

平成 16 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

アレルギー性結膜疾患における角膜線維芽細胞の役割

福田 憲

山口大学医学部眼病態学講座

要 約

春季カタルの角膜障害は、局所へ浸潤した好酸球に由来する蛋白質により角膜上皮が傷害されることによる。角膜線維芽細胞は、インターロイキン(IL)-4 や IL-13 などのヘルパーT(Th)2 サイトカインの刺激により多量の eotaxin を産生し、また細胞表面に vascular cell adhesion molecule-1 を発現することにより、角膜への好酸球浸潤を促進していることが推察された。角膜線維芽細胞には高親和性の IL-4 受容体複合体が存在し、IL-4 と IL-13 は受容体を共有していた。また、角膜線維芽細胞はサイトカインの刺激により Th2 細胞に特異的なケモカインである thymus-and activation-regulated chemokine(TARC) を産生した。皮膚線維芽細胞は角

膜線維芽細胞と同様の反応性を示したが、肺線維芽細胞は TARC を産生しなかった。これらの結果から、線維芽細胞の性質は臓器によって異なることが示唆された。角膜線維芽細胞は組織構築のためだけの細胞ではなく、眼アレルギー炎症の形成および増悪に積極的に関与している。春季カタルにおける角膜障害の新規治療薬を考える上で、角膜線維芽細胞の機能制御を視野に入れる必要がある。(日眼会誌 109 : 717-726, 2005)

キーワード：線維芽細胞, ケモカイン, 接着分子, 好酸球, 春季カタル

A Review

Role of Corneal Fibroblasts in the Pathogenesis of Ocular Allergic Diseases

Ken Fukuda

Department of Ocular Pathophysiology, Yamaguchi University School of Medicine

Abstract

The accumulation of eosinophils and the subsequent release and deposition of cytotoxic proteins by these cells are thought to play an important role in the development of corneal lesions in individuals with vernal keratoconjunctivitis (VKC). Stimulation of corneal fibroblasts with the T helper 2 (Th2)-type cytokines, interleukin (IL)-4 or IL-13, induces expression of both the chemokine eotaxin and vascular cell adhesion molecule-1, which together mediate eosinophil infiltration into the cornea. Corneal fibroblasts express a high-affinity receptor complex for IL-4 and IL-13, and their stimulation by these cytokines also induces expression of thymus-and activation-regulated chemokine (TARC), which is a potent chemoattractant for Th2 cells. Dermal fibroblasts, but not lung fibroblasts, also express

TARC, suggesting that corneal, dermal, and lung fibroblasts play different roles in the initiation of corresponding Th2 cell-mediated allergic conditions. Corneal fibroblasts thus not only maintain tissue structure but also contribute to the induction and amplification of ocular allergic inflammation. These observations suggest that the development of drugs that specifically inhibit the functions of corneal fibroblasts may provide a basis for new treatments for the corneal disorders associated with VKC.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 109 : 717-726, 2005)

Key words : Fibroblasts, Chemokines, Adhesion molecules, Eosinophil, Vernal keratoconjunctivitis

別刷請求先：755-8505 宇部市南小串 1-1-1 山口大学医学部眼病態学講座 福田 憲
(平成 17 年 3 月 18 日受付, 平成 17 年 6 月 6 日改訂受理)

Reprint requests to : Ken Fukuda, M. D. Department of Ocular Pathophysiology, Yamaguchi University School of Medicine, 1-1-1 Minami-Kogushi, Ube 755-8505, Japan E-mail : k.fukuda@yamaguchi-u.ac.jp

(Received March 18, 2005 and accepted in revised form June 6, 2005)

I 緒 言

アレルギー性結膜疾患には、アレルギー結膜炎、アトピー角結膜炎、春季カタルおよび巨大乳頭性結膜炎が含まれる。いずれの疾患も、その本態はI型アレルギー反応によって惹き起こされる炎症反応であるが、発現する臨床症状は大きく異なる。アレルギー性結膜疾患のうち春季カタルは結膜の増殖性変化と種々の角膜障害を伴う重症の慢性結膜炎であり、その病態の解明、治療法の開発などに多くの未解決な問題点が残されている¹⁾。アレルギー性眼疾患において結膜や眼脂、涙液中に好酸球が選択的に浸潤する(図1)。好酸球由来のmajor basic protein(MBP)などの細胞傷害性蛋白は上皮細胞に対して細胞毒性や創傷治癒阻害作用を持つ²⁾、MBPが角膜潰瘍部に沈着している³⁾、好酸球は角膜上皮基底膜を分解する蛋白分解酵素であるmatrix metalloproteinase(MMP)を分泌する⁴⁾、好酸球数と角膜障害の程度が相関する⁵⁾⁶⁾、などの観察により、現在では好酸球の眼局所への浸潤と活性化が角膜障害の原因とされている。

角膜には肥満細胞が存在しないため一次的なアレルギー反応は発生しないが、角膜は涙液を介して結膜組織と隣接しており、結膜で生じたアレルギー反応により結膜組織へ浸潤した炎症細胞やそこから放出されるサイトカイン、酵素などの生理活性物質の影響を受けやすい。これまでアレルギー性結膜疾患における角膜障害は、角膜組織に固有な上皮細胞や実質細胞(線維芽細胞)が結膜に浸潤した炎症細胞に由来する様々な因子によって一方的に攻撃をされることにより生じると考えられてきた。しかし近年、これらの角膜組織に固有の細胞が炎症反応により放出される種々の生理活性因子の刺激により活性化され、種々のサイトカイン、ケモカインやプロスタグランジンなどを産生し、また、細胞表面に接着分子を発現することで、effector細胞として炎症反応の増幅に積極的に関与していることが示されてきた。したがって、アレルギー性結膜疾患における角膜障害の病態では、角膜固有の細胞と種々の炎症細胞およびサイトカインなどの液性因子とのクロストークが重要な役割を果たしていると考えられる。我々は春季カタルにおける角膜への好酸球浸潤やアレルギー炎症そのものの増悪に、角膜実質に存在する線維芽細胞がどのように関わっているか、また、他臓器由来の線維芽細胞との性質の差異について検討を行ったので概説する。

II 角膜線維芽細胞によるケモカイン産生

近年、炎症細胞の炎症局所への選択的浸潤には組織を構成する上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などによるケモカイン(chemotactic cytokine, chemokine)の分泌と接着分子の発現が必須であることが明らかとなってきた。ケモカインとは白血球の走化性・活性化作用を示

