

role in the pathogenic mechanisms of HTLV-1 uveitis.

3. Regional defense system of the eye

As described above, CD4⁺ T lymphocytes made active by either autoantigens or exogenous pathogens, enter the eye and cause inflammatory responses. However, the eye is known to be an immune privileged site. We focused on ocular pigment epithelial cells because they form a blood-ocular barrier, and they may protect the eye immunologically from infiltrating inflammatory cells. Our major findings by *in vitro* experiments in mice are (a) ocular pigment epithelial cells have the capacity to suppress activated CD4⁺ T lymphocytes; (b) the mode of action of iris pigment epithelial cells (IPE) and retinal pigment epithelial cells (RPE) are different: T lymphocyte suppression by IPE requires cell-to-cell contact, whereas suppression by RPE requires soluble factors, but not cell-to-cell contact; (c) both IPE and RPE have the capacity to generate regulato-

ry T cells (Treg), thereby enhancing immune regulation in the eye.

In conclusion, CD4⁺ T lymphocytes activated by either autoantigens or infectious agents play a central role in the pathogenic mechanisms of ocular inflammation, and ocular resident cells such as IPE and RPE suppress the pathogenic activated CD4⁺ T lymphocytes, thereby contributing to homeostasis of the eye. Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 113 : 344–378, 2009)

Key words : Uveitis, Pathogenic mechanisms, Experimental autoimmune uveitis, Activated CD4⁺ T lymphocytes, Vogt-Koyanagi-Harada disease, HTLV-1 uveitis, T cell clones, Ocular pigment epithelial cells, Regional immunity of the eye, Transforming growth factor (TGF) β , Regulatory T cells

I 緒 言

眼内の恒常性維持は高度な視機能を保持するために不可欠である。本稿は、眼内恒常性維持を眼内炎症という病態に焦点を絞り、眼内に炎症を起こす仕組みとそれを防御する機構、特にそれらの分子機構を明らかにしようとするものである。

眼内炎症はさまざまな感染病原体や自己抗原、あるいは、それらに感作され活性化された種々の免疫細胞が眼内に侵入し生じる免疫反応により起こると古くから理解されてきた。病原微生物が眼内に侵入して感染病巣を形成し眼組織を傷害する機序と病態は容易に理解される。しかし、多くの眼内炎症疾患では病原微生物の直接の関与はない。これらの眼内炎症疾患の発症機序と病態に自己免疫機序が関与するであろうことは古くから推察されていたが^{1)~4)}、それが科学的に証明されたのは比較的最近のことである。それは米国の Wacker ら⁵⁾⁶⁾により確立された自己免疫性ぶどう膜炎の動物モデルに始まる。以後、この動物モデルを用い眼内炎症の自己免疫機序の解明が急速に進み^{7)~61)}、その成果はヒトのぶどう膜炎の発症機序の解明と病態の理解、そして治療法の開発に応用されてきている¹¹⁾¹⁶⁾³⁰⁾³⁶⁾³⁷⁾³⁹⁾⁵⁸⁾。

一方、眼内には眼内恒常性を維持するための機構として「血液眼関門」が存在し、眼内に不要なものが侵入できないような解剖学的バリアーとして機能することが古くから知られている。さらに、眼は免疫特権と呼ばれる特殊な免疫環境をもつ器官 (immune privilege site) の一つであることが Streilein ら^{62)~83)}により明らかにされた。その代表的なものが anterior-chamber-associated immune deviation (前房関連免疫偏位、以下 ACAID) と呼

ばれるものである^{62)~67)78)80)}。前房中に投与された抗原は眼内で抗原提示細胞に貪食され、脾臓に運ばれそこで T リンパ球を感作し抗原特異的抑制 T リンパ球が誘導され、眼に投与された抗原に対する特異的な細胞性免疫反応の抑制が誘導される現象である。この ACAID は眼に由来する抗原に対する特異的な免疫抑制である。我々はその考えをさらに推し進め、眼内に侵入する免疫細胞を非特異的に抑制制御する機構が眼内に存在し、眼内の恒常性維持に寄与しているのではないかと考えて、眼局所防御機構に関する研究を進めてきた^{81)~90)}。このような研究から明らかにされる免疫調節分子や細胞は、当然のことながら眼内炎症の制御、すなわち治療にも応用できる可能性を秘めている。

以下に、眼内炎症の発症に関与する分子機構と眼内炎症を制御する眼局所防御の分子機構について述べる。

II 眼内炎症の動物モデルと T リンパ球

ぶどう膜炎の発症機序に自己免疫機序が関与することは、以前より交感性眼炎から推測され¹⁾³⁾、病原性のある眼の自己抗原を求めて多くの研究者が長年にわたって研究を重ねていた。それら研究は交感性眼炎の事例から脈絡膜に自己抗原が存在すると考え脈絡膜の自己抗原を探すものであった²⁾⁴⁾。Wacker らも当初は脈絡膜を対象に研究したが求める自己抗原が得られず、網膜に着目し病原性のある自己抗原を発見し⁵⁾、その成果を 1977 年にまとめて発表した⁶⁾。この抗原は網膜の可溶性成分から分離精製された分子量約 55 kDa の蛋白質で、これをモルモットの眼から離れた足に完全フロインドアジュバントとともに免疫すると約 2 週間後に抗原が存在する両眼と松果体に炎症が起こる (図 1)。その後、モルモット

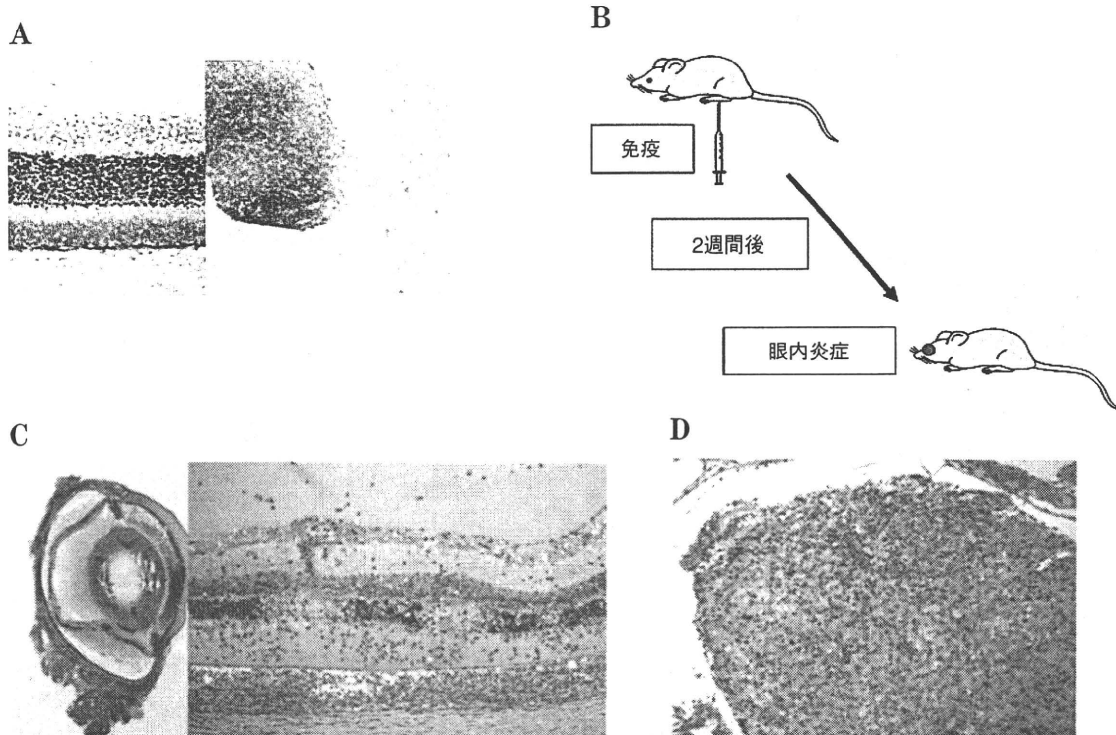


図 1 実験的自己免疫性ぶどう膜炎(EAU)。

- A : S 抗原の局在. S 抗原は網膜視細胞層と松果体に存在する(免疫組織化学染色).
 B : EAU の惹起方法. S 抗原と完全フロイドアジュバントをラット足蹠に注射する.
 C : EAU を生じた眼球(左)と網脈絡膜の病理組織像(右).
 D : 松果体. S 抗原が存在する松果体にもリンパ球浸潤を伴う炎症が生じる.

他にラット¹²⁾, マウス²⁶⁾³⁵⁾, サル¹³⁾などの実験動物でも同様の眼内炎症が生じることが報告され, この抗原は網膜可溶性抗原(retinal soluble antigen : S 抗原)と命名され, S 抗原の免疫で惹起される眼内炎症は実験的自己免疫性ぶどう膜炎(experimental autoimmune uveitis : EAU)と呼ばれている. EAU を起こす網膜抗原は S 抗原の他にも interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP)³¹⁾, phosducin³⁸⁾, recoverin⁴²⁾など多くの網膜関連蛋白質が報告されている.

EAU の発症機序を解明することはヒトのぶどう膜炎の発症機序の解明と治療に有用な知識をもたらすと考えられる. 当初はラットとモルモットが用いられた. Salinas-Carmona ら¹⁵⁾は先天的に胸腺が欠如し T リンパ球がないヌードラットでは EAU を発症しないことから, EAU の発症には T リンパ球が重要であると報告した. 我々²³⁾は S 抗原で免疫した Lewis ラットからリンパ球を取り出して, さらに *in vitro* で抗原刺激を加えて感作を強化することによりナイーブなレシピエントラットに EAU を移入できること, なかでも CD4⁺T リンパ球で強く移入できることを示した. これらの研究から自己免疫性ぶどう膜炎の動物モデルでは, T リンパ球, 特に CD4⁺T リンパ球がその発症機序に深くかかわることが明らかとなった. その後, EAU はマウス²⁶⁾³⁵⁾においても再現性高く誘導できる方法が開発され, 免疫学的

解析の可能性が飛躍的に広がりさまざまな研究が行われ, 現在では EAU の発症機構は以下のように理解されている(図 2). すなわち, アジュバントとともに免疫された網膜自己抗原は免疫局所でマクロファージなどの抗原提示細胞に貪食され, 脾臓や所属リンパ節においてリンパ球に提示され, リンパ球を感作する. 感作されたリンパ球のうち CD4⁺T リンパ球が EAU 発症の方向に働き²³⁾, CD8⁺T リンパ球は逆に EAU 発症抑制の方向に働く. CD4⁺T リンパ球はインターフェロン γ (IFN- γ)などの Th1 サイトカインを産生する Th1 細胞とインターロイキン 4(IL4)などの Th2 サイトカインを産生する Th2 細胞に分類されるが, Th1 細胞は EAU を発症・増悪させ⁴⁰⁾⁴¹⁾⁴⁵⁾, Th2 細胞は EAU を抑制すること⁵²⁾が明らかとなっている. 最近, IL-6 と形質転換増殖因子 β (transforming growth factor β , 以下 TGF- β)で刺激誘導され免疫応答で重要な働きをする Th17 細胞が EAU の発症と病態形成においても最も重要であることが報告されている^{57)59)~61)}. このように, 自己免疫性ぶどう膜炎の動物モデルでは網膜自己抗原に感作された CD4⁺T リンパ球, 特に, Th1 細胞あるいは Th17 細胞が重要である.

ところで, この EAU は種々の眼内炎症の治療薬の開発にも応用できる. EAU を用いた免疫薬理学研究で, T 細胞を選択的に抑制する新しい免疫抑制薬のシクロ

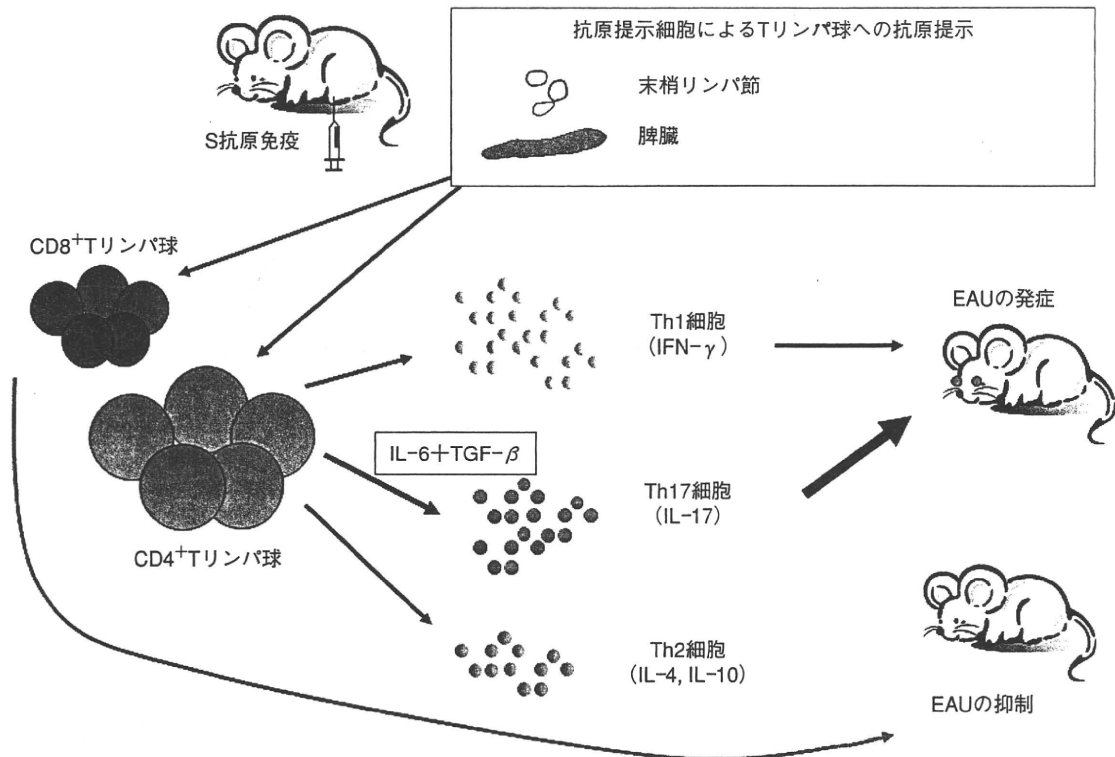


図2 実験的自己免疫性ぶどう膜炎(EAU)発症機構の模式図。

S抗原：網膜可溶性抗原，IL：インターロイキン，Th：ヘルパーT細胞，TGF- β ：形質転換増殖因子 β ，IFN- γ ：インターフェロン γ 。

スポリンは従来の免疫抑制薬と比べて著しく効果的であることが示された¹⁴⁾¹⁷⁾²⁴⁾³⁶⁾³⁹⁾。その成果に基づいて、シクロスポリンはBehçet病をはじめとする種々の難治性ぶどう膜炎の治療に臨床応用され¹⁶⁾³⁰⁾、現在では広く世界中で用いられている。その後、我が国で開発されたTリンパ球選択的抑制薬のFK506(タクロリムス)をはじめとする多くの新しい免疫抑制薬の効果がEAUで解析された^{28)32)~37)}。

