

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
竹田清子	主査 教授 池田 恒彦
	主査 教授 窪田 隆裕
	副査 教授 芝山 雄老
	副査 教授 吉田 龍太郎
	副査 教授 岡田 仁克
主論文題名 Experimental Autoimmune Uveoretinitis Initiated by Non-phagocytic Destruction of Inner Segments of Photoreceptor Cells by Mac-1 ⁺ Mononuclear Cells (Mac-1 陽性単核細胞による視細胞内節の非貪食的破壊により発症する実験的自己免疫性ぶどう膜炎)	
学位論文内容の要旨	
<p>《緒言》</p> <p>実験的自己免疫性ぶどう膜炎(以下、EAU)は、網膜自己抗原である Interphotoreceptor retinoid binding protein(以下、IRBP)に感受性のあるマウスで誘導できるヒトぶどう膜炎の動物モデルである。IRBP は、視細胞外節、網膜色素上皮細胞(以下、RPE)表面、視細胞と RPE に囲まれた interphotoreceptor space に局在し、視細胞外節の維持に供与している。EAU では IRBP に対する免疫反応が眼内組織でおこるが、EAU 発症部位における標的細胞は <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> で明確には同定されていない。EAU はヘルパーT細胞-1(以下、Th1細胞)依存性疾患で、他の実験的自己免疫性疾患の研究ではマクロファージが組織障害に重要である事が最近になり示され、EAU においてもマクロファージが組織を障害しているという研究結果が報告されている。本研究では、正常マウスと EAU マウスから網膜を採取し種々の細胞を単離した。その単離細胞のうち正常マウスの細胞の一部を標的細胞、EAU マウスの細胞の一部を傷害細胞として用い <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> で電顕的考察を行った。</p> <p>《方法》</p> <p>①EAU 誘導とスコア ヒト IRBP ペプチドを、結核死菌を含むアジュバントと共に B10RIIIマウスに皮下注射した。免疫後 0,9,11,14,21 日目に眼底を観察し、炎症の程度をスコア化した。同日、組織標本を作製し組織病理学的評価も行った。</p> <p>②網膜細胞と浸潤細胞の単離 マウス眼球を摘出し顕微鏡下で前眼部を除去した後、ヒアルロニダーゼとコラゲナーゼを含む培養液中で 37°C 50 分処理した。培養液回収後ナイロンメッシュに通し、遊離細胞液とした。次にパーコール密度勾配遠心法を用いて、最下層に全細胞を 60%パーコール溶液と混合し、その上に 40%、最上層にリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)を重層後遠心分離した。実験によっては 30%も追加した。各層間(PBS/40,30/40, 40/60, 沈査)の細胞を回収し細胞数を測定した。</p>	

③セルソーターによる解析

単離細胞を蛍光色素で標識した抗 Mac-1, Ly-6G, NK-1.1, CD4, CD8 抗体で染色し陽性細胞を回収した。

④RT-PCR 法

PBS/40, 40/60 細胞を回収し Total RNA を抽出した。Opsin mRNA を検出するため PCR で増幅し、PCR 産物を 2%アガロースゲル上に電気泳動した。

⑤電子顕微鏡的解析

正常と EAU マウスの網膜細胞を 2%グルタルアルデヒド液で固定し標本を作成した。標本は日立電子顕微鏡で観察した。

《結果》

①ヒト IRBP ペプチドで免疫した B10RⅢマウスは高率に EAU を発症した。9 日後では網膜はほぼ正常で、11 日後になると浸潤細胞をわずかに認めた。14 日になると典型的な EAU 像を呈し浸潤細胞の著明な増加が見られた。21 日には神経網膜が萎縮し、B10RⅢマウスでの EAU のピークは 14 日前後である事がわかった。

②パーコール密度勾配遠心法で単離した網膜細胞は、正常眼では 94%が PBS/40 と沈査に集積し、40/60 は非常に少なかった。電顕像では、PBS/30 に視細胞内節が、30/40 には視細胞体がみられ、沈査は RPE であった。

③EAU 眼では、正常眼では少数であった 40/60 の細胞が多数認められ 11 日後の組成は、マクロファージ 29.2%、顆粒球 36.2%、CD4⁺T リンパ球 5.2%、CD8⁺T リンパ球 1.6%であり、14 日ではマクロファージ 10.4%、顆粒球 67.4%、CD4⁺T リンパ球 10.5%、CD8⁺T リンパ球 1.2%であった。PBS/40 の細胞と RPE の数は EAU 眼で減少した。したがって、EAU11 日と 14 日に 40/60 の細胞が視細胞や RPE を障害していることが推測された。

④電顕像では、11 日に PBS/30 の視細胞内節が強く障害されていた。RPE の細胞形態は保たれていたが、RPE 顆粒はマクロファージに貪食されていた。一方、視細胞外節と視細胞体はほぼ無傷であり貪食もみられなかった。14 日では障害された視細胞内節は食色されずに残り、マクロファージが視細胞外節と RPE 顆粒を貪食していたが、視細胞体は依然無傷であった。以上の結果より、EAU による網膜破壊は IRBP 投与後 11 日に視細胞内節の非貪食的破壊が始まり、その後、RPE と視細胞外節に対するマクロファージの貪食能が活性化される事が推測された。

⑤視細胞内節に存在する opsin mRNA を正常 PBS/40 細胞で検出したが、11・14 日では、mRNA レベルは著明に減少した。したがって、視細胞内節が主な標的細胞であることが予想された。

