

自然炎症が関与する眼疾患

園田, 康平
九州大学大学院医学研究院眼科学分野

<https://doi.org/10.15017/1806768>

出版情報：福岡醫學雑誌. 107 (12), pp.205-212, 2016-12-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：

総 説

自然炎症が関与する眼疾患

九州大学大学院医学研究院眼科学分野

園 田 康 平

はじめに

眼は免疫学的に特別な機能的閉鎖臓器で、「免疫特権部位 (immune privileged site)」といわれる。免疫特権は、そもそも生体が備えた自己防御機構である¹⁾。通常の免疫炎症反応が起こってはかえって組織障害・機能障害が強くなるような臓器で、その機能を守るために存在する恒常性維持機構と解釈できる。しかし一旦限度を超えた炎症が起こると、免疫特権機構は失われ、まるでボールが坂道を転がり落ちるように眼炎症は増悪する。過剰な炎症は視機能障害に直結する。一度ダメージを受けた眼組織は、その機能回復が困難である。失明回避のためには、眼の特殊性を念頭に置いた対応が必要である。

免疫反応は大きく T リンパ球を中心とした「獲得免疫」と、より早期に反応する「自然免疫」に分類される。前者は高等生物でのみ見られるが、後者はあらゆる生物に共通する根幹的免疫系であり、感染防御の第一線で作用し、次に引き続く生体反応の方向性を決めるという役割を担う。自然免疫細胞群は様々な眼疾患の重要な起炎症細胞であるにもかかわらず、眼炎症との関連はこれまで十分に解析されて来なかった。近年、いわゆる「自然免疫」を担うマクロファージ・NKT 細胞・ $\gamma\delta$ 型 T 細胞などが眼の恒常性・透明性維持に不可欠な存在であることが認知されつつある²⁾³⁾。

自然免疫細胞は、Toll 様受容体 (Toll-like receptor ; TLR) などのレセプターを介して、細菌やウイルスの構成成分を分子パターンとして認識する。この受容体の研究が進む過程で、通常は細胞の中に留まっているある種の成分が、このレセプターを介して炎症を誘発することが注目されている。このような炎症は、感染性の「炎症」と区別して、非感染性の「自然炎症」と呼ばれ、細胞内のリガンドは傷害関連分子パターン (damage-associated molecular patterns ; DAMPs) と総称される。

自然炎症は、特殊免疫機構を持つ眼でも、急性炎症・慢性炎症に関わらず病態形成に重要である。自然免疫細胞を介する「自然炎症」は、眼感染症、内眼術後炎症、眼外傷、糖尿病網膜症、眼腫瘍等の病態に密接に関連している。我々は広義の眼炎症疾患という観点から、加齢黄斑変性などの脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization ; CNV) を原因とする「脈絡膜新生血管病」をテーマとして研究を行ってきた。

1. 網膜硝子体疾患における眼内液の解析

硝子体腔は前房と比較して眼内液の房水によるターンオーバーが遅い。また硝子体が存在するため、起炎症分子をトラップし、眼炎症慢性化病態に関与する。網膜硝子体手術の際に得られる硝子体液の解析を行うことで、網膜硝子体疾患において、DAMPs に反応して産生される液性因子の同定が可能ではないかと考えた。

対象は 2005 年 9 月～2007 年 8 月の期間に九州大学病院で硝子体手術を施行した 339 例である (疾患名 : 糖尿病黄斑浮腫, 増殖糖尿病網膜症, 網膜静脈閉塞症, 裂孔原性網膜剥離)。コントロール群は他に合

併症のない黄斑円孔，黄斑上膜 58 例とした．手術開始時に硝子体液を採取し，採取した硝子体液 10 μ l を Phosphate buffered saline (PBS) で 10 倍希釈した後，ルミネクス[®]を用いて液性因子の濃度を多症例同時測定した．スクリーニング項目はサイトカイン：11 因子 (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IFN- γ , TNF- α)，ケモカイン：7 因子 (IL-8, eotaxin, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES)，増殖因子：5 因子 (EGF, VEGF, bFGF, G-CSF, GM-CSF)，計 23 因子を同時解析した．その結果，TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 といったサイトカインはほとんど検出されない一方で，IL-8, MCP-1 といった好中球，マクロファージに作用するケモカインの上昇を認め⁴⁾．実際の内眼炎で自然免疫系細胞が重要な起炎症細胞であることが示唆された．