EAUという自己免疫性ぶどう膜炎の動物モデルにおいては、その発症機構に活性化CD4⁺Tリンパ球が重要な働きをしており、CD4⁺Tリンパ球から産生されるTh1サイトカインとTh17サイトカインは眼内炎症の発症と病態形成の機能分子として働くと考えられる。

Ⅲ ヒトの眼内炎症の発症機構とTリンパ球

ヒトのぶどう膜炎の発症機構に関して自己免疫性ぶどう膜炎のVogt—小柳—原田病、ならびに、感染性ぶどう膜炎のHTLV-1ぶどう膜炎について考察し、ヒトの眼内炎症においても活性化Tリンパ球が重要な働きをすることを以下に述べる。

なお、本稿に記したヒトの検体を用いたすべての研究は、久留米大学と東京医科歯科大学の倫理委員会の承認を得て、患者からインフォームドコンセントを得たうえで行われたものである。

1. Vogt—小柳—原田病(以下、原田病)

1) 原田病の小史

本症はスイスのAlfred Vogt⁹¹⁾により初めて報告された。頭髪、眉毛、睫毛の白髪化を伴うぶどう膜炎患者の症例報告であるが、眼病変の記載はわずかであった。その後、1914年に小柳美三⁹²⁾により眼病変の詳しい記載がなされ、患者の眼底所見を「恰モタ照ノ天空ヲ観ルガ如シ」と表現し、本疾患の眼所見のランドマークともいえる今日の夕焼け状眼底の所見が記載されていることは特記に値する。その後、1926年に原田永之助⁹³⁾が本症の5例について、その発病初期から晩期に至るまでの自然経過を詳細に記載し、本症の本態は脈絡膜の炎症であると述べている。当時の暗い眼底鏡という悪条件を勘案すると驚嘆すべきことといえる。これら二人の先達の注意深い観察と正確な記載なくして本症の疾患概念の確立はなかったと考えられる。

2) 原田病の臨床と病理

原田病は非外傷性の両眼性ぶどう膜炎で、感冒様症状などの前駆症状の数日後に突発性に発症し、両眼の眼底後局所に多発性滲出性網膜剝離を伴うぶどう膜炎が生じる。この急性眼病期には頭痛、嘔気、耳鳴、難聴などの眼外症状を伴い、髄液検査で小リンパ球増多を伴う無菌性髄膜炎、聴覚検査では感音性難聴がみられる。発病から数か月後には、全身的には脱毛、頭髪や眉毛、睫毛の白髪化、皮膚白斑、眼科的には夕焼け状眼底などの脱色

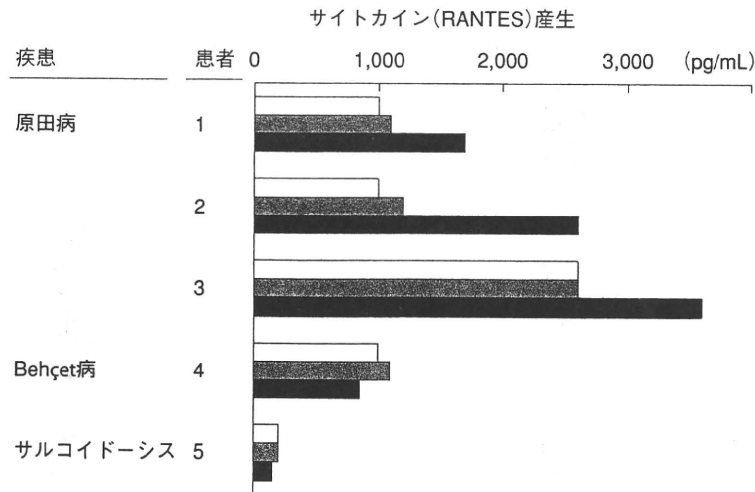


図 3 Vogt-小柳-原田病(原田病)患者眼局所から樹立した T 細胞クローンの tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂ に対する反応. 原田病患者の T 細胞クローンは tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂ に反応して RANTES を産生したが, 対照ペプチド (HA₃₀₇₋₃₁₉) には反応しない. 一方, Behçet 病とサルコイドーシス患者から樹立した T 細胞クローンにはこのような反応はない.

□: PBS, ■: インフルエンザウイルスペプチド (HA₃₀₇₋₃₁₉), ▨: tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂.

(文献 100, Table 1 から許可を得て転載, 改変)

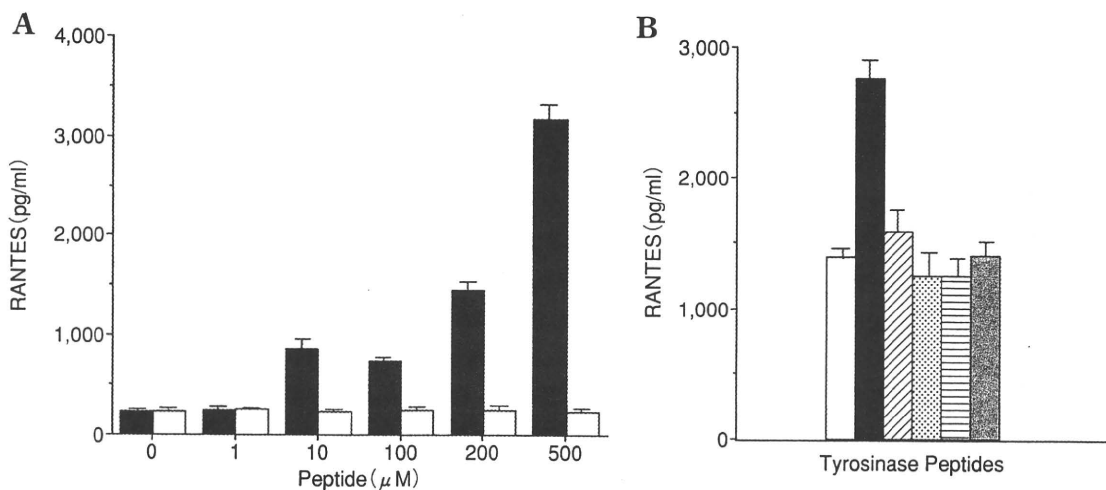


図 4 原田病患者眼局所から樹立した T 細胞クローンの tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂ に対する反応.

A: 原田病 T 細胞クローンの tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂ に対する用量依存性の検討.

原田病 T 細胞クローンは tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂ の用量に依存的に RANTES を産生したが, 対照のインフルエンザウイルスペプチドには反応しない.

■: tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂, □: インフルエンザウイルスペプチド.

B: tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂ のアナログに対する原田病 T 細胞クローンの反応.

原田病 T 細胞クローンは tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂ と 1 つアミノ酸配列がずれた tyrosinase₄₅₁₋₄₆₂ およびアミノ酸が 1 か所だけ変化したアナログに反応しない.

□: ペプチド無添加, ■: tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂, ▨: tyrosinase₄₅₁₋₄₆₂, ▩: tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂ (Y 451 を Q に変換), ▪: tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂ (L 452 を Q に変換), ▫: tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂ (D 456 を V に変換).

(文献 100, Figure 2 から許可を得て転載, 改変)

素現象が生じる. このような臨床症状に加えて, 本症患者が有色人種に多く白人には少ないことなどから, 本症はメラノサイトに対する自己免疫疾患と長らく考えられてきた. 本症の病理組織像もその仮説を支持するものである. 猪俣⁹⁴⁾の原田病患者眼病理組織の報告によると,

発病早期の多発性滲出性網膜剝離を呈する眼では, 脈絡膜のメラノサイトを取り囲むように無数のリンパ球の浸潤がみられ, 一方, 晩期の夕焼け状眼底を呈している時期の眼では, 脈絡膜のリンパ球は消退し, 脈絡膜の多数存在していたメラノサイトも完全に消失している. この

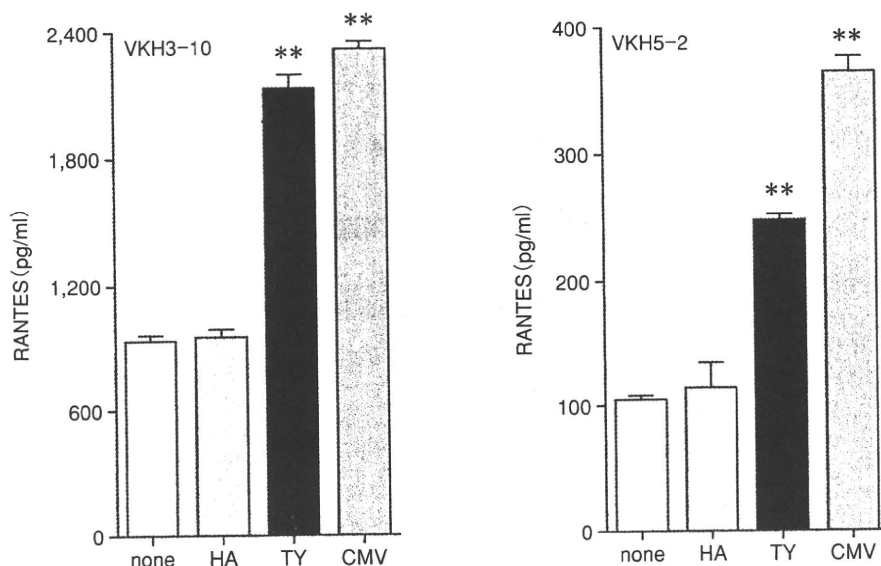


図5 原田病患者眼局所から樹立したT細胞クローンのtyrosinaseペプチドとサイトメガロウイルスペプチドに対する反応。

原田病患者6名の眼局所から樹立したT細胞クローンのtyrosinaseとCMVに対する反応性をRANTES産生により測定した。原田病患者の眼局所T細胞クローンは抗原無添加(none)と対照ペプチドには反応しなかったが、tyrosinaseとCMVの両者に強く反応しRANTESを産生した。図にはその代表的な2名の結果を示す。

VKH:原田病, HA:インフルエンザウイルスペプチド(HA₃₀₇₋₃₁₉ペプチド, 対照ペプチド), TY: tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂, CMV:サイトメガロウイルスペプチド(CMV-egH₂₉₀₋₃₀₂). **: p<0.005.

(文献100, Figure 4から許可を得て転載, 改変)

ような病理組織像は、本症では脈絡膜のメラノサイトがリンパ球浸潤の標的となり脈絡膜炎が生じていることを示すものである。

3) 原田病の発症機構

本症ではどのような機序で自己のリンパ球が自己のメラノサイトを標的とした免疫反応が生じるのか、また、そもそもメラノサイトの中のどのような抗原が原田病の原因抗原であるのかが長い間謎であった。Yamakiら^{95)~98)}は、メラノサイト関連抗原の一つでメラニン合成に関与するtyrosinaseという酵素に着目し、原田病患者末梢血リンパ球がtyrosinaseペプチドに感作されていること、tyrosinaseペプチドをラットに免疫すると両眼性の汎ぶどう膜炎を生じるのみならず免疫8週間後には眼底の脱色素現象を起こし、臨床的には夕焼け状眼底を呈し、病理組織学的にも脈絡膜のメラノサイトが消失すること、さらに、全身的にも皮膚白斑などを生じる原田病の動物モデルを作ること成功した。これらのことから、原田病の原因自己抗原はメラノサイト関連抗原の一つであるtyrosinaseであることが明らかにされた。

我々は患者の眼局所に浸潤している炎症細胞から樹立したT細胞クローンを用いてその分子機構を解析した⁹⁹⁾¹⁰⁰⁾。原田病患者前房水中の炎症細胞から樹立したCD4⁺T細胞クローンはtyrosinase₄₅₀₋₄₆₂ペプチドに反応してRANTESなどのサイトカインを産生したが、対照抗原として用いたインフルエンザウイルスのHA₃₀₇₋₃₁₉

ペプチドにはまったく反応せず、また、Behçet病など他のぶどう膜炎患者からのT細胞クローンにはこのような反応がなかった¹⁰⁰⁾(図3)。この反応はtyrosinase₄₅₀₋₄₆₂の用量に依存し、またtyrosinaseペプチドの構造にも依存した¹⁰⁰⁾(図4)。原田病末梢血リンパ球においても同様の結果が得られた。これらのことは、原田病患者だけに、tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂ペプチドに特異的に反応してサイトカインを産生するCD4⁺Tリンパ球が末梢血と眼内に存在し、これらのCD4⁺Tリンパ球が眼や全身臓器のメラノサイト上のtyrosinaseに対して免疫反応を起こして炎症を生じることを示唆するものである。

しかし、どのような機序で原田病患者のリンパ球が自己抗原であるtyrosinaseに感作されるのかが不明である。我々は、tyrosinaseが何らかの外来抗原と類似の構造を有して、その外来抗原に感作されたリンパ球が自己抗原のtyrosinaseと免疫学的交差反応を起こすのではないかという仮説を立てて、tyrosinaseペプチドと外来抗原の構造類似性をGenBankを用いてデータ解析した¹⁰⁰⁾。その結果、tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂はサイトメガロウイルス(以下、CMV)のエンベロープ糖蛋白質の一つであるCMV-egH₂₉₀₋₃₀₂ペプチドと構造類似性があり、13個のアミノ酸配列のうち6個までが同一であった。特に、この6個のアミノ酸配列はHLAクラスII抗原に提示される重要なモチーフであった。そこで我々は原田病患者のリンパ球がCMVとtyrosinaseとの両方の抗原に免疫

