



Title	Neutrophil Chemotaxis and Local Expression of Interleukin-10 in the Tolerance of Endotoxin-Induced Uveitis
Author(s)	真下, 永
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49805">https://hdl.handle.net/11094/49805</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	眞下 永
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学 位 記 番 号	第 22794 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 21 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学 位 論 文 名	Neutrophil Chemotaxis and Local Expression of Interleukin-10 in the Tolerance of Endotoxin-Induced Uveitis (エンドトキシン誘発ぶどう膜炎のトレランスにおける好中球の遊走能及びインターロイキン 10 の局所発現)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 田野 保雄 (副査) 教授 宮坂 昌之 教授 不二門 尚

### 論文内容の要旨

#### [ 目 的 ]

急性前部ぶどう膜炎 (AAU) やベーチェット病のような好中球主体のぶどう膜炎は、発作性に炎症を繰り返し重篤な視力障害を来し、治療にも難渋する疾患である。こうした疾患の発作間には寛解期が存在し、その間は炎症を生じない。これらのがぶどう膜炎の動物モデルであり、好中球主体のぶどう膜炎を生じるエンドトキシン誘発ぶどう膜炎モデル(EIU)は一度炎症を起こすとエンドトキシンによる再刺激に反応しない、一種の寛解期 (EIUトレランス) が存在することが知られている。臨床での寛解期の機序がEIUトレランスのメカニズムと共に通している可能性がある。*in vitro*ではマクロファージなどにおいてLPSトレランスの研究が行われているがEIUトレランスについては不明な点が多い。このメカニズムを解明するため、EIUトレランスの持続期間、眼局所におけるEIUトレランスに関わる因子の検索、およびEIUトレランスにおける好中球の機能について検討した。

#### [ 方法ならびに成績 ]

(実験1) 6週齢の雄のSDラットに1mg/kg のリポポリサッカライド (LPS) を後ろ足に皮下注射することでEIUトレランスを誘導した。対照群には生食を皮下注射した。注射後3, 7, 14, 28, 56, 72 日後に両群に対して再度同量のLPS を皮下注射し、その後24 時間に前房蛋白濃度及び前房細胞数を測定した。結果はEIUトレランス誘導群では対照群に比して前房蛋白濃度が56日、前房細胞数が28日まで有意に抑制されていた。

(実験2) EIUトレランス誘導後3, 7, 14, 28, 56, 84日後の虹彩毛様体組織における炎症惹起性の

サイトカイン(iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) 及び*in vitro*でLPSトレランスに関与すると報告されている因子 (IL-10, TGF $\beta$ , SHIP, SOCS-1, MyD88, TLR2, TLR4, TLR9) の遺伝子発現をリアルタイムPCR 法にて測定した。結果はIL-10のみ28日後まで連続で3倍以上の有意な発現上昇を認めた。IL-10がEIUトレランスに関与していることが示唆されたため、ELISAにて前房内IL-10蛋白濃度を経時的に測定したところ、EIUトレランス誘導7日後まで上昇を認めた。対照群では検出限界以下であった。さらにIL-10の分泌している細胞を特定するため、彩毛様体組織におけるIL-10の発現を免疫二重染色にて検討した。結果はEIUトレントラットの虹彩毛様体組織でIL-10を発現していたのは樹状細胞であり、マクロファージでは発現を認めなかった。対照群ではIL-10の発現を認めなかった。

(実験3) EIUトレントラットより採取した全血よりデキストランとFicoll溶液を用いて末梢血好中球を単離し、*in vitro*での遊走能をBoyden chamber変法にて測定したところ、対照群に比べ50%程度に抑制されていた。次に*in vivo*でのEIUトレントラットの好中球の遊走能を評価するため、EIUトレントラット (ドナー) から採取した末梢血好中球を予めLPSを投与し炎症を引き起こしたGFPラット (レシピエント) に移入し、6時間経過後に前房に浸潤してきた細胞を採取した。フローサイトメーターにて無蛍光の好中球を検出することによりドナー好中球を識別し、その割合を対照群のドナー好中球と比較したところ、EIUトレントラットの好中球の*in vivo*での遊走能は26%程度に抑制されていた。さらにEIUトレントラットの好中球に濃度を変えて、レコンビナントIL-10で処理したところ、*in vitro*の遊走能が濃度依存性に低下した。

#### [ 総括 ]

EIUトレランスは少なくとも誘導後1ヶ月は持続しており、その間、虹彩毛様体組織でIL-10の遺伝子発現が亢進している。EIUトレランス誘導には眼局所における樹状細胞によるIL-10の分泌、末梢血好中球遊走能の低下、およびこれらの相乗作用が重要な役割を果たしている。

#### 論文審査の結果の要旨

ベーチェット病や急性前部ぶどう膜炎は発作を繰り返す好中球主体の炎症性疾患である。発作間には緩解期が存在する。こうした疾患の動物モデルであるエンドトキシン誘発ぶどう膜炎モデル(EIU)においても緩解期が存在し、エンドトキシンによる再刺激に反応しない (EIUトレランス) ことが知られている。このモデルを用いて、炎症の緩解期のメカニズムへ関与する眼局所因子や好中球の遊走能の関与を検討した。EIUトレランスを誘導したラットの虹彩毛様体組織ではIL-10の遺伝子発現、蛋白発現の上昇を認め、IL-10を産生していたのはマクロファージではなく、樹状細胞であった。また、EIUトレランスにおいては末梢血好中球の遊走能は低下しており、IL-10により遊走能の低下がさらに促進された。これらの結果から眼局所でのIL-10の高発現と末梢血好中球の遊走能の低下がラットにおけるEIUトレランスのメカニズムにおいて重要な役割を持っていると考えられた。これらの結果がぶどう膜炎の寛解期を誘導する治療の開発の手がかりになる可能性があり、学位に値するものと認める。