

学位論文題名

Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU)
with an inhibitor of nuclear factor kappa B (NF-kappa B),
pyrrolidine dithiocarbamate

(NF-kappa B 阻害剤である pyrrolidine dithiocarbamate による
実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎の抑制)

学位論文内容の要旨

緒言

ヒトの網膜ぶどう膜炎は、しばしば重篤な視力低下をきたす疾患である。治療法の探索や病態解析のための動物モデルとして、実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎 (以下 EAU) が現在広く用いられている。EAU は、網膜抗原をマウスなどに免疫することで誘導される自己免疫疾患で、type1 ヘルパーT 細胞 (以下 Th1) 優位の免疫応答を特徴とする。すなわち、抗原特異的T細胞ならびに単球・マクロファージ系の細胞が、網膜ぶどう膜に浸潤して病態を形成する。これらの浸潤細胞の転写因子である nuclear factor kappa B (以下 NF- κ B) が、炎症性サイトカインなどの刺激により活性化され、炎症反応や免疫応答が増強すると考えられている。

本研究では、NF- κ B 阻害薬として近年注目されている pyrrolidine dithiocarbamate (以下 PDTC) によって、マウスのEAUが軽症化するかどうか検討した。

材料および方法

I. EAU 誘導マウスに対する PDTC 投与の影響

B10.BR マウス (雌, 6-8 週齢) を網膜視細胞間レチノイド結合蛋白由来ペプチド K2 (以下 K2) と、完全フロインドアジュバントで免疫し、EAU を誘導した。治療群は 2mg の PDTC を、対照群は溶媒の PBS を免疫後連日腹腔内投与し、以下の項目について検討した。

実験 1 臨床・組織学的 EAU の重症度

EAU を誘導したマウス (以下 EAU マウス) の眼底検査を免疫7日後より経時的に行い臨床的重症度を、また免疫後 14, 21 日に摘出した眼球の病理組織学的重症度を各々5段階にスコア化した。

実験 2 網膜ぶどう膜での NF- κ B, およびサイトカイン mRNA の発現

PDTC 治療群および対照群の EAU マウス、またナীবマウスの網膜での、NF- κ B サブユニット p65 の発現を免疫組織染色で、次に眼球内の腫瘍壊死因子 (TNF)- α とインターロイキン (IL)-1 β mRNA の発現を RT-PCR で解析した。

実験 3 抗原特異的 T 細胞反応

免疫 10 日後、PDTC 処置、および無処置 EAU マウスの所属リンパ節より T 細胞を精製し、K2 および抗原提示細胞 (以下 APC) と共に 48 時間培養し、³H-サイミジンをパルスラベルして 16 時間後の取

込を計測した (以下 T 細胞増殖反応). また, この実験では PDTC 存在下で培養, または EAU マウスの T 細胞, または APC を PDTC で前処理して洗浄したのち, T 細胞増殖反応に対する影響を解析した. さらに, 卵白アルブミン (以下 OVA) 特異的 T 細胞レセプター (TCR) トランスジェニックマウス DO11.10 の T 細胞を BALB/c に養子移入し, OVA で免疫後, 7 日間連日 PDTC または PBS を投与し, 脾臓での DO11.10 由来の T 細胞の増殖をフローサイトメトリーで解析した.

II. In vitro における PDTC の効果

APC に対する PDTC の影響を解析するため, 樹状細胞の cell line である BC1 細胞を PDTC で 60 分間前処理した. その後, 抗 CD40 抗体と IL-1 β で 90 分刺激後, 細胞より核蛋白を抽出し, NF- κ B のサブユニットの発現を western blotting で解析した.

結果

I. EAU 誘導マウスに対する PDTC 投与の影響

実験 1 眼底観察による臨床的最重症度は, 治療群で 0.90 ± 0.43 と, 対照群の 2.04 ± 0.55 と比較して有意に軽症であった ($p < 0.01$). また, 免疫 14 および 21 日後の眼球の病理組織学的重症度は, 治療群では各々 0.31 ± 0.13 および 1.29 ± 0.65 と, 対照群の 2.13 ± 0.43 , および 2.25 ± 1.00 と比較して有意に軽症であった ($p < 0.05$).

実験 2 ナイーブマウスの網膜では, p65 は Müller 細胞の細胞質に発現していたが, EAU マウスでは, p65 の発現は核に移行していた. しかし, PDTC 治療群の網膜では, p65 の核内移行が抑制されていた. また, 免疫 18 日後の EAU マウス眼球では, 対照群とくらべ, PDTC 治療群で TNF- α と IL-1 β の mRNA の発現が低下していた.

実験 3 治療, 対照群とも抗原特異的 T 細胞の増殖反応に差がなかった. しかし, PDTC 存在下で培養すると, T 細胞増殖反応はみられなかった. さらに, T 細胞もしくは APC を PDTC で前処理しても, T 細胞増殖反応は抑制された. BALB/c マウスに移入した DO11.10 T 細胞の増殖は, PDTC 治療群, 対照群で差がなかった.