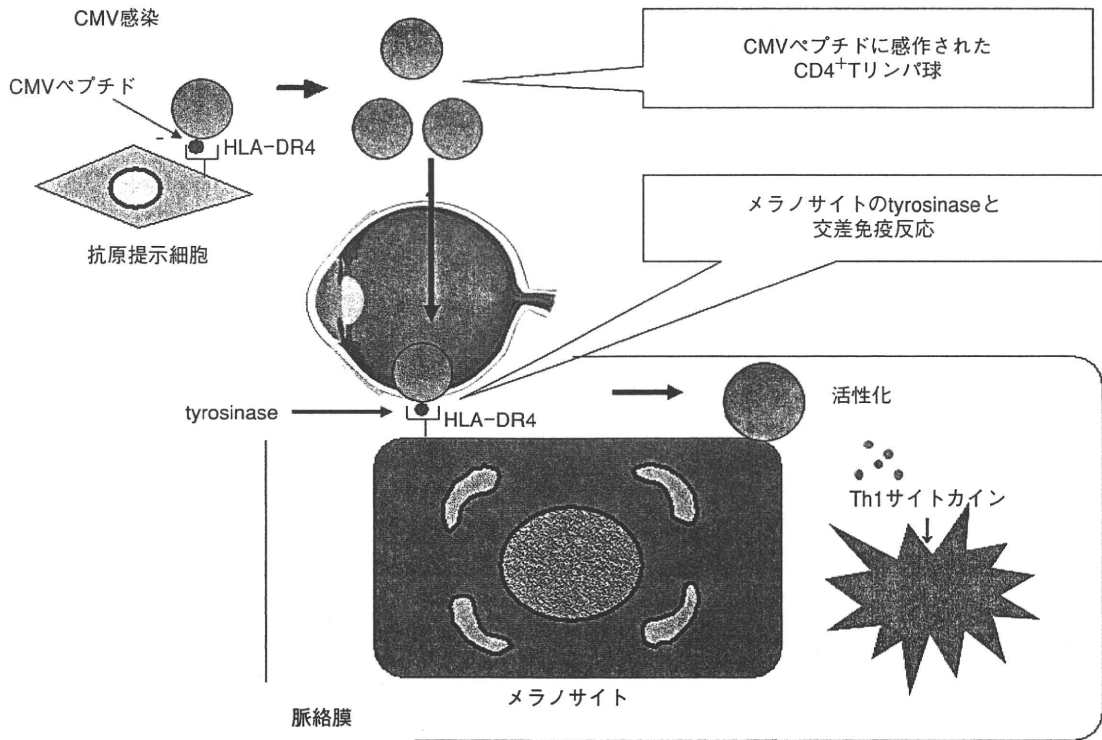


図 6 原田病の発症分子機構の仮説。

サイトメガロウイルス(CMV)の潜伏感染状態で、CMV 感作 CD4⁺T リンパ球が末梢血中に循環している。CMV 感作 CD4⁺T リンパ球は CMV ペプチドと tyrosinase ペプチドの構造類似性のために、眼内や内耳、髄膜などに存在するメラノサイト上の tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂を認識して、免疫学的交差反応を起こしてサイトカイン産生などを生じ炎症が生じる。

CMV：サイトメガロウイルス，Th：ヘルパー T 細胞。

学的反応性をもつかをリンパ球増殖試験で検討した。原田病患者の末梢血から樹立した CD4⁺T 細胞株は tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂と CMV-egH₂₉₀₋₃₀₂の両方のペプチドに対して高い増殖反応を示したが、対照抗原の HA₃₀₇₋₃₁₉に対しては増殖せず、さらに、原田病以外(Behçet 病，健康人)の患者はこれらの抗原にまったく反応しなかった。さらに、原田病患者の眼局所に浸潤している炎症細胞から樹立した T 細胞クローンについて検討したところ、末梢血と同様に tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂と CMV-egH₂₉₀₋₃₀₂の両方のペプチドに対して高い増殖反応を示した(図 5)。

我が国では成人の大半が周産期に CMV に初感染しその後は潜伏感染となっている。CMV 潜伏感染の状態では、末梢血の T リンパ球は CMV に曝露され、CMV-egH₂₉₀₋₃₀₂に感作された CD4⁺T リンパ球が末梢血に存在すると考えられる。この CMV 感作 CD4⁺T リンパ球が眼内あるいは内耳、髄膜などに存在するメラノサイトの tyrosinase₄₅₀₋₄₆₂をその構造類似性のために自己抗原と認識して免疫学的交差反応を起こし、これらの組織に炎症が生じるのではないかと考えられる(図 6)。しかも、tyrosinase ペプチドは HLA-DRB1*0405 拘束性であり、原田病が HLA-DRB1*0405 と高い正の相関があるという報告¹⁰¹⁾とも一致している。

このように、自己免疫性ぶどう膜炎の代表ともいえる

原田病の発症機構においては、自己抗原であるメラノサイト関連抗原の tyrosinase に感作され活性化した CD4⁺T リンパ球が中心的な働きをしている。

2. HTLV-1 ぶどう膜炎

1) HTLV-1

ヒト T リンパ球向性ウイルス 1 型(human T-lymphotropic virus type 1: HTLV-1)，あるいはヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1)はヒトレトロウイルスのオンコウイルスに属する RNA ウイルスである。主として CD4⁺T リンパ球に感染し、ウイルス RNA はウイルス自身の逆転写酵素により相補的 DNA(プロウイルス DNA)となり宿主細胞の染色体に組み込まれ、宿主細胞の遺伝子と同じように細胞分裂により娘細胞へと伝えられて増殖する^{102)~104)}。このような特殊な感染状態であるために、抗体の存在下でもウイルスは排除されることなく存在し、感染者は生涯にわたってウイルスキャリアとなる。HTLV-1 は輸血，性交渉，母乳のいずれかで伝播するが、我が国では 1986 年から輸血に際して HTLV-1 スクリーニング検査が行われるようになりウイルス感染者は減少している。HTLV-1 は特異な地理的分布をしており、世界的には中央アフリカ，カリブ海諸島，南アメリカ，そして、我が国では九州南部と離島(壱岐，対馬，

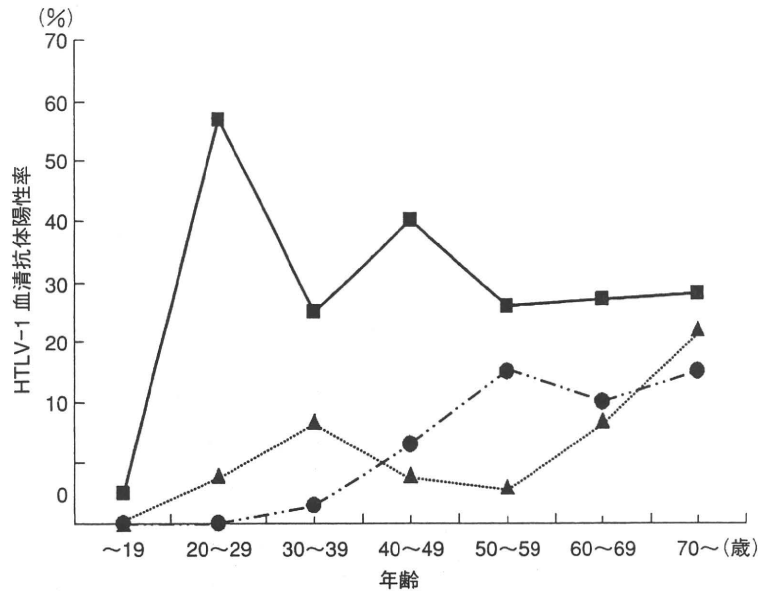


図 7 原因不明のぶどう膜炎患者の HTLV-1 血清抗体陽性率(宮崎県都城市).

原因不明のぶどう膜炎患者群は、原因が明らかな既知のぶどう膜炎患者群、およびぶどう膜炎以外の眼疾患患者群に比べて、HTLV-1 血清抗体陽性率が全年齢層で有意に高く、特に若年成人群で高かった^{121)~123)}。

■：原因不明のぶどう膜炎群，▲：原因が不明なぶどう膜炎群，●：ぶどう膜炎以外の眼疾患群。

HTLV-1：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型。

五島列島)などにウイルスキャリアが多い¹⁰⁵⁾。

HTLV-1 は、ヒトの悪性腫瘍の原因となることが初めて証明されたレトロウイルスであり、成人 T 細胞白血病/T 細胞リンパ腫 (adult T-cell leukemia, 以下 ATL) の病因ウイルスである¹⁰⁶⁾¹⁰⁷⁾。ATL は HTLV-1 感染 T 細胞がモノクローナルな増殖を起こしてきた場合に生じる^{102)~104)106)107)}。一方、ポリクローナル増殖の場合、感染 T 細胞は悪性化しないが、強力に活性化され種々の炎症性サイトカインやケモカイン、接着分子を産生し炎症を生じる¹⁰⁸⁾。その典型例が HTLV-1 関連脊髄麻痺 (HAM) と呼ばれている神経系の炎症疾患である¹⁰⁹⁾¹¹⁰⁾。

2) HTLV-1 キャリアにみられるぶどう膜炎の疫学、臨床像

大庭¹¹¹⁾、中尾ら¹¹²⁾により HAM 患者と HTLV-1 無症候キャリアに眼病変、特にぶどう膜炎が多いことが報告されて以来、九州を中心に各地から HTLV-1 感染者の眼病変の症例報告^{113)~120)}がなされた。我々は九州南部の HTLV-1 高浸淫地域に位置する宮崎県都城市の宮田眼科病院と、HTLV-1 浸淫率が少し低い福岡県久留米市の久留米大学病院において一連の疫学的、臨床的、ウイルス学的研究を行った^{121)~137)}。疫学研究としては HTLV-1 感染とぶどう膜炎に関する血清疫学調査^{121)~123)}と、筑後地方、長崎県対馬における本症の罹患率調査¹³⁶⁾¹³⁷⁾を行った。都城においては、原因不明のぶどう膜炎患者における血清抗 HTLV-1 抗体陽性率は、既知の原因のぶどう膜炎患者ならびにぶどう膜炎以外の眼疾患患者の二つの対照群に比較して有意に高く¹²²⁾(図 7)、HTLV-1 感染の

ぶどう膜炎発病に関する相対危険度(odds 比)は 11.0 であり、久留米市においても相対危険度は 5.8 であった¹²³⁾。このことから、HTLV-1 感染は、当時原因不明とされていたぶどう膜炎の発症危険因子、すなわち発病原因の一つであることが明らかになった。血清抗 HTLV-1 抗体が陽性のぶどう膜炎患者の眼症状は、中等度~高度の硝子体混濁を伴い、軽度の虹彩炎はみられるものの、出血や白斑などの網脈絡膜病変はない、いわゆる中間部ぶどう膜炎を呈するものが、HTLV-1 抗体陰性のぶどう膜炎患者よりも有意に多く、患者の多くに共通する眼症状の特徴があった¹²²⁾¹²⁴⁾¹³¹⁾¹³³⁾。全身症状を調べると、ほとんどすべての患者は ATL を伴っていないが、約 17% (女性患者の 25%) に甲状腺機能異常を伴う Graves 病の既往¹²⁵⁾¹²⁶⁾があり、Graves 病の既往のある患者はない患者に比べて末梢血 HTLV-1 ウイルス量が有意に高値であった¹³⁵⁾。このような疫学調査と臨床像の解析から、HTLV-1 血清抗体陽性者 (HTLV-1 キャリア) に生じるぶどう膜炎は、HTLV-1 に起因する疾患で、従来から知られている ATL や HAM とは独立した疾患であると考えられ、HTLV-1 関連ぶどう膜炎、あるいは HTLV-1 ぶどう膜炎と呼ばれるようになった。本症は、ウイルス感染が原因の疾患であるにもかかわらず副腎皮質ステロイド薬がきわめて有効で、軽症ではステロイド点眼薬だけで、重症ではその内服により炎症は軽快し、眼内に器質的障害を残さずに治癒し視力予後も良好なものが多い¹²²⁾¹²⁴⁾。しかし、患者の約半数に炎症の再発がみられる¹²²⁾。

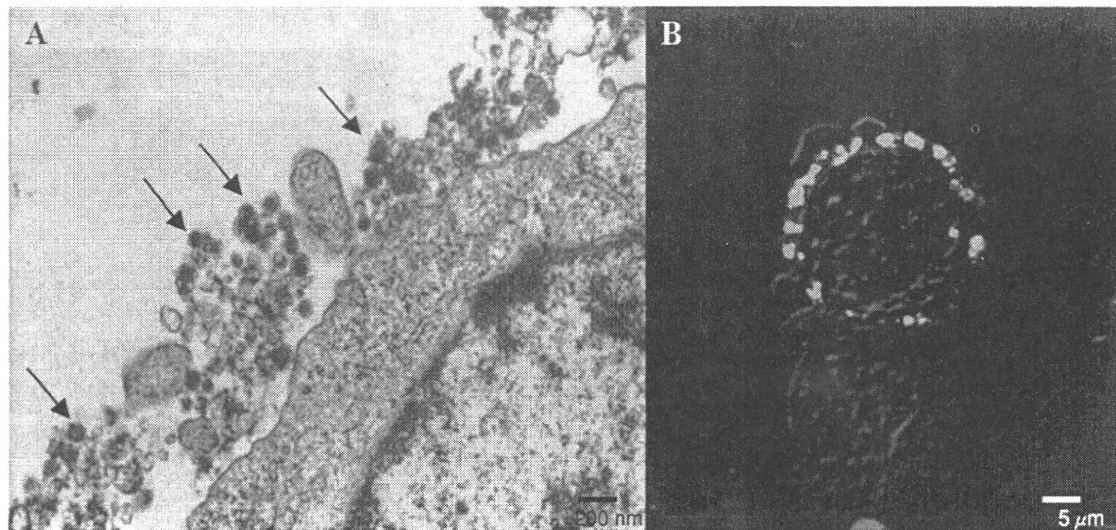


図 8 HTLV-1 ぶどう膜炎患者前房浸潤細胞から樹立した T 細胞クローン(TCC).

