

半定量的 RT-PCR 法を用いたマウス網膜における 抗原提示機能の可能性の解析

原 宏二・亀谷 修平・山木邦比古

秋田大学医学部感覚器学講座眼科学分野

(平成 16 年 1 月 13 日受付, 平成 16 年 1 月 22 日掲載決定)

The use of semi-quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) to analyze antigen-presenting functions in mouse retina

Koji Hara, Shuhei Kameya and Kunihiko Yamaki

*Division of Ophthalmology, Department of Sensory Medicine, Akita University
School of Medicine, Akita 010-8543, Japan*

Abstract: To identify the possibility of antigen presentation in the retina, we studied the production of various cytokines and the expression of cell surface molecules in the retina by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Lipopolysaccharide (LPS) or inactivated *Bordetella pertussis* (BP) was injected into the vitreous cavity of C57BL/6J mice. The retinas were collected 3, 6 and 24 hours after the injection. Expression of mRNA for MHC class II, CD11c, CD80, CD86, toll-like receptor (TLR) 4, TLR9, IL-12p35, IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-1 β , TNF- α and TGF- β was analyzed by semi-quantitative RT-PCR. Expression of mRNA for MHC class II, CD11c, CD80, CD86, TLR4 and TLR9 was found in the untreated retina. The amount of expression of MHC class II, CD11c, CD80 and CD86 increased after injection of either LPS or BP. Expression of TLR4 mRNA increased only following injection with LPS, whereas TLR9 increased following injection with BP or LPS, not clear. The expression of cytokines, IL-12p35, IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-1 β , TNF- α and TGF- β increased after injection with either LPS or BP. A time course of mRNA expression indicated a peak at 3 hours after injection, which then gradually subsided.

These results suggest that proinflammatory cytokines related to antigen presentation were upregulated by stimulation of TLR4 and TLR9.

Key words: Semi-quantitative RT-PCR, Toll-like receptor, Antigen-presenting cells, Immune privilege site

緒 言

高等動物の生体防御は自然免疫と獲得免疫から構成されている。獲得免疫は B 細胞や T 細胞などリンパ球に担われており、一般に自然免疫はマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞によって担われている。我々の体内には種々の感染症など侵入異物を排除するための自然免疫による生体防御システムが存在し

ており、自然免疫を担当する細胞は Toll-like receptor (TLR) ファミリーと呼ばれる一群の膜蛋白質を介して病原体を認識し、感染の初期防御に重要な役割を果たしていることも明らかになってきている^{1,2)}。また樹状細胞は感染の初期防御ばかりではなく成熟すると major histocompatibility complex (MHC) class II 分子や CD80, 86 などの共刺激分子を介してナイーブ T 細胞を活性化することのできる唯一の細胞とな

り、獲得免疫を誘導する³⁻⁵). 抗原提示されたナイーブ T 細胞は Th1 や Th2 細胞へと分化し、様々なサイトカインを放出して免疫反応のネットワークが形成される⁶). 一方、未熟な樹状細胞は免疫寛容を誘導するなど免疫反応を抑制的にコントロールする役割をもつことも最近明らかになってきている^{5,7}).

抗原提示細胞は全身の各臓器に常在していると考えられており、眼内においても虹彩、脈絡膜に樹状細胞が存在するという報告があるが⁸⁻¹⁰), 網膜に樹状細胞が常在しているという報告はない。現在、網膜には網膜ミクログリア (microglia) と perivascular cells (PVCs) という phenotype が異なる二つの細胞集団が存在しており、これらの細胞が網膜における免疫担当細胞だと有力視されている¹¹⁻¹⁸).

脳内に存在するミクログリア (microglia; 小神経膠細胞) は、中枢神経系を構成するグリア細胞 (glial cell; 神経膠細胞) の一つであるが、他のグリア細胞とは異なり、骨髄由来の単核細胞の前駆細胞が血液脳関門の不完全な幼若期の脳内に移行した細胞と考えられている。ミクログリアは正常時にはラミファイド (ramified) 型として静止状態にあり、一定の間隔で整然と配置し、かつ長い細胞突起を周囲に張り巡らせている組織像をしているが、炎症時あるいは虚血時には活性化されアメボイド (ameboid) 型へ形態変化を起こして傷害部位へ遊走し、様々なサイトカインや生理活性物質を放出して傷害細胞断片を貪食してしまうことが知られている。また、ミクログリアはマクロファージなど骨髄由来の単球系細胞と MHC class II など多数の表面抗原が共通していることが示され、その機能も極めて類似していることから、脳の免疫担当細胞として機能していると考えられている^{19,20}). 網膜に存在するミクログリアも同様に血液眼関門の不完全な幼若期に眼内に移行し、網膜における免疫担当細胞として働いていると考えられている^{21,22}). 一方、PVCs もまた中枢神経系において MHC class II を発現しており、機能的にもマクロファージに類似しているため同じく免疫担当細胞として考えられている^{23,24}).

眼は免疫学的特権部位 (immune privilege site) として知られている。Immune privilege site は眼の他にも脳、精巣などが知られているが、眼内では前房関連免疫偏位 (anterior chamber-associated immune deviation; ACAID) と呼ばれる特異な免疫寛容を誘導されることが報告され^{25,26}), 眼内には過剰な免疫反応を抑制する機序が存在していることが証明されてい

る。近年、網膜の immune privilege site に関する研究も報告されている^{27,28}). しかし、眼内における Immune privilege site としての特異な免疫反応の機序、網膜でのミクログリアおよび PVCs の役割に関しては未だ明らかではない。

Endotoxin-induced uveoretinitis (EIU) はグラム陰性細菌の細胞膜要素である lipopolysaccharide (LPS) などを全身あるいは局所投与することによりマウスおよびラットに急性の眼内炎症を惹起させる動物モデルである^{29,30}).