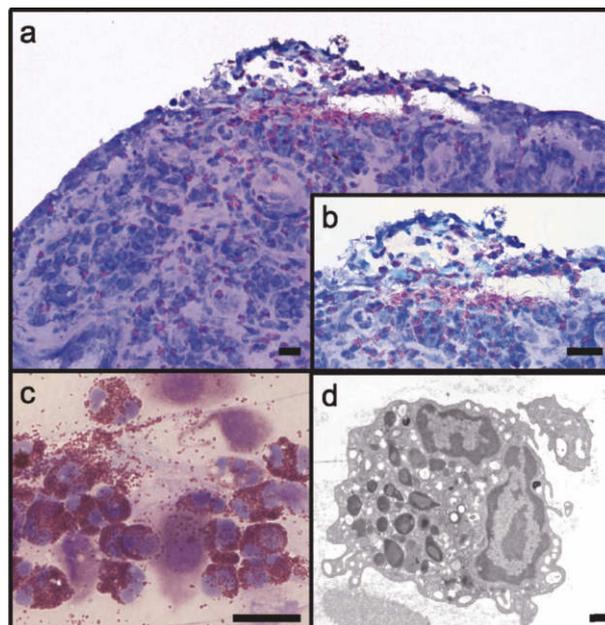


図1 春季カタルにおける好酸球浸潤。

春季カタルの巨大乳頭内には、多数の好酸球が認められ(a)、特に浸潤の強い部分では上皮が傷害され脱落し、涙液中へ好酸球が遊走している像が認められる(b、バーは20 μ m)。また、春季カタルの特徴である白色で粘質な眼脂には、多数の好酸球および好酸球より放出された顆粒とともに、傷害され脱落した上皮細胞が認められる(c:ハンセル染色、バーは20 μ m)。透過電子顕微鏡による観察では(d)、好酸球内に脱顆粒像(cytoplasmic vacuolization)が多く認められ、好酸球が活性化している(バーは1 μ m)。文献1より転載。

す類似した構造をもつ蛋白質の総称である。現在までに約55種類余りのケモカインが同定されている。一方、それぞれのケモカインに対応した白血球上のケモカイン受容体も現在までに約30種類が同定されている。白血球の種類により細胞表面に発現しているケモカイン受容体が異なるために、特定のケモカインが放出されることによって特定の白血球あるいは白血球分画の炎症局所への選択的な浸潤が誘導される。角膜障害を惹き起こす主要な要因である好酸球はケモカイン受容体のうちCCケモカイン受容体3(CCR3)を発現しており⁷⁾、このCCR3に対して特異的に活性を有するケモカインであるeotaxin(CCL11)により炎症局所に強く誘導される⁸⁾。Eotaxin以外にも好酸球に対して遊走活性を持つケモカインはregulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted(RANTES, CCL5)やmacrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α , CCL3)など幾つかあるが、eotaxinは好中球や単球などに対してはほとんど遊走活性を示さず、好酸球に対してのみ特異的に強力な遊走活性を持つという、他のケモカインにはない大きな特徴を持っている。好酸球性の炎症がみられるアレルギー性結膜疾患においても、春季カタルやアトピー角結膜炎患者の涙液のeotaxin濃度が、涙液中の好酸球数および

角膜上皮障害の程度と相関することが示され⁵⁾⁶⁾, 角膜への好酸球の浸潤およびそれに引き続いて起こる角膜障害の病態に eotaxin が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

我々は涙液中に分泌される eotaxin の起源を探る目的で, 角膜を構成する上皮細胞や線維芽細胞の eotaxin 産生能を検討した⁹⁾. これらの培養細胞を刺激するサイトカインとしては, 春季カタル患者の涙液において濃度が上昇していることが報告されている, proinflammatory サイトカインである腫瘍壊死因子(TNF)- α とヘルパー T(Th)2 サイトカインであるインターロイキン(IL)-4 および IL-13 を選択した¹⁰⁾¹¹⁾. 炎症局所において TNF- α は肥満細胞から, IL-4 および IL-13 は肥満細胞に加えて Th2 細胞から分泌されると考えられる. これらのサイトカインで刺激しても simian virus 40(SV 40)で不活化した角膜上皮細胞¹²⁾からは eotaxin の分泌はみられなかった. 一方, 角膜線維芽細胞はこれらのサイトカインの単独の刺激によって少量の eotaxin を産生し, さらに TNF- α と IL-4 あるいは IL-13 を同時に添加して培養することにより, eotaxin の産生は相乗的に促進された(図 2). これらの結果から, 角膜上皮細胞に比し, 角膜線維芽細胞の方が eotaxin の産生源としてより重要な役割を果たしていることが示された. 好酸球の顆粒蛋白による化学的な細胞傷害や巨大乳頭の隆起による物理的な刺激により, 角膜上皮のバリア機能が低下し, 角膜実質が涙液中のサイトカインに暴露され, 角膜線維芽細胞から eotaxin などの好酸球を遊走させるケモカインが多量に産生されると考えられる. 角膜線維芽細胞によって産生されたケモカインにより, さらに好酸球が角膜局所へ遊走し, 上皮障害がさらに進行して線維芽細胞が活性化され, 炎症が増悪するという悪循環に陥っていることが想定される.

III 角膜線維芽細胞による接着分子の発現

炎症局所へ炎症細胞が浸潤するためには, ケモカインだけでなく接着分子も重要な役割を果たしている. 血管内を流れている白血球が, 血管外へ移動し炎症細胞として局所の反応に参加するためには, 白血球が血管内皮細胞上でローリングした後に接着し, 内皮細胞の間隙を通り抜けて血管外へ移動する必要がある. さらに, 血管外へ遊走した白血球は組織を構成する細胞と接着することで炎症組織に留まり活性化される. この一連の炎症部位への白血球の浸潤および活性化に, 接着分子を介した白血球と血管内皮細胞や線維芽細胞などの組織構成細胞との接着が重要な役割を果たしている. この細胞接着は, 単に細胞の移動にかかわるだけでなく, 接着分子とリガンドを介した細胞情報伝達, 細胞活性化を惹起して, 炎症性疾患の発症・重症化に深く関与している. 好酸球は lymphocyte function associated antigen-1(LFA-1),

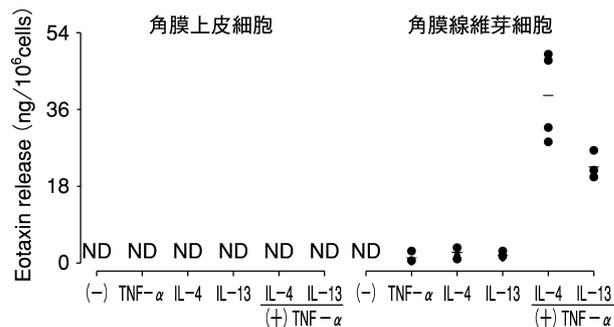


図 2 角膜上皮細胞および線維芽細胞による eotaxin 産生.