A : 電子顕微鏡で直径 100 nm のウイルス粒子(矢印)が多数検出された。バー : 200 nm.

B : HTLV-1 gag p19 蛋白質が免疫フルオレセイン染色法により TCC 細胞表面に同定された(共焦点レーザー顕微鏡写真)。バー : 5 μm.

(文献 129, Figure 2, 3 から許可を得て転載, 改変)

表 1 HTLV-1 ぶどう膜炎患者眼内浸潤細胞から樹立した HTLV-1 感染 CD4⁺T 細胞クローンのサイトカイン産生と副腎皮質ステロイドの作用

サイトカイン	サイトカイン産生(平均値±標準偏差, pg/ml)		
	培養液単独	Hydrocortisone(1 μM)	p 値
IL-1α	12,699±16549	7,974±10176	NS
IL-2	61±8	95±24	<0.05
IL-3	428±57	128±25	NS
IL-4	0	0	
IL-6	8,358±707	4,713±4574	<0.05
IL-8	1,268±544	926±602	NS
IL-10	28±28	6±8	NS
TNF-α	272±185	145±83	NS
IFN-γ	5,095±2748	2,019±1905	<0.02
GM-CSF	2,886±641	2,438±807	NS

IL : インターロイキン, TNF-α : 腫瘍壊死因子α, IFN-γ : インターフェロン γ, GM-CSF : 顆粒球単球コロニー刺激因子.

(文献 129, Table 2 から許可を得て転載, 改変)

3) HTLV-1 ぶどう膜炎の発症機構と CD4⁺T リンパ球

HTLV-1 が本症の発症にどのようにかかわっているかを知るために, 我々は患者の末梢血と前房水を用いて解析した. その結果, ① HTLV-1 ぶどう膜炎患者の末梢血ウイルス量はぶどう膜炎のない無症候性キャリアよりも有意に高かった¹²⁸⁾, ② 患者の前房水中に浸潤している細胞の大半が CD3⁺ の T リンパ球であり¹³⁴⁾, その T リンパ球受容体はポリクローナルであったことから ATL などの悪性細胞ではなく炎症細胞である¹³⁰⁾, ③ 前房浸潤細胞をポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction : PCR)法で検査し患者の大半(38 人中 37 人)か

ら HTLV-1 プロウイルス DNA が検出されたが, 偶々 HTLV-1 抗体陽性であった他のぶどう膜炎患者では 4 人中 1 人からしか検出されなかった¹³⁴⁾, ④ 前房中の HTLV-1 ウイルス量は末梢血のウイルス量よりも高い¹³⁴⁾, ⑤ 患者の前房中浸潤細胞から樹立した CD4⁺T 細胞クローンには多数の HTLV-1 ウイルス粒子が電子顕微鏡により観察され¹²⁹⁾(図 8), HTLV-1 蛋白質も免疫染色で同定された¹²⁹⁾(図 8)こと, などが明らかになった. これらのことは, HTLV-1 ぶどう膜炎患者の眼局所に HTLV-1 感染 CD4⁺T リンパ球が集積していることを示している.

次に, HTLV-1 感染 CD4⁺T リンパ球の機能につい

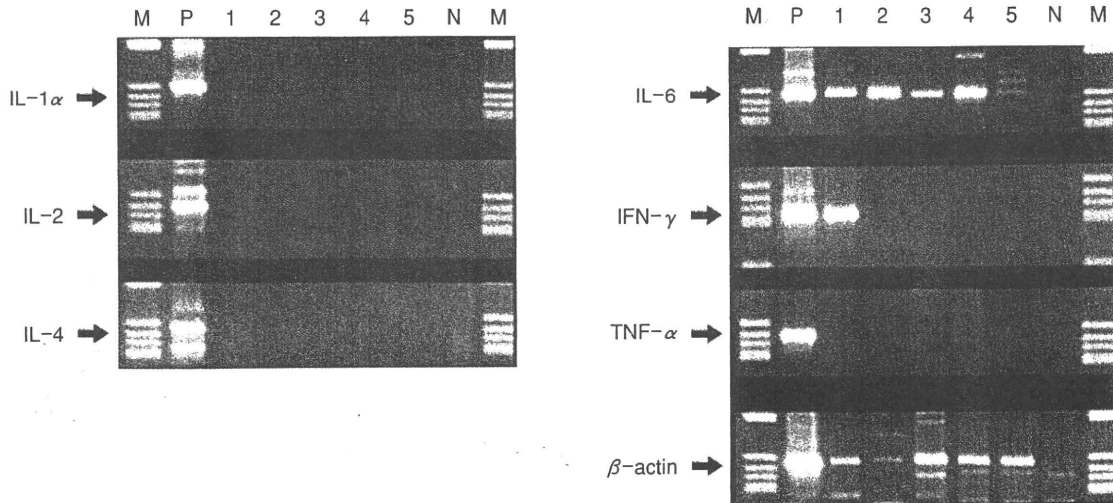


図 9 HTLV-1 ぶどう膜炎患者前房浸潤細胞のサイトカイン産生.

HTLV-1 ぶどう膜炎患者から採取した新鮮な前房水中の細胞は IL-6 以外のサイトカインを産生しない.
 IL: インターロイキン, IFN- γ : インターフェロン γ , TNF- α : 腫瘍壊死因子 α , M: 分子量マーカ, P: 陽性対照, N: 陰性対照, 1~5: HTLV-1 ぶどう膜炎患者.

(文献 134, Figure 6 から許可を得て転載, 改変)

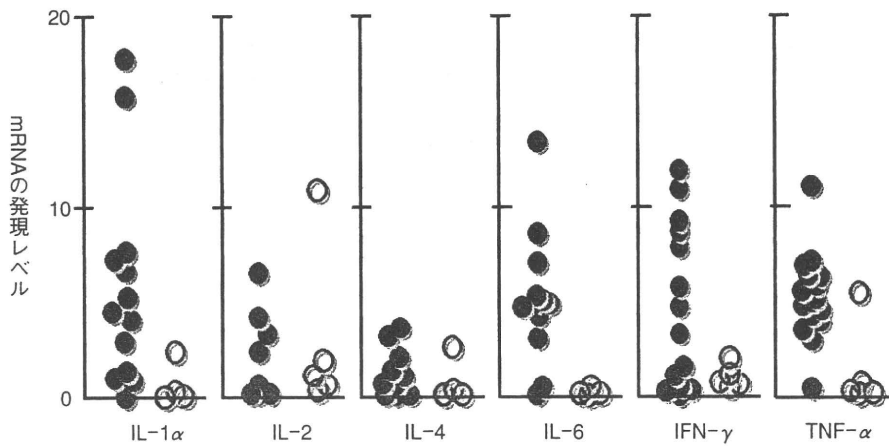


図 10 末梢血顆粒球のサイトカイン産生能.

HTLV-1 ぶどう膜炎患者の末梢血顆粒球は多くのサイトカインを発現している.
 ●: HTLV-1 ぶどう膜炎患者, ○: 健康者. IL: インターロイキン, IFN- γ : インターフェロン γ , TNF- α : 腫瘍壊死因子 α .

て, 眼局所から樹立した T 細胞クローンを用いて解析した¹²⁹⁾. HTLV-1 感染 CD4⁺T リンパ球は種々の炎症性サイトカインを大量に産生していたのに対して, HTLV-1 非感染 CD4⁺T リンパ球はこれらの炎症性サイトカインをまったく産生しない. さらに, HTLV-1 感染 CD4⁺T リンパ球の培養液中に副腎皮質ステロイド薬を添加するとサイトカイン産生は強く抑制された¹²⁹⁾(表 1). このことは, HTLV-1 ぶどう膜炎は HTLV-1 感染 CD4⁺T リンパ球が産生する炎症性サイトカインにより生じる眼内炎症であることを示すものである. また, 副腎皮質ステロイド薬が臨床的に本症の治療に有効であるのは, 先に述べた実験で示されたように副腎皮質ステロイドが HTLV-1 感染 CD4⁺T リンパ球によるサイトカイン

産生を抑制することによると考えられる.

4) HTLV-1 感染 CD4⁺T リンパ球の房水による抑制ところで, 本症の発症機構を解析している中で大変に奇妙な現象に遭遇した. それは, 患者前房浸潤細胞から樹立した HTLV-1 感染 CD4⁺T 細胞クローンは種々のサイトカインを産生していた¹²⁹⁾(表 1)が, 患者から採取した新鮮な房水中の HTLV-1 感染 CD4⁺T リンパ球はほとんどのサイトカインを産生していない¹³⁴⁾(図 9), という現象である. そこで, 患者の末梢血の HTLV-1 感染 CD4⁺T リンパ球を調べると, この末梢血リンパ球は T 細胞クローンと同様に種々のサイトカインを産生していた(図 10). 図 11 にまとめるように, 末梢血に循環している HTLV-1 感染 CD4⁺T リンパ球はサイトカインを産

サイトカイン	産生能		
IL-1 α	+	-	+
TNF- α	+	-	+
IFN- γ	+	-	+

図 11 HTLV-1 ぶどう膜炎患者の眼内と末梢血リンパ球のサイトカイン産生能のまとめ。
 HTLV-1 ぶどう膜炎患者では、末梢血中の HTLV-1 感染 T リンパ球(図中赤丸)は種々のサイトカイン(IL-1 α , TNF- α , IFN- γ)を産生するが、眼内のそれはサイトカインを産生しない。しかし、その細胞から T 細胞クローンを樹立するとサイトカインを産生ようになる。
 IL: インターロイキン, IFN- γ : インターフェロン γ , TNF- α : 腫瘍壊死因子 α 。

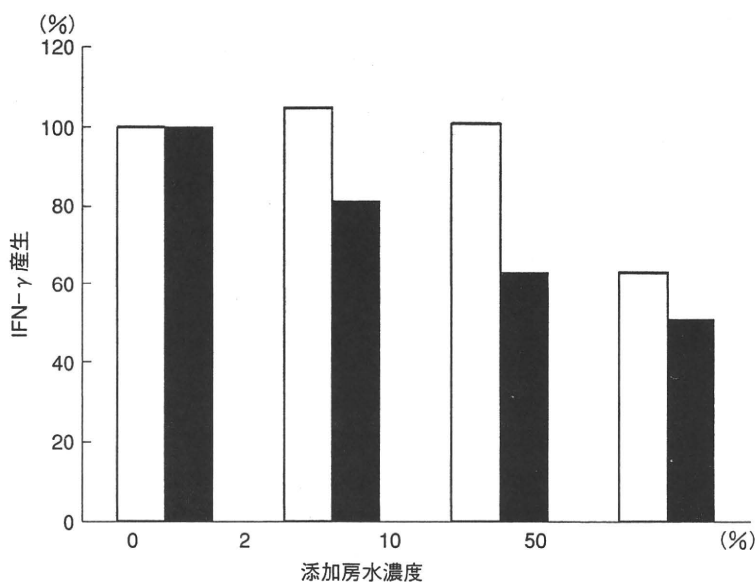


図 12 房水による HTLV-1 感染 T リンパ球抑制作用。
 ぶどう膜炎のない加齢白内障患者の手術時に採取した前房水は、HTLV-1 感染 T リンパ球のサイトカイン (IFN- γ) 産生を用量依存的に抑制する。
 ■: 白内障患者の前房水, □: PBS(陰性対照), IFN- γ : インターフェロン γ 。

生するが、眼内に浸潤した HTLV-1 感染 CD4⁺T リンパ球はサイトカインを産生せず、この浸潤細胞から樹立した T 細胞クローンはサイトカインを産生する。このことは何を意味するのであろうか？ もし、房水に HTLV-1 感染 CD4⁺T リンパ球を抑制する作用があるという仮説を立てれば、これらの現象は非常によく説明できる。そこで、この仮説を検証する目的で、加齢白内障の手術時に採取した前房水を HTLV-1 感染 CD4⁺T 細胞クローンの培養液に添加して、T 細胞クローンのサイ

トカイン産生能を測定した。前房水は添加する濃度に依存して HTLV-1 感染 CD4⁺T 細胞クローンのサイトカイン産生を抑制した(図 12)。この前房水中の抑制因子は加熱により失活し、抗 TGF- β 抗体でも中和されなかったことから TGF- β ではないと考えられ、房水に存在することが知られている免疫抑制活性をもつ vasoactive intestinal peptide (VIP)⁵³⁾¹³⁸⁾ や α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)¹³⁹⁾ とはその分子量が異なった。この HTLV-1 感染 CD4⁺T リンパ球を抑制する作用のある房

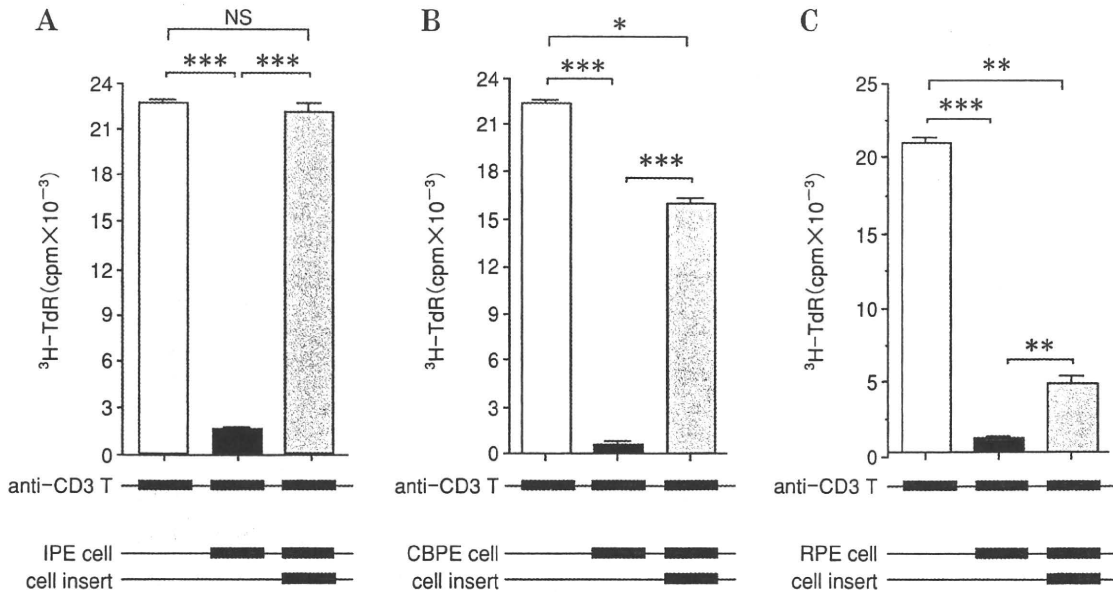


図 13 眼色素上皮の活性化 T リンパ球抑制作用とその抑制様式。

虹彩色素上皮, 毛様体色素上皮, 網膜色素上皮はいずれも活性化 CD4^+ T リンパ球の増殖反応を抑制する。虹彩色素上皮による抑制は cell insert で消失するが, 網膜色素上皮のそれは cell insert の影響をまったく受けない。

