腫のみで実質混濁を伴わないものは、組織学的に単核球の浸潤を認めた場合に拒絶反応発生とした。浸潤を認めない場合は内皮細胞数減少による角膜浮腫として拒絶反応には含めなかった。5 群の拒絶反応発生率を表 1 に示す。マウスの角膜内皮細胞は除去しても再増殖を起こすため、まず同系内皮除去群において何週間の経過で角膜浮腫が消失するかを検討した。その結果、術後 6 週までは全例で浮腫が持続したが、7 週目以降で角膜浮腫の回復する角膜が存在したため、本モデルでの臨床経過の観察期間を 6 週間と定めた。経過観察期間中、同系全層群ではすべて透明性

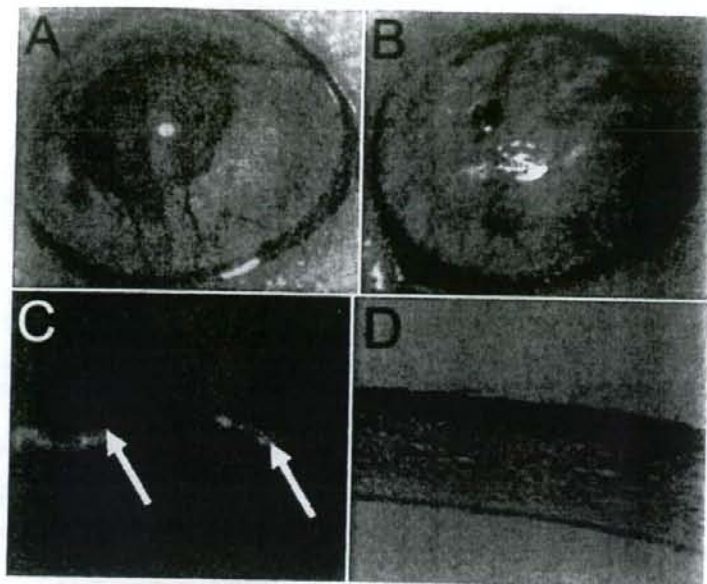


図7 前眼部写真および組織所見(術後4週目)。

A: アロ全層群の前眼部写真。移植角膜は浮腫により盛り上がって見え、前房内が見えにくくなっている。B: 培養アロ内皮群の前眼部写真。角膜浮腫はなく透明性を維持している。C: 培養アロ内皮群の内皮面の組織所見。角膜内皮はPapanicolaou染色で赤く染色されている(矢印)。D: 培養アロ内皮群のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色所見。グラフト内に浸潤細胞はほとんどみられず、拒絶反応は発生していないと考えられる。

を維持した。アロ全層群とシャム手術群はほぼ同様に拒絶反応を起こしていたが、培養アロ内皮群では拒絶反応が起きなかった。代表的なアロ全層群と培養アロ内皮群の前眼部写真と培養アロ内皮群の組織所見を示す(図7)。これらの群について術後4週目に遅延型過敏反応を検討し、さらに各群のマウスの脾臓を摘出し、C3Hの脾細胞に対する混合リンパ球培養試験を行ったところ、培養アロ内皮群では角膜の臨床経過によく一致し、どちらも陽性所見を示さない結果となった。以上のように、培養アロ角膜内皮細胞移植では *in vivo*, *in vitro* ともに全層角膜移植とは異なり、拒絶反応発生を示す所見は全く認められなかった。

3. 培養アロ角膜内皮細胞移植後の拒絶反応非発生メカニズム

一般にアログラフトに対して拒絶反応が起きない主な理由として以下の3つの可能性が考えられる。それらは、アロ抗原に対し特異的な抑制をかける免疫抑制(suppression)、アロ抗原を認識しているが反応を起こさない不応答(anergy)、アロ抗原を認識していない免疫無視(ignorance)である。そこで培養アロ角膜内皮細胞移植後の拒絶反応非発生メカニズムの検討を行った。

1) 養子移入法による制御性T細胞(免疫抑制能をもつT細胞)産生の検討

培養アロ角膜内皮細胞移植後8週目および正常マウス

の脾細胞由来の単一細胞を正常BALB/cマウスの静脈に注射した(5×10^7 個/匹)。これらのマウスにC3Hマウス角膜の全層移植を行い、両群の術後拒絶反応発生率を比較した。培養アロ角膜内皮細胞移植後に制御性T細胞(免疫抑制能をもつT細胞)が産生されていれば養子移入マウスで拒絶反応発生率が低下するはずだからである。結果として培養アロ角膜内皮細胞移植後の脾細胞養子移入マウスで拒絶反応発生率は対照に比べて低下せず、制御性(免疫抑制性)T細胞は産生されていない、すなわち培養アロ角膜内皮細胞移植により免疫抑制は起きていないものと考えられた。この結果は免疫抑制がかかることとされる全層角膜移植後長期生着眼における結果²¹⁾とは異なっていた。また前房内に上皮を剥離した角膜を入れると前房関連免疫偏位(anterior chamber-associated immune deviation, ACAID)により免疫抑制がかかることの報告²²⁾を踏まえて培養アロ内皮細胞移植後にACAIDの誘導を検討したが、本モデルではACAIDは誘導されなかった。

2) アロ抗原感作後の培養アロ角膜内皮細胞移植

予めアロ(C3Hの脾細胞)抗原感作(1×10^7 個/匹)の細胞を皮下に注射を行ったBALB/cマウスに培養アロ角膜内皮細胞移植術を行い、正常BALB/cマウスに培養アロ角膜内皮細胞移植術を行った群と拒絶反応非発生率を検討した。結果として角膜内皮細胞に反応するT細胞

が予め存在しても拒絶反応は発生しないことから、培養アロ角膜内皮細胞は移植されていてもその存在をホスト角膜が認識していない免疫無視の可能性が高いと考えられた。しかし、まだアロ抗原感作後の内皮細胞移植によって不応答が得られた可能性も完全には否定できなかったため、さらに術後 8 週目に遅延型過敏反応の有無を検討したところ、移植されたアロ角膜内皮細胞は拒絶されていないにもかかわらず遅延型過敏反応は検出された。すなわち間違いなく抗原の認識された状態で細胞性免疫反応が検出されたことから、本モデルにおいて不応答は誘導されていないことが明らかとなった。

以上の結果より培養アロ角膜内皮細胞を移植して拒絶反応が発生しない理由は、免疫抑制や不応答によるのではなく、アロ抗原を認識しない免疫無視によっていると考えられた。角膜内皮は前房水に面した角膜裏面という特異な解剖学的な位置に存在している。この位置では Descemet 膜を白血球が通過できない可能性が高いことを考慮すると抗原認識可能な経路は前房水だけとなるため、ホストに認識される確率が極端に下がる可能性がまず考えられる。また Fas をもつ浸潤細胞にアポトーシスを起こす FasL (CD95L)³⁹⁾⁴⁰⁾ や T 細胞の活性化を抑制する B7-H1 (PD-L1)⁴¹⁾ を角膜内皮細胞がもつという細胞自体の特殊性も、培養アロ角膜内皮細胞移植において免疫無視という特殊な状態を起こしている原因ではないかと考えられる。

V まとめ

マウス全層角膜移植モデルにおける拒絶反応発生メカニズムから白血球の移動に注目し、拒絶反応発生に機能的に關与する CCR1 および CCR7 という 2 つのケモカインレセプターを見出した。これらは全層角膜移植後拒絶反応抑制法につながる可能性のある新しいターゲットとして臨床応用が期待される。さらに結膜下注射という投与方法が単に眼局所の薬剤濃度を上げるだけでなく、所属リンパ節に対するドラッグデリバリー法ともなっているということも付け加えておきたい。次に 2 つめのテーマとして取り上げた正常ヒト角膜に存在している樹状細胞、単球系細胞をはじめとする白血球の存在は重要である。今回述べた拒絶反応発生にかかわりうること以外に、外来抗原のパターン認識レセプター、toll-like receptor を発現し³¹⁾、無血管の角膜において細菌防御の first line として重要な役割を果たしていると考えられる。細胞顕微鏡での前眼部観察という日常診療においても意識しておきたい事実である。最後に取り上げた培養アロ角膜内皮移植の免疫反応については、抗原の存在自体が認識されない免疫無視により拒絶反応が起きにくいことを報告した。角膜内皮細胞は角膜の透明性を維持する最も重要な細胞であり、また角膜移植を必要とする原因疾患も角膜内皮細胞数減少が最も多い。角膜内皮細胞

は、Descemet 膜と前房水に挟まれる解剖学的位置関係やこの細胞のもつ免疫学的な性質から得られる全身の組織の中でも類まれな細胞である。この特異な細胞の免疫特権を最大限に利用するためにも、培養アロ角膜内皮移植術を臨床の場で実現すること自体が今回の報告のテーマである「拒絶反応のない理想的な角膜移植手術」により近づくことになるものと私は考えている。