今回私達は、LPS および不活化した百日咳死菌 (*Bordetella Pertussis*; BP) をマウスの硝子体腔内に注入し、網膜における TLR を介する抗原提示からサイトカインの誘導までを RT-PCR 法により半定量的に測定することによって、網膜での抗原提示機能の存在する可能性および病態について推測した。

材料および方法

1. 実験動物

動物種は 6~8 週齢の雄性 C57BL/6J を使用した (日本 SLC, Japan). 本実験における動物の使用はすべて秋田大学医学部動物実験指針に則って行った。

2. LPS および BP 硝子体内注入マウスの作成

C57BL/6J マウスに対して lipopolysaccharide (LPS) 250 ng (0.125 mg/ml) あるいは百日咳死菌 (BP) (2×10^9 個/ml) を含む無菌の生理食塩水溶液 2 μ l を角膜輪部から 1~2 mm 後極側で 100 μ l ハミルトンシリンジ、30 G 1/2 注射針を用いて硝子体腔内に注入した³⁰). また、硝子体腔内注射による直接外傷との炎症と区別するためにコントロールとして無菌の生理食塩水溶液のみ 2 μ l を同様の方法にて硝子体腔内に注入した。

3. 網膜からの RNA 抽出

眼球は LPS, BP およびコントロールの生理食塩水溶液を硝子体腔内に注入 3 時間、6 時間、24 時間後に摘出した。摘出した眼球は角膜輪部で半割、前眼部、水晶体および硝子体を除去した後に網膜を分離した。また網膜内に含まれる血液成分以外の混入はないように採取した。網膜はサンプル 50 mg に対して 1 ml の RNA 抽出試薬 (TRIzol; Invitrogen, Gaithersburg, MD) を加え、懸濁した。懸濁液は 5 分間室温に放置、

0.2 ml のクロロホルムを加えて混合, 室温で 2 分間放置. その後, サンプルを 4°C, 12,000×g で 15 分間遠心, 遠心後, 水層を回収, イソプロピルアルコールを 0.5 ml 加えて混合. 室温で 2 分間放置したのち, 4°C, 12,000×g で 10 分間遠心, RNA を沈澱させた. 上清を捨て, 75% エタノールで洗浄, RNA ペレットを 55~60°C の

100 µl RNA Preparation Water (TaKaRa, Tokyo, Japan) に溶解. 溶解した RNA サンプルは 260 nm の吸光度を測定することにより総量を定量した.

4. 1st strand cDNA の合成

First strand cDNA の合成には SuperScript™

Table 1 Primer Used for RT-PCR Analysis

Primer		sequence (5'-3')	Position	Size of Product (bp)
β -Actin	forward	CACAGCTTCTTTGCAGCTCC	27-46	1033
	reverse	TCTTCATGGTGCTAGGAGCCA	1059-1039	
MHC class II	forward	TTCTACCAATCTTACGACGC	127-146	407
	reverse	TTCCGGAACCTGTGGTTAGG	533-514	
CD11c	forward	TGTGACGGTGTCTAATGATGG	2461-2481	513
	reverse	AGTTGATGCTGACTGGCACG	2993-2974	
CD80	forward	CATTCTTCTCTTTGTGCTGC	63-82	526
	reverse	AGGATCCTGGGAAATTGTCTG	588-569	
CD86	forward	GTCTTGCTGATCTCAGATGC	139-158	610
	reverse	TTTCCAGAACACACACAACG	748-729	
TLR4	forward	GAACCCTCTATCATGGAAGG	835-854	520
	reverse	CAAGGGATAAGAACGCTGAGA	1354-1334	
TLR9	forward	AACATGGTTCTCCGTCGAAGG	104-124	543
	reverse	GTAGTAGCAGTTCCTCCGTC	646-628	
IL-1 β	forward	TGAACTCAAATGTGAAATGC	83-102	438
	reverse	TGTCCATTGAGGTGGAGAGC	520-501	
IL-2	forward	TTGTGCTCCTTGTCAACAGC	88-107	452
	reverse	GATGATGCTTTGACAGAAGG	539-520	
IL-4	forward	CATCCTGCTCTTCTTTCTCG	114-133	377
	reverse	TGATGCTCTTTAGGCTTTCC	490-471	
IL-5	forward	CAGAGTCATGAGAAGGATGC	37-56	368
	reverse	ACTCTTGACAGGTAATCCAGG	404-385	
IL-6	forward	GCTATGAAGTTCCCTCTCTGC	29-48	536
	reverse	AGCTTATCTGTTAGGAGAGC	564-545	
IL-10	forward	AGCCGGAAGACAATAACTG	145-164	407
	reverse	TTTCATGGCCTTGTTAGACACC	551-532	
IL-12p35	forward	TCCAGCATGTGTCAATCACG	153-172	466
	reverse	CCTTGCTTAGAATGATCTGC	618-599	
IFN- γ	forward	TCTGAGACAATGAACGCTAC	101-120	457
	reverse	GCTTCCTGAGGCTGGATTCC	557-538	
TNF- α	forward	CTATGTCTCAGCCTCTTCTC	247-266	353
	reverse	CAGCCTTGTCCTTGAAGAG	599-580	
TGF- β 1	forward	TGCTCGCTTTGTACAACAGC	1097-1116	458
	reverse	ATCTTTGCTGTACAAGAGC	1554-1535	

(44)

マウス網膜における抗原提示機能の解析

First-Strand Synthesis System for RT-PCR キット (Invitrogen, Gaithersburg, MD) を用いた。Total RNA (4 μg) に各 10 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTP) 混合液 1 μl , オリゴ (dT) プライマー (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 1 μl および無菌の脱イオン水を加えて 10 μl の反応液とし、65°C, 5 分間加熱した。1 分以上氷中

