

最終講義



ぶどう膜炎とトランスレーショナル
リサーチ

Uveitis and its translational research

白井正彦
Masahiko USUI

東京医科大学眼科学講座 主任教授

I. はじめに

ぶどう膜炎は、眼の中膜を構成する組織である虹彩、毛様体、脈絡膜に起きる炎症の総称である。しかし、近年ではぶどう膜に限局する炎症性変化ばかりでなく、ぶどう膜に隣接する眼内組織、例えば網膜、硝子体、強膜などの炎症を含めてぶどう膜炎といい、特に最近では内眼炎と呼称する傾向にある。

ぶどう膜炎はその原因により外因性と内因性に大別される。一般にぶどう膜炎といった場合は、内因性のぶどう膜炎を指しており、古くからその発症機序について多くの研究がなされてきた。考えられるぶどう膜炎の発症機序としては、1) 寄生虫、真菌、細菌、ウイルスなどによる感染、2) アレルギー・免疫異常、3) 全身疾患の部分症、4) 原因不明、が挙げられる。とりわけ、感染性ぶどう膜炎を除く非感染性ぶどう膜炎では、免疫異常やアレルギーなどが密に発症機構と関連しており、難治なぶどう膜炎が多く、治療が困難で失明に至ることがしばしばある。特に本邦では、サルコイドーシス、Vogt-小柳-原田病、ベーチェット病といった免疫異常による汎ぶどう膜炎が三大ぶどう膜炎として占められており、ぶどう膜炎の発症機序の解明や新治療の開発は眼科医にとって極めて重要な課題である。中でも、ベーチェット病による網膜ぶどう膜炎は最近減少の傾向にあるが、今尚原因が全く不明で難治な疾患の一つである。

これまで長年にわたり、筆者らはぶどう膜炎の動物実験モデルを作成し、臨床に於ける治療の実用化に結び付けるトランスレーショナルリサーチを行ってきたので、その研究結果について述べてみたい。

II. 実験モデルの確立

1910年にElschnigが、交感性眼炎は穿孔性眼外傷に伴って遊離された抗原物質の自己免疫によって発症すると提唱して以来²⁾、ぶどう膜炎の発症における免疫反応の関与が研究されてきた。通常、疾患の発症機序や治療法を研究するには、モデル動物の確立が不可欠であり、ぶどう膜炎においても古くから実験的ぶどう膜炎の作製が試みられてきた。それらの中で免疫応答の結果として臓器特異的にぶどう膜炎を発症させることに初めて成功したのは、1949年のCollinsの報告³⁾であり、ぶどう膜抗原の接種によって実験的ぶどう膜炎が発症した。このような経緯から当初、ぶどう膜抗原を誘発抗原とした研究が行われてきたが、その発症頻度に問題があった。

1965年にWackerらが網膜抗原に強いぶどう膜網膜炎惹起能があることを報告し、それまでのぶどう膜抗原による実験モデルの発症は、混入した網膜抗原による反応であることが示された⁴⁾。その後、網膜抗原であるS抗原や光受容体間レチノイド結合蛋白質(interphotoreceptor retinoid binding protein; IRBP)が精製され、これらを免疫強化剤である完全フロインド

※本論文は2007年1月19日に行われた最終講義の要旨である。

アジュバンド (complete Freund's adjuvant; CFA) とともに感受性の高い動物に免疫すると高頻度でぶどう膜炎が発症することが判明した。発症したこのぶどう膜炎は、実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (experimental autoimmune uveoretinitis; EAU) と名付けられ⁹⁾、ヒトぶどう膜炎の動物モデルとして用いられるようになった。

III. EAU 誘発自己抗原と発症メカニズム

1. 実験動物：S 抗原や IRPB のような網膜特異抗原の接種により惹起される EAU は、ヒト難治性ぶどう膜炎の動物モデルとして広く用いられてきた。トランスレーショナルリサーチでは実験動物モデルの作製が不可欠であり、EAU を起したマウスやラットは適切なヒトの疾患モデル動物として試用できる。

2. 網膜抗原と特性：網膜抽出液をゲル濾過すると、ぶどう膜炎惹起能を有する 2 つの可溶性分画が得られ、その内の 1 つの分画からは S 抗原が⁶⁾、そしてもう一つの分画からは IRBP が分離・精製された⁷⁾。このように精製された S 抗原と IRBP の間には、免疫学的な交叉反応はない。また、田中らが報告した A 抗原は IRBP と同一のものであった⁸⁻¹⁰⁾。

S 抗原は視細胞外節の形質膜と松果体に局在する分子量 48 kDa の蛋白質で、光エネルギーの情報交換に関与するとされている。一方、IRBP は視細胞内節で生成され、視細胞、網膜色素上皮および外境界膜に囲まれた光受容体間々質 (interphotoreceptor matrix; IPM) に存在し、網膜色素上皮と視細胞外節との間でレチノイドの輸送における担体として働く機能を有している。その分子量は 140~145 kDa で糖蛋白質であることが知られている¹¹⁾。S 抗原と同様に松果体にも IRBP は存在している。発生学的にも S 抗原と IRBP の発現時期が異なり、IRBP は出生前から出現するのに対し、S 抗原は生後 3 日目より初めて現れる¹²⁾。

3. EAU の発症とその機序：これらの網膜抗原をマウス、ラット、モルモット、家兎、サルに CFA とともに免疫すると、抗原接種後およそ 10 日~14 日経過して、虹彩毛様体炎、網膜脈絡膜炎、網膜血管炎が発症する。この機序は CFA による抗原非特異的免疫反応と網膜抗原による抗原特異的免疫反応が惹起されることに始まる。抗原非特異的免疫反応はマクロファージ、好中球などの免疫担当細胞に担われ、これらの細胞は IL-1、IL-6、TNF- α などのサイトカインと呼ばれる液性因子を産生し、血管の透過性亢進、炎

症反応、他の免疫担当細胞の活性化を促すと考えられている¹³⁻¹⁵⁾。

一方、抗原特異的免疫反応は、マクロファージ、好中球の産生するサイトカインで活性化した樹状細胞などの抗原提示細胞、および T 細胞により担われる。活性化した抗原提示細胞が網膜抗原を取り込み、輸入リンパ管を介して免疫部位の所属リンパ節、または脾臓に達する¹⁶⁾。取り込まれた抗原は、蛋白分解酵素でペプチドに分解され、組織適合性抗原クラス II (MHC クラス II) 分子とともに、細胞表面に提示される。細胞表面に提示された網膜抗原ペプチド-MHC クラス II 分子複合体は、その複合体と特異的に結合することができる T 細胞受容体 (T cell receptor; TCR) を有する CD4 陽性ヘルパー T 細胞 (helper T; Th 細胞) により認識される¹⁷⁾¹⁸⁾。網膜抗原ペプチド-MHC クラス II 分子複合体を認識した Th 細胞は活性化し、分化・増殖する¹⁹⁾。リンパ節、または脾臓にて分化、増殖した網膜抗原ペプチド特異的 Th 細胞は、輸出リンパ管、血管を介して眼内に浸潤し、眼内に局在するマイクログリアなどの抗原提示細胞が提示する網膜抗原ペプチド-MHC クラス II 分子を認識することにより再活性化し、IFN- γ などのサイトカインを産生する¹³⁾²⁰⁾²¹⁾。眼内に浸潤した好中球、マクロファージも IL-1、TNF- α などを産生し¹³⁾、これらのサイトカインにより眼内で炎症が惹起され、また、マクロファージから産生される NO などにより眼内組織の障害が引き起こされる²²⁾。

IV. EAU とベーチェット病の網膜ぶどう膜炎との類似点

実験動物モデルの EAU と全く同じ病態を呈するヒトぶどう膜炎は存在しない。また、EAU では全身症状は起きないが、眼炎症はベーチェット病の網膜ぶどう膜炎に類似する点はいくつかある。