文 献

- 1) Zirm EK: Eine erfolgreiche totale Keratoplastik (A successful total keratoplasty). 1906. *Refract Corneal Surg* 5: 258-261, 1989.
- 2) Yamagami S, Suzuki Y, Tsuru T: Risk factors for graft failure in penetrating keratoplasty. *Acta Ophthalmol Scand* 74: 584-588, 1996.
- 3) Streilein JW: Immunobiology and immunopathology of corneal transplantation. *Chem Immunol* 73: 186-206, 1999.
- 4) Niederkorn JY: The immune privilege of corneal grafts. *J Leukoc Biol* 74: 167-171, 2003.
- 5) Hori J, Niederkorn JY: Immunogenicity and immune privilege of corneal allografts. *Chem Immunol Allergy* 92: 290-299, 2007.
- 6) Brissette-Storkus CS, Reynolds SM, Lepisto AJ, Hendricks RL: Identification of a novel macrophage population in the normal mouse corneal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 2264-2271, 2002.
- 7) Hamrah P, Zhang Q, Liu Y, Dana MR: Novel characterization of MHC class II-negative population of resident corneal Langerhans cell-type dendritic cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 639-646, 2002.
- 8) Hamrah P, Liu Y, Zhang Q, Dana MR: The corneal stroma is endowed with a significant number of resident dendritic cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 581-589, 2003.
- 9) Melles GR, Eggink FA, Lander F, Pels E, Rietveld FJ, Beekhuis WH: A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty. *Cornea* 17: 618-626, 1998.
- 10) Melles GR, Lander F, van Dooren BT, Pels E, Beekhuis WH: Preliminary clinical results of posterior lamellar keratoplasty through a sclerocorneal pocket incision. *Ophthalmology* 107: 1850-1856, 2000.
- 11) Terry MA, Ousley PJ: Rapid visual rehabilitation after endothelial transplants with deep lamellar endothelial keratoplasty (DLEK). *Cornea* 23: 143-153, 2004.
- 12) Gorovoy MS: Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea* 25: 886-889, 2006.
- 13) Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Cannon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, et al: Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial

- cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 800—806, 2004.
- 14) Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Usui T, Tanaka K, Hattori S, et al : Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 2992—2997, 2004.
 - 15) Shimmura S, Miyashita H, Konomi K, Shinozaki N, Taguchi T, Kobayashi H, et al : Transplantation of corneal endothelium with Descemet's membrane using a hydroxyethyl methacrylate polymer as a carrier. *Br J Ophthalmol* 89 : 134—137, 2005.
 - 16) Mimura T, Yamagami S, Usui T, Ishii Y, Ono K, Yokoo S, et al : Long-term outcome of iron-endocytosed cultured corneal endothelial cells transplantation with magnetic attraction. *Exp Eye Res* 80 : 149—157, 2005.
 - 17) Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Yanagi Y, Usui T, Ono K, et al : Sphere therapy for corneal endothelium deficiency in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 3128—3135, 2005.
 - 18) Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Yanagi Y, Usui T, Ono K, et al : Treatment of rabbit bullous keratopathy with precursors derived from cultured human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 3637—3644, 2005.
 - 19) Yamagami S, Kawashima H, Endo H, Tsuru T, Shibui H, Kagawa Y, et al : Cytokine profiles of aqueous humor and graft in orthotopic mouse corneal transplantation. *Transplantation* 66 : 1504—1510, 1998.
 - 20) Sano Y, Osawa H, Sotozono C, Kinoshita S : Cytokine expression during orthotopic corneal allograft rejection in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 1953—1957, 1998.
 - 21) Luster AD : The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 14 : 129—135, 2002.
 - 22) Yoshida R, Nagira M, Kitaura M, Imagawa N, Imai T, Yoshie O : Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *J Biol Chem* 273 : 7118—7122, 1998.
 - 23) Saeki H, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST : Cutting edge : secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* 162 : 2472—2475, 1999.
 - 24) Yamagami S, Dana MR : The critical role of lymph nodes in corneal alloimmunization and graft rejection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 1293—1298, 2001.
 - 25) Yamagami S, Dana MR, Tsuru T : Draining lymph nodes play an essential role in alloimmunity generated in response to high-risk corneal transplantation. *Cornea* 21 : 405—409, 2002.
 - 26) Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, Williams LT, et al : Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 189 : 451—60, 1999.
 - 27) Hamrah P, Yamagami S, Liu Y, Zhang Q, Vora SS, Lu B, et al : Deletion of the chemokine receptor CCR1 prolongs corneal allograft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 1228—1236, 2007.
 - 28) Yamada J, Ksander BR, Streilein JW : Cytotoxic T cells play no essential role in acute rejection of orthotopic corneal allografts in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 386—392, 2001.
 - 29) Yamagami S, Hamrah P, Zhang Q, Liu Y, Huq S, Dana MR : Early ocular chemokine gene expression and leukocyte infiltration after high-risk corneal transplantation. *Mol Vis* 11 : 632—640, 2005.
 - 30) Yamagami S, Yokoo S, Yamagami H, Amano S, Ebihara N : Distinct population of dendritic cells in normal human donor corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 4489—4494, 2005.
 - 31) Yamagami S, Ebihara N, Usui T, Yokoo S, Amano S : Bone marrow-derived cells in normal human corneal stroma. *Arch Ophthalmol* 124 : 62—69, 2006.
 - 32) Yamagami S, Yokoo S, Amano S, Ebihara N : Characterization of bone marrow derived cells in the substantia propria of the human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 4476—4481, 2007.
 - 33) Ebihara N, Yamagami S, Yokoo S, Amano S, Murakami A : Involvement of CCL2-CCR2 interaction in monocyte-lineage cell recruitment of normal human corneal stroma. *J Immunol* 178 : 3288—3292, 2007.
 - 34) Sano Y, Ksander BR, Streilein JW : Langerhans cells, orthotopic corneal allografts, and direct and indirect pathways of T-cell allorecognition. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 1422—1431, 2000.
 - 35) Liu Y, Hamrah P, Zhang Q, Taylor AW, Dana MR : Draining lymph nodes of corneal transplant hosts exhibit evidence for donor major histocompatibility complex (MHC) class II-positive dendritic cells derived from MHC class II-negative grafts. *J Exp Med* 195 : 259—268, 2002.
 - 36) Hayashi T, Yamagami S, Tanaka K, Yokoo S, Usui T, Amano S, et al : A mouse model of allogeneic corneal endothelial cell transplantation. *Cornea* 2007 (in press).
 - 37) Yamada J, Hamuro J, Sano Y, Maruyama K, Kinoshita S : Allogeneic corneal tolerance in rodents with long-term graft survival. *Transplantation* 79 : 1362—1369, 2005.
 - 38) Yamada J, Streilein JW : Induction of anterior chamber-associated immune deviation by corneal allografts placed in the anterior chamber. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : 2833—2843, 1997.

- 39) Yamagami S, Kawashima H, Tsuru T, Yamagami H, Kayagaki N, Yagita H, et al. Role of Fas-Fas ligand interactions in the immunorejection of allogeneic mouse corneal transplants. *Transplantation* 64 : 1107-1111, 1997.
- 40) Hori J, Joyce NC, Streilein JW. Immune privilege and immunogenicity reside among different layers of the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 3032-3042, 2000.
- 41) Hori J, Wang M, Miyashita M, Tanemoto K, Takahashi H, Takemori T, et al. B7-H1-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege of corneal allografts. *J Immunol* 177 : 5928-5935, 2006.
-

Comment: 西田 輝夫

角膜移植に関する法体制が整備され、ほぼ現在と同じような角膜移植が我が国でも行われるようになって丁度50年が経過した。今日では、一つの確立した視機能回復手術として角膜移植が行われており、その術後成績もある程度満足できるところに到達してきている。しかしながら、提供角膜の絶対的な不足という社会的な問題に加え、拒絶反応や眼圧管理など、よりよい術後成績のためにまだまだ解決せねばならない医学的問題が山積している。幸い角膜の移植に関しては、心臓や肝臓などの臓器の移植に比し拒絶反応の発生頻度は比較的少なく、またほとんどの例で副腎皮質ステロイドによりある程度抑制できるものの、今回の宿題報告で山上 聡氏がその演題名に掲げられているように「拒絶反応のない理想的な角膜移植手術」は、我々の夢でもある。いくつかの方策が考えられるが、一つは全く人工的な角膜の開発であり、もう一つは拒絶反応の免疫学的な機序を明らかにして術後に特異的な免疫反応の抑制をかけることである。また、現在急速に開発されているように、全層の角膜を移植するのではなく必要な角膜の部分のみを移植することも、拒絶反応の頻度を下げることに役立つと考えられる。

山上氏は、マウス全層角膜移植モデルを用いてエレガントな方法で、拒絶反応には所属リンパ節で発現されるケモカインであるCCL21とCCL19が関与していることを明らかにし、さらに角膜実質中の関与するケモカイン受容体がCCR1およびCCR7であることを示された。このように移植された角膜実質中の細胞を中心に、ホストの所属リンパ節に至る白血球の動態およびその移動に関与するケモカイン系を明確にすることにより、今後角膜移植後の拒絶反応の抑制という治療法を開発する際の分子標的を示された。

今まで角膜実質の主たる構成細胞である線維芽細胞に加え、樹状細胞や単球系細胞などの生理的な機能はあまり明確にされていなかったが、今回の報告で、所属リンパ節での抗原認識のみならず、角膜内で直接抗原が提示され認識される可能性を示された。