2. 眼炎症疾患としての脈絡膜新生血管病

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

近年，脈絡膜新生血管病は老化を基盤とした慢性炎症によって発症すると考えられるようになってきた．我々は特に自然免疫細胞群と CNV 形成過程に興味を持ち，以下の実験を行った．

自然免疫系が最もその真価を発揮するのが感染症である．感染症と CNV 関連疾患の検索を行った結果，興味ある事実を発見した．肺炎クラミジア (*C. pneumoniae*) は呼吸器感染症の代表的・一般的起炎症菌で成人の半数以上は抗体を保有しているごく一般的な微生物である．偏性細胞内寄生生物で，生きた細胞内でのみ増殖する．AMD 患者では肺炎クラミジア抗体レベルの上昇が認められ⁵⁾，また滲出型 AMD 9 例のうち 4 例において組織学的に肺炎クラミジアが認められたという⁶⁾．

CNV 形成に重要と考えられるのが網膜色素上皮細胞 (retinal pigment epithelial cell: RPE) である．RPE は一旦活性化されると様々なケモカイン・サイトカインを産生し，集簇した好中球やマクロファージを活性化し，必要以上の組織破壊をもたらす原因となる．RPE は貪食能を有し，ほとんど全ての TLR を表出し感染微生物を認識しうる点では，自然免疫細胞と通じる点がある．RPE は TLR を介して微生物を認識し得る (RPE は「自然免疫細胞的」に働き得る) のである．

我々はクラミジア死菌が直接 RPE を活性化する可能性を念頭に，感染を契機とした CNV 形成のメカニズムの解析を行った．まずレーザー誘導 CNV モデルで，レーザー照射直後に硝子体腔内に肺炎クラミジア抗原を注入したところ，CNV が悪化することを見出した⁷⁾．次に試験管内で肺炎クラミジア抗原による RPE 刺激を行った．C57BL/6J マウス摘出眼球より RPE を分離 12 日間培養後，培養液中に肺炎クラミジア抗原を加えて刺激した．一定時間後，細胞溶解液を Real-time PCR で各種サイトカイン産生能を検討した．肺炎クラミジア抗原濃度依存性に IL-6, VEGF 産生が上昇したが，対照の LPS 刺激で上昇する TNF- α は肺炎クラミジア抗原刺激では上昇しなかった⁷⁾．また Myeloid differentiation primary response protein (Myd) 88 ノックアウトマウス由来の RPE を使用すると，肺炎クラミジア刺激で IL-6, VEGF 産生が見られないことから，肺炎クラミジアの RPE に対する反応は TLR の重要なシグナル分子である Myd88 を介して行われていることが判明した⁷⁾．前提として加齢によるブルッフ膜の脆弱化 (脈絡膜-網膜境界の加齢変化) がある個体では，脈絡膜血管に潜伏感染している肺炎クラミジアが，TLR を介して RPE に認識され，RPE からの液性因子産生が起り CNV 形成を促進すると考えた (図 1)．

3. 局所浸潤自然リンパ球と脈絡膜新生血管病

T リンパ球の中でも，通常の $\alpha\beta$ 型と異なるレセプターを持つ「 $\gamma\delta$ 型 T リンパ球」や，NK 細胞マーカーと T 細胞レセプターを同時に発現する「natural killer T (NKT) 細胞」などは「自然リンパ球」とよばれその機能が注目されてきた．