1. 眼症状と病理学的所見

EAU の病態をラットやサルで観察した報告を見ると²³⁾²⁴⁾、網膜血管炎を伴うぶどう膜網膜炎が惹起されており、病理学的にはぶどう膜や網膜、特に網膜血管、視細胞層に炎症反応が強く生じ、最終的には視細胞が破壊され、網膜の荒廃が認められる (図 1)。一方、ヒトのぶどう膜炎の中で網膜血管炎を主体とする代表的な疾患はベーチェット病であり (図 2)、病理学的所見も EAU と極めて似ている。また、EAU でもベーチェット病でも前房中の浸潤細胞は好中球が多く²⁵⁾、

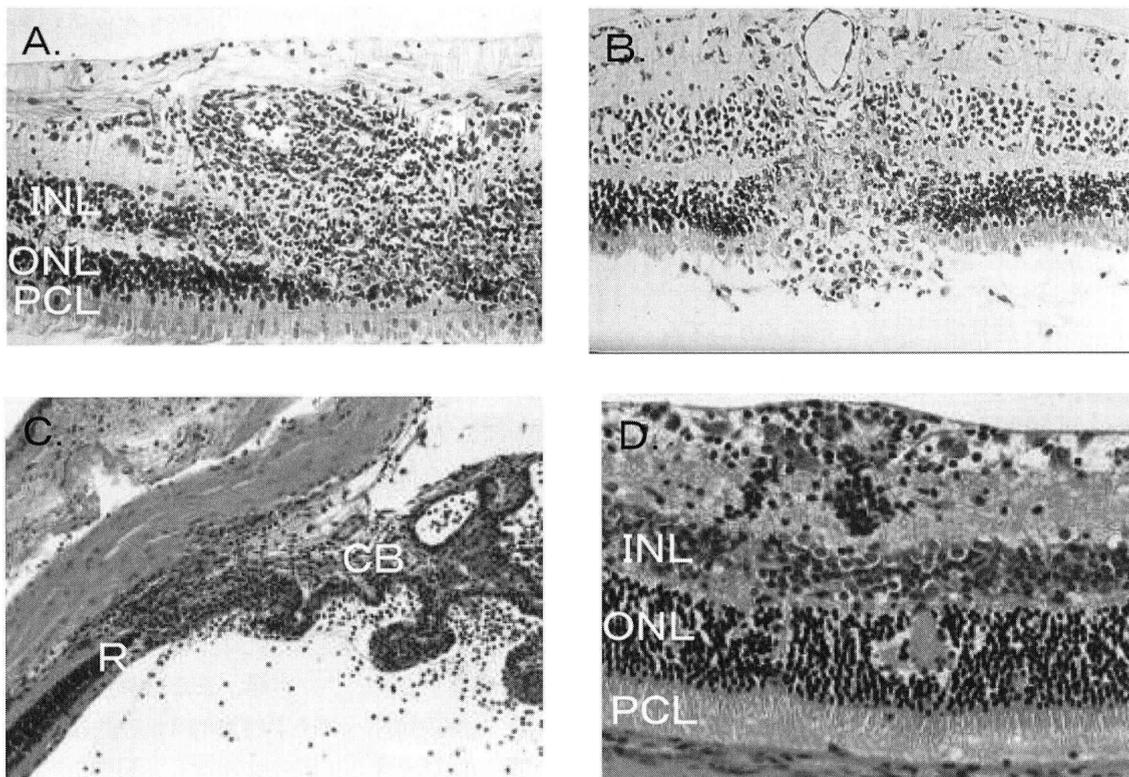


図1 サル、ラットのEAU病理組織像 (A, Bはサル、C, Dはラットで、共に網膜血管炎と視細胞層の炎症性破壊像が著明)

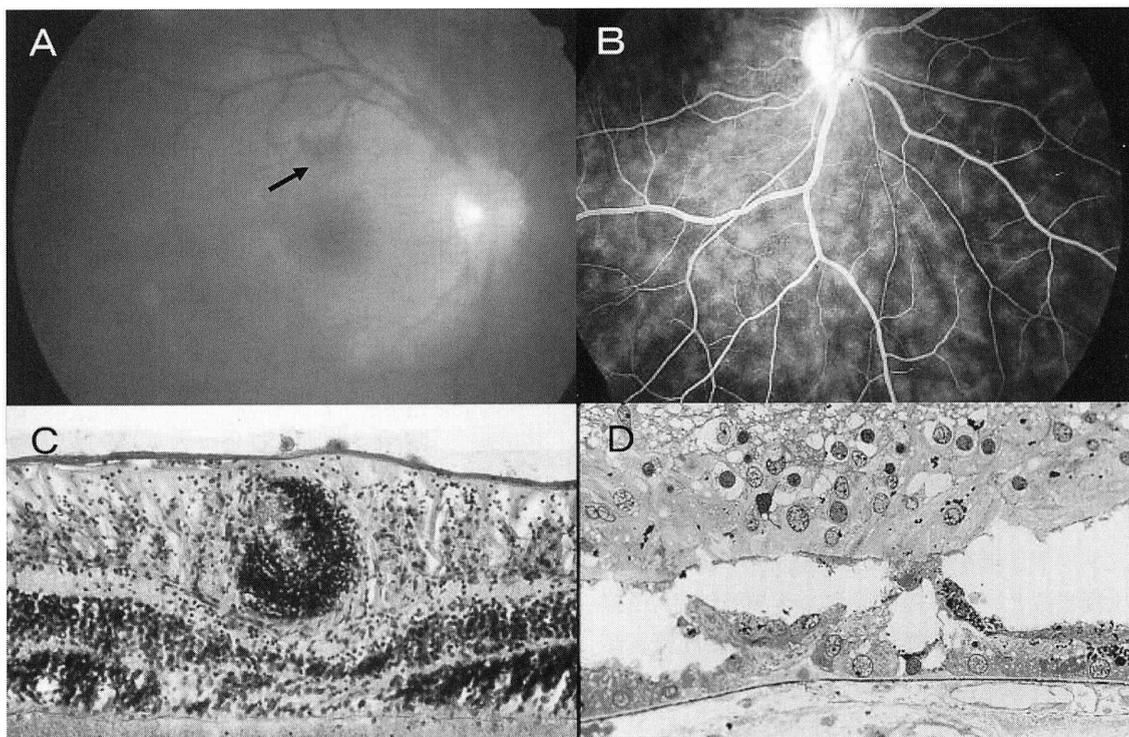


図2 ベーチェット病網膜ぶどう膜炎の眼底病変と病理組織像。網膜血管炎と視細胞層の破壊像が著明、矢印は出血を示す。

特に、再発性前房蓄膿性虹彩炎は後者における特徴の一つである。従って、口腔内アフタ、結節性紅斑様皮疹、陰部潰瘍などの全身症状を伴わない点は異なるが、EAU とベーチェット病の網膜ぶどう膜炎には類似した眼所見が認められた。

2. 抗網膜抗原抗体の存在

EAU では抗原接種後 10 日前後から眼炎症が発症し、14 日ないし 16 日でピークとなり以後漸次消退する (図 3)。抗網膜抗原抗体は 14 日ないし 21 日頃から上昇をはじめ、4 週ごろピークとなりその後炎症の推移と共に減少する²⁶⁾。

一方、ヒトのぶどう膜炎患者の血清中に、EAU の抗原が局在する視細胞外節に対する自己抗体が有るか否かについて検討した論文がある。それによると、ベーチェット病では 19 人中 4 人 (19%)、Vogt-小柳-原田病では 15 人中 1 人 (6.7%)、サルコイドーシスでは 6 人中 1 人 (16.7%) の患者に抗視細胞外節抗体が認められた²⁷⁾。従って、EAU とベーチェット病には抗網膜抗原抗体が存在する。

3. 網膜抗原に対する白血球遊走阻止

S 抗原に対する白血球遊走阻止試験を行った EAU の報告では、免疫後 1 週間後に遊走阻止率はピークとなり、その後比較的急峻に低下し 6 週後には正常域に戻る。一方、ベーチェット病患者では、健常者と比較して S 抗原に対する白血球の遊走阻止率は有意に強く、特に眼炎症発作期で著明に亢進していることが明らかになった²⁸⁾。このように EAU とベーチェット病は網膜抗原に対する白血球遊走阻止率においても同様の結果が認められた。