角膜上皮細胞は種々のサイトカインを添加して培養しても eotaxin を産生しない. 角膜線維芽細胞は腫瘍壊死因子(TNF)- α , インターロイキン(IL)-4 および IL-13 の添加により少量の eotaxin を産生する. また TNF- α と IL-4 あるいは IL-13 を同時に添加すると eotaxin の産生は相乗的に増加する. ●は各ドナー由来の細胞の 4 回の実験の平均値を示す. バーは 4 人のドナーの値の平均値を示す. ND: 検出限界以下. 文献 9 より転載, 一部改変.

macrophage antigen-1(Mac-1), very late antigen-4 (VLA-4)などの接着分子を有しているが, そのリガンドとしては免疫グロブリンスーパーファミリーに属する intercellular adhesion molecule 1(ICAM-1)や vascular cell adhesion molecule 1(VCAM-1)がある¹³⁾. 好酸球には *in vitro* での ICAM-1 や VCAM-1 によるシグナルにより, 顆粒蛋白の放出などの活性化や生存の延長が引き起こされることが知られている. ICAM-1 をリガンドとする LFA-1 や Mac-1 は好中球および好酸球に発現しているが, VCAM-1 をリガンドとする VLA-4 は好酸球のみに特異的に発現しており, アレルギー炎症における好酸球の選択的浸潤には VLA-4/VCAM-1 の経路がより重要であることが想定される. 実際に, マウスのアレルギー性喘息モデルにおいて, 好酸球は VLA-4/VCAM-1 結合依存性に組織に浸潤し, LFA-1/ICAM-1 結合は補足的に組織好酸球浸潤を制御していることが示されている¹⁴⁾. アレルギー性結膜炎の動物モデルにおいても, VLA-4 の中和抗体により結膜への好酸球の浸潤が抑制されることが報告¹⁵⁾されている. 好酸球がさらに角膜へと浸潤するためには, 血管から結膜実質を経て結膜上皮へと遊走した好酸球が涙液中へ移動し, 角膜において脱顆粒して角膜障害を生じると考えられる. 我々は角膜線維芽細胞から涙液中に産生・放出された eotaxin によって角膜局所へと遊走した好酸球が角膜に接着し活性化され, 脱顆粒するメカニズムを知る目的で, 培養角膜上皮細胞および線維芽細胞がこれらの接着分子(ICAM-1, VCAM-1)をどのようなサイトカインの刺激で発現するかを検討した¹⁶⁾¹⁷⁾. LFA-1 に対するリガンドである ICAM-1 は, 角膜上皮細胞・線維芽細胞ともに proinflammatory サイトカインである TNF- α の刺激により

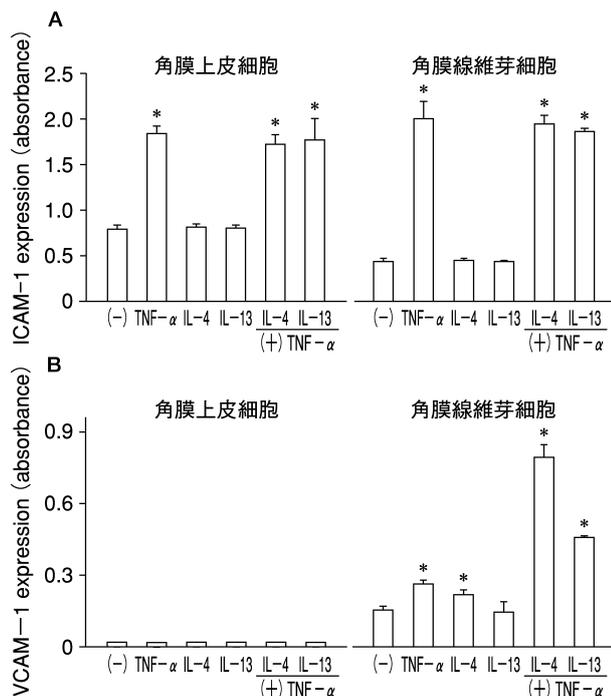


図3 角膜上皮細胞および線維芽細胞における接着分子の発現。

種々の炎症細胞に結合し得る intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) は角膜上皮細胞および線維芽細胞ともに TNF- α によって発現が誘導され、Th2 サイトカインの影響は受けない (A)。しかしながら、好酸球に特異性の高い vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) においては角膜上皮細胞には発現せず、角膜線維芽細胞では TNF- α と IL-4 あるいは IL-13 が同時に作用すると、発現が相乗的に促進される (B)。N=4, *p<0.05 (Dunnett's test)。

発現が亢進した (図3 A, B)。Th2 サイトカインである IL-4 や IL-13 の刺激では ICAM-1 の発現に影響はなかった。一方、VLA-4 に対するリガンドである VCAM-1 は、いずれのサイトカインで刺激しても角膜上皮細胞には発現しなかった (図3 C)。一方、角膜線維芽細胞では、TNF- α や Th2 サイトカインである IL-4 や IL-13 の刺激により VCAM-1 の発現が亢進し、さらに TNF- α と IL-4 あるいは IL-13 で同時に刺激すると、VCAM-1 の発現は相乗的に促進された (図3 D)。

これらの接着分子発現を制御しているサイトカインのうち、TNF- α などの proinflammatory サイトカインは炎症の種類によらず炎症局所での産生が亢進することが知られているが、IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカインはアレルギー炎症、寄生虫感染などの Th2 優位の炎症反応でのみ発現が亢進する。これらの実験結果から、角膜上皮細胞は、炎症のタイプによらず、TNF- α などの proinflammatory サイトカインが産生・放出されると種々の細胞の浸潤・活性化に関与する ICAM-1 を発現して生体防御に関与すると推定される。それに対し、角膜線維芽細胞は proinflammatory サイトカイン

のみならず、Th2 サイトカインに反応して、より好酸球に特異的な接着分子を発現することで炎症細胞の選択的浸潤に関与していることが示唆される。

IV 角膜線維芽細胞における IL-4/13 受容体の発現

前項に記載したように TNF- α や IL-4 および IL-13 による角膜線維芽細胞の活性化が眼アレルギー炎症の形成に関与していることが明らかとなった。一方、角膜線維芽細胞が TNF- α に対する受容体を発現することは示されていた¹⁸⁾が、IL-4、IL-13 の受容体の発現については不明であった。そこで、我々は角膜線維芽細胞のこれらのサイトカインの受容体の発現について検討した¹⁹⁾。IL-4 受容体複合体は、IL-4R α 、IL-13R α 1、IL-13R α 2 および IL-2 R γ c の4つの構成因子から成り、T細胞やB細胞などの炎症細胞や血管内皮細胞など種々の細胞によって、これらの構成因子の発現の組み合わせが異なっている²⁰⁾。図4に示すように、角膜線維芽細胞においてはこれら4つの因子のすべての発現が mRNA レベルおよび細胞表面の蛋白レベルで確認され、炎症細胞と同様の発現であった。また、実際に¹²⁵I 標識 IL-4 を用いて受容体結合実験を行った結果、角膜線維芽細胞には高親和性の IL-4 受容体が存在し、結合定数は約 10 pM で、結合部位数は細胞1個当たり約2万個であることが明らかとなった。また、¹²⁵I 標識 IL-4 の角膜線維芽細胞への結合は標識されていない過剰量の IL-4 のみならず IL-13 によっても阻害されることから、IL-4 と IL-13 は受容体を共有していることが推察された。IL-4 および IL-13 は角膜線維芽細胞へ作用し、転写因子である signal transducer and activator of transcription (STAT) 6 を活性化するが (図4 B)、その信号伝達の過程においては IL-4 R α が重要な役割を果たしている。なぜなら、IL-4 R α の中和抗体の添加により IL-4 あるいは IL-13 両者による角膜線維芽細胞の STAT 6 の活性化は生じず、また eotaxin の産生も抑制されるからである。また、IL-13 R α 1 を中和抗体により阻害すると、IL-13 による eotaxin の産生は抑制されるが、IL-13 R α 2 を阻害すると反対に eotaxin の産生は促進されることから、IL-13 R α 2 は他の炎症細胞と同様に decoy (おとり) 受容体として negative regulation に働いていると考えられる。

