— 綜 説 —

眼内炎症反応の成立と抗原提示過程

山本邦比古

日本医科大学大学院医学研究科感覚器視覚機能医学

日本医科大学千葉北総病院眼科

Intraocular Inflammation and Antigen Presentation

Kunihiko Yamaki

Department of Vision and Ophthalmology, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School

Department of Ophthalmology, Nippon Medical School Chiba Hokusoh Hospital

Abstract

Intraocular space is thought to be an immune privileged site. One of the most well known facts is that the corneal plantation is successful even if the donor's MHC molecules doesn't match with the recipient's. However, still this doesn't mean that the immune reaction is completely inhibited in the intraocular tissue, since the intraocular herpes infection develops fulminate immune inflammation known as acute retinal necrosis.

For explaining these complicated intraocular immune responses, in which some immune reactions are inhibited while others develop immuneinflammation, it is required to study the antigen presenting process in the intraocular tissue. And since there isn't much reports about whether the antigen presentation process in the intraocular tissue takes place or not in this paper we show preliminary results indicating the existence of potential cells able to present antigens. We also review recent literature reporting the immune reactions in intraocular tissue and central nervous systems.

(日本医科大学医学会雑誌 2008; 4: 8-14)

Key words: antigen presentation, intraocular tissue, antigen uptake, antigen presenting cells

緒 言

眼内は免疫特権部位 (immune privilege site) とされ免疫反応が生じにくい場所とされている。角膜移植では主要組織適合抗原を合致させなくても正着する率が高く、ほかの臓器とは異なる免疫反応を示す。しかしながら時には健康正常人に突然網膜壊死を来すような激的な免疫反応が生じることもある。以前は眼内や

中枢神経系などの免疫特権部位には抗原提示細胞が存在しないとされていたが、最近の研究で、これらの免疫反応の違いを形成している最も大きな要因は自然免疫過程から獲得免疫過程が発動される時点にあることが明らかになりつつある^{1,2}。しかし眼内での抗原提示過程については抗原提示を担う細胞、抗原提示時の眼内微少環境など解明されずに残されている部分が多い。

この綜説では immune privileged site (免疫特権部

Correspondence to Kunihiko Yamaki, Department of Ophthalmology, Nippon Medical School Chiba Hokusoh Hospital, 1715 Kamagari Inba-mura, Inba-gun, Chiba 270-1694, Japan

E-mail: kyamaki@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jmanms/>)

表1 解析に使用した細胞マーカーと発現細胞

マーカー	細胞	機能
OX6	MHC classII	抗原と複合体を形成
CD4	T 細胞	TCR と複合体形成
CD8	T 細胞	TCR と複合体形成
CD11b	Macrophages (DC, Microglia)	iC3b receptor
CD14	Macrophages, Monocytes	LPS receptor
CD80	抗原提示細胞 単球	活性化マーカー
CD86	抗原提示細胞 単球	活性化マーカー
TLR-4	PTRP	リポポリサッカロイドを認識
CD40	T 細胞 抗原提示細胞	補助分子・活性化マーカー
CD200	抗原提示細胞 (T cells, follicular dendritic cells)	
CD1	抗原提示細胞 単球	
ED1	Macrophages, Veiled cells	
OX62	抗原提示細胞 Veiled cells (dendritic cells & γ/δ T cells)	
Ki-M9R	Macrophages, follicular dendritic cells	

位)における自然免疫から獲得免疫が発動され免疫反応が成立するまでの過程につき樹状細胞を中心としてレビューし、眼内免疫反応研究の現状と課題について、抗原提示過程を中心として概観する。

免疫特権部位（眼内）での自然免疫系の存在

中枢神経系組織での自然免疫系

最初から眼内ではなく中枢神経組織の話となってしまうが、immune privileged siteで免疫反応全体が最もよく研究されているのがこの組織である。中枢神経での自然免疫系反応についてはほかの組織同様、近年ようやく解明の緒についた。一般的に最も効率よくToll like receptor (TLR)からのシグナルを伝えることのできる細胞はdendritic cell (DC)である。中枢神経系組織ではこのほかにTLRシグナルを伝えることのできる細胞にはmicrogliaや星状細胞などのグリア細胞、神経間細胞があるが、TLRsからのシグナルを最も効率よく伝えることができるのは中枢神経でもDC系細胞である。中枢神経系に存在するDC系細胞の起源はミエロイド系細胞であろうと推測されているが中枢神経組織に移行してくるルート、移行に伴う表面抗原の変化、機能変化などの詳細については今後解明されるべき部分が多数ある。これらには表面抗原が異なる細胞集団がある²⁻⁴。