$\gamma\delta$ 型 T リンパ球は感染の初期防御や癌免疫などで重要な働きをする細胞である．皮膚や腸管に分布す

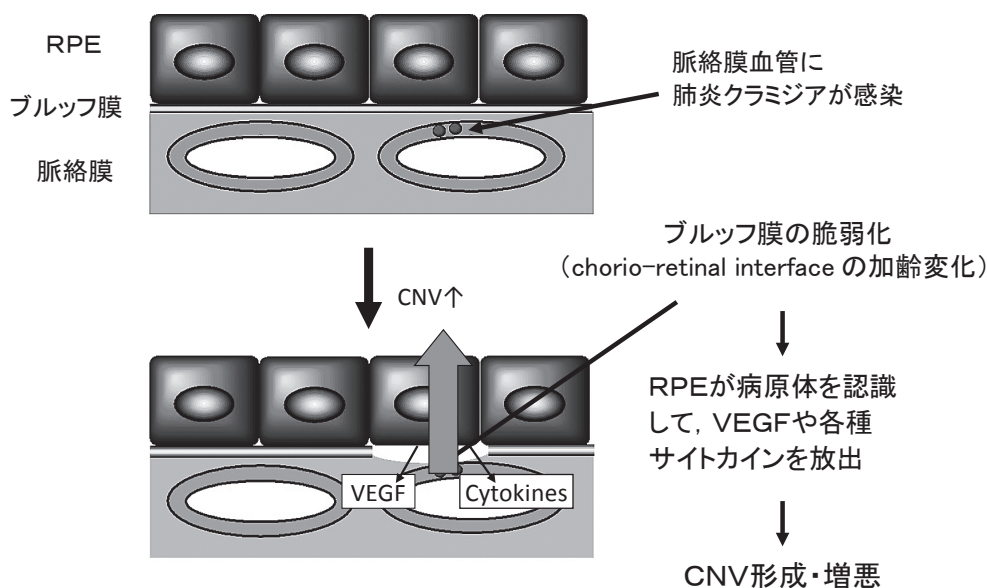


図1 肺炎クラミジアによるCNV形成仮説. 前提として加齢によるブルッフ膜の脆弱化(脈絡膜—網膜境界の加齢変化)がある個体では, 脈絡膜血管に潜伏感染している肺炎クラミジアが, TLRを介してRPEに認識され, RPEからの液性因子産生が起こりCNV形成を促進する.

るが, リステリア菌が局所感染した臓器で感染初期に臓器特異的に増加することが観察されている⁸⁾. 我々は実験的レーザー誘導CNV形成における $\gamma\delta$ 型Tリンパ球の役割について検討した. レーザー照射後4日目に眼局所で $\gamma\delta$ 型Tリンパ球が集簇した. その数は眼という特性上から決して多いわけでは無いが大量のIL-17を産生し, CNV形成に重要な役割を果たした⁹⁾. また局所で産生されるIL-1 β とHMGB-1はこの反応を増幅させて, 副次的にCNV形成に関与していた⁹⁾. 眼球内で起こる特殊な炎症反応について $\gamma\delta$ 型Tリンパ球が関与する事を示す最初の報告である.

CD1拘束性NKT細胞は自然免疫系を構成する多機能細胞で, CD1分子上に提示された生体内糖脂質に反応して, 数時間以内に炎症を様々な形で修飾する. 我々は実験的レーザー誘導CNV形成におけるNKT細胞の役割について検討した. NKT細胞に表出されているT細胞レセプターはVa14Ja281という特異的な構造を持つため, これをNKT細胞マーカーとして用いた. レーザー照射後眼内Va14mRNAの発現をreal-time PCRで測定した結果, 照射後24時間で増加が見られた. これは眼球内にNKT細胞が浸潤していることを示す. 次に2つの異なるNKT細胞ノックアウトマウスを用いてCNV形成を解析した. CD1ノックアウトマウスはNKT細胞への抗原提示が無いため, NKT細胞が分化・増殖できず, Ja281ノックアウトマウスはそもそもNKT細胞を持たない. いずれのNKT細胞ノックアウトマウスでもCNV形成が抑制され, 眼球内でのVEGF産生はタンパクレベルでも核酸レベルでも低下していた¹⁰⁾.

さらに*in vitro*での解析のため, 我々は眼球内で潤沢にCD1分子を表出しているRPEとNKT細胞の共培養システムを構築した. RPEはマウスから分離培養後, 長期継代せずに脾臓由来NKT細胞と共培養すると, 上清中にVEGFが測定される. しかし抗CD1抗体を上清中に加え, RPEとNKT細胞の結合阻害を行うとVEGF産生は抑制された. 以上の結果から眼球内に浸潤したNKT細胞はCNVを形成するためのVEGFの供給源となる可能性が示された¹⁰⁾.