V 角膜線維芽細胞と他臓器由来の線維芽細胞の性質の差異

線維芽細胞は角膜のみならず全身の臓器に存在している。従来、線維芽細胞は組織構築を保つために、主に細胞外マトリックスの代謝をする単なる支持細胞であり、炎症が生じた場合は、線維芽細胞は微生物や炎症細胞により一方的に攻撃を受けると考えられていた。しかしな

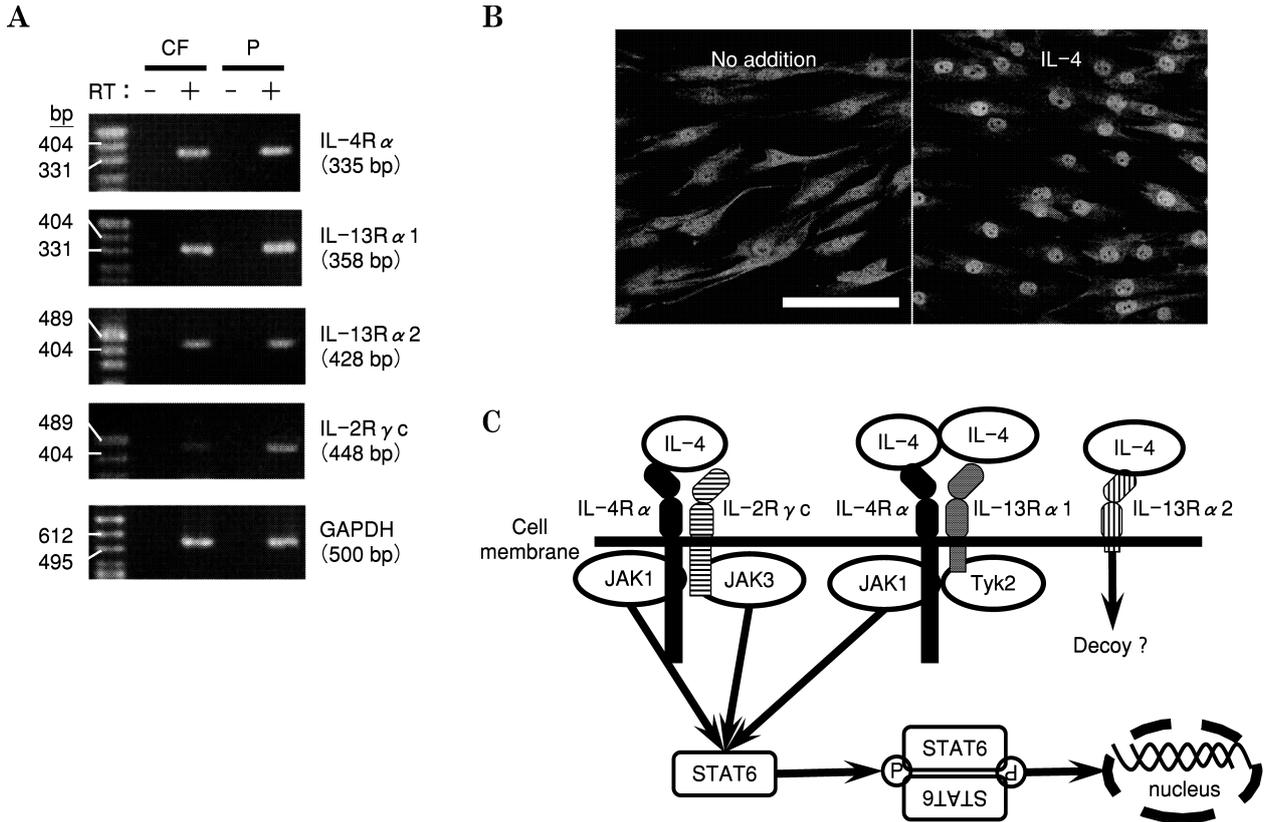


図 4 角膜線維芽細胞における IL-4 受容体の発現.

A ;角膜線維芽細胞(CF)には IL-4 受容体複合体を構成している IL-4 R α , IL-13 R α 1, IL-13 R α 2 および IL-2 R γ c などのすべての mRNA が発現している. P :陽性対照. B ;角膜線維芽細胞において細胞質に存在している signal transducer and activator of transcription(STAT)6 は, IL-4 の刺激によりリン酸化され細胞質から核内へ移動し DNA へ結合して, 種々の遺伝子発現を調節する. 文献 19 より転載, 一部改変. C ;角膜線維芽細胞上には少なくとも 3 種の IL-4 受容体複合体が発現していると考えられる. IL-4 R α と IL-13 R α 1 からなる受容体には IL-4 と IL-13 の両者が結合するが, IL-4 R α と IL-2 R γ c からなる受容体には IL-4 しか結合しない. また, IL-13 は IL-13 R α 2 にも結合するが, 細胞内にシグナルを伝えず decoy として働くと考えられている. 文献 44 より転載, 一部改変.

から近年, 種々の臓器の線維芽細胞は角膜線維芽細胞と同様に, 細胞外マトリックスの代謝のみに留まらず, 様々なサイトカインやケモカインなどの生体活性物質を発現することで, 種々の炎症細胞と相互に影響しあい, 炎症反応の増悪や遷延化に重要な役割を果たしていると考えられるようになってきた²¹⁾²²⁾.

また, 線維芽細胞はほとんどすべての組織の実質に存在する紡錘形の細胞であるが, そのすべてが同様の性質を持った均一の細胞集団ではないことも報告されてきている. 隣接する臓器であっても線維芽細胞のフェノタイプや機能が異なっていたり, 同じ組織内においてさえも異なったフェノタイプの線維芽細胞の集団が存在することや, 炎症などによる局所の微小環境の変化により線維芽細胞の性質が変化することが報告^{23)~28)}されてきている. さらに, これらの異なる組織由来の細胞の性質は, 継代培養しても長く保たれる²²⁾²⁹⁾³⁰⁾.