CD11c positive cells：この細胞集団は炎症時組織ではDCの多数を占め、ミエロイド起源の細胞が中枢神経組織に移行してきたものと推測されている。機能については相反する報告がなされていたがこれは同一細胞の時期と微少環境の違いによる機能の差異と近年報

告されている³。

CD11b positive cell：この細胞集団には多数の異なる細胞が含まれる。代表的な細胞にはmicroglia, macrophage, などがある。これらの細胞の移行ルートについては不明であるが、おおむね炎症性免疫反応を収束させる方向に働く³。

眼内組織での自然免疫系

眼内にも自然免疫系を発動する可能性のある細胞が多数存在することが判明してきた。しかしながらこれらの細胞群が果たしている役割の詳細については依然不明のままである⁵⁻¹⁰。

Toll like receptor (TLR)分子群の発現とマクロファージ、dendritic cell markerを指標としてこれらの細胞をみると、前眼部では結膜・角膜上皮、角膜実質、角膜内皮細胞などに発現がみられる。眼内組織には以下のような発現がみられるとされている。

私たちはこれまでの報告に加え、眼内で抗原提示過程が機能している可能性を検索するため、peptide抗原を前房内あるいは脈絡膜、網膜色素上皮下に直接注入し、抗原の取り込みと抗原提示細胞に発現されている細胞マーカー、抗原提示細胞と密接に関連するとされている細胞表面マーカーにて眼内組織を検討した。眼内で抗原提示を行うためには抗原を取り込むことが必要であり、この機能を最初のメルクマールとした。抗原の性状およびにルートは適切なモデルとはできないが、眼内感染あるいは外傷時の状態を想定する場合には近似した状態と考えられる。

今回私たちはpeptide抗原としてtyrosinase related protein 1 (TRP1)由来で、実験的自己免疫性Vogt-小柳-原田病 (VKH)をラットに惹起させる

図1 LPSとCSFE標識 peptide 前房注入後3時間後の虹彩, 毛様体

- A** 虹彩: MHC class II, TLR-4, 標識 peptide, 核染色を示す. この染色では peptide 取り込み陽性, TLR-4 陽性, MHC class II 陰性群と peptide 取り込み陰性, TLR-4 陽性, MHC class II 陰性群がみられた.
- B** 虹彩: MHC class II, CD-1, 標識 peptide, 核染色を示す. この染色では peptide 取り込み陽性, CD-1 陽性, MHC class II 陽性群がみられた.
- C** 毛様体: MHC class II, TLR-4, 標識 peptide, 核染色を示す. この染色では peptide 取り込み陽性, TLR-4 陽性, MHC class II 陰性群と peptide 取り込み陰性, TLR-4 陽性, MHC class II 陰性群がみられた.

ことのできる TRP1-18 (30 アミノ酸長) CSFE 標識を使用した¹¹⁻¹⁵. 抗原を直接眼内に注入する方法で, 前房あるいは脈絡膜, 網膜色素上皮下に注入した. 注入時リポポリサッカロイド (LPS) を同時に注入し, 眼内感染状態に類似したものと CSFE 標識 peptide 単独注入群とで比較した. 検索に用いた細胞表面マーカーは表 1 に示す. 以下にこれまでの報告と私たちの preliminary な結果を示す.

虹彩・毛様体

眼内組織である虹彩, 毛様体無色素上皮, 毛様体内皮細胞にも TLR-4 の発現がみられるとされている. ヒト眼球ではこれらの細胞の大部分は CD68 陰性で, マクロファージではなく, 樹状細胞であるとしている⁹. ラット眼球にはマクロファージマーカーによる染色で樹状形態を示す細胞が虹彩では虹彩根部から瞳孔縁にまで分布し, 血管周囲に多く分布がみられるとされている. 毛様体でも結合組織中に分布している

としている. マクロファージの分布はほかの組織と比較しても多いとされている¹⁰.

しかし私たちの方法ではラット虹彩, 毛様体では無処置の状態では TLR 分子群の発現は確認が困難であった. また抗原取り込み細胞も少なく, ほとんど検出されなかった (データ未示す).