一方、パーツ移植の一つの例として角膜内皮移植の動物モデルを確立され、きわめて興味深いことに、培養アロ角膜内皮移植では拒絶反応が生じないことを示された。内皮移植では、その解剖学的な特性から異種抗原を認識しない免疫無視であると考えられる。角膜は皮膚とその発生を同じにする組織であるが、透明性の獲得と交換にさまざまな生体防護反応を失っていると考えられる。今回示されたこともきわめて興味ある現象であり、今後より深くその機序を解明されていくことを期待する。

山上氏は、角膜を中心とする前眼部における免疫反応を中心に、細胞のレベル、サイトカインのレベルあるいは今回のようにケモカインのレベルで、今まで多くの業績を積み重ねておられる。今回、宿題報告で提示された知見をもとに今後さらに理想の角膜移植手術を目指して研究を深めていかれ、いつの日か我々が実際の臨床の場で拒絶反応を克服して角膜移植を行う日が来ることを心より希望する。

先天性遺伝性角膜内皮ジストロフィ

Congenital Hereditary Endothelial Dystrophy

山田 昌和*

はじめに

先天性遺伝性角膜内皮ジストロフィ (congenital hereditary endothelial dystrophy: CHED) は1893年に Laurenceにより初めて報告されたまれな先天性角膜ジストロフィであり¹⁾、わが国でも少数の報告例がある。本疾患は先天性の水疱性角膜症とも言うべき疾患であり、さまざまな名称が付けられていたが、Pearceらにより提唱された CHED が現在は広く用いられている^{2,3)}。遺伝形式には常染色体優性遺伝と劣性遺伝の両方があり、前者を CHED1、後者を CHED2 とよぶ。両者の責任遺伝子は異なることがわかってきており、臨床的にも違いがみられる。

非常にまれな角膜ジストロフィであるが、乳幼児の両眼性の角膜混濁を診た場合には鑑別疾患の一つである。幼少時より発症するために視性刺激遮断弱視の問題があるが、場合によっては角膜移植の適応となる。ここでは本症の臨床所見、検査所見、鑑別診断について概説する。

I 臨床所見および臨床経過

両眼の角膜混濁が生直後から生後1~2年以内に生じることがほとんどで、進行はごく緩徐であることが多い(図1)。視力予後は一般に不良であり、特に眼振を伴う場合は視力不良のサインである。ただし、発症時期が遅い症例や混濁が著明でない症例では、ある程度の視力の発達がみられる。角膜混濁は内皮機能不全による実質浮腫によるものであり、角膜厚は正常の2~3倍にまで増

加していることもある。通常、角膜内への血管の侵入は認められない。Peters 異常や強膜化角膜などと異なり、通常は前眼部、後眼部ともに異常所見を伴わない。また、一般に全身的な先天異常や精神発達遅滞を伴わない。

常染色体優性遺伝と劣性遺伝の場合があり、後者では家族歴がはっきりしない(孤発例)ことがある。一般に優性遺伝の CHED1 では発症年齢が遅く、混濁の程度が軽い傾向がある^{4,5)}。視力が比較的良好な例は CHED1 でみられやすく、逆に劣性遺伝の CHED2 では視力予後が不良で、眼振を伴いやすい。

角膜所見は基本的に変化しないか、緩徐に進行する。ただし、成人例では2次的な変化が加わり、spheroid 変性や血管侵入を伴ってくることもある。図2は40歳代の CHED1 症例の前眼部写真であるが、角膜浮腫に加えて続発性に spheroid 変性を生じていることがわかる。

小児の全層角膜移植は手術手技や術後管理に困難な点が多く、予後不良であることが多いが、CHED に関しては比較的良好な成績が報告されている^{6,7)}。これは、1) 虹彩や水晶体などに異常を伴わないこと、2) 全身合併症や精神発達遅滞などを伴わないこと、3) 発症時期は生後早期であっても、手術は成長してから行っていることが多いこと(大人になって手術を行う場合もある)などが関係しているものと推測される。

術後観察期間が3年程度の2つの報告^{6,7)}では、移植片透明治癒率は90%程度ときわめて高く、視力予後でも0.2以上の視力が66~84%の症例で得られている。

*Masakazu Yamada: 国立病院機構東京医療センター感覚器センター

[別刷請求先] 山田昌和: 〒152-8982 東京都目黒区東が丘2-5-1 国立病院機構東京医療センター感覚器センター

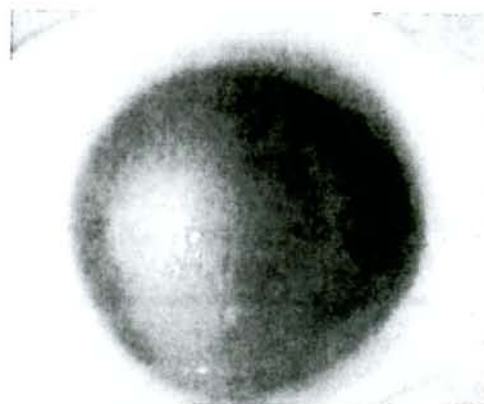


図1 先天性角膜内皮ジストロフィ
角膜上皮、実質に浮腫状混濁がみられるが、優性遺伝の症例であり、混濁の程度は比較的軽い。



図2 先天性角膜内皮ジストロフィ
成人例であり、浮腫状混濁の程度は軽いが、spheroid 変性や周辺からの血管侵入など続発性的変化を生じている

この数字は、成人の角膜ジストロフィに対する全層角膜移植の成績と比較しても極端に劣るものではない。ただし、重症例で乳幼児のうちに手術を行う場合には、周術期の管理の問題と視性刺激遮断弱視の存在があるので、これほどの成績は期待できない。

II 検査所見

1. 病理組織所見

病理組織所見では、Descemet膜の肥厚と角膜内皮細胞の欠如、もしくは著明な減少が特徴とされている^{3,8)}。

角膜上皮には、細胞間隙の拡大や上皮基底細胞下の水疱性変化がみられ、Bowman膜は一部で消失していたり、線維性組織で置換されていることもある。角膜実質は著明に厚みが増しており、ラメラ構造の乱れが著明である。これらは水疱性角膜症で一般的にみられる変化であり、続発性的変化と考えられる。

病理所見として重要なのはDescemet膜と角膜内皮の所見である。Descemet膜の肥厚は劣性遺伝のCHED2で著明であることが多い。また肥厚したDescemet膜のうち内皮側にPAS染色(過ヨウ素酸Schiff染色)で染色されない領域があることも特徴とされている⁸⁾。年齢の高い症例ほどDescemet膜の肥厚が著明であることから、CHEDでの角膜の変化は生後も続いていることが示唆される。

2. 遺伝子検査所見

常染色体優性遺伝のCHED1の責任遺伝子の染色体座位は染色体20番の20p11.2-q11.2の領域にあり⁹⁾、劣性遺伝のCHED2は同じ20番染色体の別の領域(20p13)にマップされ、両者は異なる遺伝子背景をもつことが2000年までに報告されていた¹⁰⁾。

最近、CHED2の責任遺伝子がsolute carrier family 4 (sodium borate transporter) member 11 (SLC4A11)であることが明らかとなり、SLC4A11領域の遺伝子変異が相次いで報告されている^{11,12)}。Sodium borate transporterは細胞内外のイオン輸送に関与する膜蛋白であり、その異常は角膜内皮の主要な機能であるポンプ機能の障害に繋がるものと推測されている。Fuchs角膜内皮ジストロフィの一部でもSLC4A11領域のヘテロの遺伝子変異が報告されており¹³⁾、sodium borate transporterが角膜内皮の機能維持に重要な膜蛋白であることが示唆される。

優性遺伝のCHED1の責任遺伝子は確定されていないが、20p11.2-q11.2の領域は後部多形性角膜内皮ジストロフィがマップされている領域¹⁴⁾とoverlapしており、両者には何らかの関連があることが示唆される。

遺伝子異常からみるとCHED1とCHED2は別疾患であり、CHED1が後部多形性角膜内皮ジストロフィと、CHED2がFuchs角膜内皮ジストロフィとの関連が示唆

表1 先天性角膜内皮ジストロフィ (CHED) の鑑別疾患

	罹患眼	発症時期	他の眼異常	全身異常	遺伝形式
CHED	両眼	生下時	なし	なし	常優、常劣
先天緑内障	両眼または片眼	生下時～さまざま	高眼圧、牛眼	伴うことあり	さまざま
Peters異常	両眼または片眼	生下時	虹彩、水晶体の異常	Peters plus 症候群	不明が多い
錐子分娩	片眼	生下時	なし	なし	非遺伝性
梅毒性角膜実質炎	両眼	幼児期以降	網脈絡膜炎 虹彩萎縮、癒着	Hutchinson 3徴	非遺伝性
ムコ多糖症	両眼	1~2歳以降	網膜変性 視神経萎縮	ガーゴイル顔貌 全身症状	主に常劣
後部多形性角膜内皮ジストロフィ	両眼	生下時～さまざま	なし	なし	常優
先天性角膜実質ジストロフィ	両眼	生下時	なし	なし	常優