A: 虹彩色素上皮, B: 毛様体色素上皮, C: 網膜色素上皮。

$^3\text{H-TdR}$: サイミジン取り込み, cpm: count per minutes, anti-CD3T: 抗 CD3 抗体存在下で活性化させた CD4^+ T リンパ球, IPE: 虹彩色素上皮, CBPE: 毛様体色素上皮, RPE: 網膜色素上皮, cell insert: 細胞間に挿入膜。

NS: 有意差なし, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.005$, ***: $p < 0.001$ 。

(文献 81, Figure 1 から許可を得て転載, 改変)

水中の抑制因子の同定は未解決であるが, この現象は眼内に活性化 CD4^+ T リンパ球を抑制する局所防御機構が存在することを示しており, 眼内の恒常性維持に重要な働きをしていると考えられる。そこで, 我々は眼内の局所防御機構とその分子機構を解明することを目的として, 以下の研究を行った。

IV 眼の局所防御機構と眼色素上皮細胞

1. 眼の防御機構と immune privilege

眼には解剖学的に血液眼関門が存在し眼内への異物などの侵入を防御している。これらのバリアーが破綻した場合に, 眼にとって有害な細胞や物質が自由に眼内に侵入することを防ぐために第 2 のバリアーとして免疫学的なバリアーが存在すると考えられる。Streilein ら^{62)~83)}は, 眼は中枢神経や精巣などとともに免疫特権の存在する特殊な部位 (immune privilege site) であることを支持する多くの研究成果を報告している。その代表的なものは前房関連免疫偏位 (ACAID)^{62)~67)78)80)}であるが, これは眼由来の抗原に対し脾臓を介して抗原特異的な細胞性免疫だけが抑制されるという現象である。我々^{81)~90)}は, 眼の局所防御機構には ACAID のような抗原特異的な免疫抑制だけでなく, 非特異的な免疫抑制機構も存在し, それは血液眼関門の部位に存在する可能性が高いと考え

て, 眼の色素上皮細胞に注目して研究した。

2. 眼色素上皮細胞の免疫抑制作用

1) 免疫抑制の様式

C57BL/6 マウスから虹彩色素上皮細胞, 毛様体色素上皮細胞, 網膜色素上皮細胞を切り出して primary culture とし, 抗 CD3 抗体の存在下でマウス CD4^+ T リンパ球と培養すると, いずれの眼色素上皮細胞も抗 CD3 抗体で活性化された CD4^+ T リンパ球の増殖反応を強く抑制した⁷⁶⁾⁷⁷⁾⁷⁹⁾⁸¹⁾(図 13)。すなわち, 眼の色素上皮細胞は非特異的に活性化された CD4^+ T リンパ球の増殖を抑制する免疫抑制作用があるといえる。また, 色素上皮細胞と T リンパ球の間に一種の膜 (cell insert membrane) を入れて二つの細胞を分離し, 可溶性成分は膜を通過して細胞間を行き来できるが, 2 種類の細胞同士の接触はできないような培養条件にすると, ①虹彩色素上皮による活性化 CD4^+ T リンパ球抑制作用は消失する, ②網膜色素上皮の作用は変化なく CD4^+ T リンパ球を強く抑制する, ③毛様体色素上皮は虹彩色素上皮と網膜色素上皮の中間程度の抑制作用を示した⁷⁶⁾⁷⁷⁾⁷⁹⁾⁸¹⁾。このことから, 虹彩色素上皮は細胞同士が直接接触することにより T リンパ球を抑制し, 網膜色素上皮は可溶性因子を介して T リンパ球を抑制し, 毛様体色素上皮は細胞接触と可溶性因子の両方を用いて T リンパ球を抑制す

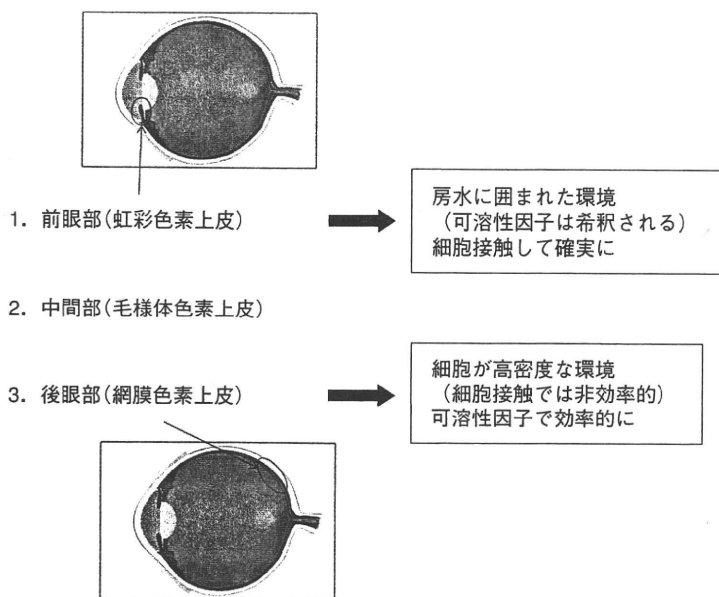


図 14 前眼部と後眼部の微小環境の相違と免疫抑制の様式の相違の仮説.

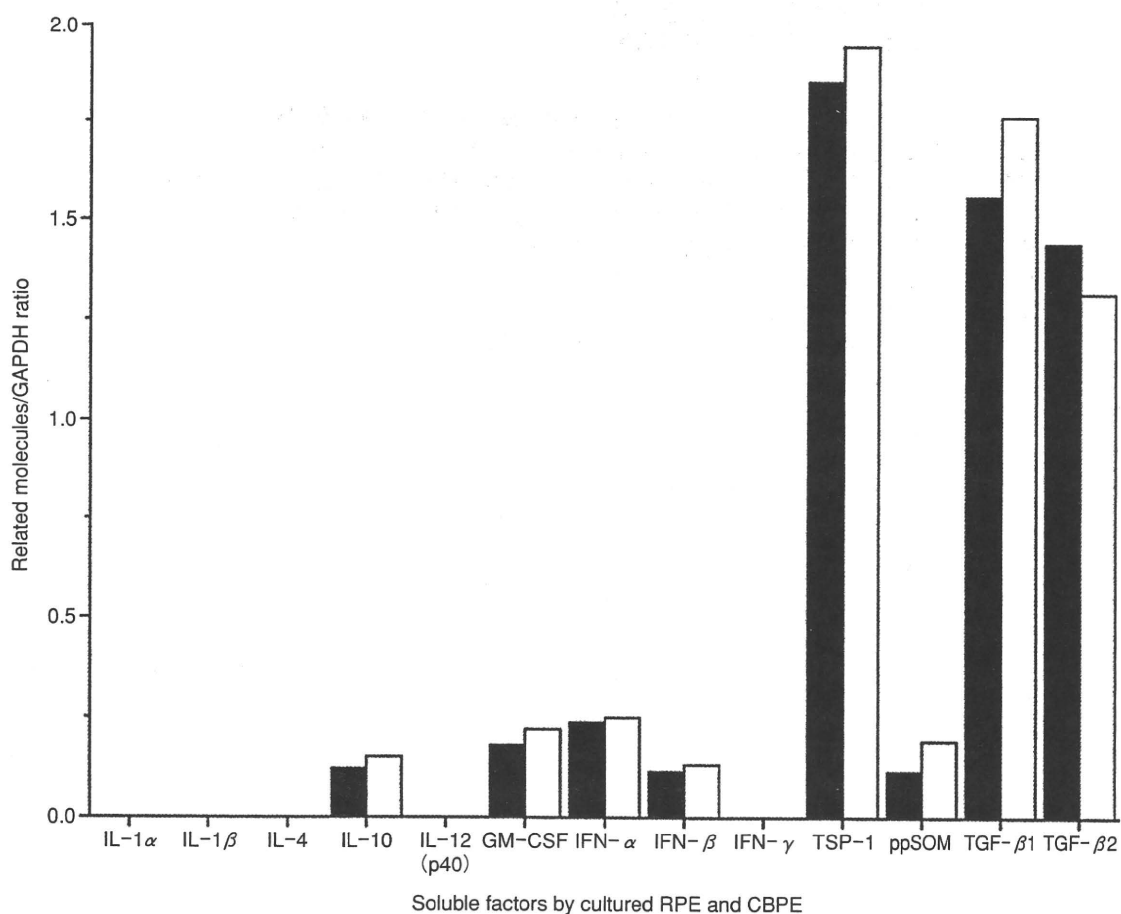


図 15 網膜色素上皮と毛様体色素上皮の可溶性因子.

網膜色素上皮と毛様体色素上皮に発現している因子を解析し、TSP-1 と TGF- β 1, TGF- β 2 の特に高い発現がみられた。

□：網膜色素上皮, ■：毛様体色素上皮. IL：インターロイキン, GM-CSF：顆粒球単球コロニー刺激因子, IFN- γ ：インターフェロン γ , TSP-1：thrombospondin-1, ppSOM：somatostatin, TNF- α ：腫瘍壊死因子 α , TGF- β ：形質転換増殖因子 β .

(文献 85, Figure 4 から許可を得て転載, 改変)

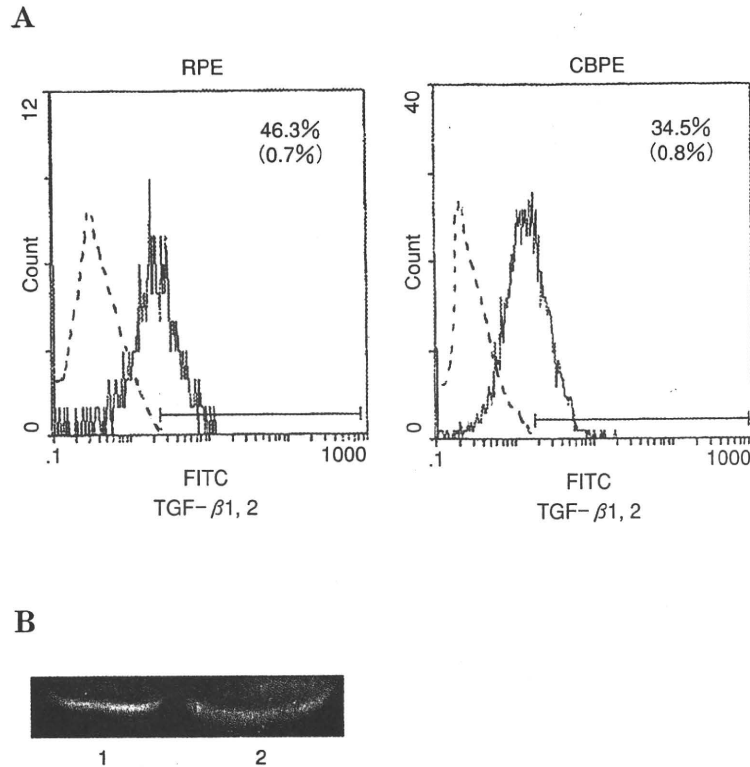


図 16 網膜色素上皮と毛様体色素上皮における TGF- β の発現.

- A : 網膜色素上皮と毛様体色素上皮の TGF- β 陽性細胞(フローサイトメトリー法)
 網膜色素上皮では TGF- β 1, 2 陽性細胞が 46.3%, 毛様体色素上皮では 34.5% も検出された.
 RPE : 網膜色素上皮, CBPE : 毛様体色素上皮, TGF- β : 形質転換増殖因子 β .
- B : 網膜色素上皮と毛様体色素上皮の培養上清のウエスタンブロット.
 網膜色素上皮と毛様体色素上皮の培養上清に TGF- β 1, 2 が蛋白質レベルで検出され, これらの色素上皮は TGF- β を産生・分泌すると考えられる.
 1 : 網膜色素上皮の培養上清, 2 : 毛様体色素上皮の培養上清.

(文献 85, Figure 6 から許可を得て転載, 改変)

ると結論される.

一見複雑で奇妙とも思えるこのような 3 種類の眼色素上皮細胞の作用様式の違いは何故起こるのであろうか? 眼内微小環境における 3 種類の眼色素上皮細胞の解剖学的な場所と関係があるのではないかと考えられる. すなわち, 虹彩色素上皮は前眼部の房水に囲まれた環境に位置しているので, 虹彩色素上皮が可溶性因子を分泌しても房水により希釈されると考えられる. したがって, 前眼部では細胞同士が直接接触することで免疫抑制作用を効率的に行うのではなかろうか(図 14). 一方, 種々の細胞が密度高く存在する後眼部に位置する網膜色素上皮は, 細胞接触による免疫抑制では効率が悪く可溶性因子を用いるのではないかと考える. 眼の長い進化の過程でこのような巧妙な仕組みが出来上がってきたものと思うと, その仕組みの巧妙さに畏敬の念を覚えざるを得ない.

2) 網膜色素上皮細胞の免疫抑制分子機構

それでは, 網膜色素上皮の免疫抑制作用に寄与する可溶性因子はどのような物質であろうか? 我々は, 網膜色素上皮と毛様体色素上皮の培養液の可溶性因子の遺伝

子発現を検討したところ, thrombospondin-1(TSP-1)と TGF- β が特に強く発現しており⁸⁵⁾(図 15), これらの可溶性因子が重要と考えられたので, それぞれについて網膜色素上皮における発現と機能についてさらに詳しく解析した.