で急冷後、10 x Reverse Transcription (RT) buffer 2 μl , 25 mM MgCl_2 4 μl , 0.1 M dithiothreitol (DTT) 2 μl , RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor 1 μl (Invitrogen) を加えた。42°C, 2 分間インキュベート後、逆転写酵素 50 U (SuperScript™II RT; Invitrogen) を 1 μl 加え、42°C, 50 分間および 70°C,

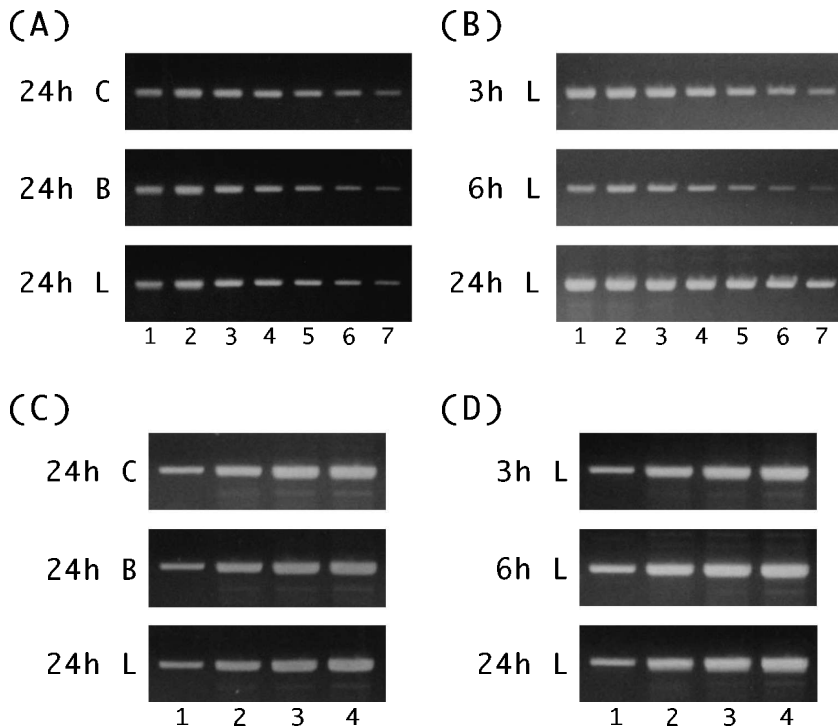


Fig. 1 β -actin 1/2 希釈系列によるサンプル cDNA 量の補正。

(A) β -actin 1/2 希釈系列による LPS および BP 注入後 24 時間経過したマウス網膜におけるサンプル cDNA 量の補正前。

C: コントロールの生理食塩水注入群 (コントロール群), B: 不活化百日咳死菌 (BP) 注入群, L: LPS 注入群。

Lane 1: 希釈倍率 1 倍, Lane 2: 1/2 倍, Lane 3: 1/4 倍, Lane 4: 1/8 倍, Lane 5: 1/16 倍, Lane 6: 1/32 倍, Lane 7: 1/64 倍を示す。

(B) LPS 注入後 3, 6, 24 時間経過したマウス網膜における β -actin 1/2 希釈系列によるサンプル cDNA 量の補正前。

C: コントロール群, B: BP 注入群, L: LPS 注入群。

Lane 1: 希釈倍率 1 倍, Lane 2: 1/2 倍, Lane 3: 1/4 倍, Lane 4: 1/8 倍, Lane 5: 1/16 倍, Lane 6: 1/32 倍, Lane 7: 1/64 倍を示す。

(C) LPS および BP 注入後 24 時間経過したマウス網膜サンプル cDNA 量の補正後。

各 Lane は以下の増幅条件下での PCR 生成量を示す。

Lane 1: 28 サイクル後, Lane 2: 32 サイクル後, Lane 3: 36 サイクル後, Lane 4: 40 サイクル後のサンプルを示す。

(D) LPS 注入後 3, 6, 24 時間経過したマウス網膜サンプル cDNA 量の補正後。

各 Lane は以下の増幅条件下での PCR 生成量を示す。

Lane 1: 28 サイクル後, Lane 2: 32 サイクル後, Lane 3: 36 サイクル後, Lane 4: 40 サイクル後のサンプルを示す。

15分間インキュベートし、水中で急冷。さらに RNase H (Invitrogen) 1 μ l を加えて 37°C, 20 分間インキュベートした。

5. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

使用したオリゴヌクレオチドプライマーを Table 1 に示した。Polymerase Chain Reaction (PCR) は KOD-Plus-DNA Polymerase キット (TOYOBO, Osaka, Japan) を用い、使用説明書に推奨されている条件にて行った。PCR による目的 DNA の増幅は以下の条件で行った: 94°C, 2 分 (pre-heating), 94°C, 15 秒 (denaturation), 56°C, 30 秒 (annealing), 68°C で 30 秒 (extension), サイクル数は必要に応じて変化した。各々の PCR 生成物 10 μ l を 2% アガロースゲル上に電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色、解析した。

6. 半定量的 PCR

目的遺伝子の発現量を定量する方法として半定量的 RT-PCR を行った。内部標準遺伝子として β -actin を用い、サンプル DNA 量を 1~1/64 倍までの 1/2 希釈系列を作成して PCR を行い、各希釈率の PCR 生成量を比較することでサンプル DNA 量の補正を行った。DNA 量を補正したサンプルの PCR 反応液を用いて PCR を行った。PCR サイクル数は各サンプルごとに 28, 32, 36, 40 サイクルと 4 サイクルごとずらして PCR 生成物を回収し、各サイクルごとの PCR 生成量を相対的に比較することによって定量した。