LPS と peptide 抗原を前房に注入 3 時間後の虹彩, 毛様体では抗原取り込み細胞が多数みられた. これらの細胞は 4 群に分けられ, 1. 抗原取り込みあり, TLR4 陽性, Class II 陰性細胞, 2. 抗原取り込みあり, TLR4 陰性, Class II 陽性細胞, 3. 抗原取り込みあり, TLR4 陰性, Class II 陰性細胞, 4. 抗原取り込みなし, TLR4 陽性, Class II 陰性細胞がみられた. またこれらの細胞の大部分は CD1 陽性細胞であった (図 1).

LPS 刺激後, 抗原取り込み可能細胞あるいは TLR4 発現細胞に 4 群の細胞がみられたことは同じ細胞の刺激状態の異なるステージをみているのか, 異なる細胞集団をみているのかは今回の preliminary な結果から

図2 LPS と CSFE 標識 peptide 脈絡膜あるいは網膜下注入後 3 時間後の posterior segment

- A** 脈絡膜, 網膜: OX62, MHC Class II, 標識 peptide, 核染色を示す. OX62 陽性の抗原提示細胞と推測される細胞が脈絡膜, 網膜色素上皮層, 網膜層にみられる. 網膜色素上皮層に存在する細胞は抗原提示細胞が脈絡膜側から色素上皮層を越え, 網膜層に浸潤することを推測させる. これらの細胞は Class II 陰性である.
- B** 脈絡膜, 網膜: TLR4, MHC Class II, 標識 peptide, 核染色を示す. これらの細胞は TLR4 陽性, Class II 陰性である.
- C** 脈絡膜, 網膜: CD14, MHC Class II, 標識 peptide, 核染色を示す. これらの細胞は CD14 陽性, Class II 陰性である. TLR4, CD14 陽性であり, LPS の receptor として機能していると推測される.
- D** 脈絡膜, 網膜: CD14, MHC Class II, 標識 peptide, 核染色を示す (弱拡大). これらの細胞は CD14 陽性, Class I 陰性である.
- E** 脈絡膜, 網膜: CD11-b, MHC Class II, 標識 peptide, 核染色を示す. 脈絡膜, 網膜色素上皮細胞層に存在する peptide 取り込み細胞は CD11-b を発現していないが, 神経網膜に存在する peptide 取り込み細胞は CD11-b を発現している.

は不明であった. しかし虹彩, 毛様体にも抗原を取り込み, 提示するポテンシャルを持った細胞が存在することは判明した. またこれらの細胞は正常状態では検出が困難であることから, 数量的に少ないか, 機能的

に定常状態にあると考えられた.

脈絡膜

RT-PCR による TLR4, MD-2, CD14 の mRNA 検

図3 LPS と CSFE 標識 peptide 脈絡膜あるいは網膜下注入後 3 時間後の posterior segment

- A** 網膜：CD1, MHC Class II, 標識 peptide, 核染色を示す。網膜層に浸潤する球形形状を示す細胞は CD1 陽性, Class II 陰性を示すものが多い。
- B** 網膜：ED1, MHC Class II, 標識 peptide, 核染色を示す。網膜層に ED1 陽性, Class II 陰性を示す細胞が存在する。細胞は視細胞間を色素上皮側から外顆粒層まで伸展する形態を示している。
- C** 網膜：Ki-M9R, MHC Class II, 標識 peptide, 核染色を示す。網膜層に Ki-M9R 陽性, Class II 陰性を示す細胞が存在する。細胞は視細胞間を色素上皮側から外顆粒層まで伸展する形態あるいは球状を示している。
- D** 網膜：CD11-b, MHC Class II, 標識 peptide, 核染色を示す。視細胞間を色素上皮側から外顆粒層まで伸展する形態の細胞は CD11-b 陽性であるが、球状形態の細胞は CD11-b 陰性である。

索では正常脈絡膜に mRNA の発現がみられるとされている⁹。免疫染色でも TLR4, MD-2, CD14 の発現がみられ、これらの分子群は同一部位に発現されており、TLR4 receptor として機能しているものと推測されている。またこれらの細胞は樹状細胞の形態を示していること、HLA-DR 陽性であることから脈絡膜 resident dendritic cell と推測されている⁹。これらの細胞は毛様体、虹彩に比較して出現頻度が低く、上皮下あるいは血管周囲に局在していたとしている。

私たちの preliminary な結果でも無処置ラット脈絡膜に少数の TLR4 陽性細胞がみられたが、抗原取り込みは検出されず、MHC class II は弱陽性かほとんど発現されていなかった（データ示さず）。

