

## 平成 21 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

炎症性サイトカイン tumor necrosis factor- $\alpha$  による  
培養角膜上皮バリアー破綻の機序

木村 和博

山口大学大学院医学系研究科眼病態学講座

## 要 約

角膜上皮は、角膜の恒常性維持のためバリアーとして重要な働きをする。上皮細胞間に存在する接着構造である tight junction は、上皮細胞のバリアー形成に非常に重要な役割を担っている。前眼部の感染、炎症は、角膜上皮の構造ならびに機能に影響を及ぼす。本研究では、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の角膜上皮バリアー機能、tight junction (TJ) 構成分子に対する影響およびその分子機構について検討した。その結果、角膜上皮細胞のバリアー機能は TNF- $\alpha$  の濃度および時間依存性に低下した。さらに、TNF- $\alpha$  は TJ 構成蛋白質である zonula occludens-1 (ZO-1) の TJ への局在を阻害した。一方で、ZO-1 の蛋白質発現量には影響を及ぼさなかった。

TNF- $\alpha$  は、nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) を介するシグナル伝達経路を活性化した。NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路阻害剤 curcumin を加えることにより、TNF- $\alpha$  添加後 24 時間 (late phase) における角膜上皮バリアー機能低下ならびに ZO-1 の TJ 局在への影響が抑制された。これらの結果から、TNF- $\alpha$  は前眼部感染や炎症などによる角膜上皮障害の過程で、重要な因子として作用していること示唆された。(日眼会誌 114 : 935—943, 2010)

キーワード：角膜上皮細胞、上皮バリアー、炎症性サイトカイン tumor necrosis factor- $\alpha$ 、タイトジャンクション、NF- $\kappa$ B

## A Review

Molecular Mechanism of the Disruption of Barrier Function in Cultured Human Corneal Epithelial Cells Induced by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , a Proinflammatory Cytokine

Kazuhiro Kimura

Department of Ocular Pathophysiology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine

## Abstract

**Purpose** : The corneal epithelium provides a barrier that is important for the maintenance of corneal homeostasis. Tight junctions of the corneal epithelium between adjacent epithelial cells are essential for barrier function. The inflammation or infection around ocular surface has influence on the structure and the function of corneal epithelium. We examined the effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a proinflammatory cytokine, on tight junctions as well as on barrier functions in human corneal epithelial (HCE) cells. TNF- $\alpha$  reduced the barrier functions of HCE cells in a concentration- and time-dependent manner. It also induced the disappearance of ZO-1 from the interfaces of neighboring cells without affecting their overall abundance. TNF- $\alpha$  induced the

activation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway in HCE cells. The NF- $\kappa$ B inhibitor curcumin blocked the effects of TNF- $\alpha$  on both barrier functions and the subcellular distribution of ZO-1 at a late phase.

TNF- $\alpha$  induced the redistribution of ZO-1 from TJ of HCE cells and thereby disrupted the barrier function of these cells in a manner dependent on NF- $\kappa$ B at the late phase. This action of TNF- $\alpha$  may contribute to corneal epithelial damage associated with ocular infection and inflammation.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 114 : 935—943, 2010)

**Key words** : Corneal epithelial cells, Barrier, Tumor necrosis factor- $\alpha$ , Tight junction, NF- $\kappa$ B

別刷請求先：755-8505 宇部市南小串 1-1-1 山口大学大学院医学系研究科眼科学 木村 和博

(平成 22 年 4 月 7 日受付, 平成 22 年 6 月 21 日改訂受理) E-mail : k.kimura@yamaguchi-u.ac.jp

Reprint requests to : Kazuhiro Kimura, M. D., Ph. D. Department of Ocular Pathophysiology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami-Kogushi, Ube-shi, Yamaguchi-ken 755-8505, Japan

(Received April 7, 2010 and accepted in revised form June 21, 2010)