一方, アレルギー炎症は眼表面に特異的な疾患ではなく, 鼻粘膜や肺などの気道や皮膚などの様々な臓器にも

生じる. これらの臓器においても, 炎症の原因となる I 型アレルギー反応自体は, 免疫担当細胞により同様の機序で生じていると考えられるが, その炎症像や臨床症状の表現形は全く異なっている. 病態解明のために, 気道や皮膚由来の上皮細胞や線維芽細胞などの組織構成細胞を用いた研究が数多くなされているが, 同様の細胞種においても由来する臓器が異なるとその結果は必ずしも一致しない²⁴⁾²⁸⁾. したがって, 標的臓器の解剖学的な差異以外に, 存在する組織構成細胞の性質が異なっている可能性が考えられる.

我々は角膜の線維芽細胞が, 喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の標的臓器に存在する線維芽細胞と性質が同様に検討した³¹⁾. まず, 皮膚や肺においても好酸球の浸潤に重要な役割を果たしている eotaxin の産生について検討した. 皮膚および肺由来の線維芽細胞は角膜線維芽細胞と同様の反応性を示し(図 2), TNF- α , IL-4 および IL-13 の刺激により少量の eotaxin を産生し, さらに TNF- α と IL-4 あるいは IL-13 を同時に添

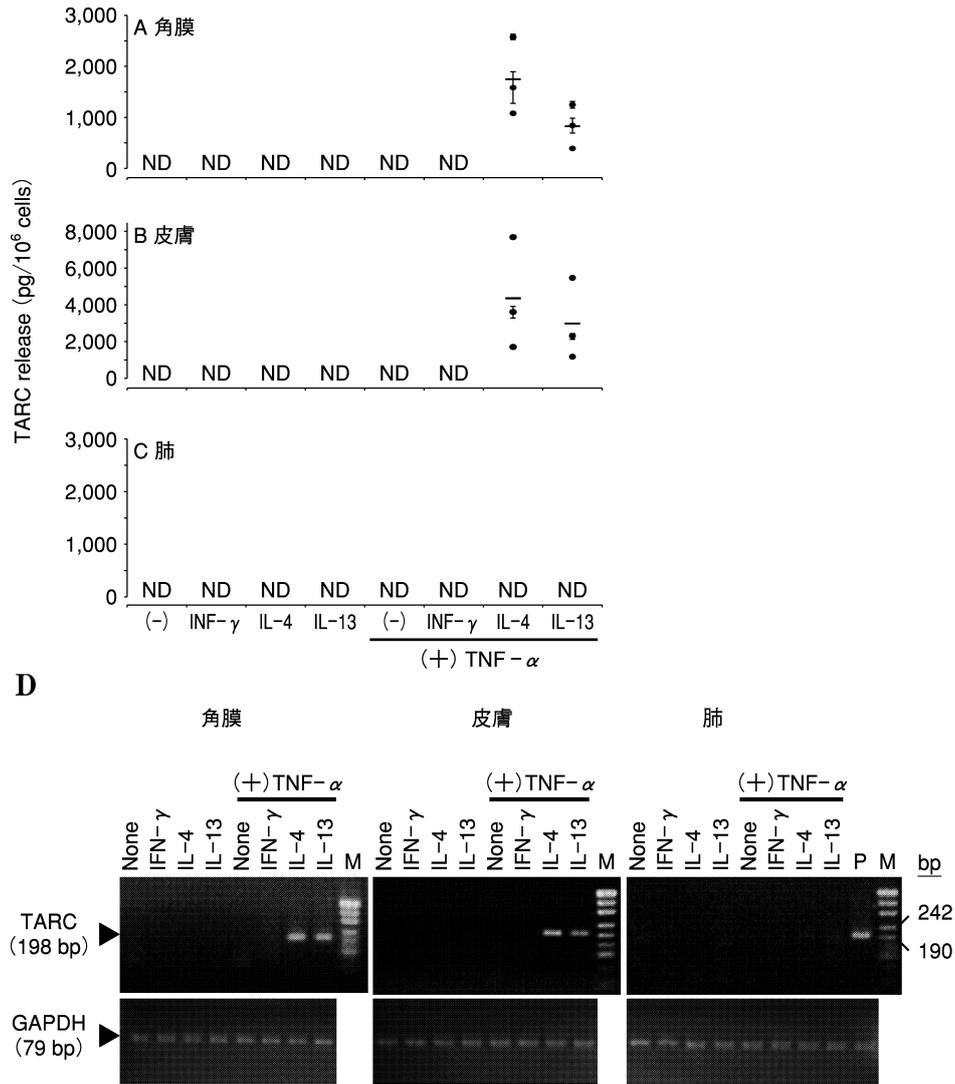


図 5 各臓器由来の線維芽細胞における TARC の産生。

角膜(A)および皮膚(B)由来の線維芽細胞は TNF- α と IL-4 あるいは IL-13 の同時刺激により多量の thymus- and activation-regulated chemokine(TARC)を産生するが、肺(C)由来の線維芽細胞はサイトカインによる刺激でも TARC を産生しない。ND: 検出限界以下。TARC mRNA も角膜および皮膚線維芽細胞では TNF- α と IL-4 あるいは IL-13 の同時刺激で誘導されるが、肺線維芽細胞では誘導されない(D)。●は各ドナー由来の細胞の4回の実験の平均値±標準誤差を示す。バーは3人のドナーの値の平均値を示す。P: 陽性対照。文献 31 より転載、一部改変。

加して培養することにより、eotaxin 産生は相乗的に増加した。次に、各臓器由来の線維芽細胞からの thymus- and activation-regulated chemokine(TARC, CCL 17) および macrophage-derived chemokine(MDC, CCL 22) の産生能を検討した³¹⁾³²⁾。TARC および MDC はいずれも CCR 4 を特異的な受容体とするケモカインであり、Th2 細胞に対する特異性が高く強力な遊走活性を持つ³³⁾³⁴⁾。前述のように、アレルギー性結膜疾患、喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患はいずれも Th2 優位な炎症であることが示されている^{35)~37)}。したがって、炎症局所において TARC や MDC を抑制することはアレルギー反応を惹き起こす根元的な細胞である Th2 細胞の浸潤の抑制につながり、それ以降のアレル

ギー炎症を抑制出来ると考えられる。実際に、喘息やアトピー性皮膚炎の動物モデルにおいても、TARC や MDC に対する中和抗体の投与により炎症反応の軽減や症状の改善が認められている³⁸⁾³⁹⁾。角膜、皮膚および肺由来の線維芽細胞いずれも、単独のサイトカインの添加においては、TARC の産生は認められなかった。しかしながら、TNF- α に IL-4 あるいは IL-13 を同時に添加して培養すると角膜線維芽細胞は多量の TARC を産生した(図 5 A)。TNF- α とインターフェロン(IFN)- γ を同時に添加して培養しても TARC の産生は認められなかった。また、皮膚由来の線維芽細胞も同様に TNF- α と IL-4 あるいは IL-13 の同時刺激により多量の TARC を産生した(図 5 B)。しかしながら、肺由来の線維芽細胞