LPS と peptide 抗原を脈絡膜あるいは網膜色素上皮に直接注入 3 時間後では脈絡膜に抗原取り込みあり、TLR4 陽性、CD14 陽性、OX62 陽性（抗原提示

細胞マーカー）、CD1 陽性、Class II 弱陽性～陰性細胞がみられる。これらの細胞は CD11b 陰性で、炎症急性期に CD11b 陽性細胞が中枢神経系に浸潤し、重要な役割を果たすとの報告とは異なっていた（図 2）。

網膜

網膜では網膜色素上皮細胞に発現がみられるとされている^{6,7}。

私たちの preliminary study では、peptide のみ注入群では網膜色素上皮には弱い抗原の取り込みしかなく、Class II の発現はみられなかった（データ示さず）。LPS と peptide 抗原の注入では peptide 抗原の取り込み陽性、Class II 発現弱陽性となった。しかし TLR4 の発現はみられなかった。これらの結果は脈絡膜でも抗原提示が行われていることを示唆しているが、刺激性あるいは免疫の恒常性を保たせる方向に抗

原提示が行われているかは不明であった (図 3)。

peptide 抗原のみ注入群では神経網膜内には抗原取り込み細胞, Class II 陽性, TLR4 陽性細胞はいずれもみられなかった。

peptide 抗原と LPS 脈絡膜あるいは網膜色素上皮下注入群では神経網膜内, 色素上皮間に peptide 取り込み陽性細胞群の浸潤がみられた。これらの細胞は 1. peptide 取り込み陽性, CD1 陽性, CD11b 陰性, Class II 陰性あるいは弱陽性細胞群, 2. peptide 取り込み陽性, CD11b 陽性, ED1 陽性細胞群, 3. peptide 取り込み陽性, CD11b 陽性, Ki-M9R 陽性細胞群に分類された (図 3)。ED1 陽性細胞あるいは Ki-M9R 陽性細胞群は形態がミューラ細胞あるいはマイクログリア様であり, これらの可能性が高いと推測された。またこれらの細胞は Class II を強くは発現しておらず, 炎症の急性期にも免疫反応を積極的に抑制性方向に抗原提示をしている可能性も考えられた。すなわち調節性抗原提示細胞, 調節性 T 細胞の誘導を積極的に行い, 神経網膜を炎症から保護する機能の可能性が示唆された。またこれらの細胞は CD11b 陽性で, 中枢神経系組織に CD11b 陽性細胞が浸潤してくるとの報告と符号した。しかしこのモデルでは炎症急性期であるにも関わらず, 積極的に抑制性免疫反応を誘導していると推測され, 上記報告とは異なった。

これらの研究は眼内での基礎的な免疫研究ではあるが, 私たちの目指しているのは眼内に強く症状が出現し, 時としては視力予後不良となる全身の自己免疫疾患である Vogt-小柳-原田病 (VKH) の解明と治療への応用である。

VKH は日本人を含めモンゴロイドに多発するメラノサイトに対する自己免疫疾患である。日本での患者は 15/1,000,000 と諸外国に比較して極めて高く, 日本での疾患成立機序, 特異的な免疫機序に基づく治療法解明が待たれる疾患である。日本人に高率に発症するのはこの疾患が HLA DRB1*0405 と極めて高い相関を持っているためで, 日本人 VKH の 90% 以上が HLA DBR1*0405 陽性である (日本人全体では約 20~30% が HLA DRB1*0405 陽性)。このことは VKH を惹起させている自己抗原が HLA DRB1*0405 と複合体を形成して抗原提示されていることを示唆している。ヒトの実際の自己免疫疾患でありながら, 動物モデルのような抗原・MHC 複合体の 1 対 1 対応があり, 抗原が比較的単一である可能性が高い。このことは抗原が特定されれば, 抗原提示過程から開始される獲得免疫反応 (自己免疫反応) を解明することができる可能性の高いことを示している。

私たちは VKH 特異的抗原解明のために VKH 患者リンパ球の反応性, 実験動物に自己免疫性炎症を惹起させることができるのと 2 点をメルクマールとして抗原の検索を行ってきた。VKH 患者リンパ球のメラノサイト特異的抗原に対する反応性については幾つかの報告がなされ, いずれも正常健常人と比較して, 該当する抗原に対する反応性が上昇していたとしている。また VKH 病巣局所である前房水あるいは脳脊髄液から採取したリンパ球でも tyrosinase family protein に対する反応性が上昇していた。