4. 共通の網膜抗原

近年開発されたプロテオミクスと呼ばれる新しい手法を用いて、ベーチェット病患者の特異的網膜抗原の同定を行った。方法を概説すると、マウスの網膜か

ら凍結融解法にて蛋白を抽出し、二次元電気泳動にかけ、泳動後のゲルをニトロセルロース膜に転写した後、これにベーチェット病患者 (13 名) と健常人 (15 名) の血清を反応させた。発色されたスポットを患者群、健常人群で比較し、患者群で 4 例以上かつ健常人群で 1 例以下、または患者群で 3 例かつ健常人群で 0 例であった陽性のスポットを、ベーチェット病患者血清中の自己抗体が認識する網膜抗原として選出した。そして、該当する蛋白スポットをゲルから切り出し、質量分析装置 (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry: MALDI-TOF MS)、MASCOT (Matrix Science, London, UK) によりその蛋白質を同定した。6 個のスポットが抗原候補として選出され、そのうちの 3 個が解析可能であった²⁹⁾。3 個の蛋白質のうち 2 個は、S 抗原 (ベーチェット病で 30.7% 陽性³⁰⁾、健常人では陽性なし) と alpha-enolase (ベーチェット病で 30.7% が陽性であり、健常人は 6.7% 陽性)³¹⁾ であり、これまでにベーチェット病の自己抗原として報告されている蛋白質であった。

今回検出された最後の一つの蛋白質は、selenium binding protein であり、ベーチェット病で 23.1% が陽性であった。この蛋白質は健常人にはみられず、新たに同定されたベーチェット病の自己抗原と考えられた。また、selenium binding protein が他の自己免疫病において報告されたことも現在までのところない。解析できなかった 3 つのスポットは、スポットの濃度が薄いため同定に至らなかった。

5. 好中球の異常、特にアポトーシスの異常について

ラット EAU の病理所見をみると、前房、虹彩毛様体、網膜とその視細胞層に浸潤する炎症細胞のうち好中球の占める頻度が多い。そこで、ラットを網膜抗原で免疫した後に、抗好中球抗体を投与すると、EAU の発症が抑制されることが報告され、EAU の眼炎症発現に好中球の役割が大きいことを明らかにした²⁵⁾。

一方、ベーチェット病では、病変部位に好中球とリンパ球の強い浸潤があり、眼局所で生じる前房蓄膿中には多数の好中球が認められる³²⁾。また、末梢血の好中球を用いた研究では、健常人に比べ好中球の遊走能や活性酸素産生能がベーチェット病で亢進していること³³⁾をはじめ、サイトカインに対する反応性の低下、さらにサイトカインの産生亢進がみられるなど³⁴⁾³⁵⁾、ベーチェット病患者における好中球の機能異

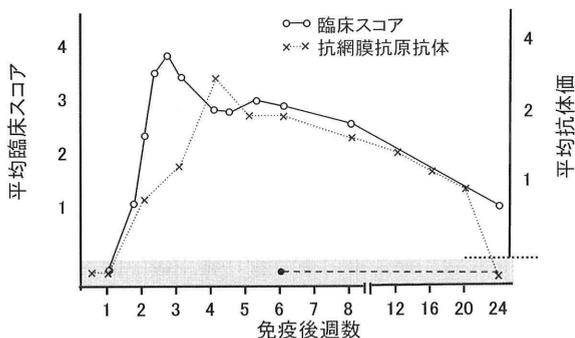


図 3 EAU における臨床スコアの経過と抗網膜抗体の推移

常が指摘されてきた。これらの研究に基づいて、ベーチェット病のぶどう膜網膜炎の治療として好中球遊走能を抑制するコルヒチンの投与や好中球を除去する療法（顆粒球除去療法）が行われ、炎症の発作回数が減少し、治療効果のあることが報告された³⁶⁾。

このようにEAUとベーチェット病では眼炎症の発現に好中球の関与が大である。一般に、好中球の生体内寿命は1~2日であるにも関わらず、このような病態発現に関与することから、EAUとベーチェット病患者における好中球の細胞死（アポトーシス）の感受性について検討した。

1) EAUの好中球アポトーシス

EAUの炎症前、眼炎症期、眼炎症寛解期における好中球のアポトーシスに抑制がみられるか否かについて検討した。実験方法の概要は、ヒトIRBPPペプチドアミノ酸残基1-20位（以後ヒトIRBPと略す）でC57/BL6マウスを免疫すると、免疫後14日目頃からEAUの炎症が誘発され、21日目以降に炎症が徐々に消退する³⁷⁾。そこで、免疫前、免疫後14日目と35日目にマウスを屠殺し、その脾臓から好中球を分離しアポトーシスについて実験した。採取した好中球をin vitroで12時間、LPS刺激下または非刺激下で培養し、AnnexinV-Cy5 Apoptosis Detection Kitで染色した後アポトーシス細胞を解析した。その結果、EAUにおける好中球アポトーシスは眼炎症消退期の免疫後35日目で、免疫前、免疫後14日目と比較して統計学的に有意にアポトーシスが抑制されていた（図4）。LPS刺激により免疫前、すなわち正常マウスの好中球アポトーシスは抑制されたが、免疫後のマウスのアポトーシスは抑制されていなかった。しかし、LPS刺激下でも免疫後35日目の好中球アポトーシスは免疫後14

日目の好中球のそれに比較して有意に抑制されていた。

2) ベーチェット病患者の好中球アポトーシス

眼症状を持つベーチェット病患者29名、健常人15名から承諾書に同意を得た後、末梢血を採取し、好中球を分離し、in vitroで培養した。培養開始後12時間目にEAUの実験と同様に行った。そして好中球のアポトーシス細胞の割合を、眼炎症発作期、寛解期、健常人の3群間で比較したところ（図5）、寛解期の好中球アポトーシスは、健常人のそれと比較して有意に抑制されていた。しかし、発作期と健常人との間に有意な差は認められなかった。LPS刺激により好中球のアポトーシスはどの群でも抑制されたが、寛解期の患者好中球アポトーシスはさらに抑制されていた。このことから、眼炎症寛解期における好中球のアポトーシスに対する抵抗性は、好中球の活性化に依存するものではないことが示された。また、同一ベーチェット病患者（9名）で発作期、寛解期における好中球のアポトーシスレベルをそれぞれ測定したところ、すべての患者で、寛解期の方が発作期より好中球のアポトーシスが抑制されており、両群間において有意差がみられた（ $p=0.007$ ）。興味深いことに、寛解期のベーチェッ

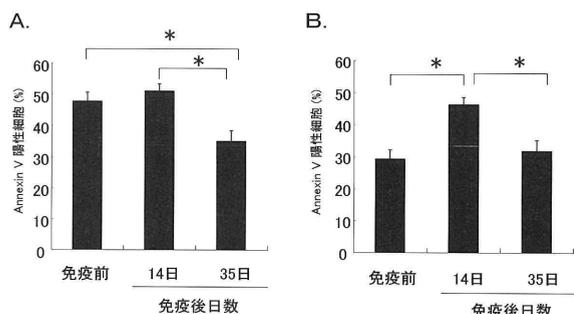


図4 EAU発症マウスの好中球アポトーシス解析・A（無刺激）：炎症消退期に好中球アポトーシスは有意に抑制されていた。B（LPS刺激下）免疫前の好中球アポトーシスは抑制されたが、EAU発症マウスでは抑制されなかった。

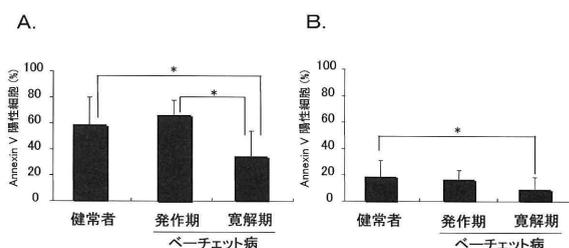


図5 ベーチェット病患者末梢血好中球のアポトーシス解析・A（無刺激）炎症寛解期の好中球は有意に抑制されていた。B（LPS刺激下）寛解期の好中球は健康者に比べ有意に抑制されていた。