常優：常染色体優性遺伝、常劣：常染色体劣性遺伝。

されるのは興味深い。他の角膜ジストロフィのように臨床型ではなく、分子遺伝学からの分類がなされ、CHEDの疾患概念が再構成される日が近いのかもしれない。

III 鑑別疾患

鑑別疾患として問題になるものを表1に示す。生下時もしくは乳幼児に両眼性に角膜混濁をきたす疾患が鑑別の対象となる。

先天緑内障ではDescemet膜破裂により浮腫性の角膜混濁をきたすことがあるが、眼圧の上昇、角膜径の増大により鑑別される。ただし、先天緑内障と合併した症例の報告があり、先天緑内障で眼圧が正常化しても角膜浮

腫の軽減がみられない場合には本症の合併を疑う必要がある。Peters異常や強膜化角膜などの前眼部発生異常は、両眼の所見に左右差がみられることが多いこと、虹彩や隅角、水晶体などの異常所見から鑑別される(図3, 4)。



図3 Peters異常

角膜混濁が中央に限局しており、虹彩と角膜の不分離と白内障を合併している。

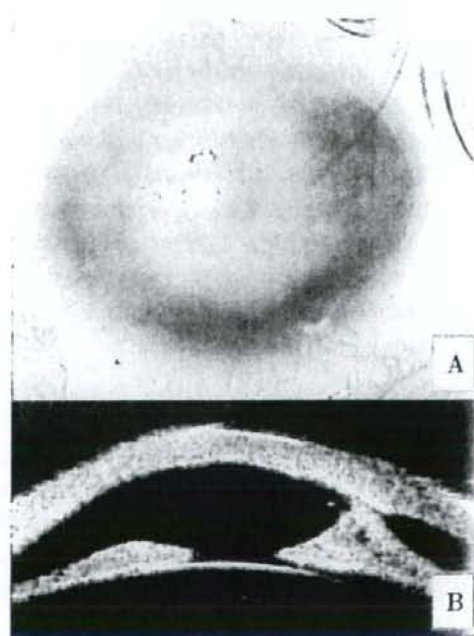


図4 Peters異常

角膜混濁が広範で両眼性の例では先天性角膜内皮ジストロフィとの鑑別が問題になる(A)が、前眼部エコーで虹彩と角膜の不分離が確認される(B)。

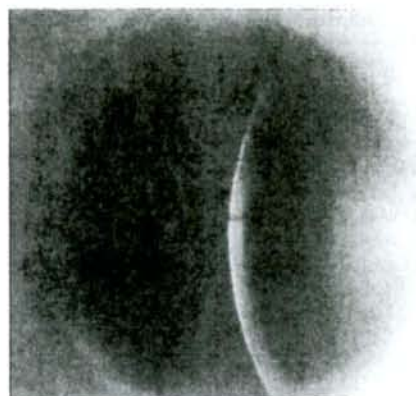


図5 先天性角膜実質ジストロフィ
スリガラス状のびまん性実質混濁は角膜中央部に強く、
実質の厚みは正常である。

鑑別で問題となるのは先天性角膜実質ジストロフィ (congenital hereditary stromal dystrophy: CHSD) であると思われる (図5)。CHSDはきわめてまれな先天性角膜ジストロフィであり、生下時より存在し、非進行性の両眼性の角膜混濁を特徴とする^{15,16)}。スリガラス状のびまん性の混濁は中央部の実質浅層に強く、角膜厚は正常である。常染色体優性遺伝であり、原因遺伝子は特定されていない。実質のコラーゲン線維の形成異常と考えられており、角膜内皮やDescemet膜に異常はない。CHEDと臨床診断されている症例のなかにCHSDが混在している可能性があり、実際、CHEDと臨床診断された症例のなかに病理所見からはCHSDと考えられる症例が報告されている¹⁵⁾。

おわりに

先天性の角膜混濁は10万人の出生に3人の割合といわれ、基本的にはまれな病態である。先天性角膜混濁にはさまざまな原因があり、CHEDはそのうちの一つにすぎないので、一般眼科医が遭遇する機会はなかなかないかもしれない。しかし、最近の知見からは、角膜内皮ジストロフィがCHEDや後部多形性角膜内皮ジストロフィからFuchs角膜内皮ジストロフィまで一連のスペクトラムで整理される可能性があり、その意味も含めて角膜専門医でなくとも知っておきたい疾患と考えられる。

- 1) Laurence GZ: Corneitis interstitialis in utero. *Klin Monat Augenhelkunde* 1: 351, 1893
- 2) Maumenee AE: Congenital hereditary corneal dystrophy. *Am J Ophthalmol* 50: 1114-1124, 1960
- 3) Pearce WG, Tripathi RC, Morgan G: Congenital endothelial corneal dystrophy: clinical, pathological and genetic study. *Br J Ophthalmol* 53: 577-591, 1969
- 4) Kenyon KR, Maumenee AE: Further studies of congenital hereditary endothelial dystrophy of the cornea. *Am J Ophthalmol* 76: 419-439, 1973
- 5) Judisch GF, Maumenee IH: Clinical differentiation of recessive congenital hereditary endothelial dystrophy and dominant hereditary endothelial dystrophy. *Am J Ophthalmol* 85: 606-612, 1978
- 6) Kirkness CM: The corneal endothelial dystrophies. *Ann Acad Med* 18: 158-164, 1989
- 7) Sajjadi H, Javadi MA, Hemmati R et al: Results of penetrating keratoplasty in CHED (congenital hereditary endothelial dystrophy). *Cornea* 14: 18-25, 1995
- 8) Kirkness CM, McCartney A, Rice NS et al: Congenital hereditary corneal oedema of Maumenee: its clinical features, management and pathology. *Br J Ophthalmol* 71: 130-144, 1987
- 9) Toma NMG, Ebenezer ND, Inglehearn CF et al: Linkage of congenital hereditary endothelial dystrophy to chromosome 20. *Human Mol Genet* 4: 2395-2398, 1995
- 10) Callaghan M, Hand CK, Kennedy SM et al: Homozygosity mapping and linkage analysis demonstrate that autosomal recessive congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED) and autosomal dominant CHED are genetically distinct. *Br J Ophthalmol* 83: 115-119, 1999
- 11) Vithana EN, Morgan P, Sundaresan P et al: Mutations in sodium-borate cotransporter SLC4A11 cause recessive congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED2). *Nature Genet* 38: 755-757, 2006
- 12) Jiao X, Sultana A, Garg P et al: Autosomal recessive corneal endothelial dystrophy (CHED2) is associated with mutations in SLC4A11. *J Med Genet* 44: 64-68, 2007
- 13) Vithana EN, Morgan P, Ramprasad V et al: SLC4A11 mutations in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Human Mol Genet* 17: 655-666, 2008
- 14) Heon E, Mathers WD, Alward WL et al: Linkage of posterior polymorphous corneal dystrophy to 20q11. *Human Mol Genet* 4: 485-488, 1995
- 15) Witschel H, Fine BS, Grütznier P et al: Congenital hereditary stromal dystrophy of the cornea. *Arch Ophthalmol* 96: 1043-1051, 1978
- 16) Ginderdeuren RV, Vos RD, Casteels I et al: Report of a new family with dominant congenital hereditary stromal dystrophy of the cornea. *Cornea* 21: 118-120, 2002

結膜弛緩症に対する結膜縫着術

永井正子*^{1,2} 羽藤 晋*^{1,2} 大野建治*¹ 望月弘嗣*¹ 山田昌和*¹

*¹ 国立病院機構東京医療センター感覚器センター *² 慶應義塾大学医学部眼科学教室

Surgical Repair of Conjunctivochalasis with Anchoring Sutures

Masako Nagai^{1,2}, Shin Hatou^{1,2}, Kenji Ohno¹, Hiroshi Mochizuki¹ and Masakazu Yamada¹

¹National Institute of Sensory Organs, National Tokyo Medical Center, ²Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine

結膜弛緩症に対する anchoring suture による結膜縫着術の治療成績について検討した。対象は東京医療センターで結膜縫着術を施行した結膜弛緩症症例 21 例 38 眼で、手術時年齢は平均 74.0±6.9 歳、性別は男性 3 例、女性 18 例であった。本術式により 89.5% の例で涙液メニスカスを完全に再建できたが、自覚症状の著明な改善を得ることができたのは 63.2% であった。自覚症状の改善率を自覚症状別に比較すると、流涙型では 87.5% (16 眼中 14 眼) で高かったが、ドライアイ型では 50% (8 眼中 4 眼)、炎症型では 50% (8 眼中 4 眼) と流涙型以外では低い傾向にあった。また対象には、capsulopalpebral fascia (CPF) の弛緩を伴う円蓋部挙上型 5 眼が含まれていたが、同じ術式で対応することができた。本方法は、手術手技が比較的容易で短時間に行えること、術後の炎症所見、異物感が少ないこと、CPF の弛緩を伴う円蓋部挙上型にも同じ術式で対応できることなどが利点と考えられた。

Surgical results of conjunctivochalasis repair with anchoring sutures were reviewed in 38 eyes of 21 patients (mean age: 74.0±6.9 yrs; 3 males, 18 females) who were treated with anchoring sutures at National Tokyo Medical Center. Of these patients, 89.5% achieved the resolution of conjunctivochalasis, resulting in complete reconstruction of the tear meniscus. Subjective symptoms, however, were completely resolved in only 63.2% of cases. When the patients were divided into subgroups according to the subjective symptoms, the success rate of lacrimation type was excellent (87.5%), whereas the success rates of the dry-eye and inflammation types were 50% and 50%, respectively. Five cases that had accompanying relaxation of the capsulopalpebral fascia (CPF) were treated by the same procedure, without problems. This surgical technique appears to be easy, safe and less time-consuming. The minimization of postoperative inflammation and foreign-body sensation is advantageous over other techniques. Surgical repair of conjunctivochalasis with anchoring sutures appears to be effective for treating the condition.