結 果

1. 内部標準遺伝子による DNA 量の補正

β -actin を内部標準遺伝子としたサンプルの 1/2 希釈系列の PCR 生成量を比較することでサンプル DNA 量の補正を行った (Fig. 1A, 1B)。1/2 希釈系列の結果より、24 時間後の LPS, BP およびコントロールの生理食塩水注入群における補正後のサンプル DNA 量は、ほぼ等量であることが示された (Fig. 1C)。さらに LPS 注入群において注入後 3 時間, 6 時間, 24 時間経過してから採取した各サンプルに含まれる補正後のサンプル DNA 量も、ほぼ等量であることが示された (Fig. 1D)。

2. 正常マウス網膜における細胞表面分子 mRNA の発現

無処置, 正常マウス網膜での検討では MHC class II mRNA, CD11c, CD80, CD86, TLR4, TLR9 mRNA の発現が確認された (Fig. 2A, 2B)。

3. 細胞表面分子 mRNA の発現量変化

LPS あるいは BP 注入 24 時間後のマウス網膜では MHC class II, CD11c, CD80, CD86 mRNA の発現量はいずれも増加していた (Fig. 3)。

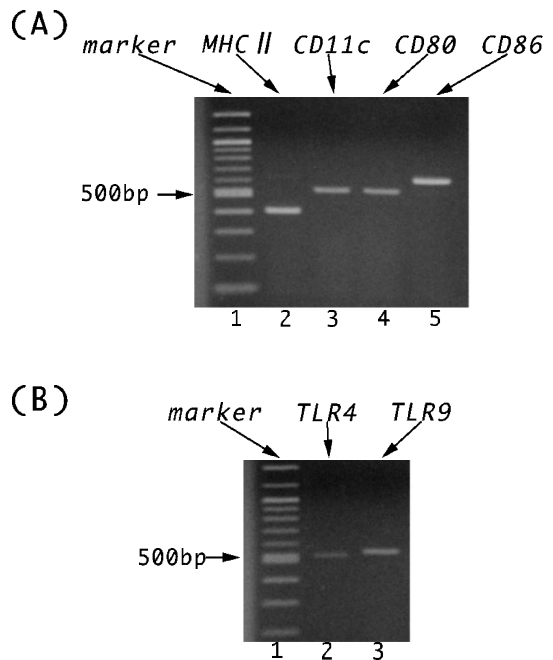


Fig. 2 正常マウス網膜における細胞表面分子の発現。

(A) 無処置群マウス網膜における MHC class II, CD11c, CD80, CD86 mRNA 発現。

Lane 1: 100 bp DNA marker. Lane 2: MHC class II は MHC class II mRNA, Lane 3: CD11c は CD11c, Lane 4: CD80 は CD80, Lane 5: CD86 は CD86 mRNA それぞれの発現を示す。

(B) 無処置群マウス網膜における TLR 4 および TLR 9 mRNA 発現の有無。

Lane 1: 100 bp DNA marker. Lane 2: TLR4 は TLR4, Lane 3: TLR9 は TLR9 mRNA それぞれの発現を示す。

(46)

マウス網膜における抗原提示機能の解析

4. Toll-like receptor (TLR) mRNA の発現量変化

LPS あるいは BP 注入 24 時間後の LPS 注入群ではコントロールの生理食塩水溶液を注入した群と比較して TLR4 mRNA の発現量は有意に増加していた。BP を注入した群ではコントロール群と比較して TLR4 mRNA の発現量に有意な差は認められなかった。TLR9 mRNA の発現量は LPS および BP 注入群

のいずれもコントロール群と比較して有意に増加していた (Fig. 4)。

5. サイトカイン mRNA の発現量変化

サイトカインの検討では、LPS あるいは BP 注入 24 時間後のマウス網膜で、interleukin (IL)-12p35, IL-2, interferon (IFN)- γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α , transforming growth factor (TGF)- β , IL-10 mRNA 発現量の増加がみられ

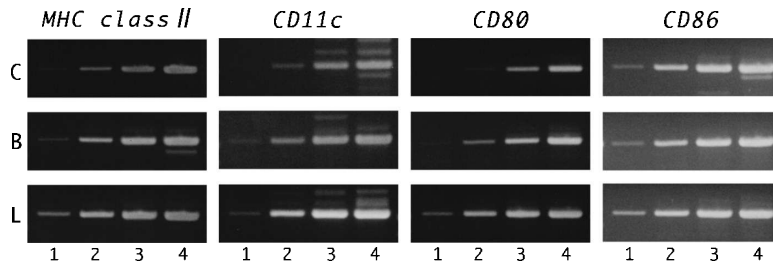


Fig. 3 LPS および BP 注入 24 時間後のマウス網膜における MHC class II, CD11c, CD80, CD86 mRNA 発現量変化。