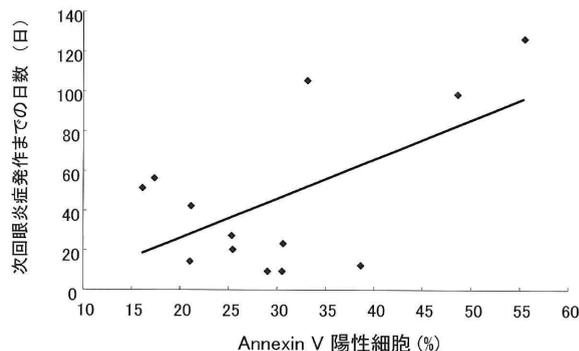


図6 寛解期のベーチェット病患者末梢血好中球アポトーシスと次回発作までの期間

ト病患者の好中球アポトーシスを測定した日から次の発作が起きるまでの期間と好中球アポトーシスとの間に相関がみられるか否か検討したところ (図 6)、両者には正の相関があり、有意差をもって認められた ($r=1.84$, $p=0.03$)。つまり、寛解期の好中球アポトーシスが抑制されていればいるほど、次の眼炎症発作までの期間が短いことが判明した。

6. Th1 優位な免疫反応

Th 細胞は、その産生するサイトカインにより機能が異なり、少なくとも 2 つのサブセットに分類されることが知られている³⁸⁾。Th タイプ 1 細胞 (Th1 細胞) は IL-2、IFN- γ 、TNF- β を産生し、遅延型過敏反応に関与するのに対して、Th タイプ 2 細胞 (Th2 細胞) は、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 を産生し、アレルギー性疾患に関与し、互いに拮抗作用を有する。他の自己免疫病の動物モデルと同様に、EAU は Th1 細胞により惹起されることが報告されている³⁹⁻⁴¹⁾。そこでマウス EAU における Th1、Th2 細胞が産生するサイトカインの経時的変化について検討した³⁷⁾。Th1 サイトカインである IFN- γ は IRBP 免疫後 2 週目から EAU の発症とともに産生がみられ、眼炎症の重症度に従い免疫後 4 週目にピークに達し、その後は減少した。一方、Th2 サイトカインである IL-4 は、免疫後 4 週目から産生がみられ、眼炎症が消退傾向を呈した免疫後 6 週目にピークに達し、徐々に減少した (図 7)。このような眼炎症時の Th1 細胞優位なサイトカイン産生がベーチェット病患者においてもみられるか否かについて末梢血 T 細胞における mRNA の発現をオリゴマイクロアレイで網羅的に解析した。東京医科大学倫理委員会で認可された承諾書に同意が得られた眼炎症発作期のベーチェット病患者 8 名、眼炎症寛解期の患者 8 名、健常者 7 名の末梢血から単核球を分離し、mRNA を抽出後、約 2 万個の遺伝子発現を測定可能な Code Link Bioarray (Amersham Biosciences[®]) を用いて解析した。その結果、Th1 サイトカインであ

る IFN- γ mRNA の発現は眼炎症発作期のベーチェット病患者で亢進しておらず、また Th2 サイトカインである IL-4、IL-6、IL-10 mRNA の発現も、各群間で差が認められなかった。

先に述べたように、Th1 細胞と Th2 細胞ではその産生するサイトカインにより機能が異なるが、その生体内遊走を司る液性因子、ケモカインもいくつかを除いては異なることが知られている。代表的なものとして、Th1 細胞は、ケモカイン受容体に CXCR3 と CCR5 を発現し、CXCR3 は CXCL9、CXCL10 と結合することにより、CCR5 は CCL3、CCL4、CCL5 と結合することによりその生体内遊走は促進される。一方、Th2 細胞はケモカイン受容体に CCR3 と CCR4 を発現し、CCR3 は CCL5、CCL11、CCL15 と結合することにより、また CCR4 は CCL17 と結合することにより、Th2 細胞の遊走が促進される。IRBP 免疫後のマウスの後眼部におけるケモカインの発現を解析すると、Th1 細胞遊走促進ケモカインである CXCL10、およびその受容体である CXCR3 の優位な発現が確認された⁴²⁾。サイトカインは炎症局所で働くのに対し、ケモカインはより遠隔的に働き、Th1、Th2 の病態理解に適していると考えられる。そこで、ベーチェット病患者の末梢血を用いたマイクロアレイデータにおける Th1、Th2 ケモカイン mRNA の発現をみると、CCL3、CXCL10 および CXCR3 の mRNA 発現レベルはベーチェット病患者で強く、特に CXCL10 mRNA は眼炎症発作期の患者でもっとも強く、ついで眼炎症寛解期の患者に認められ、最後が健常者の順となり、眼炎症に伴う Th1 の優位性がベーチェット病でも確認された。

以上の結果から、EAU にはベーチェット病の網膜ぶどう膜炎に見られる下記の病態、すなわち、1) 眼所見と病理学的所見、2) 抗網膜抗原抗体の存在、3) 網膜抗原に対する白血球遊走阻止、4) 共通の網膜抗原、5) 好中球の異常、6) Th1 優位な免疫反応、の項目において類似点があることが明らかになった。従って、EAU はベーチェット病の網膜ぶどう膜炎を標的としたトランスレーショナルリサーチに適したモデルであると考えた。

VI. EAU を用いた新たな治療法の開発

ベーチェット病の網膜ぶどう膜炎に対する効果的治療法の開発を目的として、1) 全身的な副作用を最小限にする免疫抑制薬の眼内投与、2) ぶどう膜網膜

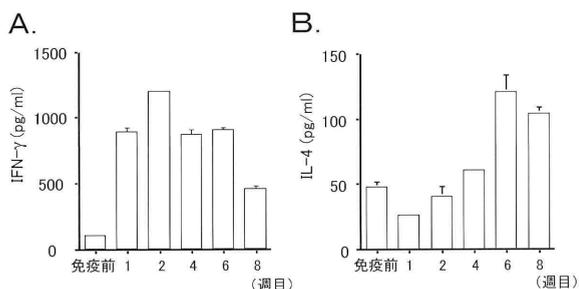


図 7 EAU における Th1、Th2 サイトカインの経時的推移

炎の発症に關与する Th1 細胞 (悪玉細胞) の抑制、3) ぶどう膜網膜炎を抑制する制御性 T 細胞 (善玉細胞) の活性化という 3つのアプローチをテーマに EAU の発症に対する抑制実験を行った。

1) 免疫抑制薬 (タクロリムス: FK506) の硝子体内投与

タクロリムスは、その作用機序として T 細胞の細胞質内に存在する FK 結合蛋白質 (FK binding protein、FKBP) と結合し、FK506-FKBP 結合体が T 細胞の核内で IL-2 産生に關する mRNA の発現を制御し、その結果 T 細胞の機能が抑制されるといわれている⁴³⁾⁴⁴⁾。臓器移植における拒絶反応の抑制や種々の自己免疫疾患の治療に幅広く使用され、EAU に対する抑制効果についても報告されている⁴⁵⁾⁴⁶⁾。しかし、日本で行われた難治性ぶどう膜炎に対するタクロリムスの治験では、腎機能障害や神経症状、胃腸症状などの副作用の発現頻度が高く、未だヒトぶどう膜炎に臨床応用するには至っていない⁴⁷⁾。このようなタクロリムスの全身的な副作用をできる限り回避し、眼局所的に抗炎症効果を誘導する試案として、強膜内にタクロリムス徐放用プラグの留置実験が報告され、結核菌の免疫で誘

発される家兎ぶどう膜炎が抑制された⁴⁸⁾。我々もまた、牛血清アルブミン (BSA) で免疫し、硝子体に BSA を注入することにより誘発した家兎の実験的ぶどう膜炎が、タクロリムスの硝子体内投与で眼内組織に影響を与えず抑制されることを認めた⁴⁹⁾。これらの結果を踏まえ、上記のようなぶどう膜炎だけではなく、網膜に強い炎症所見を呈する EAU においてもタ