(Atarashii Ganka (Journal of the Eye) 25(11):1557-1560, 2008)

Key words: 結膜弛緩症, 手術, ドライアイ, 流涙, conjunctivochalasis, surgery, dry eye, epiphora.

はじめに

結膜弛緩症は、おもに下方球結膜が弛緩する状態を指し、加齢性変化によって生じるとされている¹⁾。また近年 capsulopalpebral fascia (CPF) の弛緩により結膜円蓋部が挙上し、結果として結膜が下眼瞼縁を占拠する機序の結膜弛緩症が存在することが報告されている²⁾。結膜弛緩症は決して新しい疾患概念ではなく、高齢者における有病率が高い疾患であるが、長い間、過小評価されてきた疾患の一つである¹⁾。しか

し米国で 1990 年代から流涙あるいはドライアイの原因疾患の一つとして再認識され、わが国でも多彩な自覚症状を呈する高齢者の不定愁訴の原因疾患として注目されるようになってきている³⁾。

結膜弛緩症の治療として手術が有用であることが知られており、その術式も横井らの結膜切除術⁴⁾、Meller らの羊膜移植を併用した結膜切除術⁵⁾、Otaka らの結膜縫着術⁶⁾ などさまざまな術式が報告されている。筆者らは Otaka らの結

[別刷請求先] 永井正子: 〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学病院眼科

Reprint requests: Masako Nagai, M.D., Department of Ophthalmology, Keio University Hospital, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, JAPAN

膜縫着術を modify して、より簡便で侵襲の少ない術式として 10-0 ナイロン[®]糸を用いた anchoring suture による結膜縫着術を行っている。今回、その治療成績について検討したので報告する。

1 対象および方法

対象は東京医療センター眼科において、2005年4月から2006年12月に結膜縫着術を施行した結膜弛緩症21例38眼である。対象の手術時年齢は61~86歳(74.0±6.9歳、平均±標準偏差)、性別は男性3例、女性18例であった。

国立病院機構東京医療センター感覚器センター(以下、当科)では、結膜弛緩症の治療の第一選択を手術とはせずに、まず点眼治療を試みている。点眼治療として人工涙液、ヒアルロン酸製剤、ステロイド薬、非ステロイド系消炎薬などを症例に応じていくつか試み、自覚症状の軽快がみられないものを手術適応とした。

手術は点眼麻酔の後に2%リドカイン(キシロカイン[®])を少量、結膜下に注射して行い、6-0シルク糸で6時に制御糸をかけて上転させた状態で眼球を固定した(図1)。輪部から結膜円蓋部に向けてスパーテルか鑷子の背の部分を用いて結膜を伸展させた状態を保ちながら、輪部から約8mmの部分に10-0ナイロン[®]糸で結膜から強膜をすくって縫合した。結膜を伸展させると下直筋の位置が同定できるので、下直筋は避けるようにし、下直筋の耳側に2針、鼻側に3針縫合をかけるようにした。

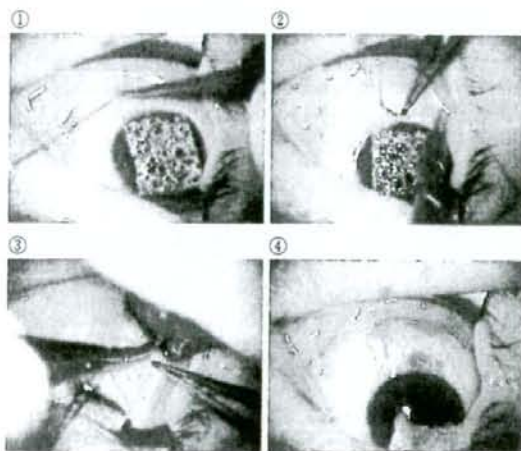


図1 手術方法

- ①結膜下注射で局所麻酔を行い、②6時方向に6-0シルク糸で制御糸をかける。
- ③上転させた状態で結膜を伸展し、輪部から約8mmのところから10-0ナイロン[®]糸で結膜と強膜を縫着する。下直筋を避け、その鼻側と耳側に2~3針ずつ縫着する。
- ④結膜が伸展し、弛緩が解除されていることを確認して終了。

術後は、抗菌薬とステロイド薬(0.1%フルオロメトロンあるいは0.1%リン酸ベタメタゾン)の点眼1日3~4回を術後2~3週間行い、原則として抜糸は行わなかった。

診療録をもとに結膜弛緩症手術症例の術後の自他覚所見の改善度、合併症、再発について retrospective に検討した。また症例を術前の臨床症状別、もしくは CPF 弛緩の有無に基づいて分類し、術後の改善度を比較検討した。CPF には下眼板枝、円蓋部枝があり、結膜弛緩症は円蓋部枝の弛緩で起こりやすく、ここでいう CPF の弛緩とは円蓋部枝の弛緩である。臨床症状については流涙型、ドライアイ型、炎症型の3型に分けた⁷⁾。流涙型は角結膜の生体染色所見や刺激症状はあまりみられず、間欠的流涙を主症状とする型、ドライアイ型は眼乾燥症状や異物感があり、弛緩結膜上方の角膜に生体染色がみられる型、炎症型は刺激症状や充血が強く、結膜炎症所見が主体の型とした。ただし、いずれか1つに分類できない症例に関しては、混合型としたものもある。

II 結 果

今回の対象である結膜弛緩症手術症例21例38眼を臨床所見別に分類した結果を図2に示す。流涙型10例16眼が最も多く、ドライアイ型4例8眼、炎症型4例8眼で、1つに分類できなかった混合型は炎症型+ドライアイ型2例4眼、流涙型+ドライアイ型1例2眼であった。また、CPF 弛緩の有無では、CPF 弛緩を伴う円蓋部挙上型が3例5眼、CPF 弛緩を伴わないものが18例33眼であった。

典型的な症例の術前後の所見を図3に示す。弛緩した結膜が下方の涙液メニスカスを占拠しているが、CPF の弛緩は伴っていない例である。術後1週目には涙液メニスカスは完全に再建されており、下方球結膜の炎症所見は軽度であることがわかる。図4は CPF の弛緩を伴い、結膜嚢が浅くなっている例であるが、術後は結膜嚢が深く保たれていることがわかる。

38眼のうち、涙液メニスカスを完全に再建できたものは89.5%(34眼)であったが、自覚症状の著明な改善を得られ

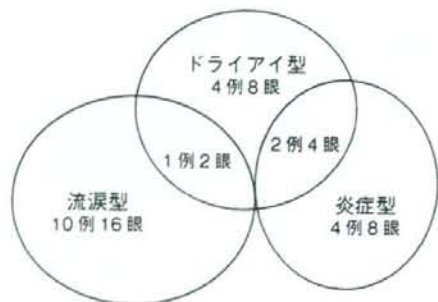


図2 臨床所見別の症例の内訳

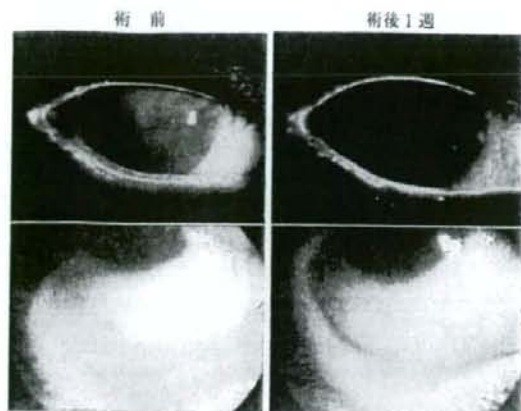


図3 典型的な症例の術前後の所見

弛緩した結膜が下方の涙液メニスカスを占拠しているが、結膜囊短縮は伴っていない例。術後1週目には涙液メニスカスは完全に再建されており、下方球結膜の炎症所見は軽度である。

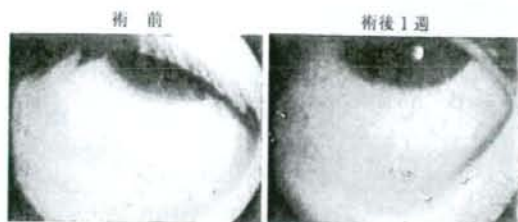


図4 円蓋部挙上型の術前後の所見

術前に比べて、術後は結膜囊はむしろ深くなっており、円蓋部挙上型にも同じ術式で対応できる。

では再手術を施行し、症状、所見ともに改善している。

III 考 按

結膜弛緩症に対して施行した10-0ナイロン糸を用いたanchoring sutureによる結膜縫着術の治療成績について検討した。本術式により89.5%の例で涙液メニスカスを完全に再建できたが、自覚症状の著明な改善を得ることができたのは63.2%であった。他覚的な結膜弛緩の改善率と自覚症状の改善率の間には差があり、手術によって自覚症状の著明な改善を得られなかった症例が1/3以上あったことは、結膜弛緩症以外にマイボーム腺機能不全、眼瞼外反などの眼表面疾患を合併している症例が含まれていたことが影響していると思われる。当科では手術の適応を点眼治療で症状が改善しない例としているが、愁訴が結膜弛緩症によるものかどうか術前にはさらに慎重な検討を要するものと考えられた。