次に我々はNKT細胞をリガンドで生体内強制的刺激することを試みた. α -ガラクトシルセラミド(alpha-galactosylceramide, α GalCer)は, 海綿の成分から見つかった糖脂質でNKT細胞を生体内で活性化し各種サイトカイン産生を誘導することが知られていた. そこでレーザー照射直後に α -ガラクトシルセラミド硝子体腔内投与を行った. 当初 α -ガラクトシルセラミド硝子体腔内投与により, 生体内でのVEGF産生が増加しCNVが増悪するであろう, と考えていたが, 結果は反対に α -ガラクトシルセラミド

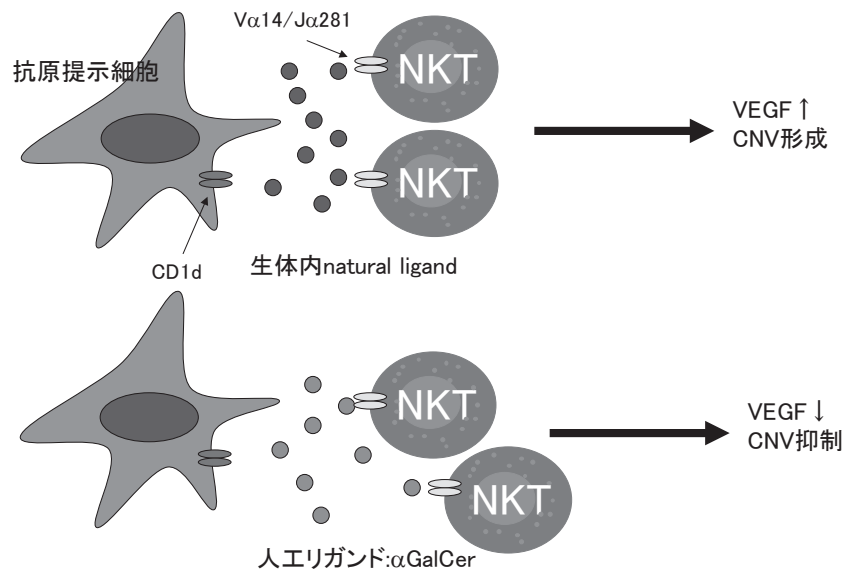


図2 実験的 CNV モデルでの NKT 細胞の役割

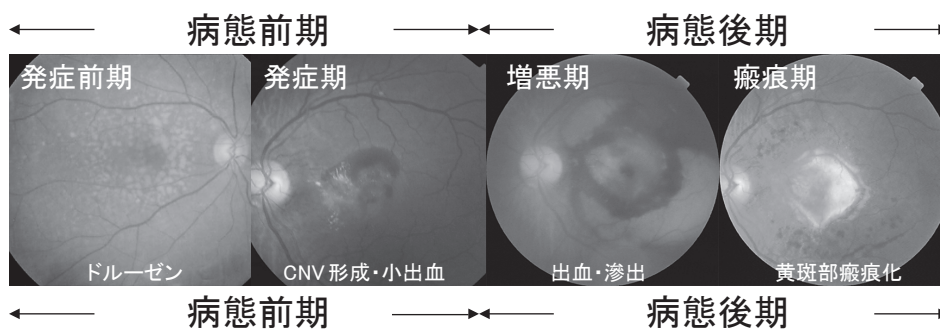


図3 加齢黄斑変性の進行病期

投与により CNV 形成・VEGF 産生が抑制されるというものであった。上述 *in vitro* の実験系でも VEGF は α -ガラクトシルセラミド添加で抑制された¹⁰⁾。