これに加え, tyrosinase family protein を各種実験動物に免疫することにより実験的に VKH に類似した自己免疫疾患を惹起させることができた。

以上から私たちは tyrosinase family protein が VKH 特異的抗原の一つであると推測している。

VKH の臨床症状は最初に前駆期があり, 全身倦怠感, 軽度感冒様症状が出現する。その後 1~2 週間後に眼病期となり, 眼症状や髄膜刺激症状, 内耳障害などの免疫特権部位とされる臓器に症状が出現する。眼病期が 1~2 カ月で終了した後に皮膚症状などそのほかの全身症状が出現する。最初の前駆症状が感染などの外部からの抗原侵入とそれに対する自然免疫による全身症状, その後 1~2 週後に生じる眼病期が獲得免疫による症状であると解釈すると, VKH の臨床症状を良く説明できる。

この仮定に立つと眼内あるいは中枢神経系などの免疫特権部位とされる臓器で最初の抗原提示が行われ, 自己免疫が成立すると推定される。このことから次の段階としてこれらの抗原の抗原提示過程と自己免疫反応が開始される機序の解明へと進む必要があると考え, 自己抗原である tyrosinase family protein の眼内での抗原提示過程を検討した。いまだ preliminary な結果であるが眼内でも抗原提示が行われていると思われる, 今後自己免疫疾患のみならず, 眼内での免疫反応機序の解明に役立つものと期待している。

文 献

1. Hart DNJ, Fabre JW: Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med* 1981; 153: 347-361.
2. Suter T, Biollaz G, Gatto D, Bernasconi L, Herren T, Reith W, Fontana A: The brain as an immune privileged site: dendritic cells of the central nervous system inhibit T cell activation. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2998-3006.
3. Fischer HG, Reichmann G: Brain Dendritic Cells and Macrophages/Microglia in Central Nervous System Inflammation. *The Journal of Immunology* 2001; 166:

- 2717-2726.
4. Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, Noelle RJ, Becher B: Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nature Med* 2005; 10: 328-335.
 5. Brito BE, Zamora DO, Bonnahr RA, Pan Y, Planck SR, Rosenbaum JT: Toll-like receptor 4 and CD14 expression in human ciliary body and TLR-4 in human iris endothelial cells. *Exp Eye Res* 2004; 79: 203-208.
 6. 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. *Journal of Neuroimmunology* 2004; 153: 7-15.
 7. Ebihara N, Chen L, Tokura T, Ushio H, Iwatsu M, Murakami A: Distinct Functions between Toll-Like Receptors 3 and 9 in Retinal Pigment Epithelial Cells. *Ophthalmic Res* 2007; 39: 155-163.
 8. Chang JH, McCluskey PJ, Wakefield D: Toll-like receptors in ocular immunity and the immunopathogenesis of inflammatory eye disease. *Br J Ophthalmol* 2006; 90: 103-108.
 9. Chang JH, McCluskey PJ, Wakefield D: Toll-like receptor 4 and its associated lipopolysaccharide receptor complex by resident antigen-presenting cells in the human uvea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 1871-1878.
 10. McMenamin PG, Crewe J, Morrison S, Holt PG: Immunomorphologic studies of macrophages and MHC class II-positive dendritic cells in the iris and ciliary body of rat, mouse, and human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 3234-3250.
 11. Yamaki K, Kondo I, Nakamura H, Miyano M, Konno S, Sakuragi S: Ocular and extraocular inflammation induce by immunization of tyrosinase related protein 1 and 2 in Lewis rats. *Exp Eye Res* 2000; 71: 361-369.
 12. Yamaki K, Takiyama N, Itho N, Mizuki N, Maehara S, Wakaiki S, Hayakawa K, Kotani T: Experimentally induced Vogt-Koyanagi-Harada disease in two Akita dogs. *Exp Eye Res* 2005; 80: 273-280.
 13. Yamaki K, Gocho K, Hayakawa K, Kondo I: Tyrosinase family proteins are antigens specific to Vogt-Koyanagi-Harada disease. *J Immunol* 2000; 165: 7323-7329.
 14. Gocho K, Kondo I, Yamaki K: Identification of autoreactive T cells in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 2004-2009.
 15. 山口雅彦, 後町清子, 山本邦比古: Vogt—小柳—原田(原田)病患者病巣局所から樹立したT細胞株の解析. *秋田医学* 2003; 30: 1-11.

(受付: 2007 年 9 月 5 日)

(受理: 2007 年 10 月 17 日)