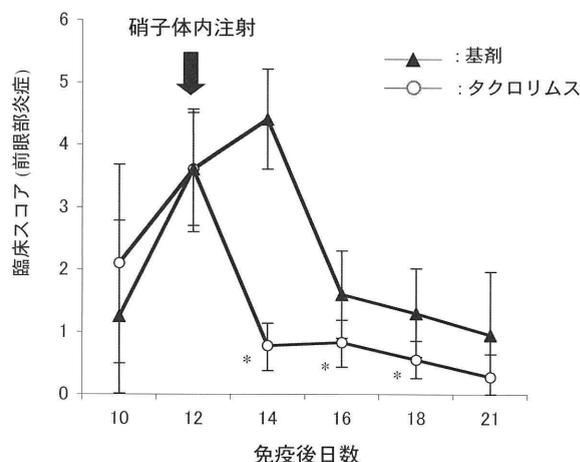
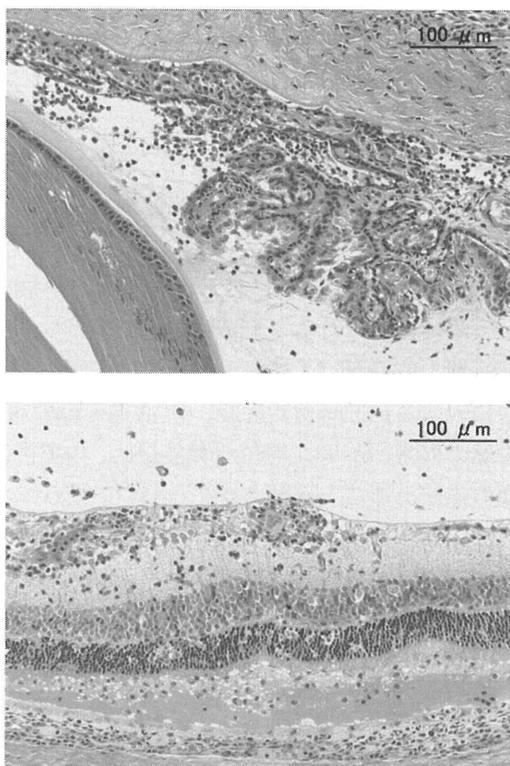


図8 タクロリムス硝子体内投与ラットのEAU前眼部臨床スコアの経時的変化

基剤投与群



タクロリムス投与群

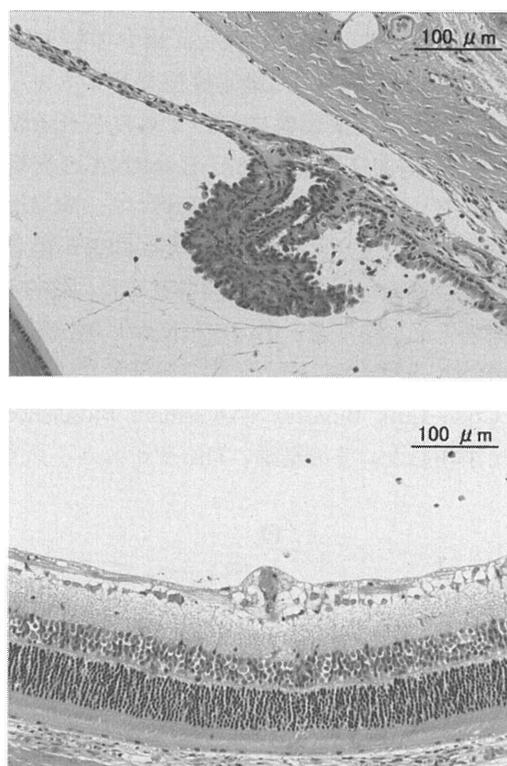


図9 タクロリムス硝子体内投与後ラットEAUの病理組織像 (A: 左上下段は基剤投与群、B: 右上下段はタクロリムス投与群) タクロリムス投与群において炎症所見が軽微であった。

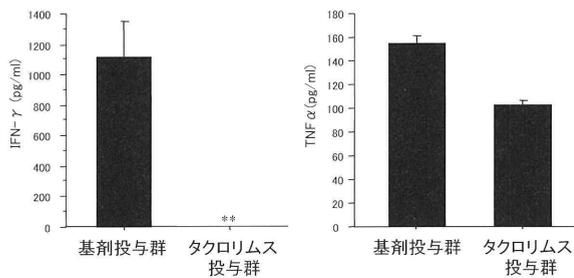


図10 タクロリムス硝子体内投与とラットの眼局所における炎症性サイトカイン産生。タクロリムス投与群ではIFN- γ もTNF- α も有意に産生抑制されていた。

クロリムスの硝子体内投与が有効であるか否かについて検討した⁵⁰⁾。Lewisラットの足底部にウシIRBPのR14⁵¹⁾ペプチド(ペプチドアミノ酸残基1169~1191位)0.2 μ gをCFAとともに免疫し、12日目にタクロリムス10 μ g/5 μ lを左眼の硝子体内に投与した。対照には基剤のみを投与した。細隙灯による前眼部炎症所見について比較したところ、免疫のみ、あるいは基剤を投与した群では瞳孔縁にフィブリンの析出、全周の虹彩後癒着を認めたが、タクロリムス硝子体内投与群ではフィブリンの析出はみられず、明らかな虹彩後癒着も認められなかった。さらにタクロリムス10 μ g投与群は基剤投与群と比べて前眼部炎症スコアが有意に低値であった(図8)。免疫後14日目のEAU病理組織学的所見においても、基剤投与群では前眼部、後眼部ともに炎症性細胞の著明な浸潤や網膜血管炎、網膜視細胞層の著しい破壊が観察されたが、タクロリムス投与群では炎症性細胞の浸潤は軽微であり、網膜の層構造は保たれ、有意な病理組織スコアの軽減がみられた(図9)。タクロリムス非投与眼の右眼は、免疫のみの群と同様の炎症を呈し、EAUの抑制はみられなかった。次に、免疫後14日目の摘出眼球から水晶体を除去し、眼内の炎症性サイトカイン、IFN- γ およびTNF- α をELISA法にて測定したところ、基剤投与眼と比較してタクロリムス投与眼ではIFN- γ 、TNF- α ともに有意に低値であった(図10)。また、タクロリムス投与眼と対照眼の網膜からRNAを抽出し、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子解析を行ったところ、タクロリムス投与眼では対照眼に比較してIL-1受容体タイプ1、iNOS、IL-6などの炎症関連遺伝子は軒並み減少し、NF-kappaB抑制分子やFKBPなどの炎症抑制遺伝子は増加していた(表1)。さらに、R14免疫後12日目にタクロリムスおよび基剤を硝子体内投与後、R14(1mg/20ml/rat)をラットの耳介皮下

表1 FK506硝子体内注入後の遺伝子発現(網膜)の変動

炎症関連遺伝子(発現比)	FK506	Rinderon [®]
IL-1受容体タイプ1	0.01 ↓	ND
iNOS(NO産生酵素)	0.21 ↓	ND
IL-6	0.23 ↓	ND
RANTES	0.31 ↓	0.21 ↓
CD3 antigen(T細胞発現分子)	0.32 ↓	0.40 ↓
CCR7(抗原提示細胞発現分子)	0.35 ↓	ND
IL-1	0.46 ↓	0.40 ↓
Inhibitor of kappa B alpha(NF-kappa B抑制分子)	3.40 ↑	ND
FK結合蛋白質(FKBP)	3.01 ↑	ND

ND: 検出限界値以下

に接種し、その48時間後に遅延型過敏反応を測定することにより、タクロリムス硝子体内投与による全身免疫系への影響についても検討したところ、タクロリムス硝子体内投与群においてはR14に対する遅延型過敏反応がみられ、基剤投与群との間に有意差はみられなかった。以上の結果から、タクロリムスの硝子体内投与は全身の免疫系を抑制せず、眼局所の炎症性サイトカインの産生を制御することによりEAUを軽症化すると考えられた。

2) ぶどう膜網膜炎の発症に関与するTh1細胞(悪玉細胞)の抑制

Th細胞は抗原提示細胞との相互作用によりTh1またはTh2細胞に分化するが、その分化を制御する因子として抗原提示細胞から産生されるサイトカインが知られているので、サイトカインによるEAUの制御について述べる。