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

4. 脈絡膜新生血管病に伴う網脈絡膜癒痕形成と自然免疫

AMD に代表される実際の脈絡膜新生血管病の臨床病態は、図3のように進行する。従来の CNV に関する研究はその形成機序に関するものが多いが、実際の臨床病態では CNV からの出血後に生じる黄斑部の癒痕治癒過程に関わる炎症反応も重要である。近年 CNV 形成過程を抑制するものとして硝子体腔へのベバシズマブ等の抗 VEGF 抗体硝子体腔内投与、またすでに形成された CNV に対してはベルテポルフィンを用いた光線力学的療法等の新しい治療が始まり、一定の治療効果が認められている。しかし新治療の著効時期は発症前期・発症期にほぼ限定される。多くの患者は黄斑部出血後視力が低下し初めて病気に気がつくのであるが、すでに視力回復という観点からは回復が難しい時期にさしかかっている。組織癒痕化

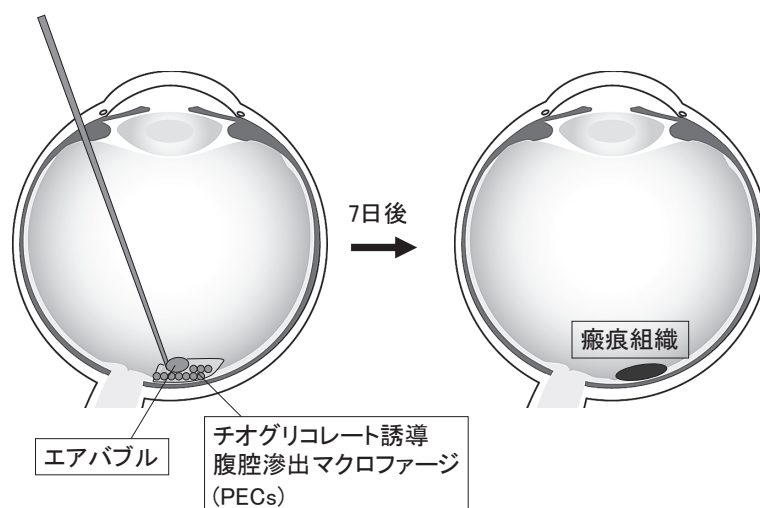


図4 網膜下瘢痕モデルの作成法

が始まると、最新治療をもってしても「CNVは治癒しても視力は回復しない」ということになる。

脈絡膜新生血管病の治療ターゲットとして、CNVからの出血・滲出後に生じる黄斑部の機能障害（瘢痕治癒）過程も重要と考えられる。仮に網膜下出血を起こしても、それに対して起こる必要以上の免疫炎症反応を制御できれば、黄斑部組織破壊を最小限に止めることができよう。我々はCNVの形成病態に加えて、CNVからの血液成分の出血・滲出により二次的に形成される網脈絡膜瘢痕病態に興味を持ち、自然免疫細胞との関連を中心に解析することにした。

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

網脈絡膜瘢痕モデルの作成・評価は下記の手順で行った（図4）。

- 1) マウス眼底後極部に、1カ所レーザー強凝固を行う。この際ブルッフ膜を破壊する程度の強凝固とする。これにより脈絡膜からの炎症細胞浸潤を可能にすると同時に、網膜下にエアバブルを生じさせる。
- 2) 毛様体扁平部から33ゲージ針を刺入し、網膜下にチオグリコレート誘導腹腔マクロファージを注入する。
- 3) レーザーで生じたエアバブルが網膜刺入創をシールするため、直後に注入細胞が硝子体内に播種するのを防ぐ。また網膜光凝固も行っていることになるため、数時間で網膜刺入創は閉鎖する。
- 4) 7日後に脈絡膜フラットマウントを作成する。網脈絡膜瘢痕組織は通常脈絡膜側に付着する。
- 5) グリオシスマーカーである抗Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)抗体で免疫染色する。脈絡膜に付着した瘢痕組織が可視化されるので、その部分の面積測定をImageJ[®]で行う。

瘢痕組織とそれに混在するグリオシスは、本来は網膜・脈絡膜構成細胞の変化である。しかし網膜と脈絡膜を分離する際に脈絡膜側に付着し、GFAP染色により容易に可視化できた。脈絡膜フラットマウントは網膜と比較して伸張性が低いため、安定した面積測定が可能であった¹¹⁾。以上の理由で、脈絡膜フラットマウントを用いた上記の方法が本モデルの定量的評価法として現時点で最適と考えられた。