MHC class II, CD11c, CD80, CD86 はそれぞれの mRNA 発現を示す。

C: コントロール群, B: BP 注入群, L: LPS 注入群。

各 Lane は以下の増幅条件下での PCR 生成量を示す。

Lane 1: 28 サイクル後, Lane 2: 32 サイクル後, Lane 3: 36 サイクル後, Lane 4: 40 サイクル後のサンプルを示す。

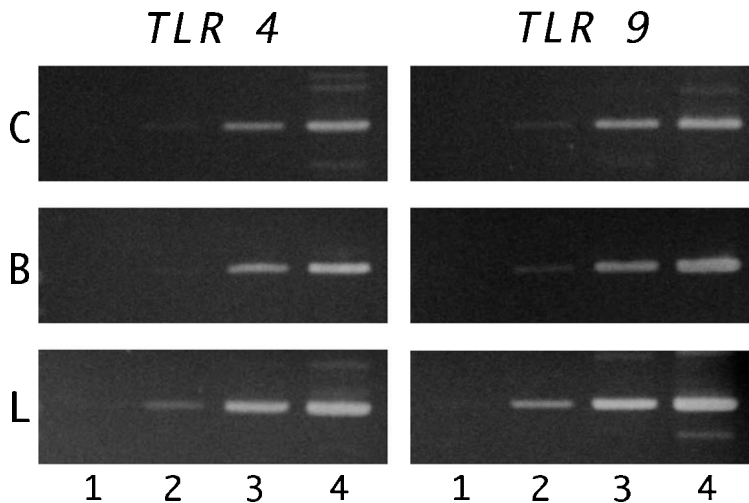


Fig. 4 LPS および BP 注入 24 時間後のマウス網膜における TLR4, TLR9 mRNA 発現量変化。

TLR4, TLR9 はそれぞれの mRNA 発現を示す。

C: コントロール群, B: BP 注入群, L: LPS 注入群。

各 Lane は以下の増幅条件下での PCR 生成量を示す。

Lane 1: 28 サイクル後, Lane 2: 32 サイクル後, Lane 3: 36 サイクル後, Lane 4: 40 サイクル後のサンプルを示す。

た。これは LPS および BP 注入群共にみられた (Fig. 5A, 5B, 5C)。

6. 細胞表面分子およびサイトカイン mRNA の経時変化

LPS 注入群における 3 時間, 6 時間, 24 時間後の MHC class II, CD11c, CD80, CD86, IL-2, IFN- γ , IL-5, IL-10 mRNA の経時的発現量の変化では, MHC

class II, CD80, CD86 mRNA の発現は 3 時間後に既に増大し, その後の経時変化は認められなかった。CD 11c mRNA の発現量は 3 時間後が最も多く, 6 時間後, 24 時間後と経時的に減少していた。IL-2, IFN- γ , IL-5 は 3 時間後に mRNA 発現量が最も多く, 時間の経過とともに漸減していた (Fig. 6)。IL-10 は処置後 3 時間で発現の増加がみられ, 24 時間後にも変化はみられなかった。

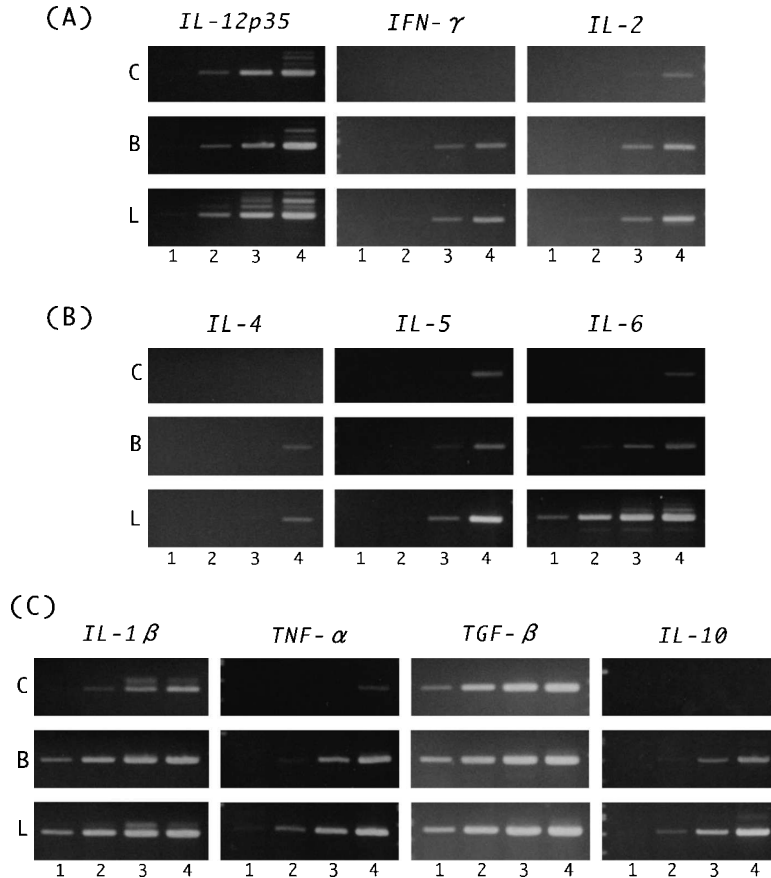


Fig. 5 LPS および BP 注入 24 時間後のマウス網膜におけるサイトカイン mRNA の発現量の変化。

(A) Th1 型サイトカイン mRNA の発現量変化。

IL-12p35, IL-2, IFN- γ それぞれの mRNA 発現を示す。

(B) Th2 型サイトカイン mRNA の発現量変化。

IL-4 は IL-4, IL-5, IL-6 それぞれの mRNA 発現を示す。

(C) IL-1 β , TNF- α , TGF- β , IL-10 mRNA の発現量変化。

IL-1 β , TNF- α , TGF- β , IL-10 はそれぞれの mRNA 発現を示す。

C: コントロール群, B: BP 注入群, L: LPS 注入群。

各 Lane は以下の増幅条件下での PCR 生成量を示す。

Lane 1: 28 サイクル後, Lane 2: 32 サイクル後, Lane 3: 36 サイクル後, Lane 4: 40 サイクル後のサンプルを示す。

(48)

マウス網膜における抗原提示機能の解析

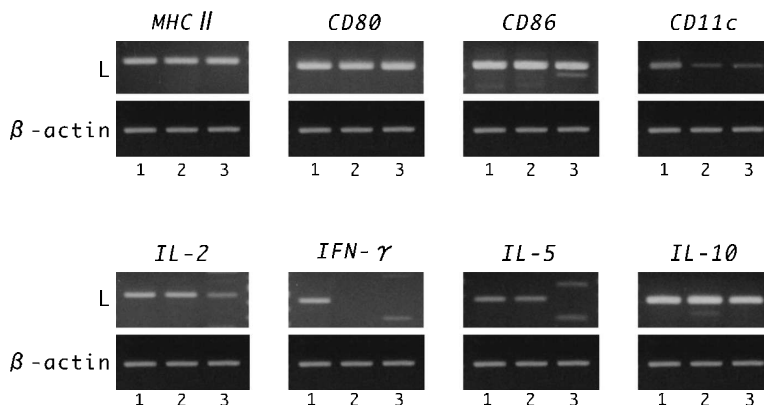


Fig. 6 LPS 注入後 3, 6, 24 時間の MHC class II, CD11c, CD80, CD86, IL-2, IFN- γ , IL-5, IL-10 mRNA の経時的発現量変化。