IL-12は樹状細胞、マクロファージから産生されるサイトカインであり、その産生はIFN- γ の刺激により促進され、Th1細胞分化を誘導することが知られている⁵²⁾⁵³⁾。EAUの発症を惹起するT細胞はTh1タイプであることから³⁹⁻⁴¹⁾、IL-12の作用を阻害する中和抗体を投与することによりIRBPの免疫によるEAUの発症を抑制できるか否かについて検討を行った。B10.AマウスにIRBPを強化免疫し、同時に抗IL-12抗体を1mg投与し、30日後にEAUの発症を観察した。その結果、抗IL-12抗体を投与しなかったコントロール群のマウスでは、IRBPの免疫により13匹中9匹(69%)にEAUの発症が病理組織学的にみられたのに対して、抗IL-12抗体投与群では12匹0匹(0%)とEAUの発症は完全に抑制されていた(表2)⁵⁴⁾。ま

表 2 抗 IL-12 抗体投与による EAU の抑制 (文献 54 より許可を得て改変、転載)

	コントロール群	抗 IL-12 抗体投与
発症率	9/13*	0/12

*EAU 発症数/IRBP 免疫数

表 3 IRBP 刺激に対する抗 IL-12 抗体投与マウス脾臓 T 細胞のサイトカイン産生 (文献 54 より許可を得て改変、転載)

pg/ml	Th1		Th2	
	IL-2	IFN- γ	IL-4	IL-5
コントロール群	306.5	341.9	< 50	39.0
抗 IL-12 抗体投与群	33.0	< 10	< 50	195.9

た、IRBP の刺激に対する T 細胞の産生サイトカインを測定したところ、抗 IL-12 抗体投与群ではコントロール群と比較して、Th1 サイトカインである IL-2、IFN- γ 産生が低下し、Th2 サイトカインである IL-5 産生が増加していた (表 3)。この結果から、抗 IL-12 抗体の投与により、IRBP 反応性 Th 細胞が Th1 細胞優位の状態から Th2 細胞優位に生体内でシフトし、EAU の発症が抑制されたと考えられた⁵⁴⁾。

3) ぶどう膜網膜炎を抑制する制御性細胞 (善玉細胞) の活性化

免疫系は、生体を侵襲しようとする様々なウイルス、細菌、異物を認識し、排除する一方、自己の組織に対してはその免疫応答を“負”に制御するメカニズムにより、生体の恒常性が維持されている。ある種の T 細胞にはこのように免疫応答を負に制御する機能があり、制御性 T 細胞と名付けられ、これまでに数種の制御性 T 細胞が報告されている。その中でも特に注目されているものに CD25⁺CD4⁺ 制御性 T 細胞 (CD25⁺ 制御性 T 細胞) がある⁵⁵⁾⁵⁶⁾。CD25 とは IL-2 受容体 α 鎖のことであり、通常の T 細胞は活性化されたときのみ IL-2 受容体を発現するのに対して、この制御性 T 細胞は恒常的に IL-2 受容体 α 鎖を発現し、マウス末梢血 Th 細胞全体の 5~10% を占めるといわれている。ヒトの末梢血中においても類似した制御性 T 細胞の存在が報告され⁵⁷⁾⁵⁸⁾、自己反応性 T 細胞と接触することにより抑制作用を表すとされている。一型糖尿病、多発性硬化症ではその機能異常が報告されている⁵⁹⁾⁶⁰⁾。

一般に、CD25⁺ 制御性 T 細胞は胸腺で成熟し、生後 3 日目から末梢に出現するので⁶¹⁾、実験では B6A

表 4 CD25⁺ 制御性 T 細胞除去マウスにおける臓器特異的自己免疫病の発症率 (文献 62 より改変)

マウス(数)	自己免疫病を発症したマウス数 (%)				
	胃炎	涙腺炎	甲状腺炎	ぶどう膜網膜炎	前立腺炎
胸腺摘出マウス (25)	2 (8.0)	21 (84.0)	0	0	18 (72.0)
CD25 ⁺ 制御性 T 細胞除去マウス (30)	20 (66.7)	30 (100)	4 (13.3)	6 (20.0)	30 (100)

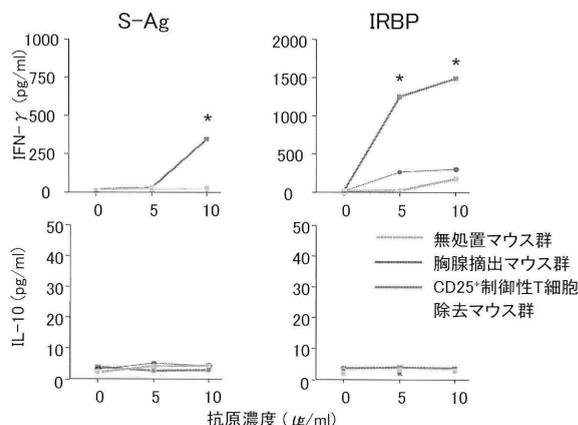


図 11 CD25⁺ 制御性 T 細胞除去マウスにおける T 細胞の S 抗原、IRBP 刺激に対する IFN- γ 、IL-10 産生能

(C57BL/6 \times A/J) マウスの胸腺を生後 3 日目に摘出し、抗 CD25 抗体投与によりさらにマウス生体内の CD25⁺ 制御性 T 細胞を除去した。その結果、甲状腺炎、胃炎、精巣炎、卵巣炎の発症に加え、ぶどう膜網膜炎の発症が認められた (表 4)⁶²⁾。また、このぶどう膜網膜炎を発症した CD25⁺ 制御性 T 細胞除去マウスでは、その血清中に抗網膜抗原抗体がみられ、その T 細胞は S 抗原および IRBP の刺激によって増殖や IFN- γ 産生をすることが示された (図 11)⁶²⁾。そこで、生体内の CD25⁺ 制御性 T 細胞を移入し増やすことにより EAU の発症をその活動期で抑制できるか否かを検討した。

ヒト IRBP を C57BL/6 マウスに免疫した後、7 日目に無処置の正常マウスの脾臓から採取した CD25⁺ 制御性 T 細胞を静脈内投与し、15 日目、18 日目、21 日目に眼底検査を行った。免疫のみ、または CD25⁺ 制御性 T 細胞以外の CD25⁻ T 細胞を投与されたマウス群と比較して、CD25⁺ 制御性 T 細胞を投与されたマウス群では EAU の有意な抑制効果が検眼鏡的に全ての観察日で認められた (図 12)。また、免疫後 21 日目にマウスを屠殺し、EAU の重症度を病理組織学的に評価したところ、検眼鏡所見の結果と同様に、CD25⁺ 制御

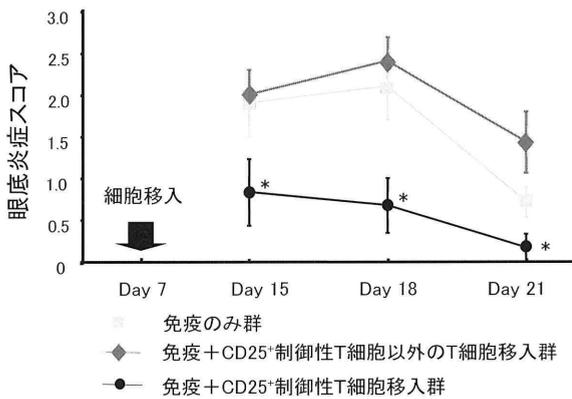


図 12 CD25⁺ 制御性 T 細胞移入後のEAU眼底スコアの推移

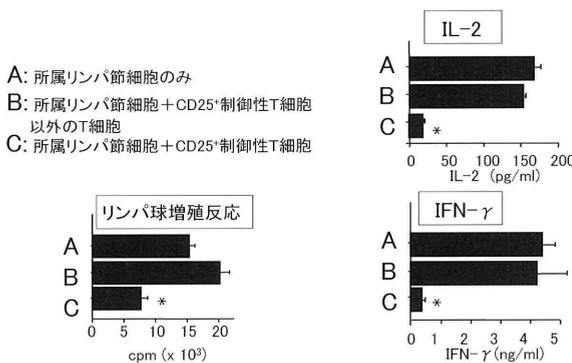


図 13 CD25⁺ 制御性 T 細胞存在下におけるリンパ球増殖反応と Th1 サイトカイン産生 (CD25⁺ 制御性 T 細胞と共培養するとリンパ球増殖反応、サイトカインの産生は有意に抑制された)