5. 網脈絡膜瘢痕治癒における自然免疫細胞の役割

本モデルではマクロファージ注入後7日目に、検眼鏡的にヒトに類似した局所瘢痕を再現できた。また組織学的にも瘢痕部に一致して構成細胞が紡錘形になり、この部分は筋線維芽細胞のマーカーである α -平滑筋アクチン (α -smooth muscle actin, α -SMA) で染色された。我々は活性化型マクロファージを中心

に局所に誘導される免疫・炎症機序が網脈絡膜癬痕化に関与するか確認するために、ステロイド薬全身投与の影響を検討した。網膜下マクロファージ注入後、1日おきにデキサメサゾン1 μ g/gの腹腔内投与を行ったところ、網脈絡膜癬痕組織は著明に減少した。網脈絡膜癬痕が基本的に炎症反応を介して形成されていることが再確認された。

活性化型マクロファージには還元型と酸化型が存在することが知られている。還元型と酸化型ではそのサイトカイン産生が大きく異なる。例えば還元型マクロファージではIL-12上昇・IL-6低下であるが、酸化型ではIL-12低下・IL-6上昇である。還元型と酸化型はMCB試薬による細胞内グルタチオン量で評価することができる。興味深いことに、注入直後の網膜内のマクロファージは還元型であるが、網膜下の酸化ストレスにより、徐々に酸化型へと変化していた。還元型グルタチオン誘導剤としてN-アセチル-L-シスチンやグルタチオン・モノエチルエステルなどを硝子体腔に注入することで、癬痕形成が抑制された。網脈絡膜癬痕化に、酸化ストレス下でのマクロファージ機能変化が重要であることが示された¹¹⁾。

マクロファージに加えて病態形成に重要と考えられるのがRPEである。AMD患者網膜下増殖組織は①増殖・遊走したRPE、②マクロファージが混在していた。RPEは、生理的条件下では視細胞の外節の食機能をはじめ神経網膜の環境を保持するのに重要である。一方で、いったん炎症状態にシフトすると、機能変化を生じ各種ケモカイン・サイトカインを産生し炎症反応を増強する。事実マクロファージと共培養したRPEは細胞内 α -SMAが上昇し、網膜下注入によって、網膜下癬痕形成に至ることが判った¹¹⁾。本モデルでは、注入したマクロファージとRPEが作用し合い、癬痕形成を誘導していると考えられた。

おわりに

広義の眼炎症疾患という観点から脈絡膜新生血管病などの網膜硝子体疾患を取り上げ、特に自然炎症の役割に焦点を当て研究を行った。脈絡膜新生血管病について、これまでの眼局所炎症と自然免疫系の研究基盤を元にマウス網膜下癬痕モデルを作成し、脈絡膜新生血管病の最終的な予後不良原因である黄斑部機能障害・癬痕化抑制に向け具体的な治療法確立を目指してきた。今後も研究を続け、従来のCNV形成抑制治療や退縮治療と組み合わせることで、幅広いステージでの脈絡膜血管新生病の治療が行えるようにしたいと考えている。