## I 緒 言

角膜は、無色透明な無血管組織でありその透明性維持が非常に重要である。角膜は5層構造からなり、角膜上皮、角膜実質および角膜内皮が密接な相互関係の中で正常構造を保ち、角膜の透明性維持に寄与している<sup>1)</sup>。なかでも角膜全体の厚みの90%を占める角膜実質は、いったん外傷や感染などの外的要因によって傷害を受けると、たとえ治癒しても永続的な混濁が生じる。眼球の最表層に位置する角膜上皮は、バリアーとして働き、病原微生物の感染、侵入や、粉塵、外傷など外界からの直接的な侵襲から角膜実質を防御し、角膜実質の恒常性維持を制御するとともに、眼球全体を保護する。それゆえ、種々の疾患により角膜上皮細胞間結合が脆弱になり上皮細胞周囲を取り巻くように局在する細胞接着装置による障壁が破られると、角膜実質の内部環境の恒常性の維持、ひいては角膜全体の組織透明性にも大きく影響する<sup>2)~4)</sup>。角膜上皮は常に外界と接しており感染源となる病原微生物、アレルゲンとしての埃や花粉、外傷の原因となる異物などの種々の外的要因に曝露されている。それゆえ、角膜上皮が傷害を受けた場合、角膜実質さらには眼球内部への感染、炎症の波及を防ぐため角膜上皮の創傷治癒機転が働き、欠損部周辺の上皮細胞が速やかに欠損部分を覆い修復される。再被覆した角膜上皮は、上皮細胞の分化が進み、整然とした層構造およびバリアーとしての機能を有する正常角膜上皮に戻る。

前眼部感染症、外傷、アレルギーやドライアイなどに

伴って認められることがある点状表層角膜症、角膜びらんなどの角膜障害は臨床上非常に重大な問題である<sup>5)</sup>。前眼部炎症反応によって放出される炎症惹起誘発因子によって角膜を中心としたオキュラーサーフェスを構成する組織の固有細胞や遊走してきた浸潤細胞がさらに活性化され、局所での種々のサイトカイン、ケモカインなどの各種メディエーターの放出や接着因子の合成を促し、炎症反応の増幅を来す。このように、種々の原因によって惹起される前眼部炎症による角膜障害の病態では、外的要因による直接障害とともに、サイトカインおよびケモカインなどの多彩な作用を有する液性因子と角膜を中心とした組織固有細胞や浸潤細胞との密接な相互作用が関与していると考えられる。我々は、角膜を中心とした種々の前眼部疾患に伴う炎症による角膜障害の端緒となる角膜上皮障害の機序解明に取り組んできた。本稿では、角膜上皮の正常構造や機能に種々の影響を与えると予想される炎症性サイトカインによる角膜上皮バリアーへの作用ならびにその分子作用機序について検討を行ったので概説する。

## II 角膜上皮細胞における細胞間接着構造およびバリアー機能

角膜上皮は、基底膜上の基底細胞、中層の翼細胞、表層の表層細胞からなる5~6層の非角化上皮である。角膜上皮は絶えず生理的にターンオーバーを繰り返しており、増殖能を有する基底細胞が約1週間かけて表層に向かって分化し、最終的に脱落していく。前述のように、

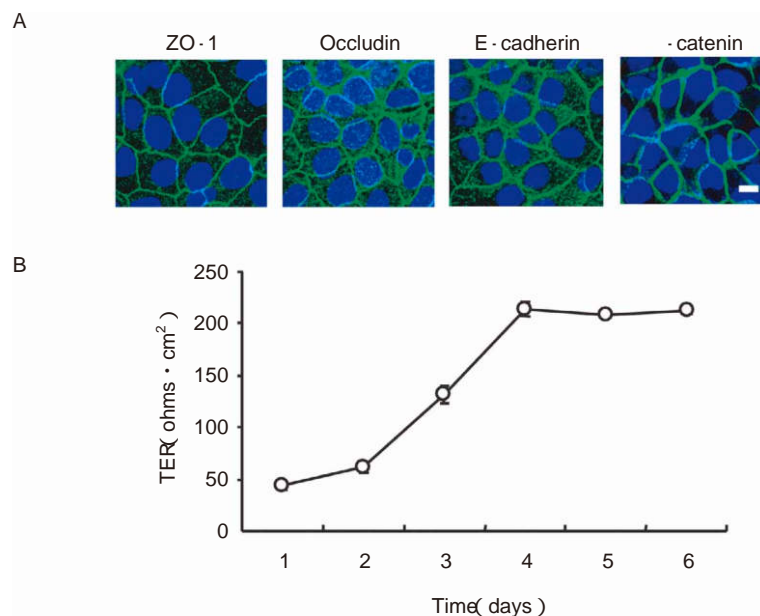


図1 角膜上皮細胞の細胞間接着装置とバリアー機能。

A: Tight junction 構成分子 [zonula occludens (ZO)-1, occludin], adherens junction 構成分子 (E-cadherin, β-catenin) は培養ヒト角膜上皮細胞の細胞-細胞間結合部に局在する。Bar: 10 μm。B: ヒト角膜上皮細胞の培養開始後4日目まで経上皮電気抵抗値 (TER) の上昇が認められ、それ以降6日目まで安定状態を維持しバリアーを形成する。