MHC class II, CD11c, CD80, CD86, IL-2, IFN- γ , IL-5, IL-10 はそれぞれの mRNA の経時変化を示す。

L: LPS 注入群, β -actin は内部標準遺伝子 β -actin mRNA の発現量を示す。

Lane 1: 3 時間後, Lane 2: 6 時間後, Lane 3: 24 時間後を示す。

考 案

抗原提示細胞は全身の各臓器に常在していると考えられており、眼内においても虹彩、脈絡膜に樹状細胞が存在するという報告があるが⁸⁻¹⁰、網膜に樹状細胞が存在しているという報告はない。現在、網膜に存在する抗原提示機能を持つ細胞として網膜ミクログリアと perivascular cells (PVCs) という phenotype が異なる二つの細胞集団が有力視されており、眼内での炎症時には血液中の循環マクロファージも炎症部位に浸潤するため、網膜ミクログリア、PVCs および循環マクロファージが眼内炎症を誘導すると考えられている¹¹⁻¹⁸。しかし、網膜ミクログリアおよび PVCs の役割、免疫反応の機序は未だ明らかではない。

私達は免疫組織染色手法によって網膜での抗原提示機能の存在を証明しようと試みたが、他の組織では通常染色される抗原提示細胞マーカーあるいは本実験でも用いた TLR4, TLR9 などに対する抗体では証明が困難であった。また網膜での抗原提示機能を持っていると目されるミクログリアを直接特定できる細胞マーカーがまだ存在しないなど細胞レベルでの同定は困難であると考えられた。このため最初にマウス網膜で抗原提示が行われているかを網膜全体として検討するために半定量的 RT-PCR にて抗原提示過程の存在を間接的に解析した。検討は抗原提示機能を持つ細胞のマーカーとなる MHC class II, 骨髄由来の単球系マーカーである CD11c, 抗原提示細胞の共刺激分子である

CD80, CD86, 抗原提示細胞に存在し、自然免疫を誘導する Toll-like receptor (TLR) mRNA が無処置・正常マウス網膜に発現しているのかについて解析した。その結果、MHC class II, CD11c, CD80, CD86, TLR4 および TLR9 mRNA すべてが正常マウス網膜にも発現していた (Fig. 2A, 2B)。これに加え、LPS あるいは BP の硝子体内注入により、MHC class II, CD11c, CD80, CD86 mRNA の発現量はいずれも増加した (Fig. 3)。TLR については LPS あるいは BP 注入後、LPS 群ではコントロール群と比較して TLR4, 9 mRNA 両者の発現量が有意に増加していた。しかし、BP 群ではコントロール群と比較して TLR9 の発現増加はみられたが、TLR4 mRNA の発現量に有意な差はみられなかった (Fig. 4)。このように LPS を特異的に認識する TLR4 の mRNA が LPS 注入群でのみ発現量が増加していたことは、この実験系が機能していることを示していると考えられた。このことから正常マウス網膜に抗原提示機能を持つ細胞が存在し、LPS あるいは BP 刺激によって TLR を介する自然免疫による生体防御機構が誘導されている可能性が推測された。

次に私達はマウス網膜で自然免疫反応が誘導されているのならば、次のステップとして獲得免疫反応も誘導され、各種サイトカインも産生されていると推測されたので、各種サイトカインの mRNA 発現および発現量の変化についても解析した。本研究では Th1 型サイトカインである IL-12p35, IL-2, IFN- γ , Th2 型サ

イトカインである IL-4, IL-5, IL-6, 炎症性サイトカインである IL-1 β , ミエロイド系の炎症性サイトカインである TNF- α , 免疫調節性サイトカインである TGF- β および IL-10 mRNA において LPS あるいは BP 注入後の発現量変化について解析した。LPS あるいは BP 注入後, 24 時間のマウス網膜において Th1 型サイトカインである IL-12p35, IL-2, IFN- γ , Th2 型サイトカインである IL-4, IL-5, IL-6, 両系統とも mRNA の発現量が増加していた。また, IL-1 β , TNF- α , TGF- β , IL-10 mRNA の発現量も増加していた (Fig. 5A, 5B, 5C)。このことから LPS あるいは BP 注入によって, 各種 proinflammatory サイトカインが誘導され, 自然免疫系に引き続き, 獲得免疫系も網膜で働いていることが示唆された。

LPS 注入 3 時間, 6 時間, 24 時間後の MHC class II, CD11c, CD80, CD86, IL-2, IFN- γ , IL-5, IL-10 mRNA の経時的発現量の解析では, MHC class II, CD80, CD86 の発現量に経時的変化はなかったが, CD11c の発現量は 3 時間後が最も多く, 6 時間後, 24 時間後と減少した。サイトカインでは IL-10 を除く IL-2, IFN- γ , IL-5 全てのサイトカインで 3 時間後に発現量が最も多く, 時間の経過とともに漸減していた (Fig. 6)。