参 考 文 献

- 1) Streilein JW : Ocular immune privilege : therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat Rev Immunol* 3 : 879-889, 2003.
- 2) Sonoda KH, Exley M, Snapper S, Balk SP and Stein-Streilein J : CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. *J Exp Med* 190 : 1215-1225, 1999.
- 3) Sonoda KH, Sasa Y, Qiao H, Tsutsumi C, Hisatomi T, Komiyama S, Kubota T, Sakamoto T, Kawano Y and Ishibashi T : Immunoregulatory role of ocular macrophages : the macrophages produce RANTES to suppress experimental autoimmune uveitis. *J Immunol* 171 : 2652-2659, 2003.
- 4) Yoshimura T, Sonoda KH, Sugahara M, Mochizuki Y, Enaida H, Oshima Y, Ueno A, Hata Y, Yoshida H and Ishibashi T : Comprehensive analysis of inflammatory immune mediators in vitreoretinal diseases. *PLoS One* 4 : e8158, 2009.
- 5) Ishida O, Oku H, Ikeda T, Nishimura M, Kawagoe K and Nakamura K : Is Chlamydia pneumoniae infection a risk factor for age related macular degeneration? *Br J Ophthalmol* 87 : 523-524, 2003.
- 6) Kalayoglu MV, Bula D, Arroyo J, Gragoudas ES, D'Amico D and Miller JW : Identification of Chlamydia pneumoniae within human choroidal neovascular membranes secondary to age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 243 : 1080-1090, 2005.
- 7) Fujimoto T, Sonoda KH, Hijioka K, Sato K, Takeda A, Hasegawa E, Oshima Y and Ishibashi T : Choroidal neovascularization enhanced by Chlamydia pneumoniae via Toll-like receptor 2 in the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 51 : 4694-4702, 2010.
- 8) Sonoda KH, Mukasa A, Matsuzaki G and Nomoto K : The induction of renal autoantigen-specific T cells by a

- local *Listeria monocytogenes* infection. *Immunology* 86 : 190-198, 1995.
- 9) Hasegawa E, Sonoda KH, Shichita T, Morita R, Sekiya T, Kimura A, Oshima Y, Takeda A, Yoshimura T, Yoshida S, Ishibashi T and Yoshimura A : IL-23-independent induction of IL-17 from $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells promotes experimental intraocular neovascularization. *J Immunol* 190(4) : 1778-1787, 2013.
 - 10) Hijioka K, Sonoda KH, Tsutsumi-Miyahara C, Fujimoto T, Oshima Y, Taniguchi M and Ishibashi T : Investigation of the role of CD1d-restricted invariant NKT cells in experimental choroidal neovascularization. *Biochem Biophys Res Commun* 374 : 38-43, 2008.
 - 11) Jo YJ, Sonoda KH, Oshima Y, Takeda A, Kohno R, Yamada J, Hamuro J, Yang Y, Notomi S, Hisatomi T and Ishibashi T : Establishment of a new animal model of focal subretinal fibrosis that resembles disciform lesion in advanced age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52 : 6089-6095, 2011.

Natural Immunity and Ocular Inflammation

Koh-Hei SONODA

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

Abstract

We have focused on the role of innate immunity during the formation of “choroidal neovascularization (CNV) -related diseases”. Inflammation affects the formation and the progression of various vitreoretinal diseases. We performed a comprehensive analysis of inflammatory immune mediators in the vitreous fluids with diabetic macular edema, proliferative diabetic retinopathy, branch retinal vein occlusion, central retinal vein occlusion and rhegmatogenous retinal detachment. The concentrations of 20 soluble factors (nine cytokines, six chemokines, and five growth factors) were measured simultaneously by multiplex bead analysis system. Out of 20 soluble factors, three factors : interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) were significantly elevated in all groups of vitreoretinal diseases compared with control group. According to the correlation analysis in the individual patient’s level, these three factors that were simultaneously increased, did not show any independent upregulation in all the examined diseases.

We also elucidated the role of natural killer (NK) T cells, which restricted CD1 molecule and participate in the innate immune response, in laser-induced experimental CNV. We examined CNV formation in independent two NKT cell-deficient mice, either CD1 knockout (KO) mice or $J\alpha 18$ KO mice, and found that both KO mice showed significant reduction of experimental CNV.

During the clinical process of CNV-related diseases, not only CNV formation, subretinal scarring is thought to be another important step. We thus established the experimental model of subretinal scarring by injecting peritoneal exudating macrophages into subretinal space. Subretinal fibrous tissue was observed by fundus scope in PEC-inoculated mice after seven days. The tissue was consisted of monotonous and low cell-density area, which expressed α -SMA with collagen synthesis. Because PEC-inoculated MCP-1 KO mice showed less amount of glial residual, not only exogenous macrophages, but also intrinsic macrophages are critical. Activated macrophages directly induced myofibrotic changes in RPE cells *in vitro*.

Key words : innate immunity, age-related macular degeneration, retinal scarring, macrophages, drug deliver system