性 T 細胞投与群においてEAU発症率の低下、有意な炎症スコアの減少がみられた。

次に、CD25⁺ 制御性 T 細胞がすでに活性化したヒト IRBP 反応性 T 細胞の増殖、および Th1 サイトカイン産生を抑制できるか否かについて in vitro で検討を行った。まず、ヒト IRBP で免疫後、14 日目に所属リンパ節である頸部リンパ節を採取し、ヒト IRBP の刺激下で無処置のマウスの CD25⁻ T 細胞または CD25⁺ 制御性 T 細胞とともに共培養した。CD25⁺ 制御性 T 細胞と共培養した群では T 細胞増殖反応は有意に抑制され、Th1 サイトカインである IL-2 および IFN- γ 産生も著明に低下していた(図 13)。これらの結果から、CD25⁺ 制御性 T 細胞はすでに活性化している網膜抗原特異的 T 細胞に作用し、EAU をその活動期で抑制できることが示された。

V. おわりに

約半世紀をかけてヒトぶどう膜炎の動物モデルと

して、網膜抗原の免疫によるEAUが確立され、これを用いてぶどう膜網膜炎の病態が実験的に検証されている。EAUは全身症状を欠くもののヒトぶどう膜炎のなかではベーチェット病の網膜ぶどう膜炎に極めて似ており、いくつかの病態や免疫反応にも類似性の存在が認められてきた。今なお原因や発症機序が不明で、かつ種々のヒトぶどう膜網膜炎のなかで最も失明する頻度が高いベーチェット病を解明し、克服する治療法を発見あるいは開発するには、今後も積み重ねられるEAUに対する基礎研究がトランスレーショナルリサーチとして臨床でも十分検討されることを期待してやまない。

(稿を終わるにあたり、本論文の作製にご協力いただいた順天堂大学医学部免疫学教室の奥村康教授、秋葉久弥講師、聖マリアンナ大学難病研究所所長の西岡久寿樹教授、加藤智啓助教授、日本赤十字社医療センター増田寛治郎院長、そして東京医科大学免疫学教室の水口純一郎主任教授、高田栄子講師、病理学教室黒田雅彦助教授に心から感謝し御礼を申し上げます。また、教室のぶどう膜炎研究班の諸先生と本特別講演の作成に参加し、実験および指導をした坂井潤一、後藤浩、田中孝男、竹内大、毛塚剛司、横井秀俊、藤盛圭太、慶野博、鈴木潤、塚原林太郎、大谷壮士、白井嘉彦、竹内礼、服部貴明、大井圭子、奥貫陽子、山川直之の各氏に心から御礼を申し上げます。)

文 献

- Goto H, Mochizuki M, Kotake S, Usui M, Ohno S : Epidemiological survey of intraocular inflammation in Japan. *Jap J Ophthalmol* **51** : 41-44, 2007
- Elschnig A : Studien zur sympathischen Ophthalmia. *Albrecht von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* **76** : 509-546, 1910
- Collins Rc : Experimental studies on sympathetic ophthalmia. *Am J Ophthalmol* **32** : 1687-1699, 1949
- Wacker Wb, Lipton Mm : Experimental allergic uveitis: homologous retina as uveitogenic antigen. *Nature* **206** : 253-254, 1965
- De Kozak Y, Usui M, Faure Jp : Experimental autoimmune uveoretinitis. Ultrastructure of chorioretinal lesions induced in guinea pigs by immunization against the outer rods of the bovine retina. *Arch Ophtalmol (Paris)* **36** : 231-248, 1976
- De Kozak Y, Sakai J, Thillaye B, Faure Jp : S antigen-induced experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Curr Eye Res* **1** : 327-337, 1981
- Gery I, Wiggert B, Redmond Tm, Kuwabara T,

- Crawford Ma, Vistica Bp, et al: Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **27**: 1296-1300, 1986
- 8) 田中孝男、高野 繁、関 文治、後藤 浩、頼徳 治、白井正彦: 網膜 A 抗原による実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)について。日眼会誌 **91**: 145-150, 1987
 - 9) 高村健太郎、田中孝男、白井正彦、坂井潤一、野中茂久、Gery I, et al: 網膜 A 抗原と Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein (IRBP)との同一性について。日眼会誌 **91**: 827-832, 1987
 - 10) Vistica BP, Usui M, Kuwabara T, Wiggert B, Lee L, Redmond TM, Chader GJ, et al: IRBP from bovine retina is poorly uveitogenic in guinea pigs and is identical to A-antigen. *Curr Eye Res* **6**: 409-417, 1987
 - 11) Adamus G, Chan Cc: Experimental autoimmune uveitides: multiple antigens, diverse diseases. *Int Rev Immunol* **21**: 209-229, 2002
 - 12) 白井正彦: 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎の発症機序について。Interphotoreceptor retinoid-binding protein を抗原とした実験モデルを中心に。日眼会誌 **96**: 1580-1607, 1992
 - 13) Luna Jd, Chan Cc, Derevjani Nl, Mahlow J, Chiu C, Peng B, et al: Blood-retinal barrier (BRB) breakdown in experimental autoimmune uveoretinitis: comparison with vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1beta-mediated breakdown. *J Neurosci Res* **49**: 268-280, 1997
 - 14) Ohta K, Yamagami S, Wiggert B, Dana Mr, Streilein Jw: Chemokine gene expression in iris-ciliary body during experimental autoimmune uveoretinitis. *Curr Eye Res* **24**: 451-457, 2002
 - 15) Dick Ad, Forrester Jv, Liversidge J, Cope Ap: The role of tumour necrosis factor (TNF-alpha) in experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). *Prog Retin Eye Res* **23**: 617-637, 2004
 - 16) Cravens Pd, Lipsky Pe: Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. *Immunol Cell Biol* **80**: 497-505, 2002
 - 17) Yano A, Schwartz Rh, Paul We: Antigen presentation in the murine T-lymphocyte proliferative response. I. Requirement for genetic identity at the major histocompatibility complex. *J Exp Med* **146**: 828-843, 1977
 - 18) Glimcher Lh, Kim Kj, Green I, Paul We: Ia antigen-bearing B cell tumor lines can present protein antigen and alloantigen in a major histocompatibility complex-restricted fashion to antigen-reactive T cells. *J Exp Med* **155**: 445-459, 1982
 - 19) McAdam Aj, Schweitzer An, Sharpe Ah: The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Rev* **165**: 231-247, 1998
 - 20) Okada Aa, Keino H, Suzuki J, Sakai J, Usui M, Mizuguchi J: Kinetics of intraocular cytokines in the suppression of experimental autoimmune uveoretinitis by type I IFN. *Int Immunol* **10**: 1917-1922, 1998
 - 21) Jiang Hr, Lumsden L, Forrester Jv: Macrophages and dendritic cells in IRBP-induced experimental autoimmune uveoretinitis in B10RIII mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**: 3177-3185, 1999
 - 22) Hoey S, Grabowski Ps, Ralston Sh, Forrester Jv, Liversidge J: Nitric oxide accelerates the onset and increases the severity of experimental autoimmune uveoretinitis through an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol* **159**: 5132-5142, 1997
 - 23) Nussenblatt Rb, Kuwabara T, De Monasterio Fm, Wacker Wb: S-antigen uveitis in primates. A new model for human disease. *Arch Ophthalmol* **99**: 1090-1092, 1981
 - 24) Chan Cc, Mochizuki M, Palestine Ag, Benezra D, Gery I, Nussenblatt Rb: Kinetics of T-lymphocyte subsets in the eyes of Lewis rats with experimental autoimmune uveitis. *Cell Immunol* **96**: 430-434, 1985
 - 25) 土方 聡、坂井潤一、白井正彦、仙道富士郎: 抗好中球抗体による実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎の抑制。あたらしい眼科 **11**: 1291-1296, 1994
 - 26) Usui M, Matsushima T, Nakayama S, Takano S, Sakai J: Experimental autoimmune uveo-retinitis (EAU) in guineapigs following one injection of autologous retinal antigen (ARA). *International Congress of Ophthalmology* **23d**: 1048-1051, 1978
 - 27) 坂井潤一、関 文治、白井正彦: ヒト葡萄膜炎における網膜外節の免疫原性。日眼会誌 **83**: 1179-1190, 1979
 - 28) Sakai J, Seki F, Mitsuhashi M, Usui M: Leukocyte migration inhibition test (LMIT) in Behcet's disease with retinal soluble antigens. Third international symposium on the immunology and immunopathology of the eye: 294-297, 1985
 - 29) Okunuki Y, Usui Y, Takeuchi M, Kezuka T, Hattori T, Masuko K, et al: Proteomic surveillance of autoimmunity in Behcet's disease with uveitis: Selenium binding protein is a novel autoantigen in Behcet's disease. *Exp Eye Res* **84**: 823-831, 2007
 - 30) Yamamoto Jh, Minami M, Inaba G, Masuda K, Mochizuki M: Cellular autoimmunity to retinal specific antigens in patients with Behcet's disease. *Br J Ophthalmol* **77**: 584-589, 1993
 - 31) Lee Kh, Chung Hs, Kim Hs, Oh Sh, Ha Mk, Baik Jh, et al: Human alpha-enolase from endothelial cells as a target antigen of anti-endothelial cell antibody in Behcet's disease. *Arthritis Rheum* **48**: 2025-2035, 2003
 - 32) 嶋田孝吉、矢尾板英夫、鹿野信一: Behcet 病患者房水中の白血球遊走活性。日眼会誌 **75**: 2100-2105,