胞においては、いずれのサイトカインを組み合わせても刺激しても TARC の産生は認められなかった(図 5 C)。TNF- α と IL-4 あるいは IL-13 の同時刺激による角膜および皮膚線維芽細胞の TARC の産生は、TNF- α 、IL-4 および IL-13 の濃度依存的に亢進したが、IL-4 は IL-13 に比しより強く TARC の産生を促進した。また、real-time PCR を用いた TARC mRNA の発現においても、蛋白レベルと同様の結果を示した。すなわち、角膜および皮膚線維芽細胞においてはサイトカイン単独の刺激においては TARC mRNA は検出されなかったが、TNF- α と IL-4 あるいは IL-13 の同時刺激により TARC mRNA の発現が検出された(図 5 D)。また、CCR 4 のもう一つのリガンドである MDC は、角膜、皮膚および肺由来の線維芽細胞いずれの細胞からも産生されなかった。文献的に、皮膚や肺由来の上皮細胞は、サイトカインの刺激に反応して TARC を産生することが報告⁴⁰⁾⁴¹⁾されている。一方、角膜においては、SV 40 で不死化した培養上皮細胞を用いて検討したところ、角膜上皮細胞は種々のサイトカインで刺激しても TARC は蛋白レベル、mRNA レベルともに発現が認められなかった。このように 3 つの臓器由来の上皮細胞、線維芽細胞の TARC 産生のパターンは異なっている。この上皮細胞と線維芽細胞との反応性の差異が、具体的にどのような意味を持っているのかは現時点では明確ではないが、アレルギー性炎症の臓器特異的な病態に関与している可能性が推察される。また、角膜においては、ケモカイン産生能は一般に上皮細胞では低く、線維芽細胞では高いという特異な性格を有しており、角膜線維芽細胞が炎症反応の形成により重要な役割を果たしていることを示すと同時に、他の臓器で得られた知見が必ずしも眼の病態に当てはまらないことも示している。

VI 線維芽細胞の制御の可能性

好中球に対して強い遊走活性を持つ IL-8 は、角膜上皮細胞および線維芽細胞いずれの細胞からも TNF- α などの proinflammatory サイトカイン単独の刺激により多量に放出されることが報告⁴²⁾されている。一方、好酸球に特異性の高い eotaxin は前述の通り、角膜上皮細胞からは全く産生されず、線維芽細胞においても proinflammatory サイトカインのみでは少量しか産生されないが、Th2 サイトカインである IL-4 や IL-13 が共存すると相乗的に産生量が増加する⁹⁾。また、接着分子の発現形式も、種々の炎症細胞に対して接着し得る ICAM-1 は角膜上皮細胞および線維芽細胞いずれの細胞からも TNF- α などの proinflammatory サイトカイン単独の刺激で発現され、好酸球の接着に特異的な VCAM-1 は proinflammatory サイトカインに加えて、Th2 サイトカインである IL-4 や IL-13 が共存した時に発現が上昇する¹⁶⁾¹⁷⁾。これらの事実を考え合わせると、角膜上皮細

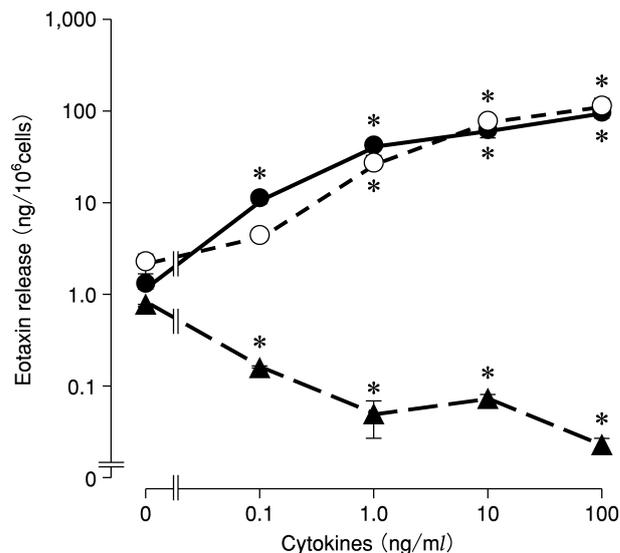


図 6 eotaxin 産生に対する IFN- γ (と IL-4, IL-13) の作用。

TNF- α に Th2 サイトカインである IL-4 (●) あるいは IL-13 (○) を加えると角膜線維芽細胞からの eotaxin の産生は相乗的に増加するのに対し、Th1 サイトカインであるインターフェロン(IFN)- γ (▲) を加えると、濃度依存的に eotaxin 産生は抑制される。N=4, *p<0.05 (Dunnett's test)。文献 9 および 43 より転載、一部改変

胞は炎症の性質によらず非特異的に反応するが、角膜線維芽細胞は Th2 型の炎症反応を認識し、Th2 型の炎症反応に応じたケモカインや接着分子を発現することで、好酸球、Th2 リンパ球などのアレルギー性結膜疾患に特徴的な炎症細胞の選択的な浸潤に関与していると考えられる。このことをさらに検討するために、我々は Th1 サイトカインである IFN- γ の角膜線維芽細胞による eotaxin 産生に対する作用を検討した⁴³⁾。IFN- γ は単独では、角膜線維芽細胞の eotaxin 産生に対して何ら影響しなかった。IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカインは前述のように TNF- α や IL-1 などの proinflammatory サイトカインによって誘導された eotaxin 産生を相乗的に促進するのに対し、IFN- γ は IL-4 とは全く反対の作用を示し、TNF- α や IL-1 誘導性の eotaxin 産生を強力に抑制した(図 6)。また、IFN- γ は、TNF- α と IL-4 の同時刺激により誘導される多量の eotaxin の産生をほぼ完全に抑制した。これらの結果は、個々のサイトカインの角膜線維芽細胞に対する作用が異なるということに留まらず、線維芽細胞自身が炎症反応が Th1 優位か Th2 優位かを識別し、ケモカインや接着分子の発現を変化させて浸潤細胞の選択に積極的に関与していることを示唆している。さらにこれらの結果は、角膜線維芽細胞を制御することにより角膜への好酸球の浸潤の抑制および、それに引き続いて起こる角膜障害の治療に応用出来る可能性を示唆している。また、Th2 サイトカイン