⑥正常 PBS/40 と RPE 細胞に EAU40/60 細胞から Mac-1⁺細胞を除去した細胞群を加え *in vitro* で 12 時間共培養すると、PBS/40 細胞はほぼ正常の形態を維持した。しかし、EAU40/60 全細胞では PBS/40 細胞が非貪食的に強く破壊され、視細胞外節と RPE 顆粒はマクロファージに貪食された。近傍の顆粒球はこれらの標的細胞に全く作用せず脱顆粒や貪食像も無かった。*In vivo* でみられた視細胞内節の破壊が、*in vitro* で行った正常 PBS/40 細胞と EAU40/60 細胞との共培養の実験でも確認された。

⑦近年、ミクログリアが EAU 初期に視細胞層に浸潤し TNF- α や NO が EAU 発症に関与している事がラットで報告されている。9 日の Mac-1⁺細胞の中にはマクロファージより小型の細胞が存在し、ミクログリアが特異的に浸潤していることが推測された。

⑧正常 PBS/40 細胞と EAU40/60 細胞との共培養を行うと視細胞内節の破壊がみられたが、抗 TNF- α 抗体存在下ではやや障害が阻害され、N-モノメチルアルギニン (NMMA; iNOS 阻害剤) 存在下では視細胞内節がほぼ無傷に維持された事より、Mac-1⁺細胞による視細胞内節の非貪食的破壊に TNF- α や NO が関与している事が推測された。

《考 察》

EAUはTh1依存性疾患である事や、マクロファージが組織障害に関与している事が報告されているが、網膜局所での傷害細胞や標的細胞については同定されておらず議論が分かれている。本研究によって、B10RⅢマウスのEAU組織障害は2つの異なった傷害細胞と標的細胞の組み合わせで起っている事がわかった。すなわち、EAU初期(11日)では潜在性Mac-1⁺細胞(ミクログリア)の非貪食的活性により視細胞内節が特異的に障害され、ピーク期(14日)では視細胞外節とRPE顆粒が炎症性マクロファージにより貪食されていた。視細胞内節の非貪食的破壊は抗TNF- α 抗体やNMMA存在下で抑制されたが、他の細胞には変化がなくミクログリアのようなMac-1⁺細胞がTh1細胞からIFN- γ やTNF- α などのサイトカイン刺激を受けiNOSを発現し、その結果NOを局所的に放出し視細胞内節を特異的に障害していると考えられた。

したがって、視細胞内節の破壊が起こると視細胞外節の維持に必須のタンパク質であるIRBPが産生されなくなるために、二次的に視細胞外節やRPEの障害が起こると考えられ、障害された視細胞外節やRPEがマクロファージに貪食される事が確認された。しかし、視細胞内節が特異的にミクログリアのようなMac-1⁺細胞に非貪食的に破壊され、視細胞外節やRPEがマクロファージに特異的に貪食される分子機構は依然不明であり、今後解明されるべき課題であると考えられた。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	竹田清子
論文審査担当者		主査 教授 池田 恒彦	
		主査 教授 窪田 隆裕	
		副査 教授 芝山 雄老	
		副査 教授 吉田 龍太郎	
		副査 教授 岡田 仁克	
主論文題名			
<p>Experimental Autoimmune Uveoretinitis Initiated by Non-phagocytic Destruction of Inner Segments of Photoreceptor Cells by Mac-1⁺ Mononuclear Cells (Mac-1 陽性単核細胞による視細胞内節の非貪食的破壊により発症する実験的自己免疫性ぶどう膜炎)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>本研究において申請者は、実験的自己免疫性ぶどう膜炎(以下、EAU)発症機序解明のために正常および EAU マウスから網膜細胞を単離し、網膜局所での標的細胞と傷害細胞を同定した。EAU はヘルパーT 細胞-1(Th1 細胞)依存性疾患で、マクロファージが EAU 組織障害に重要であることがわかってきている。しかし、EAU 局所での標的細胞は <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> で明確に同定されておらず、単離した網膜細胞により解析した例は殆どなかった。</p> <p>申請者は正常マウスと EAU マウスから網膜を採取し種々の細胞を単離した。その単離細胞のうち正常マウスの細胞の一部を標的細胞、EAU マウスの細胞の一部を傷害細胞として用い <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> で電顕によって解析した。EAU 誘導は検眼鏡的および組織病理学的に確認した。パーコール密度勾配遠心法で採取された PBS/40%パーコール、40%/60%、沈査の細胞のうち、PBS/40 分画には視細胞、沈査には網膜色素上皮細胞(以下、RPE)、EAU マウスの 40/60 分画にはマクロファージや顆粒球が回収された。電顕像において、EAU11 日目では視細胞内節が強く障害され 14 日目になると視細胞外節と RPE 顆粒がマクロファージに貪食されていた。視細胞内節が破壊されていることは opsin mRNA の著明な減少によって確認された。<i>In vitro</i> における正常 PBS/40 と EAU40/60 細胞との共培養の実験でも PBS/40 の非貪食的破壊が見られ <i>in vivo</i> と同様の結果であった。しかし、EAU40/60 細胞から Mac-1⁺細胞を除去すると視細胞内節の破壊が抑制された。また、抗 TNF-α 抗体や iNOS 阻害剤存在下では視細胞内節がほぼ無傷に維持された。EAU 初期にみられる Mac-1⁺細胞はマクロファージより小型でミクログリアと推測された。</p> <p>本研究結果において、EAU 11 日目では Mac-1⁺細胞(ミクログリア)の非貪食的活性により視細胞内節が特異的に障害され視細胞外節と RPE の維持に必要な IRBP の合成が減少し二次的に外節や RPE が障害され、14 日目になり障害された視細胞外節と RPE 顆粒がマクロファージに貪食され EAU を発症した可能性が示唆された。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p>			
(主論文公表誌)			
Microbiology and immunology 52: - , 2008 in press			