臨床所見、自覚症状により病型を分類した場合、流涙型では自他覚所見の改善率が87.5%と良好であったが、ドライアイ型、炎症型では自覚症状の改善率がいずれも50%と低い傾向にあった。また、CPFの弛緩を伴う円蓋部挙上型においては、5眼全例で涙液メニスカスを完全に再建することができたが、自覚症状が改善したのは1眼にとどまった。これらの結果は、臨床所見や解剖学的な所見によって、手術の予後をある程度推測できることを示しているのかもしれない。ただし、病型別の奏効率に関しては、今回の症例数が十分でない面があり、今後、症例数を増やして検討する必要があるものと考えられた。

本手術は10~15分程度と短時間で行うことができ、術後の合併症は重篤なものはない。また、術後の異物感、充血が軽く、ほとんどの症例で術後1カ月以内に消失することも利点と考えられた。また、新たな円蓋部を作製することで、CPFの弛緩による円蓋部挙上型にも同じ術式で対応できる点で有用と考えられた。ただし、経過観察期間中に10.5%に弛緩症の再発がみられた。結膜切除による結膜弛緩症手術と異なり、球結膜と強膜に癒着が生じる範囲が狭く、結膜囊に近い部分に限られることが原因と推測される。この

たのは63.2% (24眼)にとどまった。

臨床所見別の分類では、涙液メニスカスの再建率は流涙型で93.8% (16眼中15眼)、炎症型で100% (8眼中8眼)と良好であったが、ドライアイ型では62.5% (8眼中5眼)と低い結果になった。一方、自覚症状の改善率は流涙型87.5% (16眼中14眼)が高かったが、ドライアイ型では50% (8眼中4眼)、炎症型では50% (8眼中4眼)と流涙型以外では低い傾向にあった。

CPF弛緩の有無では、涙液メニスカス再建率はCPF弛緩による円蓋部挙上型では100% (5眼中5眼)、CPF弛緩を伴わない型では87.8% (33眼中29眼)であったが、自覚症状の改善率は円蓋部挙上型においては20% (5眼中1眼)、CPF弛緩を伴わない型では69.7% (33眼中23眼)となり、他覚的な涙液メニスカス再建率と自覚症状改善率はあまり一致しなかった。

術後の合併症として、異物感と充血・結膜下出血がみられたが、眼球運動障害、感染などの重篤な合併症はみられなかった。異物感は、術後1週間では50% (19眼)にみられたが、術後1カ月では28.9% (11眼)に減少した。術後1カ月を超えて異物感が持続した症例は6眼あったが、2例4眼でマイボーム腺機能不全、1例2眼で眼瞼外反を合併しており、持続する異物感には結膜弛緩症以外の要因が考えられた。充血・結膜下出血は、術後1週間で18.4% (7眼)、術後1カ月で7.9% (3眼)の症例で生じたが、これ以上遷延する例はなかった。

術後経過観察期間中、10.5% (4眼)に再発がみられた。その内訳は炎症型2例3眼、流涙型1例1眼であり、再発の時期は術後1年後以降であった。このうち、炎症型1例1眼

点は、術後の炎症所見が軽いという利点と表裏の関係にあるものと思われるが、再発しにくい術式の改良の余地があるものと考えられた。

本論文の要旨は第31回角膜カンファレンスで発表した。

文 献

- 1) Meller D, Tseng SC: Conjunctivochalasis, literature review and possible pathophysiology. *Surv Ophthalmol* 43: 225-232, 1998
- 2) 三戸秀哲, 井出 醇: 結膜弛緩症を合併した加齢性下眼瞼内反症. *眼紀* 52: 1025-1027, 2001
- 3) 山崎太三, 井出 醇, 三戸秀哲ほか: 結膜弛緩症. *眼科* 47: 1536-1542, 2005
- 4) 横井則彦, 西井正和: 結膜弛緩症, 結膜弛緩症関連疾患に対する手術. *眼科手術* 18: 7-14, 2005
- 5) Meller D, Maskin SL, Pires RT et al: Amniotic membrane transplantation for symptomatic conjunctivochalasis refractory to medical treatments. *Cornea* 19: 796-803, 2000
- 6) Otaka I, Kyu N: A new surgical technique for management of conjunctivochalasis. *Am J Ophthalmol* 129: 385-387, 2000
- 7) 山田昌和: 結膜弛緩症の考え方. *東京都眼科医会報* 194: 2-5, 2006

* * *



Obesity causes a shift in metabolic flow of gangliosides in adipose tissues

Aya Tanabe^a, Morihito Matsuda^a, Atsunori Fukuhara^a, Yugo Miyata^a, Ryutaro Komuro^a, Ichihiro Shimomura^a, Hiromasa Tojo^{b,*}

^a Department of Metabolic Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^b Department of Biophysics and Biochemistry, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 December 2008

Available online 29 December 2008

Keywords:

Ganglioside
Adipose tissue
Macrophage

ABSTRACT

Obesity is associated with insulin resistance and a mild chronic inflammation in adipose tissues. Recent studies suggested that GM3 ganglioside mediates dysfunction in insulin signaling. However, it has not been determined the ganglioside profiling in adipose tissues of obese animals. Here, we for the first time examined semi-quantitative ganglioside profiles in the adipose tissues of high fat- and high sucrose-induced obese, diabetic C57BL/6J mice by TLC and HPLC/mass spectrometry. In control adipose tissues GM3 dominated with traces of GM1 and GD1a; obesity led to a dramatic increase in GM2, GM1, and GD1a with the GM3 content unchanged. Similar results were obtained in KK and KKAY mice. Adipocytes separated from stromal vascular cells including macrophages contained more of those gangliosides in KKAY mice than in KK mice. These results underscore those gangliosides in the pathophysiology of obesity-related diseases.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Obesity is a state of chronic inflammation of adipose tissue and recent studies indicated that adipose tissue macrophages are strongly associated with obesity-induced complications in both rodents and humans [1]. The number of F4/80-positive macrophages in adipose tissues significantly correlated with both adipocyte size and body mass [2]. Adipose tissue macrophages produce significant amounts of proinflammatory cytokines, such as TNF α and IL-6 [2], and pharmacological inhibition of macrophage migration lowered the macrophage content of adipose tissue with improved insulin sensitivity [3]. Consequently, adipose tissue macrophages play a significant role in the pathology of obesity.

Gangliosides belong to one of the major glycosphingolipids in mammals, concentrated in lipid microdomains, and contain different numbers of sialyl residue in the defined sugar sequence. Sialylation of lactosylceramide leads to monosialoganglioside GM3, which is then converted sequentially into α -series gangliosides by the actions of specific glycosyltransferases [4]. Gangliosides are known to play major roles as mediators for cell–cell or cell–matrix recognition, and act as modulators of transmembrane signal transducers, and of regulating cell proliferation [5]. Moreover, gangliosides are implicated in insulin resistance. GM3 synthase-deficient mice showed increased insulin sensitivity with enhanced insulin receptor phosphorylation in skeletal muscle, and were less prone to high fat diet-induced insulin resistance [6]. In 3T3-L1 adipocytes treatment with GM3 suppressed insulin-induced phos-

phorylation of insulin receptor and IRS-1 [7], and reducing gangliosides content by a glucosylceramide synthase inhibitor PDMP improved TNF α -induced insulin resistance [7].

These studies suggest that ganglioside contents in adipose or other tissues are associated with insulin signaling mechanisms. However, detailed ganglioside profiles in obese adipose tissues of both disease model, animals and man have not yet been determined. Here, we for the first time demonstrate that α -series gangliosides GM2, GM1, and GD1a are dramatically increased in the adipose tissues of obese mice by normal-phase HPLC/mass spectrometry (HPLC/MS).

Materials and methods

Reagent. For lipid analysis, DEAE–Sephadex A-25 was purchased from GE Healthcare (Waukesha, WI), and Sep-pack C18 cartridge column from Waters (Tokyo, Japan) and Silica gel 60 high-performance thin-layer chromatography plates (HPTLC) from Merck (Darmstadt, FRG). Highly purified gangliosides (GM3, GM2, GM1, GD1a, GD1b, and GT1b) were purchased from Matreya (Pleasant Gap, PA) and stored at -20°C .

Animals. Male C57BL/6J mice, and female KKAY and KK mice were purchased from CLEA Japan. Male C57BL/6J mice were fed high fat/high sucrose (HF/HS) diet for 35 weeks. HF/HS diet: 14% beef tallow, 14% lard, 2% soybean oil, 20% sucrose, 25% milk casein, 15% corn starch, 5% cellulose, 3.5% mineral mixture, and 1% vitamin mixture. Perigonadal white adipose tissue (WAT) and epididymal WAT were dissected and immediately frozen in liquid nitrogen.