(i) TGF- β

元来, TGF- β は強力な免疫抑制物質としてよく知られている. この強力な免疫抑制因子が網膜色素上皮の培養液中に存在するだけでなく, 網膜色素上皮に遺伝子レベルと蛋白質レベルで発現しているかどうかを reverse transcription (RT)-PCR とフローサイトメトリーで調べたところ, TGF- β は網膜色素上皮と毛様体色素上皮で産生分泌されていることが判明した⁸⁵⁾(図 16). 次に TGF- β がどのような機序で T リンパ球を抑制するかを知るために, 我々は dominant negative TGF- β 受容体マウス(DN TGF- β R マウス)という遺伝子改変マウスを用いて解析した. この遺伝子改変マウスの T リンパ球細胞表面の TGF- β 受容体からは TGF- β シグナルが入らない特殊なマウスである. 網膜色素上皮は野生型マウスの活性化 CD4⁺T リンパ球の増殖反応は強く抑制したのに

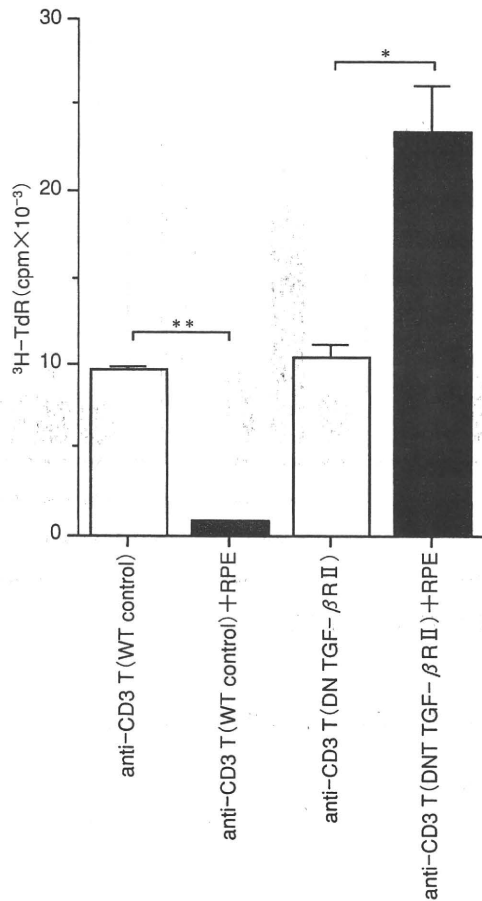


図 17 網膜色素上皮と毛様体色素上皮の T リンパ球抑制と TGF-β シグナル。

TGF-β シグナルが T リンパ球上の受容体に入らない遺伝子改変マウス (DN TGF-β RII) 由来の T リンパ球は網膜色素上皮と毛様体色素上皮で抑制されない。野生型マウスの T リンパ球は網膜色素上皮と毛様体色素上皮で抑制される。anti-CD3 T : 抗 CD3 抗体で刺激活性化された T リンパ球, WT : 野生型マウス, RPE : 網膜色素上皮, DN TGF-β RII : dominant negative TGF-β 受容体マウス, ³H-TdR : サイミジン取り込み, cpm : count per minutes.

* : p<0.05, ** : p<0.005.

(文献 85, Figure 5 から許可を得て転載, 改変)

対して, DN TGF-βR マウスの CD4⁺T リンパ球の増殖反応は抑制せず, むしろ増強した⁸⁵⁾(図 17)。このことから, 網膜色素上皮で産生分泌された TGF-β のシグナルが適正に活性化 CD4⁺T リンパ球に入ることにより T リンパ球が抑制されると結論される。このように強力な免疫抑制活性をもつ TGF-β が生体内に無秩序に発現することは, 生体にとってきわめて危険である。しかし, 通常の生体で TGF-β は免疫抑制作用のない潜伏型 TGF-β として存在し, 特定の刺激を受けてはじめて活性型 TGF-β に変換され免疫抑制機能を発揮する。網膜色素上皮においてもこのような巧妙な制御機構が動いており, その制御分子が次に述べる TSP-1 であることが

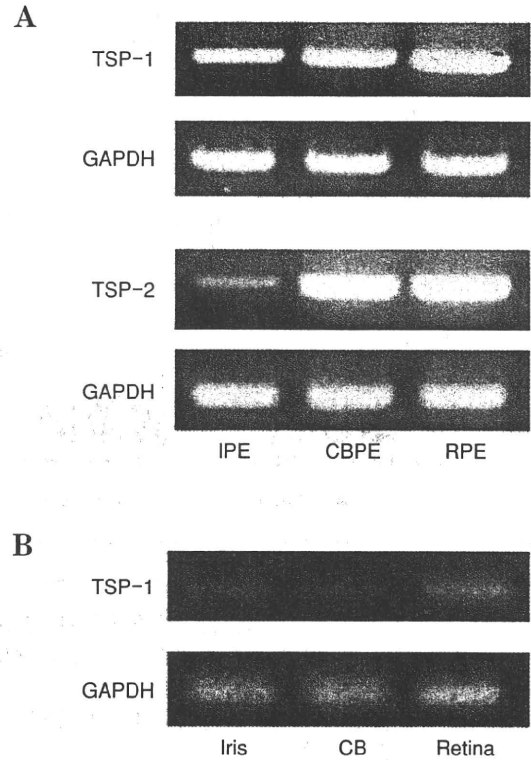


図 18 Thrombospondin-1 (TSP-1) の発現。

A : 培養眼色素上皮。TSP-1 は虹彩色素上皮, 毛様体色素上皮, 網膜色素上皮の primary culture 細胞で遺伝子発現している。

TSP-1 : thrombospondin-1, TSP-2 : thrombospondin-2. IPE : 虹彩色素上皮, CBPE : 毛様体色素上皮, RPE : 網膜色素上皮。

B : 組織。TSP-1 は虹彩, 毛様体, 網膜の新鮮組織においても遺伝子発現しているが, 特に網膜での発現が強い。

CB : 毛様体。

(文献 86, Figure 1 から許可を得て転載, 改変)

我々の研究で明らかとなった。

(ii) Thrombospondin-1 (TSP-1)

TSP-1 の発現を 3 種類の目の色素上皮細胞において RT-PCR とフローサイトメトリーで調べたところ, TSP-1 は遺伝子レベルでも蛋白質レベルでも 3 つの色素上皮細胞に発現していたが, 特に網膜色素上皮に強く発現していた⁸⁶⁾(図 18)。その機能を調べるために, 種々の抑制因子に対する中和抗体で網膜色素上皮を前処置したところ, 抗 TSP-1 抗体だけが網膜色素上皮の T リンパ球抑制作用を中和した⁸⁵⁾(図 19)。さらに, 網膜色素上皮の TGF-β 産生能に TSP-1 がどのような作用をもつかについてリコンビナント TSP-1 (rTSP-1) を用いて調べたところ, rTSP-1 は RPE の total TGF-β の産生には影響しなかったが, 活性型 TGF-β 産生分泌を強く増強した⁸⁶⁾(図 20)。これらのことから, TSP-1 は網膜色素上皮に存在し, 潜伏型 TGF-β を活性型の可溶性 TGF-β に変換させる重要な作用があると考えられる。

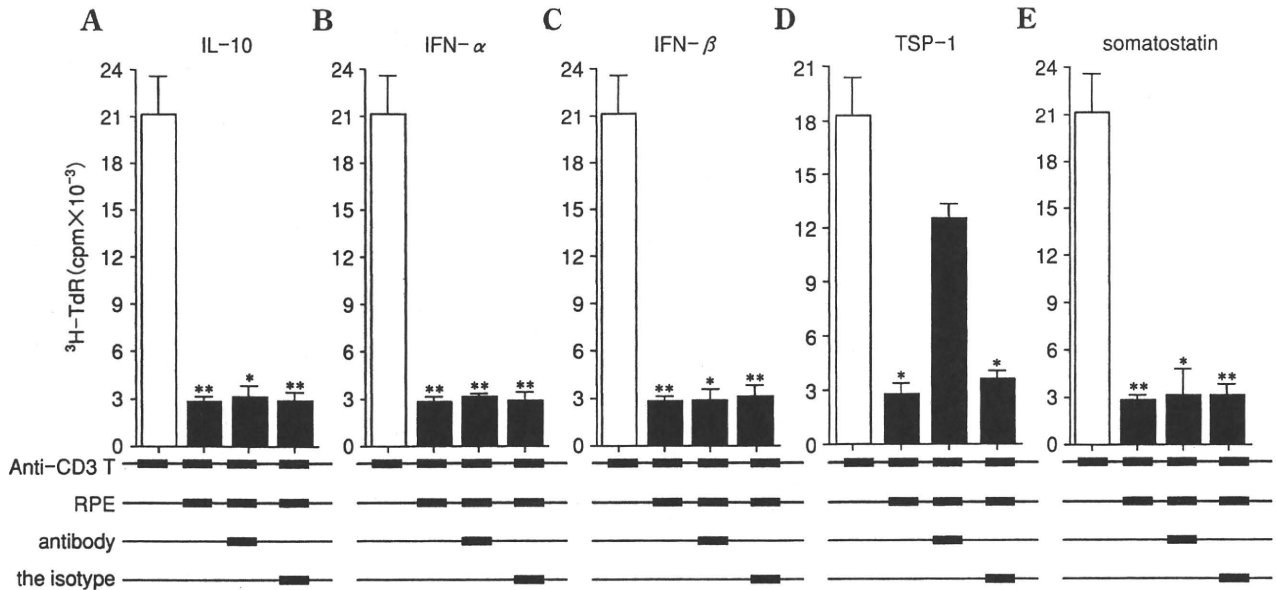


図 19 各種可溶性因子中和抗体が網膜色素上皮に対する作用。

網膜色素上皮の活性化 CD4⁺T リンパ球抑制作用が各種の可溶性因子の抗体で中和されるかを検討した。抗 TSP-1 抗体でのみ強く中和された。

A~E: それぞれ IL-10, IFN- α , IFN- β , TSP-1, somatostatin の中和抗体で網膜色素上皮を前処理した後に T リンパ球と共培養した群。

IL: インターロイキン, IFN: インターフェロン, TSP-1: thrombospondin-1

³H-TdR: サイミジン取り込み, cpm: count per minutes, anti-CD3 T: 抗 CD3 抗体で活性化された T リンパ球, RPE: 網膜色素上皮。

*: p<0.05, **: p<0.005.

(文献 85, Figure 7 から許可を得て転載, 改変)

(iii) 網膜色素上皮の活性化 CD4⁺T リンパ球抑制の分子機構

以上のことから、我々は、網膜色素上皮の T リンパ球抑制分子機構は以下の如くであると考え(図 21)。すなわち、網膜色素上皮に存在する TSP-1 により潜伏型 TGF- β が活性型の可溶性 TGF- β に変換されて分泌され、その可溶性 TGF- β が CD4⁺T リンパ球細胞表面の TGF- β 受容体に結合し TGF- β シグナルが T リンパ球に入ることにより CD4⁺T リンパ球が抑制される。

3) 虹彩色素上皮細胞の免疫抑制分子機構

前述したように、前眼部に位置し房水に囲まれた環境に存在する虹彩色素上皮は T リンパ球と直接細胞同士が接触することで活性化 T リンパ球の増殖反応を抑制する。この虹彩色素上皮と T リンパ球との細胞接触を媒介するものはどのような物質であろうか? 以下に述べる研究から虹彩色素上皮細胞表面に発現されている B7-2 分子と T リンパ球表面に発現されている cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4(以下, CTLA-4) 分子が重要な働きをすることが明らかとなった。

(i) B7-2 分子

我々は、3 種類の眼色素上皮細胞において、細胞表面に発現され免疫抑制作用をもつことが知られている種々の分子の発現を RT-PCR 法により比較検討した。多く

の候補分子の中で、B7-2(CD86) 分子は虹彩色素上皮で強く発現され、毛様体色素上皮ではごくわずかに発現され、網膜色素上皮ではまったく発現されていなかった⁸¹⁾(図 22)。フローサイトメトリーによる蛋白質発現も同様に虹彩色素上皮でのみ強く発現されていた。虹彩色素上皮細胞表面において発現され網膜色素上皮では発現されていない B7-2 分子が、虹彩色素上皮にユニークな細胞接触による T 細胞抑制に関与している可能性が強く示唆される。そこで、B7-2 分子の機能を解析するために B7-2 ノックアウトマウス(B7-2 KO マウス)を用いて実験した。野生型マウス由来の 3 種類の色素上皮細胞は活性化 CD4⁺T リンパ球の増殖反応を強く抑制したが、B7-2 KO マウス由来の虹彩色素上皮は抑制できなかった⁸¹⁾(図 23)。一方、B7-2 KO マウス由来の網膜色素上皮や毛様体色素上皮は虹彩色素上皮と異なり活性化 CD4⁺T リンパ球を抑制した。これらのことから、虹彩色素上皮は細胞表面に発現している B7-2 分子を介して T リンパ球を抑制すると結論される。

元来、B7-2 分子は T リンパ球活性化過程における副刺激分子としてよく知られている分子であり¹⁴⁰⁾¹⁴¹⁾、そのリガンドとしては CTLA-4 が知られている¹⁴²⁾。そこで、我々は虹彩色素上皮と接触する活性化 CD4⁺T リンパ球に CTLA-4 が発現されているかを検討した。