- 1971
- 33) Sakane T, Takeno M, Suzuki N, Inaba G: Behcet's disease. *N Engl J Med* **341**: 1284-1291, 1999
- 34) 浅越康助, 笹田昌孝: 病態形成と好中球機能異常。リウマチ科 **17**: 578-581, 1997
- 35) 下山義博, 丘野光洋, 永渕裕子, 鈴木 登, 坂根剛: ペーチェット病患者好中球における自発的サイトカイン産生。炎症 **20**: 157-164, 2000
- 36) Sonoda Kh, Inaba S, Ariyama A, Kawano Yi, Saniabadi A, Ishibashi T: Therapeutic neutrophil apheresis in patients with ocular Behcet disease. *Arch Ophthalmol* **123**: 267-269, 2005
- 37) Takeuchi M, Yokoi H, Tsukahara R, Sakai J, Usui M: Differentiation of Th1 and Th2 cells in lymph nodes and spleens of mice during experimental autoimmune uveoretinitis. *Jpn J Ophthalmol* **45**: 463-469, 2001
- 38) Cherwinski Hm, Schumacher Jh, Brown Kd, Mosmann Tr: Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med* **166**: 1229-1244, 1987
- 39) Caspi Rr, Silver Pb, Chan Cc, Sun B, Agarwal Rk, Wells J, et al: Genetic susceptibility to experimental autoimmune uveoretinitis in the rat is associated with an elevated Th1 response. *J Immunol* **157**: 2668-2675, 1996
- 40) Tarrant Tk, Silver Pb, Chan Cc, Wiggert B, Caspi Rr: Endogenous IL-12 is required for induction and expression of experimental autoimmune uveitis. *J Immunol* **161**: 122-127, 1998
- 41) Sun B, Rizzo Lv, Sun Sh, Chan Cc, Wiggert B, Wilder Rl, et al: Genetic susceptibility to experimental autoimmune uveitis involves more than a predisposition to generate a T helper-1-like or a T helper-2-like response. *J Immunol* **159**: 1004-1011, 1997
- 42) Keino H, Takeuchi M, Kezuka T, Yamakawa N, Tsukahara R, Usui M: Chemokine and chemokine receptor expression during experimental autoimmune uveoretinitis in mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **241**: 111-115, 2003
- 43) Sawada S, Suzuki G, Kawase Y, Takaku F: Novel immunosuppressive agent, FK506. In vitro effects on the cloned T cell activation. *J Immunol* **139**: 1797-1803, 1987
- 44) Hatanaka H, Kino T, Asano M, Goto T, Tanaka H, Okuhara M: FK-506 related compounds produced by *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993. *J Antibiot* **42**: 620-622, 1989
- 45) Starzl Te, Todo S, Fung J, Demetris Aj, Venkatar-
amman R, Jain A: FK 506 for liver, kidney, and
pancreas transplantation. *Lancet* **2**: 1000-1004,
1989
- 46) Kawashima H, Fujino Y, Mochizuki M: Effects of
a new immunosuppressive agent, FK506, on experi-
mental autoimmune uveoretinitis in rats. *Invest*
Ophthalmol Vis Sci **29**: 1265-1271, 1988
- 47) Mochizuki M, Masuda K, Sakane T, Inaba G, Ito K,
Kogure M, et al: A multicenter clinical open trial of
FK 506 in refractory uveitis, including Behcet's
disease. Japanese FK 506 Study Group on Refrac-
tory Uveitis. *Transplant Proc* **23**: 3343-3346, 1991
- 48) Sakurai E, Nozaki M, Okabe K, Kunou N, Kimura
H, Ogura Y: Scleral plug of biodegradable poly-
mers containing tacrolimus (FK506) for experimen-
tal uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**: 4845-
4852, 2003
- 49) Ishikawa T, Hokama H, Katagiri Y, Goto H, Usui
M: Effects of intravitreal injection of tacrolimus
(FK506) in experimental uveitis. *Curr Eye Res* **30**:
93-101, 2005
- 50) Oh-i K, Keino H, Goto H, Yamakawa N, Murase
K, Usui Y, et al: Intravitreal injection of
Tacrolimus(FK506) suppresses ongoing experimen-
tal autoimmune uveoretinitis in Rats. *Br J Ophth-
almol* **91**: 237-242, 2007
- 51) Sanui H, Redmond Tm, Kotake S, Wiggert B, Hu
Lh, Margalit H, et al: Identification of an im-
munodominant and highly immunopathogenic
determinant in the retinal interphotoreceptor
retinoid-binding protein (IRBP). *J Exp Med* **169**:
1947-1960, 1989
- 52) Ma X, Trinchieri G: Regulation of interleukin-12
production in antigen-presenting cells. *Adv Im-
munol* **79**: 55-92, 2001
- 53) Moser M, Murphy Km: Dendritic cell regulation of
TH1-TH2 development. *Nat Immunol* **1**: 199-
205, 2000
- 54) Yokoi H, Kato K, Kezuka T, Sakai J, Usui M,
Yagita H, et al: Prevention of experimental autoim-
mune uveoretinitis by monoclonal antibody to
interleukin-12. *Eur J Immunol* **27**: 641-646, 1997
- 55) Sakaguchi S: Naturally arising Foxp3-expressing
CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological
tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* **6**:
345-352, 2005
- 56) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda
M: Immunologic self-tolerance maintained by
activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-
chains (CD25). Breakdown of a single mechanism
of self-tolerance causes various autoimmune diseases.
J Immunol **155**: 1151-1164, 1995
- 57) Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T,
Schuler G: Ex Vivo Isolation and Characterization
of CD4⁺CD25⁺ T Cells with Regulatory Properties
from Human Blood. *J Exp Med* **193**: 1303-1310,
2001
- 58) Baecher-Allan C, Brown Ja, Freeman Gj, Hafler Da:
CD4⁺CD25^{high} Regulatory Cells in Human Periph-

- eral Blood. *J Immunol* **167**: 1245-1253, 2001
- 59) Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, et al: Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* **109**: 131-140, 2002
- 60) Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HI, Hafler Da: Loss of Functional Suppression by CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis. *J Exp Med* **199**: 971-979, 2004
- 61) Bagavant H, Thompson C, Ohno K, Setiady Y, Tung Ks: Differential effect of neonatal thymectomy on systemic and organ-specific autoimmune disease. *Int Immunol* **14**: 1397-1406, 2002
- 62) Takeuchi M, Keino H, Kezuka T, Usui M, Taguchi O: Immune responses to retinal self-antigens in CD25(+)CD4(+) regulatory T-cell-depleted mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**: 1879-1886, 2004