(文献 15, 29 より許可を得て転載, 一部改変)

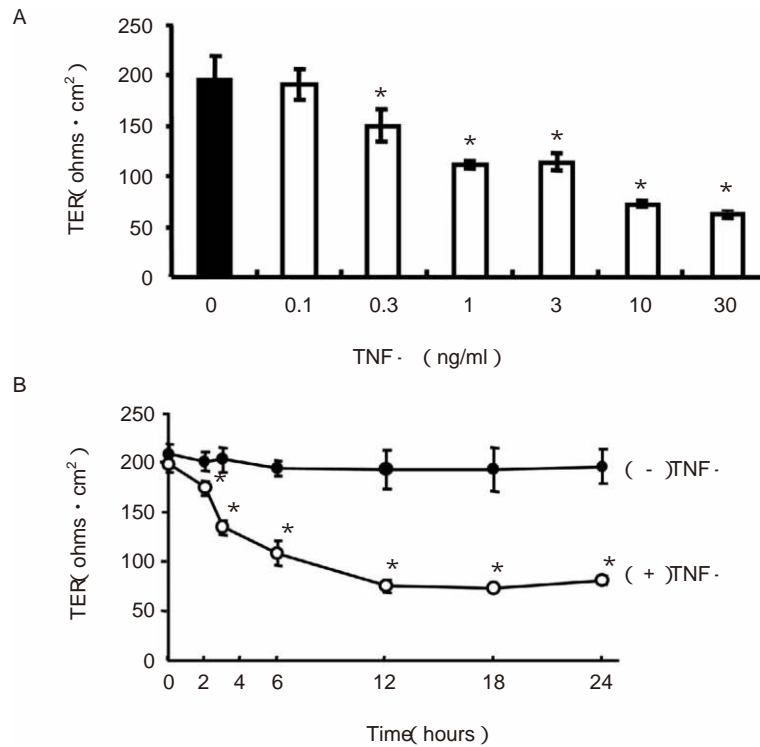


図 2 Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  による角膜上皮細胞のバリアーへの作用。

角膜上皮細胞のバリアー機能が安定した状態で TNF- $\alpha$  を加え、24 時間後 TNF- $\alpha$  の濃度依存的に TER が低下した (A)。TNF- $\alpha$  を添加後、TER の変化を経時的に測定したところ、時間依存的に TER が低下した (B)。\* :  $p < 0.05$ 。(文献 29 より許可を得て転載、一部改変)

角膜上皮はバリアーとして外界から種々の侵襲から角膜実質さらには眼球全体を守ることにより、角膜の透明性維持に寄与している。角膜上皮細胞のバリアー機能を考えると、隣接する角膜上皮細胞間に存在する接着構造が重要な働きをする。一般に上皮細胞は頭頂部 (apical) で微絨毛、一次絨毛などの特殊な構造を形成し、基底部 (basal) では細胞外基質との結合に関与する接着斑を形成し、構造および機能的な極性を有する。そして、apical 側から上皮細胞—細胞間で接着装置があり tight junctions, adherens junctions, desmosomes の、構成分子など異なる 3 種類の接着装置が存在する<sup>6)~8)</sup>。角膜上皮においても、tight junctions, adherens junctions, desmosomes の存在が免疫組織学的あるいは生化学的解析にて認められている。Tight junction 構成蛋白質である zonula occludens (ZO)-1, occludin および claudins は、角膜上皮の表層細胞に局在する<sup>9)10)</sup>。Adherens junction 構成蛋白質の E-cadherin,  $\beta$ -catenin は、角膜上皮中層の翼細胞から基底細胞にかけて認められる<sup>11)</sup>。さらに、desmosome 構成蛋白質である desmoglein 1, 2 および desmoplakin は、角膜中層付近にその局在が認められる<sup>12)</sup>。このことは、角膜上皮の各々の細胞層で異なる接着構造を形成しつつも機能を重複あるいは分担し、重層化した角膜上皮がバリアーとしての機能を果たしていることを示唆している。一方で、単層培養した角膜上皮においても、ZO-1, -2, occludin や E-cadherin,  $\beta$ -

catenin などが細胞—細胞間に局在し、接着構造を形成している<sup>11)13)~15)</sup>(図 1 A)。そこで、単層培養したヒト角膜上皮細胞が、実際にバリアー機能を有するか検討した。上皮バリアー機能は、経上皮電気抵抗値 (transepithelial electric resistance : TER) にて評価した。細胞密度が confluent の状態で播種し、TER の変動を経時的に測定した。その結果、角膜上皮播種後 4 日経過すると TER は 200 ohms  $\cdot$  cm<sup>2</sup> 付近で plateau に達し、培養ヒト角膜上皮細胞が安定したバリアー機能を有することが明らかとなった (図 1 B)。