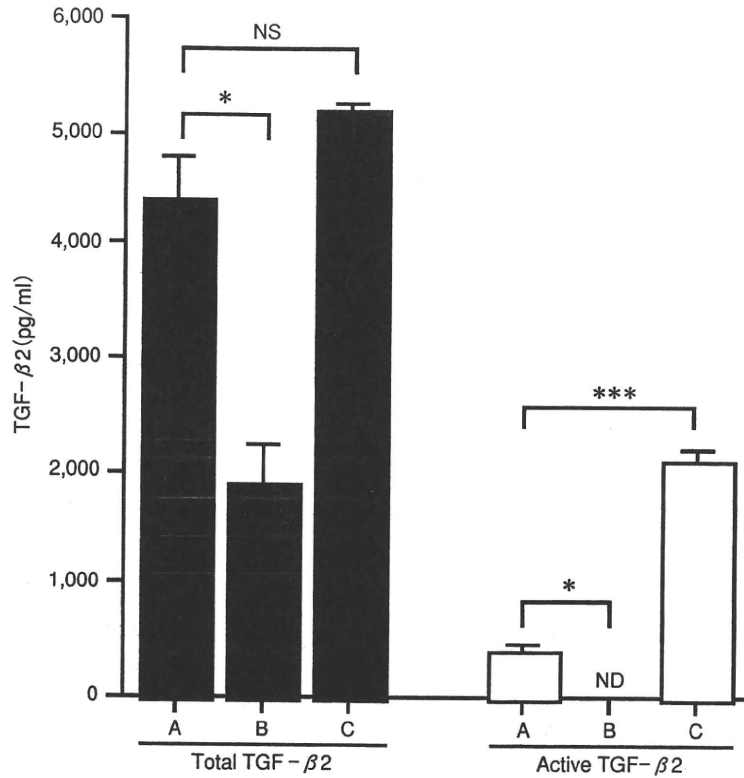


図 20 リコンビナント TSP-1 の網膜色素上皮 TGF-β 産生に対する作用。

網膜色素上皮培養上清に含まれる TGF-β2 をバイオアッセイで測定した。網膜色素上皮を抗 TGF-β2 抗体で処理すると網膜色素上皮培養上清中の TGF-β2 は減少した。一方、リコンビナント TSP-1 で処理すると網膜色素上皮培養上清中の総 TGF-β2 量は変化しないが活性型 TGF-β2 が増加した。

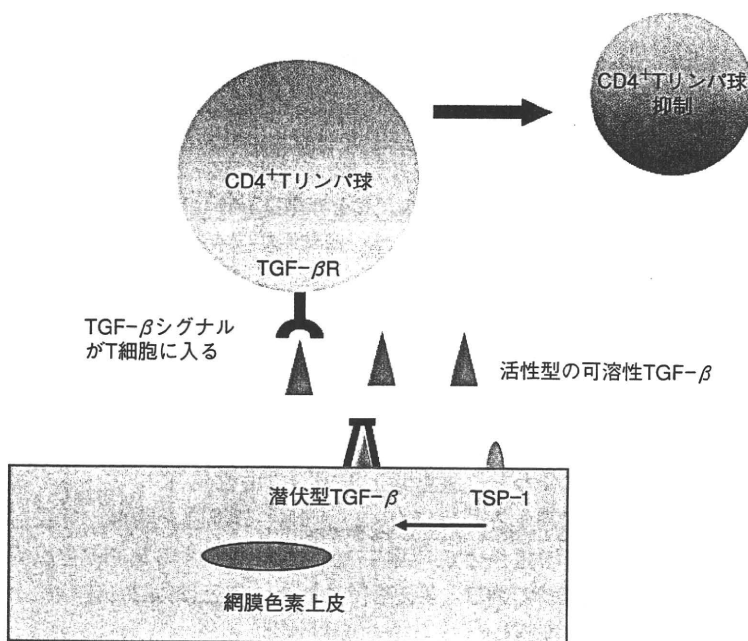
■：総 TGF-β2，□：活性型 TGF-β2

A：網膜色素上皮，B：網膜色素上皮+抗 TGF-β2 抗体，C：網膜色素上皮+リコンビナント TSP-1。

TGF-β2：形質転換増殖因子 β2，ND：not detected。

NS：有意差なし，*：p<0.05，***：p<0.001。

(文献 86, Figure 2 から許可を得て転載, 改変)



潜伏型 TGF-β が網膜色素上皮の TSP-1 により活性型の可溶性 TGF-β となり分泌され、活性化 T リンパ球上の TGF-β 受容体と反応する。TGF-β シグナルが TGF-β 受容体を介して CD4⁺T リンパ球に入ると抑制シグナルが CD4⁺T リンパ球に生じてその増殖は抑制される。

TSP-1：thrombospondin-1，TGF-β：形質転換増殖因子 β，TGF-βR：TGF-β 受容体。

図 21 網膜色素上皮における T リンパ球の抑制分子機構。

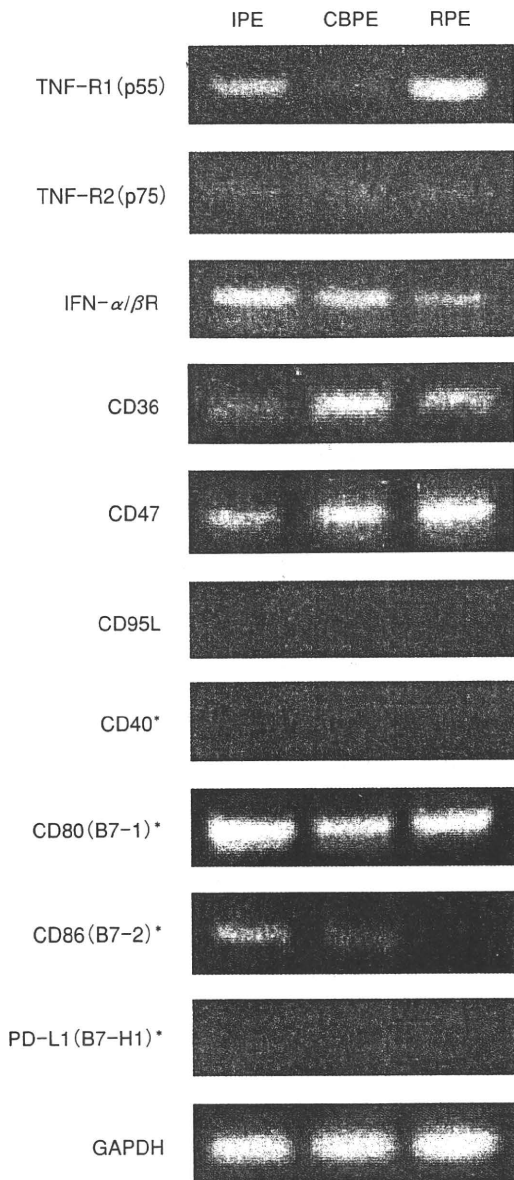


図 2 眼色素上皮における各種抑制因子の遺伝子発現。眼色素上皮細胞表面の種々の抑制因子の遺伝子発現を reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) で測定した。

CD86(B7-2)は虹彩色素上皮に強く発現し、毛様体色素上皮では弱く、網膜色素上皮では発現がなかった。このような細胞表面分子は他になかった。

IPE: 虹彩色素上皮, CBPE: 毛様体色素上皮, PRE: 網膜色素上皮, TNF-R: 腫瘍壊死因子受容体, IFN- α/β R: インターフェロン α/β 受容体, CD95L: CD95 ligand, PD-L1: programmed death-ligand 1.

(文献 81, Figure 2 から許可を得て転載, 改変)

(ii) CTLA-4

CTLA-4 が活性化 CD4⁺T リンパ球の細胞表面に発現されているかを免疫染色法により検討すると, CTLA-4 は虹彩色素上皮と接触している活性化 CD4⁺T リンパ球の細胞表面に強く発現されていた⁸²⁾(図 24)。また, CTLA-4 KO マウスから採取した T リンパ球は, 野生型

マウス由来の T リンパ球と異なり虹彩色素上皮で抑制されない⁸¹⁾(図 25)。すなわち, 虹彩色素上皮が活性化 CD4⁺T リンパ球を抑制するためには T リンパ球表面に CTLA-4 が発現していることも必要である。しかし, B7-2 と CTLA-4 は虹彩色素上皮と活性化 CD4⁺T リンパ球とを細胞接触させる機能をもつ分子ではあるが, 実際の免疫抑制機能分子ではない。虹彩色素上皮の免疫抑制作用の機能分子は, 網膜色素上皮と同様に TGF- β が担っている。これは以下の実験から明らかである。

(iii) 虹彩色素上皮の免疫抑制機能分子としての TGF- β

培養虹彩色素上皮において TGF- β が発現しているか否かを免疫染色法で検討すると, 虹彩色素上皮細胞表面には TGF- β が強く発現されている⁸³⁾(図 26)。また, その機能を検討する目的で, TGF- β シグナルが T 細胞に入っていない dominant negative TGF- β 受容体マウス (DN TGF- β R マウス) を用いて実験した。虹彩色素上皮は野生型マウス由来の活性化 CD4⁺T リンパ球のサイトカイン産生を強く抑制したのに対して, DN TGF- β R マウス由来の T リンパ球をまったく抑制しなかった⁸³⁾(図 27)。このことから, 虹彩色素上皮細胞表面に発現している TGF- β のシグナルが活性化 CD4⁺T リンパ球に入ることが T 細胞抑制に必要であると結論される。

虹彩色素上皮における活性化 CD4⁺T リンパ球の抑制分子機構を図に示す(図 28)。TGF- β の免疫抑制機能分子としての働きは虹彩色素上皮でも網膜色素上皮と同じであり, また TSP-1 分子により潜伏型から活性型の TGF- β に変換される点も同じであるが, 大きな相違点は網膜色素上皮で働く TGF- β は可溶性 TGF- β であるのに対して, 虹彩色素上皮では膜結合型 TGF- β である。

3. マウス眼色素上皮細胞による制御性 T 細胞 (regulatory T cell) の誘導

今まで述べてきた研究により, 眼の色素上皮細胞は活性化 CD4⁺T リンパ球を直接抑制する作用があること, しかも, 色素上皮細胞が位置する眼内の微小環境に応じて, 網膜では可溶性因子を用いて, 虹彩では細胞接触を介して T リンパ球を抑制する巧妙な分子機構が存在することが明らかとなった。しかし, 眼にはさらに巧妙な免疫抑制機構が存在する。それは, これらの眼色素上皮細胞が眼内に浸潤してきた活性化 T リンパ球の性質を変化させて他の活性化 T リンパ球を抑制する機能をもつ制御性 T 細胞に変換させることである。

すなわち, 眼色素上皮細胞は活性化 T リンパ球を直接抑制するだけでなく, 制御性 T 細胞を誘導し免疫抑制を増幅させて, 眼内の恒常性を維持する驚くべき機構をもっているといえる。これらのことは以下の実験により確認された。

1) 制御性 T 細胞誘導の実験系(図 29)

マウスから採取した CD4⁺T リンパ球あるいは CD8⁺

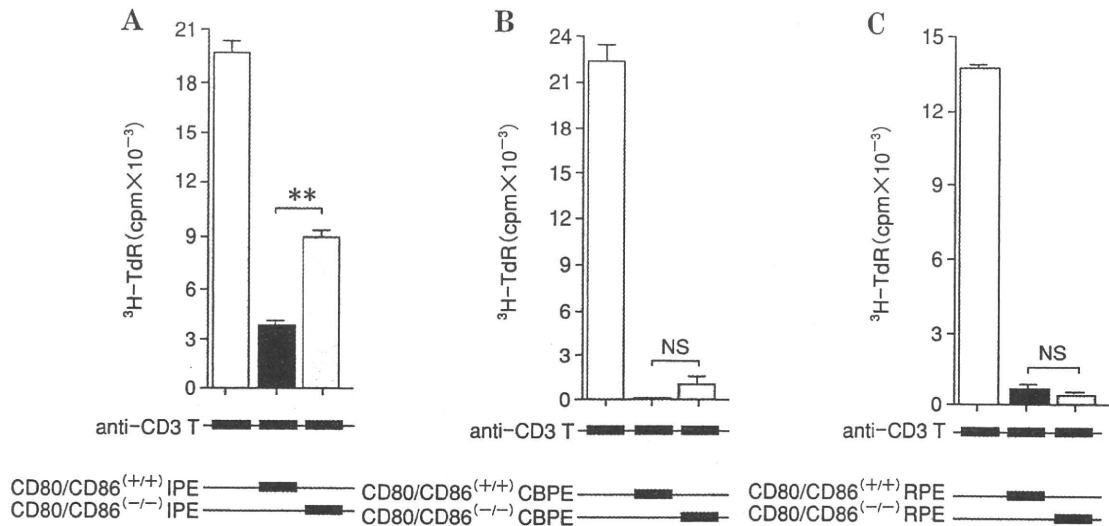


図 23 B 7-2 ノックアウトマウス由来の眼色素上皮による T 細胞抑制。

野生型由来の眼色素上皮は活性化 T リンパ球を強く抑制する。B 7-2 ノックアウトマウス由来の毛様体色素上皮と網膜色素上皮の T リンパ球抑制作用は変化しないが、虹彩色素上皮の T リンパ球抑制作用は失活する。

A：虹彩色素上皮，B：毛様体色素上皮，C：網膜色素上皮。

CD80/CD86^(+/+)：野生型マウス，CD80/CD86^(-/-)：B 7-2 ノックアウトマウス，IPE：虹彩色素上皮，CBPE：毛様体色素上皮，RPE：網膜色素上皮。³H-TdR：サイミジン取り込み，cpm：count per minutes，anti-CD3 T：抗 CD3 抗体で活性化された T リンパ球。

NS：有意差なし，**：p<0.005。

(文献 81, Figure 6 から許可を得て転載，改変)

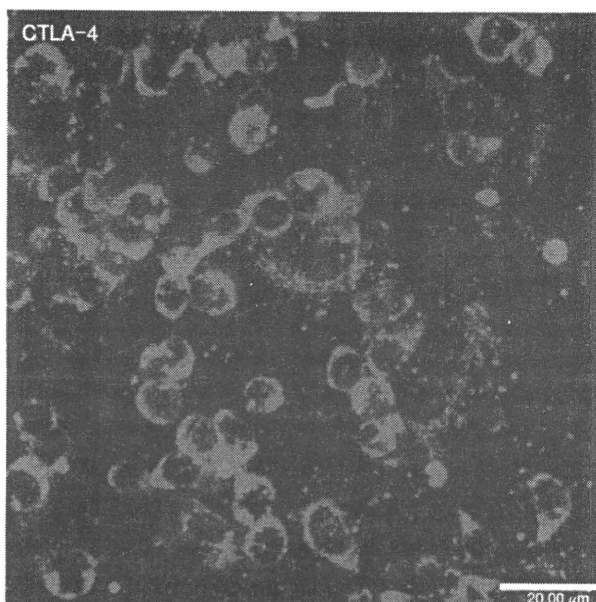


図 24 T リンパ球細胞表面の CTLA-4 発現。

虹彩色素上皮と接触している活性化 T リンパ球は細胞表面に CTLA-4 を強く発現している(フルオレセイン蛍光顕微鏡)。

CTLA-4：cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4.
バー：20 μm。

(文献 82, Figure 7 から許可を得て転載，改変)