* Corresponding author. Fax: +81 6 6879 3742.

E-mail address: htoj@mr-mbio.med.osaka-u.ac.jp (H. Tojo).

Fractionation of adipose tissues. Epididymal fat pads from female KK and KKAY mice were excised and minced in Krebs-Ringer-bicarbonate-HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonic acid) buffer which contained 120 mM NaCl, 4 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgSO_4 , 1 mM CaCl_2 , 10 mM NaHCO_3 , 30 mM HEPES, 20 μM adenosine, and 4% (w/v) bovine serum albumin (Calbiochem, San Diego, CA). Tissue suspensions were centrifuged at 500g for 5 min to remove erythrocytes and free leukocytes. Collagenase was added to the final concentration of 2 mg/ml and incubated at 37 °C for 20 min with shaking. The cell suspension was filtered through a 250- μm filter and then spun at 300g for 1 min to separate floating mature adipocytes fraction (MA) from the stromal vascular fraction (SV) pellet. This fractionation and washing procedure were repeated twice with Krebs-Ringer-bicarbonate-HEPES buffer. Finally both fractions were washed with phosphate buffered saline.

Isolation and analysis of gangliosides. Gangliosides were isolated from epididymal and perigonadal WAT and cell fractions by the procedure of Pacuszka [8] with some modifications. Four hundred milligrams of epididymal WAT was extracted twice with 4 ml of chloroform:methanol (2:1, v/v) under sonication in a bath for 20 min, and the residues were re-extracted sequentially with 4 ml of chloroform:methanol (1:1, v/v) twice, chloroform:methanol (1:2) twice, and chloroform:methanol:distilled water (4:8:3, v/v/v) twice. The combined extracts were dried under nitrogen flow, dissolved in 1 ml of chloroform:methanol (2:1, v/v) and applied to a DEAE-Sephadex A-25 column (1.5 × 8 cm; acetate form). The column was washed with 24 ml of chloroform:methanol:water (30:60:8, v/v/v) and then chloroform:methanol:water (60:35:8, v/v/v) to remove neutral lipids. Then, acidic lipids including gangliosides were eluted with 24 ml of methanol containing 200 mM ammonium acetate. The solvent was dried under nitrogen, and the residue was dissolved in 2 ml of 0.5 M NaOH in methanol, refluxed at 65 °C for 2 h to saponify ester-containing lipids including phospholipids. The mixture was neutralized with 1 M acetic acid solution, diluted with water, and applied on a Sep-Pack C18 cartridge column, which was pre-equilibrated with 50% methanol/water. The column was washed with 32 ml of methanol/water (1:1, v/v). Then gangliosides were eluted with 24 ml of methanol. The isolated gangliosides were separated by HPTLC with chloroform:methanol:0.25% CaCl_2 (60:35:8, v/v/v) as the developing solvent, and visualized with orcinol in 10% H_2SO_4 at 105 °C for 10 min.

RNA isolation and quantitative real-time RT-PCR. Total RNA was extracted from cells and tissues using RNA STAT-60 Reagent (Tel-Test, Friendswood, TX) or Sepasol (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), according to the manufacturer's instructions. One microgram of total RNA was converted to cDNA using Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Quantitative real-time RT-PCR was performed on Light Cycler Real-Time PCR instrument (Roche) using SYBR Green (Roche) in a 20- μl reaction mixture. The sequences of primers are listed in the Supplementary Table. The relative amount of mRNA was calculated from an internal standard curve, and normalized to expression levels of cyclophilin.

Ganglioside analysis by HPLC/mass spectrometry. One of the authors (HT) has developed a method capable of analyzing a wider range of lipid classes from neutral lipids to phospholipids on a single normal-phase chromatographic run with three solvent (A–C) gradients and post-column mixing of solvent D that helps electrospray ionization (ESI) of lipids eluted earlier with non-polar solvents. The present method is based on the phospholipid analysis mode [9,10] of the comprehensive method, which uses a binary gradient (solvents B–C) without ESI-assisting solvent D. To separate gangliosides being more polar than phospholipids on micro-bore normal-phase HPLC, the water contents in solvent C was increased according to the methods of Kundu and Scott [11] and the final concentration of 20 mM ammonium formate was added

to it for improving chromatographic resolution and ESI efficiency. Lipid extracts containing gangliosides were prepared as described above, and an aliquot was supplemented with appropriate amounts (usually 5 pmol) of bovine brain GT1b as internal standard, which is not contained in murine adipose gangliosides. For the measurements of fractionated samples, 500 pmol of GT1b was added to cell fractions prior to extraction. The GT1b consists mainly of C20:0 (70%) and C18:0 (30%) species with an average monoisotopic molecular weight of 2146.7. An aliquot (2–2.5 μl) of the mixtures was directly subjected to HPLC/mass spectrometry.

Statistical analysis. All data were expressed as means \pm SEM. Differences between groups were examined for statistical significance using the unpaired Student's *t*-test. A *p* value less than 0.05 denoted the presence of a statistically significant difference.

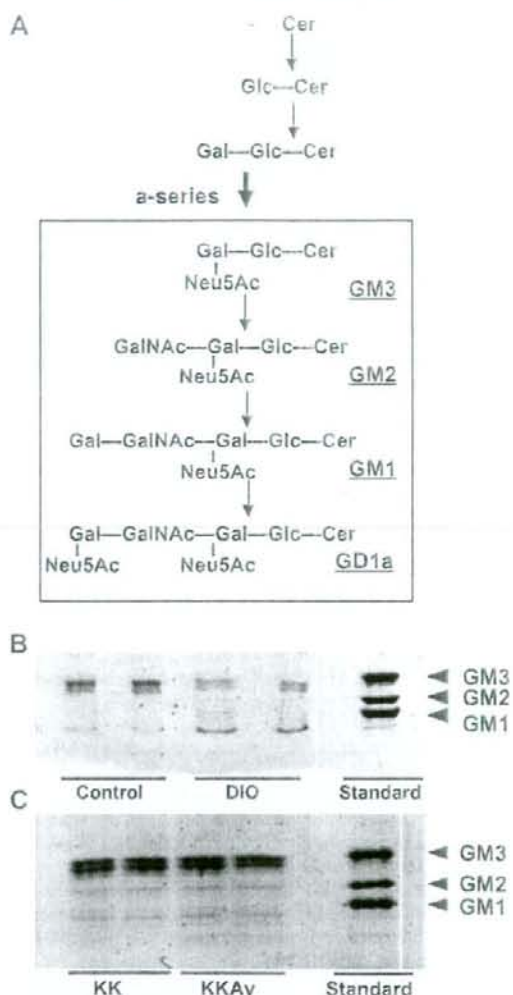


Fig. 1. TLC profiles of gangliosides of control and obese adipose tissues. (A) Structures and de novo metabolic pathway of a-series gangliosides. Cer, ceramide; Glc, glucose; Gal, galactose; GalNAc, N-acetylgalactosamine; Neu5Ac, N-acetylneuramic acid. (B) Gangliosides isolated from control and DIO epididymal adipose tissues were separated on TLC using the solvent system as described in H_2SO_4 , and TLC plates were visualized with the orcinol-Materials and methods reagent. On the standard lane, an aliquot of standard GM3, GM2, and GM1 mixtures was developed ($n = 2$ each). (C) Gangliosides isolated from KK and KKAY perigonadal adipose tissue were separated on TLC as in B ($n = 2$ each).

Results

A synopsis of the severity of obesity and type 2 diabetes in model mice

In this study, we used mice with diet-induced obesity (DIO) generated by long-term feeding of HS/HF diet for 35 weeks as a mimic for human lifestyle-induced obesity with reference to genetic obesity models, 10-week-old KK mice and its congenic and more obese strain KKAY with the lethal yellow (agouti) gene. To check the severity of obesity and type 2 diabetes, body weight and plasma glucose levels were examined in each animal group. Body weights and plasma glucose levels of DIO mice (51.8 ± 3.1 g, and 239 ± 6.8 mg/dl, respectively) indeed showed they were obese and diabetic, compared with those of controls (37.2 ± 1.2 g, $p < 0.05$ and 174 ± 9.5 mg/dl, $p < 0.01$, respectively). The same data pairs show that KKAY mice (44.4 ± 1.1 g, and 435 ± 44 mg/dl, respectively) were more obese and diabetic than KK mice (35.4 ± 1.0 g, $p < 0.001$, and 256 ± 8 mg/dl, $p < 0.05$, respectively).

Effects of HF/HS DIO on ganglioside profiles in adipose tissues

To explore the functional roles of gangliosides residing preferentially in lipid microdomains in obesity pathophysiology, we first examined detailed ganglioside profiles in control and DIO epididymal adipose tissues by TLC and HPLC/MS as described in Materials

and methods. The structures of a-series gangliosides relevant to this study and their metabolic pathway are shown in Fig. 1A. Extensive solvent extraction, and treatments on an anion-exchange and a reverse-phase column as described in Materials and methods were required for successful analysis, because of huge amounts of triacylglycerols in the adipose tissues. TLC separated adipose gangliosides into the faster migrating major band (the R_f value of 0.48) corresponding to a GM3 standard and trace bands in its behind in control mice; DIO led to a significant decrease in the GM3 band intensity on the tissue weight basis and in turn a marked increase in the intensity of the slowest band (the R_f value of 0.33) corresponding to a ganglioside class with more sugar than GM1, possibly GD1 (Fig. 1B).