生体内では免疫学的恒常性を維持するために免疫寛容を誘導するメカニズム (中枢性および末梢性免疫寛容) が存在している。中枢性免疫寛容は胸腺における自己反応性 T 細胞を排除し, 一方, 末梢性免疫寛容は免疫抑制性の regulatory T 細胞が抗原特異的な T 細胞の anergy を誘導することによって考えられている。近年, 未熟樹状細胞が regulatory T 細胞を分化誘導し, 末梢の免疫寛容を制御する働きを持つことが注目されている³¹⁾。Groux らはヒトとマウスの CD4 陽性 T 細胞を IL-10 で反復刺激を行うと免疫反応を抑制する新しい subset である regulatory T 細胞 (Tr1) が分化誘導されること, その作用は Tr1 細胞から産生される免疫抑制作用を持つ IL-10 と TGF- β によるものであることを報告した³²⁾。また, Wakkach らは IL-10 によって Tr1 細胞への分化が誘導される作用は抗原提示細胞を介したものであることを報告している³³⁾。さらに Jonuleit らは *in vitro* においてナイーブ CD4 陽性 T 細胞を未熟樹状細胞で反復刺激をすると抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の anergy および Th1 反応を抑制する CD4 陽性 Tr1 細胞が誘導されることを報告した³⁴⁾。Dhodapkar らは *in vivo* において抗原を

パルスした未熟樹状細胞を投与すると IL-10 産生 CD8 陽性 T 細胞が誘導されることを報告している³⁵⁾。眼内においても Jiang らは培養した骨髄由来の未熟樹状細胞をマウスに投与すると experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) の発症を抑制できると報告している³⁶⁾。

眼は immune privilege site として知られており, 上記の免疫寛容機序に加え, さらなる免疫寛容機序が考えられている。特に前房において anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) と呼ばれる特異な免疫寛容を誘導する機序が存在することが既に報告されている^{25,26)}。Wilbanks と Streilein らは ACAID の誘導に血液中の F4/80 陽性細胞が関与していること, さらに虹彩および毛様体実質細胞には骨髄由来の F4/80 陽性抗原提示細胞が存在しており, 抗原を貪食した抗原提示細胞が血液循環を介して脾臓に到達することを報告している。また, 脾臓に移入した抗原提示細胞が regulatory T 細胞を誘導することも報告している³⁷⁻⁴⁰⁾。しかし, その作用機構についてはいまだ不明である。ACAID の機序に関しては上記以外にも IL-10, TGF- β , α -Melanocyte growth hormone (α -MSH), Carcitonine gene related protein (CGRP), Fas-Fas Ligand の系など, 様々な機序が報告されている⁴¹⁻⁴⁶⁾。近年, Streilein らは網膜下腔が immune privilege site であることを報告し, 網膜色素上皮および神経網膜が immune privilege tissue である可能性などが報告されている^{27,28)}。現在, 網膜における免疫反応の機序, ミクログリアおよび PVCs の役割は明らかになっていないが, 炎症時に免疫抑制サイトカインである IL-10 および TGF- β mRNA が網膜に多く発現していたことは, 網膜において過剰な炎症を抑制する免疫反応のネットワークが働いている可能性が推測された。

私達は LPS あるいは BP の眼内注入により網膜での TLR4, TLR9 などの表面分子とこれに引き続く, proinflammatory サイトカインの誘導の解析により, 網膜でも抗原提示機能が存在する可能性を示した。これに加え, 眼内炎症惹起時には免疫抑制性サイトカインである IL-10 および TGF- β の発現が増加していたことは, 網膜が過剰な免疫反応を抑制する機序を持つ可能性も推測された。しかし, 今回は網膜という組織全体を解析したものであり, 網膜における抗原提示細胞自体を同定したものではない。網膜における抗原提示細胞を同定し, 免疫反応の機序を明らかにしていく

ためには、さらに免疫組織学的手法や培養細胞を用いた細胞レベルでの研究が必要不可欠であると考えられた。

謝 辞

この研究は文部科学省、科学研究費課題番号14571655-00 (早川宏一) の補助を受け行った。

文 献

- 1) Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, **21**, 335-376.
- 2) Akira, S., Takeda, K. and Kaisho, T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.*, **2**, 675-680.
- 3) Steinman, R.M. (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.*, **9**, 271-296.
- 4) Steinman, R.M. and Inaba, K. (1999) Myeloid dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.*, **66**, 205-208.
- 5) Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B. and Palucka, K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, **18**, 767-811.
- 6) Moser, M. and Murphy, K.M. (2000) Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat. Immunol.*, **1**, 199-205.
- 7) Banchereau, J. and Steinman, R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, **392**, 245-252.
- 8) McMenamin, P.G. (1999) Dendritic cells and macrophages in the uveal tract of the normal mouse eye. *Br. J. Ophthalmol.*, **83**, 598-604.
- 9) Butler, T.L. and McMenamin, P.G. (1996) Resident and infiltrating immune cells in the uveal tract in the early and late stages of experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **37**, 2195-2210.
- 10) Forrester, J.V., McMenamin, P.G., Holthouse, I., Lumsden, L. and Liversidge, J. (1994) Localization and characterization of major histocompatibility complex class II-positive cells in the posterior segment of the eye: implications for induction of autoimmune uveoretinitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **35**, 64-77.
- 11) Gregerson, D.S. and Yang, J. (2003) CD45-positive cells of the retina and their responsiveness to *in vivo* and *in vitro* treatment with IFN-gamma or anti-CD40. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**, 3083-3093.
- 12) Chen, L., Yang, P. and Kijlstra, A. (2002) Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul. Immunol. Inflamm.*, **10**, 27-39.
- 13) Yang, P., Chen, L., Zwart, R. and Kijlstra, A. (2002) Immune cells in the porcine retina: distribution, characterization and morphological features. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **43**, 1488-92.
- 14) Yang, P., Das, P.K. and Kijlstra, A. (2000) Localization and characterization of immunocompetent cells in the human retina. *Ocul. Immunol. Inflamm.*, **8**, 149-157.
- 15) Matsubara, T., Pararaiasegaram, G., Wu, G.S. and Rao, N.A. (1999) Retinal microglia differentially express phenotypic markers of antigen-presenting cells *in vitro*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **40**, 3186-3193.
- 16) Zhang, J., Wu, G.S., Ishimoto, S., Pararaiasegaram, G. and Rao, N.A. (1997) Expression of major histocompatibility complex molecules in rodent retina. Immunohistochemical study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **38**, 1848-1857.
- 17) Dick, A.D., Ford, A.L., Forrester, J.V. and Sedgwick, J.D. (1995) Flow cytometric identification of a minority population of MHC class II positive cells in the normal rat retina distinct from CD45^{low}CD11b/c+CD4^{low} parenchymal microglia. *Br. J. Ophthalmol.*, **79**, 834-840.
- 18) Provis, J.M., Penfold, P.L., Edwards, A.J. and van, Driel, D. (1995) Human retinal microglia: expression of immune markers and relationship to the glia limitans. *Glia*, **14**, 243-256.
- 19) Aloisi, F. (2001) Immune function of microglia. *Glia*, **36**, 165-179.