II. In vitro における PDTC の効果

IL-1 β と抗 CD40 抗体で刺激後に, BC1 細胞の核蛋白の NF- κ B の発現は増加したが, PDTC 前処理によって, 核内 NF- κ B の発現は低下した.

考察

実験 1 では, PDTC 投与により EAU が有意に抑制されることが示された. また, 実験 2 では, PDTC の全身投与によって, 網膜 Müller 細胞での NF- κ B p65 の核内移行, および眼球内での TNF- α , IL-1 β mRNA の発現が低下することが示された. EAU は Th1 優位の免疫応答とされている. そこで実験 3 で, PDTC 全身投与の T 細胞および APC に及ぼす影響を検討した. その結果, PDTC 投与は抗原特異的 T 細胞の誘導には影響しないことが示された. この結果は, DO11.10 T 細胞の反応によって支持された. しかし実験 3 の抗原特異的 T 細胞増殖反応を PDTC 存在下で行うと, 完全に反応は抑制された. さらに T 細胞, または APC を PDTC で前処理することによって, T 細胞増殖反応が抑制された. また実験 4 では, PDTC が樹状細胞における NF- κ B の核内移行を抑制した. これらの結果から, in vivo においても PDTC は一度誘導されたエフェクター T 細胞や, APC の活性を抑制する可能性が示された. 以上, 今回の研究から, PDTC の EAU 抑制機序として, EAU の病態形成に関わる細胞の NF- κ B 活性化を抑制し, 炎症部位である眼局所での炎症性サイトカイン産生を低下させることが考えられた. NF- κ B は種々の生体反応に関わることから, 今後さらに多くの研究が必要ではあるが, NF- κ B の抑制を網膜ぶどう膜炎の治療戦略の一つとして考慮すべきと考えている.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 小 野 江 和 則
副 査 教 授 大 野 重 昭

学 位 論 文 題 名

Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) with an inhibitor of nuclear factor kappa B (NF-kappa B), pyrrolidine dithiocarbamate

(NF-kappa B 阻害剤である pyrrolidine dithiocarbamate による
実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎の抑制)

動物モデルによる眼科領域の炎症性疾患に対する pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)を用いた治療の試みは、これまでも報告されている。これらは、エンドトキシン誘導ぶどう膜炎(EIU)や実験的自己免疫性前部ぶどう膜炎 (EAAU)であり、急性の、しかも炎症反応の場が前部ぶどう膜にある疾患である。申請者は、より慢性の経過をたどり、かつ炎症の主体が後眼部にある自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)をモデルとしてPDTCの作用機序と治療効果を検討した。EAUは網膜自己抗原をマウスに免疫することにより発症するが、PDTC投与により臨床症状の著明な改善および組織学的網膜変化の抑制がみられた。EAU発症に際し、ぶどう膜網膜への炎症細胞浸潤およびサイトカインの産生がみられるが、サイトカインの産生は、NF-kappa Bにより制御されている。EAUの発症に先立って網膜ミューラー細胞では、NF-kappa Bのp65サブユニットが細胞質から核へと移動しており、PDTC投与によりこの移動は著明に抑制されていることを明らかにした。さらにPDTCは網膜の腫瘍壊死因子やインターロイキン-1の産生をも抑制した。従って、PDTCは網膜に対する影響のみならず、抗原提示細胞の抗原提示能や網膜抗原特異的T細胞の活性化を抑制することにより、EAUの発症を抑制している可能性のあることを明らかにした。発表にあたり、主査の上出教授より、PDTCの長期間投与による影響の有無、抗原特異的T細胞の誘導が起こった後での投与実験の有無、PDTCを投与したマウスの抗原提示細胞による抗原特異的T細胞増殖反応の実験の有無についての質問があった。さらに、PDTC投与下では

リンパ節での抗原特異的T細胞の誘導がおきても眼球局所に侵入できない可能性があるため、養子移入の実験で眼球に浸潤した細胞の割合を直接みる実験ができると作用機序がさらに解明できる可能性があること、また眼球に直接薬剤を投与するような実験系の開発が望まれるという提言があった。 ついで、副査の小野江教授から、網膜ミューラー細胞のEAUでの果たす役割について、また mRNA 発現のデータは、免疫後 10 日目ではミューラー細胞で NF-kappa B の活性化がおり、免疫後 18 日目では炎症性細胞からのサイトカイン産生を反映しているのかという質問があった。最後に副査の大野教授より、EAU のような眼炎症モデルは他にあるか、あるとすればEAUとの相違点があるか、眼底検査において検者間でのばらつきがあるか、PDTC 以外にも EAU を抑制するような研究を他におこなっているか、という質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自己のデータや、これまでの文献を引用し、適切な回答を行った。この論文は、NF-kappa B 阻害剤である pyrrolidine dithiocarbamate が自己免疫性ぶどう膜網膜炎を抑制する機序を明らかにした点で高く評価され、今後自己免疫性ぶどう膜網膜炎の新規治療法の開発への応用が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。