Next we compared the amounts of gangliosides in each animal group by HPLC/MS using GT1b as internal standard, because endogenous GT1b was undetectable in any adipose tissue samples examined. Hereafter, ganglioside levels are reported as the ratio of the peak area of a molecular species assigned by HPLC/MS to that of internal standard GT1b, and normalized to protein concentration. In control mice GM3 dominated and only trace of GD1a were detectable, while the adipose tissues of DIO mice contain considerable amounts of a-series gangliosides including GM2, GM1, and GD1a as well as GM3 (Fig. 2A), consistent with the results of TLC. The GM3 levels normalized to the protein concentration were unchanged (Fig. 2A), because the protein concentrations per tissue

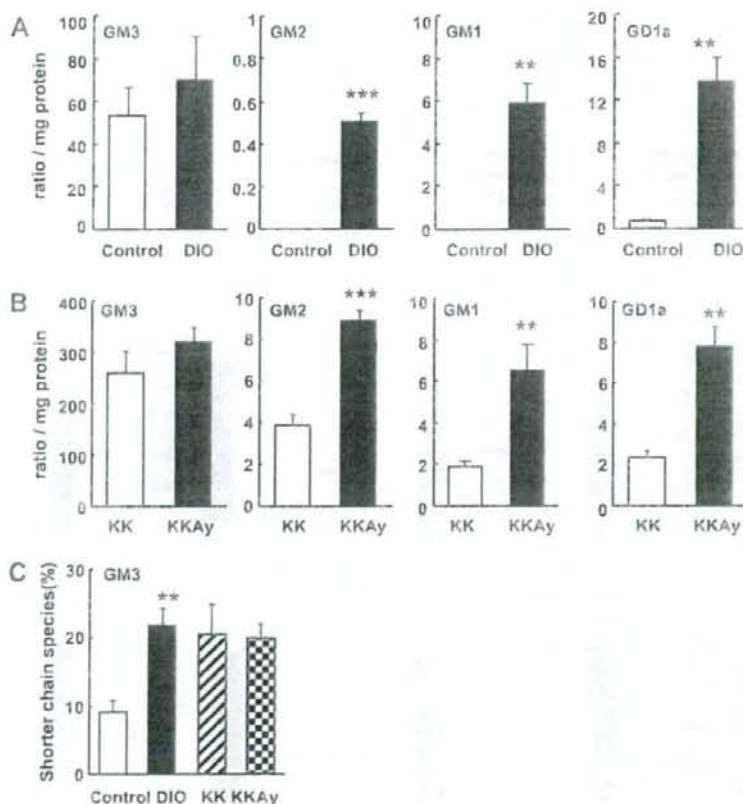


Fig. 2. Ganglioside profiling by HPLC/MS in control and obese adipose tissue. (A) The total levels of GM3, GM2, GM1, and GD1a isolated from control and DIO epididymal adipose tissues. The values were reported as the sum of quantitatively significant peak areas corresponding to molecular species assigned by HPLC/MS, and normalized to the peak area of internal standard GT1b and protein concentration. (B) The total levels of GM3, GM2, GM1, and GD1a isolated from KK and KKAY perigonadal adipose tissue as in (A). (C) The proportion of shorter chain species (16:0 and 18:0) of GM3 in control, DIO, KK and KKAY mice. ** $p < 0.01$, compared with control mice ($n = 4$ each).

weight of the DIO adipose tissues were about a half of those of control. In addition, GM3 in the DIO tissues contained a significantly increased proportion of palmitoyl (16:0) and stearoyl (18:0) species (Fig. 2C). On-line data-dependent tandem MS showed that GM3 mainly comprised molecular species with mono-hydroxylated fatty acyl and N-acetylneuraminyl moieties, and the other adipose a-series gangliosides those with non-hydroxylated fatty acyl and N-glycolylneuraminyl moieties (data not shown).

Ganglioside profiling in adipose tissues of KK and KKAY mice

To compare the adipose ganglioside profiles in DIO with those in genetic obesity, we determined a-series gangliosides from perigonadal adipose tissue of KK and KKAY mice (Figs. 1C and 2B). TLC separated adipose gangliosides into the faster migrating major band (the R_f value of 0.51) corresponding to a GM3 standard and trace bands in its behind in KK and KKAY mice. There were no differences in GM3 amounts on the tissue weight basis between KK and KKAY mice (Fig. 1C). In accordance with these results, the GM3 levels per mg protein were not significantly different between KK and KKAY mice (Fig. 2B), but ~4-fold greater than those of the former model (Fig. 2A). Like the diet-induced model, a-series gangliosides more complex than GM3 were markedly enriched in the genetic models (Fig. 2B), and the levels of GM3 species containing 16:0 and 18:0 did not change between KK and KKAY mice (Fig. 2C). In the genetic models, GM3 mainly comprised molecular species with either N-acetylneuraminyl or N-glycolylneuraminyl moiety, and non-hydroxylated fatty acyl moiety, and the other adipose a-series gangliosides those with non-hydroxylated fatty acyl and N-glycolylneuraminyl moieties (data not shown).

mRNA expression of GM2 synthase was elevated in DIO and KKAY mice

To investigate the mechanism underlying the induction of these gangliosides, we next measured mRNA levels of a variety of synthases relevant to a-series gangliosides. Expression level of GM2 synthase was significantly elevated in DIO and KKAY mice com-

pared with each control group, whereas expressions of GM3, GM1, and GD1a synthases were not (Fig. 3A, C, and Supplementary Figure).

Contribution of adipocytes and infiltrated macrophage to ganglioside profiles

In obese mice, macrophages infiltrate into adipose tissues, and are the major source of inflammatory cytokines [2]. In accordance with previous reports, the expression levels of macrophage markers CD68 and F4/80 were markedly increased in DIO mice compared to control mice (Fig. 3B). Similar results were observed in the genetic models (Fig. 3D). This suggests that macrophage infiltration could be involved in adipose ganglioside profiles altered in obesity. To check this, stromal vascular cell (SV) fractions containing macrophages were separated from mature adipocytes (MA) fractions with the adipose tissues of KK and KKAY mice. In both fractions, the levels of GM2, GM1, and GD1a correlated with degree of obesity (Fig. 4B). The changes in those levels between KK and KKAY mice were more drastic in MA fraction than in the SV fraction (Fig. 4B). The GM3 level of KK mice was comparable with that of KKAY mice in MA fraction, while that in the SV fraction from KKAY mice tended to decrease, compared to that from KK mice (Fig. 4A).

To further examine cell type-specific ganglioside profiles, lipid extracts were obtained from 3T3-L1 pre-adipocytes, differentiated 3T3-L1 adipocytes and macrophage cell line RAW264. TLC analysis revealed that the major ganglioside of 3T3-L1 was GM3, and its levels were significantly reduced during differentiation into adipocytes. 3T3-L1 contained only a small amount of GD1a. In contrast, GM1 and GD1a dominated with trace of GM3 in RAW264 macrophages (Fig. 4C).

Discussion

In this study, for the first time we dissected the ganglioside profiles in control and obese adipose tissues by normal-phase HPLC/

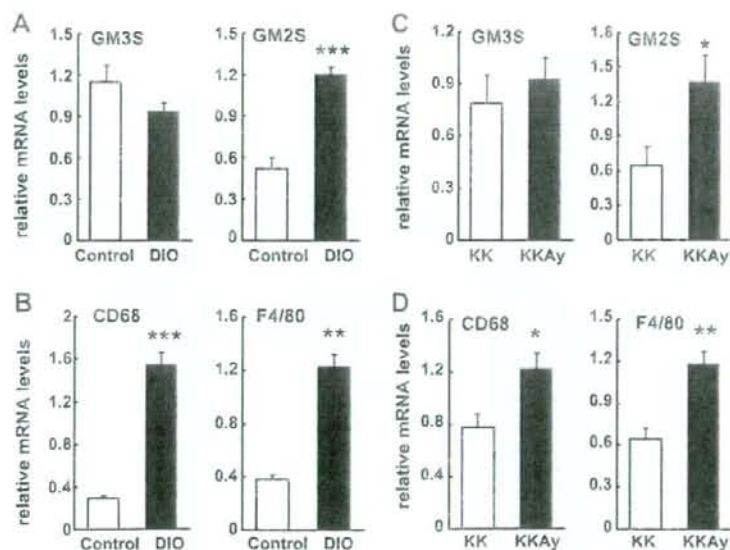


Fig. 3. Expression levels of genes for ganglioside (GM2 and GM3) synthases and macrophage markers CD68 and F4/80 in adipose tissues of control and obese mice. mRNA expressions of indicated genes were measured by quantitative RT-PCR. Values were normalized to the level of cyclophilin mRNA and expressed as means \pm SEM ($n = 4$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; (A, B) control vs. DIO, (C, D) KK vs. KKAY.