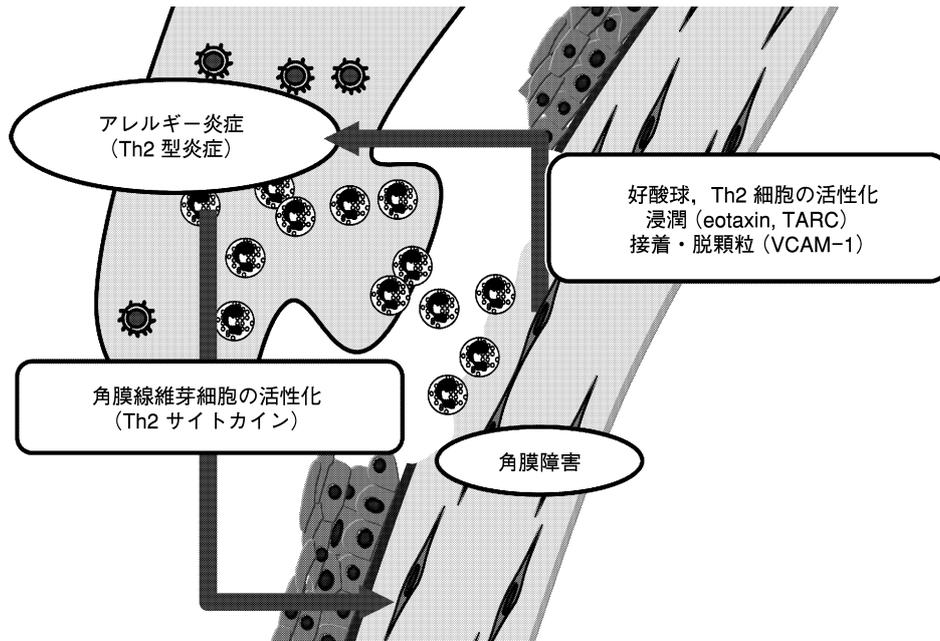


図 7 角膜線維芽細胞の眼アレルギー炎症への関与。

好酸球の顆粒蛋白による化学的な細胞障害や巨大乳頭の隆起による物理的な刺激により、角膜上皮のバリア機能が低下し、角膜線維芽細胞が結膜より放出された涙液中のサイトカインにより活性化される。活性化した角膜線維芽細胞が eotaxin や TARC などのケモカインや VCAM-1 などの接着分子を発現することで、好酸球、Th2 細胞を遊走・活性化し、炎症が増悪するという悪循環に陥っていることが想定される。

の信号伝達における角膜線維芽細胞の制御については、前述したように IL-4 $R\alpha$ の阻害により IL-4 および IL-13 両者の抑制が可能であると考えられる。

現在春季カタルの治療に用いられているステロイド剤は、角膜線維芽細胞からの eotaxin 産生や, ICAM-1 および VCAM-1 などの接着分子の発現を抑制する。これらの結果は、ステロイド剤が免疫担当細胞の抑制のみならず、角膜線維芽細胞に対しても直接作用してその機能を制御している可能性を示唆している。

VII 結 語

線維芽細胞は単に組織を構成しているだけでなく、種々のサイトカイン、特に Th2 サイトカインである IL-4 や IL-13 に反応して、アレルギー性炎症の形成および増悪に重要な役割を果たしている⁴⁴⁾(図 7)。また、角膜や皮膚と肺由来の線維芽細胞は、TARC の産生能が異なり、Th2 型のアレルギー炎症の形成においてこれらの細胞の役割が異なっている。さらに、種々の疾患において、炎症組織由来の線維芽細胞は健常組織由来の細胞に比し、性質が変化して活性化が起こりやすくなっていることが知られている。慢性の炎症性疾患である春季カタルにおいても、持続する炎症性サイトカイン、Th2 サイトカインの刺激により線維芽細胞の性質が変化している可能性が考えられる。しかしながら現時点では、*in vivo* において角膜および結膜の線維芽細胞が活性化しているかどうかの証明はされていない。今後は巨

大乳頭や角膜潰瘍部由来の線維芽細胞など、病変部由来の細胞と健常組織由来の細胞の性質や機能を *in vitro* で、また *in vivo* においても何らかのマーカを用いて比較検討することで、春季カタルの病態がさらに明らかとなることが推察される。将来的には、角膜の細胞の機能のみを特異的に抑制することによって、免疫抑制を起さずアレルギー炎症のみを治療できる選択性の高い薬剤の開発が必要であると考えられる。

稿を終えるに当たり、すべての研究にご指導、ご助言を賜りました山口大学分子感知医科学講座(眼科学)西田輝夫教授および熊谷直樹助教授に深謝いたします。また、多くの実験を一緒に行ってきた山口大学分子感知医科学講座(眼科学)および眼病態学講座の共同研究者の諸先生方ならびに技術補佐員の方々に感謝いたします。

文 献

- 1) Kumagai N, Fukuda K, Fujitsu Y, Seki K, Nishida T: Treatment of corneal lesions in individuals with vernal keratoconjunctivitis. *Allergol Int* 54: 51–59, 2005.
- 2) Trocmé SD, Gleich GJ, Kephart GM, Zieske JD: Eosinophil granule major basic protein inhibition of corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3051–3056, 1994.
- 3) Trocmé SD, Kephart GM, Bourne WM, Buckley RJ, Gleich GJ: Eosinophil granule major basic