- 20) Ling, E.A. and Wong, W.C. (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*, **7**, 9-18.
- 21) Provis, J.M., Diaz, C.M. and Penfold, P.L. (1996) Microglia in human retina: a heterogeneous population with distinct ontogenies. *Perspect. Dev. Neurobiol.*, **3**, 213-222.
- 22) Penfold, P.L., Madigan, M.C. and Provis, J.M. (1991) Antibodies to human leukocyte antigens indicate subpopulations of microglia in human retina. *Vis. Neurosci.*, **7**, 383-388.
- 23) Cuff, C.A., Berman, J.W. and Brosnan, C.F. (1996) The ordered array of perivascular macrophages is disrupted by IL-1-induced inflammation in the rabbit retina. *Glia*, **17**, 307-316.
- 24) Hickey, W. and Kimura, H. (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen *in vivo*. *Science*, **239**, 290-292.
- 25) Stein-Streilein, J. and Streilein, J.W. (2002) Anterior chamber associated immune deviation (ACAID): regulation, biological relevance, and implications for therapy. *Int. Rev. Immunol.*, **21**, 123-152.
- 26) 慶野 博 (2002) ACAID (anterior chamber associated immune deviation). *臨床免疫* **38**, 334-340.
- 27) Wenkel, H. and Streilein, J.W. (2000) Evidence that retinal pigment epithelium functions as an immune-privileged tissue. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 3467-3473.
- 28) Streilein, J.W., Ma, N., Wenkel, H., Ng, T.F. and Zamiri, P. (2002) Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision. Res.*, **42**, 487-495.
- 29) Rosenbaum, J.T., MacDevitt, H.O., Guss, R.B. and Egbert, P.R. (1980) Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. *Nature*, **286**, 611-613.
- 30) Yang, P., Smith, J.R., Damodar, K.S., Planck, S.R. and Rosenbaum, J.T. (2003) Visualization of cell death *in vivo* during murine endotoxin-induced uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**, 1993-1997.
- 31) Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breittmayer, J.P., Cottrez, F. and Groux, H. (2003) Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation *in vivo*. *Immunity*, **18**, 605-617.
- 32) Groux, H., Bigler, M., O'Garra, A., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E. and Roncarolo, M.G. (1997) A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T cell responses and prevents colitis. *Nature*, **389**, 737-742.
- 33) Wakkach, A., Cottrez, F. and Groux, H. (2001) Differentiation of regulatory T cells 1 is induced by CD2 costimulation. *J. Immunol.*, **167**, 3107-3113.
- 34) Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. and Enk, A.H. (2000) Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4+ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogenic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.*, **192**, 1213-1222.
- 35) Dhodapkar, M.V., Steinman, R.M., Krasovsky, J., Munz, C. and Bhardwaj, N. (2001) Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.*, **193**, 233-238.
- 36) Jiang, H.R., Muckersie, E., Robertson, M. and Forrester, J.V. (2003) Antigen-specific inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis by Bone marrow-derived immature dendritic cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**, 1598-1607.
- 37) Wilbanks, G.A. and Streilein, J.W. (1991) Studies on the induction of anterior chamber associated immune deviation (ACAID). I. Evidence that an antigen-specific, ACAID-inducing, cell-associated signal exists in the peripheral blood. *J. Immunol.*, **146**, 2610-2617.
- 38) Wilbanks, G.A., Mammolenti, M. and Streilein, J.W. (1991) Studies on the induction of anterior chamber associated immune deviation (ACAID). II. Eye-derived cells participate in generating blood borne signals that induce ACAID. *J. Immunol.*, **146**, 3018-3024.
- 39) Streilein, J.W., Okamoto, S., Hara, Y., Kosiwicz, M. and Ksander, B. (1997) Blood-borne signals that induce anterior chamber-

- associated immune deviation after intracameral injection of antigen. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **38**, 2245-2254.
- 40) Wilbanks, G.A. and Streilein, J.W. (1990) Characterization of suppressor cells in anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) induced by soluble antigen. Evidence of two functionally and phenotypically distinct T-suppressor cell populations. *Immunology*, **71**, 383-389.
- 41) Sonoda, K.H., Exley, M., Snapper, S., Balk, S.P. and Stein-Streilein, J. (1999) CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. *J. Exp. Med.*, **190**, 1215-1226.
- 42) Sonoda, K.H., Faunce, D.E., Taniguchi, M., Exley, M., Balk, S. and Stein-Streilein, J. (2001) NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. *J. Immunol.*, **166**, 42-50.
- 43) Faunce, D.E., Sonoda, K.H. and Stein-Streilein, J. (2001) MIP-2 recruits NKT cells to the spleen during tolerance induction. *J. Immunol.*, **166**, 313-321.
- 44) Streilein, J.W. (1993) Immune privilege as the result of local tissue barriers and immunosuppressive microenvironments. *Curr. Opin. Immunol.*, **5**, 428-432.
- 45) Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R. and Ferguson, T.A. (1995) Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*, **270**, 1189-1192.
- 46) Griffith, T.S., Yu, X., Herndon, J.M., Green, D.R. and Ferguson, T.A. (1996) CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity*, **5**, 7-16.