T リンパ球を低濃度の抗 CD3 抗体(0.01 μg/ml)存在下で 3 種類の眼色素上皮細胞と共培養し、その後に T リンパ球だけを回収し放射線照射する。この放射線処置により T リンパ球は細胞増殖の機能は失うが、他の生物活性は残っている状態になる。マウスから採取した CD4⁺T リンパ球(レスポンドー T 細胞)と高濃度の抗 CD3 抗体(1 μg/ml)の培養系に、先ほどの眼色素上皮細胞に曝露し放射線照射した T リンパ球を加えて共培養し、この T リンパ球がレスポンドー T 細胞の増殖反応に与える作用を調べる。もし、この実験系においてレスポンドー T 細胞の増殖が色素上皮細胞に曝露処理された T リンパ球により抑制されれば、色素上皮細胞が制御性 T 細胞を誘導したことになる。実際の実験結果を以下に示す。

2) 眼色素上皮により誘導される制御性 T 細胞のサブタイプ

眼色素上皮はどのような T リンパ球を制御性 T 細胞へと誘導するのであろうか？ 虹彩色素上皮と網膜色素上皮は同じ T リンパ球を制御性 T 細胞に変化させるのであろうか？ この疑問について、前述の実験系を用いて検討した。その結果を図 30 にまとめる。虹彩色素上皮に曝露された CD8⁺T リンパ球はレスポンドー T 細胞増殖を強く抑制したが、虹彩色素上皮に曝露された CD4⁺T リンパ球のレスポンドー T 細胞抑制作用は弱かった⁹⁰⁾(図 30)。一方、網膜色素上皮に曝露された

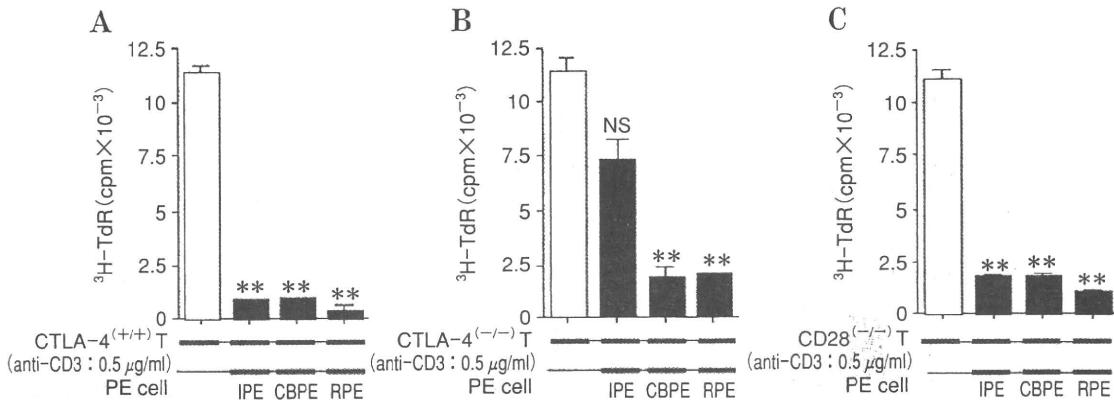


図 25 眼色素上皮の CTLA-4 ノックアウトマウス由来 T リンパ球に対する抑制作用。

野生型マウス由来の活性化 T リンパ球はすべての眼色素上皮で強く抑制されるが、CTLA-4 ノックアウトマウス由来の T リンパ球は虹彩色素上皮で抑制されない。

A: 野生型マウス, B: CTLA-4 ノックアウトマウス, C: CD28 ノックアウトマウス。

CTLA-4^(+/+)T: 野生型マウス由来 T リンパ球, CTLA-4^(-/-)T: CTLA-4 ノックアウトマウス由来 T リンパ球, CD28^(-/-)T: CD28 ノックアウトマウス由来 T リンパ球, PE: 眼色素上皮, IPE: 虹彩色素上皮, CBPE: 毛様体色素上皮, RPE: 網膜色素上皮。

NS: 有意差なし, **: p<0.005.

(文献 81, Figure 8 から許可を得て転載, 改変)

CD4⁺T リンパ球はレスポンド T 細胞の増殖を非常に強く抑制したが、網膜色素上皮に曝露された CD8⁺T リンパ球のレスポンド T 細胞抑制作用は弱かった。すなわち、虹彩色素上皮は主に CD8⁺T 細胞を制御性 T 細胞へと誘導し、網膜色素上皮は主に CD4⁺T 細胞を制御性 T 細胞へと誘導することが分かった。一方、毛様体色素上皮には制御性 T 細胞を誘導する機能はなかった。何故、このように前眼部と後眼部とで異なる T リンパ球を制御性 T 細胞に変化させるのか？ その生物学的意義は不明であり、今後の研究課題の一つである。

3) 眼色素上皮細胞により誘導される制御性 T 細胞のプロファイル

末梢血中に存在している制御性 T 細胞は、CD25 陽性で Foxp3 遺伝子を発現し、活性化 T 細胞抑制をはじめ多くの免疫応答を抑制する機能を有することが知られている¹⁴³⁾¹⁴⁴⁾。ところで、網膜色素上皮細胞により誘導された制御性 T 細胞はどうであろうか？ そのプロファイルを解析した結果を表に示す(表 2)。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺で可溶性 TGF-β を産生分泌し、TGF-β 受容体を発現し、TSP-1 分子を発現している T 細胞であった⁹⁰⁾。一方、虹彩色素上皮細胞により誘導された制御性 T 細胞は、CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺で、膜結合型 TGF-β、TGF-β 受容体、TSP-1 を細胞表面に発現する細胞であった¹⁴⁵⁾。

4) 網膜色素上皮の制御性 T 細胞誘導に関与する分子

網膜色素上皮の制御性 T 細胞誘導にかかわる特異な可溶性因子が存在するかどうかを知るために、我々はマウスの虹彩色素上皮、毛様体色素上皮、網膜色素上皮の培養細胞を用いて GeneChip[®]解析を行い、遺伝子発現

を網羅的に調べて比較検討した⁹⁰⁾。このマイクロアレーは 45,102 遺伝子を含んでおり、その中で網膜色素上皮は 12,384 個、毛様体色素上皮は 13,993 個、虹彩色素上皮は 15,073 個の遺伝子が有意な発現レベルであった。これらの中で、それぞれの色素上皮細胞に高く発現されている遺伝子を抽出し、特に、網膜色素上皮細胞における発現が他の 2 種類の色素上皮細胞と比べて signal log ratio で 5.0 以上強いものは cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 2α (CTLA-2α) だけであった。CTLA-2α の機能については未だ不明の点が多いが、cathepsin L あるいは cysteine protease を抑制する新しい分子として注目され、免疫反応系における作用も報告されている。CTLA-2α は網膜色素上皮で mRNA レベルの発現が強く検出されたが、虹彩色素上皮と毛様体色素上皮では発現していなかった⁹⁰⁾(図 31)。また、その蛋白質発現も免疫組織染色で網膜色素上皮の細胞表面に斑状顆粒状に確認されたが、虹彩色素上皮では染色されない。この網膜色素上皮細胞で産生される CTLA-2α の機能を知るために、マウス・リコンビナント CTLA-2α (rCTLA-2α) を用いて実験した。すなわち、CD4⁺T リンパ球を低濃度 (0.01~0.1 μg/ml) の CD3 抗体存在下で rCTLA-2α と前処置して作製した CTLA-2α 処置 T リンパ球が、CD4⁺のレスポンド T 細胞の増殖を抑制するかを調べた。rCTLA-2α 処置 T リンパ球は前処置に用いる rCTLA-2α の濃度に依存してレスポンド T 細胞の増殖反応を抑制した⁹⁰⁾(図 32)。この rCTLA-2α 処置 T リンパ球の中でも CD25⁺細胞は Foxp3 遺伝子を強く発現しているが、CD25⁻T 細胞は Foxp3 遺伝子の発現はなかった。Foxp3 遺伝子は制御性 T 細胞の唯一のマ

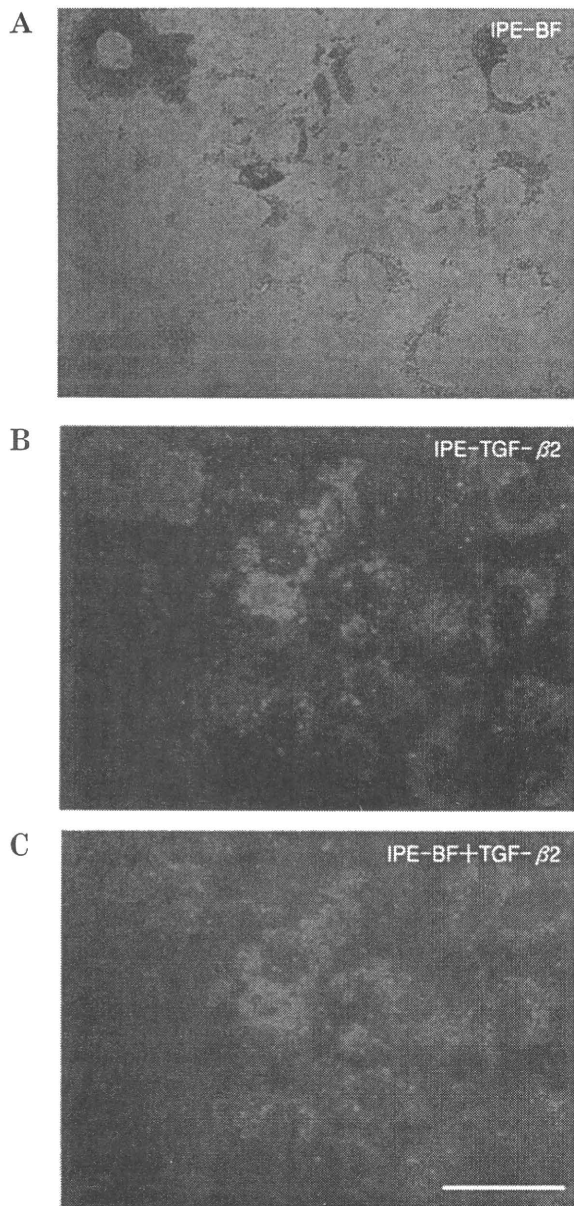


図 26 虹彩色素上皮における TGF-β2 の発現.

- A : 虹彩色素上皮の光学顕微鏡写真. メラニン色素をもつ虹彩色素上皮が観察される.
- B : 虹彩色素上皮の TGF-β2 フルオレセイン蛍光顕微鏡写真. 細胞表面に TGF-β2(赤)をもつ細胞が観察される.
- C : 光学顕微鏡とフルオレセイン蛍光顕微鏡の重ね合わせ(TGF-βは虹彩色素上皮絵上に染色). AとBを重ね合わせると TGF-β2は虹彩色素上皮に発現していることが分かる.

IPE : 虹彩色素上皮, BF : bright field image, TGF-β2 : 形質転換増殖因子 β2. バー : 50 μm.

(文献 83, Figure 3 から許可を得て転載, 改変)

カーであることから, CTLA-2αは活性化 CD4⁺T リンパ球を制御性 T 細胞へと誘導する機能があると結論される. CTLA-2αを small interfering RNA (siRNA) でブロックすることで CTLA-2αの機能をさらに解析した⁹⁰⁾. 網膜色素上皮に曝露した T リンパ球は制御性 T

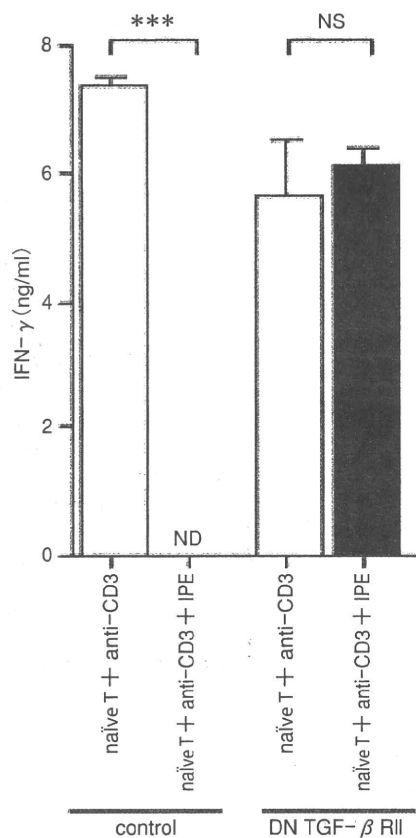


図 27 TGF-β シグナルと虹彩色素上皮の T リンパ球抑制作用.

野生型マウス由来 T リンパ球のインターフェロン γ は虹彩色素上皮で強く抑制される. しかし, DN TGF-β RII マウス由来の T リンパ球は虹彩色素上皮で抑制されない.

DN TGF-β RII : dominant negative TGF-β 受容体マウス(TGF-βのシグナルが T リンパ球に入らない遺伝子改変マウス), IFN-γ : インターフェロン γ, T : T リンパ球, IPE : 虹彩色素上皮.

ND : not detected, NS : 有意差なし, *** : p < 0.001.

(文献 83, Figure 6 から許可を得て転載, 改変)

細胞へと誘導されレスポンダー T 細胞の増殖を強く抑制するが, CTLA-2αの siRNA を遺伝子導入した網膜色素上皮細胞に曝露された T リンパ球はレスポンダー T 細胞の増殖反応を抑制できず(図 33), このことから CTLA-2αは網膜色素上皮細胞の制御性 T 細胞誘導に不可欠な因子であるといえる.

以上の研究結果から網膜色素上皮細胞による制御性 T 細胞誘導の分子機構は図 34 の如くと考えられる. すなわち, 網膜色素上皮細胞表面の TSP-1 分子により潜伏型 TGF-β が活性型の可溶性 TGF-β となり分泌され, CD4⁺T 細胞表面の TGF-β 受容体と結合する. 同時に, 網膜色素上皮細胞から CTLA-2α が産生・分泌され, 可溶性 CTLA-2α が CD4⁺T リンパ球に反応すると T リンパ球に抑制シグナルが入り, CD4⁺T リンパ球は Foxp3 遺伝子を発現して制御性 T 細胞へと変化する. この制