- protein deposition in corneal ulcers associated with vernal keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 115 : 640—643, 1993.
- 4) **Kumagai N, Yamamoto K, Fukuda K, Nakamura Y, Fujitsu Y, Nuno Y, et al** : Active matrix metalloproteinases in the tear fluid of individuals with vernal keratoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 110 : 489—491, 2002.
 - 5) **Fukagawa K, Nakajima T, Tsubota K, Shimura S, Saito H, Hirai K** : Presence of eotaxin in tears of patients with atopic keratoconjunctivitis with severe corneal damage. *J Allergy Clin Immunol* 103 : 1220—1221, 1999.
 - 6) **Leonardi A, Jose PJ, Zhan H, Calder VL** : Tear and mucus eotaxin-1 and eotaxin-2 in allergic keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 110 : 487—492, 2003.
 - 7) **Heath H, Qin S, Rao P, Wu L, LaRosa G, Kassam N, et al** : Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR 3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J Clin Invest* 99 : 178—184, 1997.
 - 8) **Jose PJ, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Walsh DT, Moqbel R, Totty NF, et al** : Eotaxin : A potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med* 179 : 881—887, 1994.
 - 9) **Kumagai N, Fukuda K, Ishimura Y, Nishida T** : Synergistic induction of eotaxin expression in human keratocytes by TNF- α and IL-4 or IL-13. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 1448—1453, 2000.
 - 10) **Fujishima H, Takeuchi T, Shinozaki N, Saito I, Tsubota K** : Measurement of IL-4 in tears of patients with seasonal allergic conjunctivitis and vernal keratoconjunctivitis. *Clin Exp Immunol* 102 : 395—398, 1995.
 - 11) **Leonardi A, Brun P, Tavolato M, Plebani M, Abatangelo G, Secchi AG** : Tumor necrosis factor- α (TNF- α) in seasonal allergic conjunctivitis and vernal keratoconjunctivitis. *Eur J Ophthalmol* 13 : 606—610, 2003.
 - 12) **Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, et al** : An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 614—621, 1995.
 - 13) **Foster CA** : VCAM-1/ α 4-integrin adhesion pathway : therapeutic target for allergic inflammatory disorders. *J Allergy Clin Immunol* 98 : S 270—277, 1996.
 - 14) **Nakajima H, Sano H, Nishimura T, Yoshida S, Iwamoto I** : Role of vascular cell adhesion molecule 1/very late activation antigen 4 and intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function-associated antigen 1 interactions in antigen-induced eosinophil and T cell recruitment into the tissue. *J Exp Med* 179 : 1145—1154, 1994.
 - 15) **Ebihara N, Yokoyama T, Kimura T, Nakayasu K, Okumura K, Kanai A, et al** : Anti VLA-4 monoclonal antibody inhibits eosinophil infiltration in allergic conjunctivitis model of guinea pig. *Curr Eye Res* 19 : 20—25, 1999.
 - 16) **Kumagai N, Fukuda K, Fujitsu Y, Nishida T** : Expression of functional ICAM-1 on cultured human keratocytes induced by tumor necrosis factor- α . *Jpn J Ophthalmol* 47 : 134—141, 2003.
 - 17) **Kumagai N, Fukuda K, Fujitsu Y, Nishida T** : Synergistic effect of TNF- α and either IL-4 or IL-13 on VCAM-1 expression by cultured human corneal fibroblasts. *Cornea* 22 : 557—561, 2003.
 - 18) **Mohan RR, Mohan RR, Kim WJ, Wilson SE** : Modulation of TNF- α -induced apoptosis in corneal fibroblasts by transcription factor NF- κ B. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 1327—1336, 2000.
 - 19) **Fukuda K, Fujitsu Y, Kumagai N, Nishida T** : Characterization of the interleukin-4 receptor complex in human corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 183—188, 2002.
 - 20) **Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE** : The IL-4 receptor : Signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 17 : 701—738, 1999.
 - 21) **Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M** : Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol* 22 : 199—204, 2001.
 - 22) **Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP** : Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol* 151 : 317—322, 1997.
 - 23) **Komuro T** : Re-evaluation of fibroblasts and fibroblast-like cells. *Anat Embryol* 182 : 103—112, 1990.
 - 24) **Nonaka M, Pawankar R, Saji F, Yagi T** : Distinct expression of RANTES and GM-CSF by lipopolysaccharide in human nasal fibroblasts but not in other airway fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol* 119 : 314—321, 1999.
 - 25) **Phipps RP, Penney DP, Keng P, Silvera M, Harkins S, Derdak S** : Immune functions of subpopulations of lung fibroblasts. *Immunol Res* 9 : 275—286, 1990.
 - 26) **Sappino AP, Schürch W, Gabbiani G** : Differentiation repertoire of fibroblastic cells : Expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest* 63 : 144—161, 1990.
 - 27) **Schmitt-Gräff A, Desmoulière A, Gabbiani G** : Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features : An example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch* 425 : 3—24, 1994.
 - 28) **Xing Z, Jordana M, Braciak T, Ohtoshi T, Gauldie J** : Lipopolysaccharide induces expression of granulocyte/macrophage colony-stimu-

- lating factor, interleukin-8, and interleukin-6 in human nasal, but not lung, fibroblasts: Evidence for heterogeneity within the respiratory tract. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9 : 255–263, 1993.
- 29) **Brouty-Boyé D, Pottin-Clémenceau C, Doucet C, Jasmin C, Azzarone B**: Chemokines and CD 40 expression in human fibroblasts. *Eur J Immunol* 30 : 914–919, 2000.
- 30) **Hogaboam CM, Steinhauser ML, Chensue SW, Kunkel SL**: Novel roles for chemokines and fibroblasts in interstitial fibrosis. *Kidney Int* 54 : 2152–2159, 1998.
- 31) **Fukuda K, Fujitsu Y, Seki K, Kumagai N, Nishida T**: Differential expression of thymus- and activation-regulated chemokine (CCL 17) and macrophage-derived chemokine (CCL 22) by human fibroblasts from cornea, skin, and lung. *J Allergy Clin Immunol* 111 : 520–526, 2003.
- 32) **Kumagai N, Fukuda K, Nishida T**: Synergistic effect of TNF- α and IL-4 on the expression of thymus- and activation-regulated chemokine in human corneal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 279 : 1–5, 2000.
- 33) **Imai T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Yoshie O**: The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem* 272 : 15036–15042, 1997.
- 34) **Imai T, Chantry D, Raport CJ, Wood CL, Nishimura M, Godiska R**, et al: Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem* 273 : 1764–1768, 1998.
- 35) **Maggi E, Biswas P, Del Prete G, Parronchi P, Macchia D, Simonelli C**, et al: Accumulation of Th-2-like helper T cells in the conjunctiva of patients with vernal conjunctivitis. *J Immunol* 146 : 1169–1174, 1991.
- 36) **Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsiopoulos A, Barkans J, Bentley AM**, et al: Predominant T_{H2}-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 326 : 298–304, 1992.
- 37) **van Reijssen FC, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Kalthoff FS, Maggi E, Romagnani S, Westland JKT**, et al: Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of Th2 phenotype in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 90 : 184–193, 1992.
- 38) **Gonzalo JA, Pan Y, Lloyd CM, Jia GQ, Yu G, Dussault B**, et al: Mouse monocyte-derived chemokine is involved in airway hyperreactivity and lung inflammation. *J Immunol* 163 : 403–411, 1999.
- 39) **Vestergaard C, Yoneyama H, Murai M, Nakamura K, Tamaki K, Terashima Y**, et al: Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest* 104 : 1097–1105, 1999.
- 40) **Sekiya T, Miyamasu M, Imanishi M, Yamada H, Nakajima T, Yamaguchi M**, et al: Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. *J Immunol* 165 : 2205–2213, 2000.
- 41) **Vestergaard C, Bang K, Gesser B, Yoneyama H, Matsushima K, Larsen CG**: A Th₂ chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA⁺CCR 4⁺ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin. *J Invest Dermatol* 115 : 640–646, 2000.
- 42) **Cubitt CL, Tang Q, Monteiro CA, Lausch RN, Oakes JE**: IL-8 gene expression in cultures of human corneal epithelial cells and keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 3199–3206, 1993.
- 43) **Fukuda K, Yamada N, Fujitsu Y, Kumagai N, Nishida T**: Inhibition of eotaxin expression in human corneal fibroblasts by interferon- γ . *Int Arch Allergy Immunol* 129 : 138–144, 2002.
- 44) **福田 憲, 熊谷直樹**: サイトカインからみたアレルギー性結膜疾患のメカニズム. *あたらしい眼科* 20 : 57–63, 2003.