### III 角膜上皮細胞における炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ による上皮バリアーへの作用

前眼部炎症を来す疾患において、種々のサイトカイン、ケモカインの分泌、発現が増加していることが報告されている<sup>16)~19)</sup>。これらの因子が角膜上皮バリアー機能に対して何らかの影響を及ぼしていると考えられる。しかしながら、どの因子に角膜上皮バリアーに対する障害作用があるのか、さらにどのような作用機序で障害を来すのか未だ不明の点が多い。炎症性サイトカインの一つである tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) は、角膜を中心としたオキュラーサーフェスにおける炎症に関与していると考えられている<sup>20)~23)</sup>。実際、TNF- $\alpha$  は、前眼部外傷、感染、アレルギーおよびドライアイなどにおいて涙液中や組織中にその分泌、発現の亢進が認めら

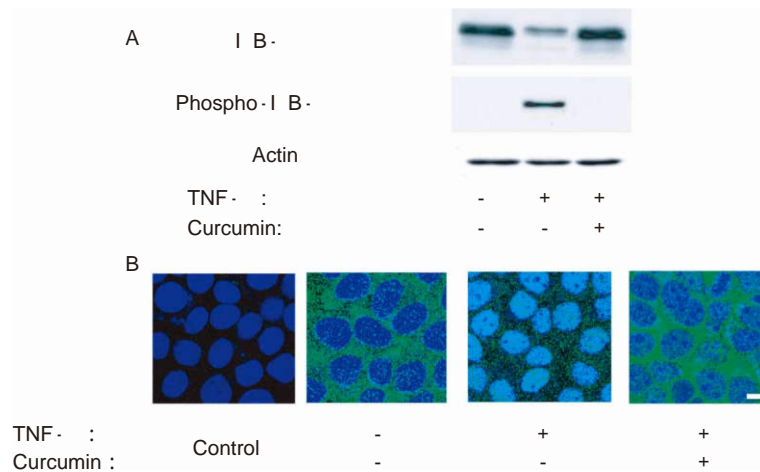


図3 角膜上皮細胞における TNF- $\alpha$  による nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) シグナル伝達経路の活性化。A: 角膜上皮細胞において, TNF- $\alpha$  刺激により I $\kappa$ B- $\alpha$  のリン酸化ならびに I $\kappa$ B- $\alpha$  の分解が促進された。B: NF- $\kappa$ B は, 定常状態では角膜上皮細胞の細胞質に主に局在するが, TNF- $\alpha$  は, この細胞質に局在する NF- $\kappa$ B を核内へと移行させた。NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路阻害剤 (curcumin) は, これら TNF- $\alpha$  による作用を有意に抑制した。Bar: 10  $\mu$ m。

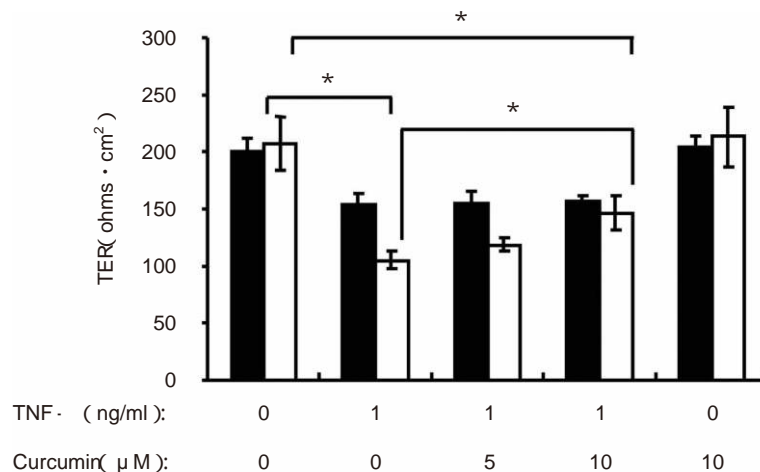


図4 TNF- $\alpha$  による角膜上皮バリアー低下への NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路の関与。

TNF- $\alpha$  による late phase (24 時間後,  $\square$ ) での角膜上皮細胞の TER の低下が, NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路阻害剤 (curcumin) 添加により抑制された。一方で, TNF- $\alpha$  による early phase (2 時間後,  $\blacksquare$ ) における TER の低下は抑制されなかった。\*:  $p < 0.05$ 。(文献 29 より許可を得て転載)

れ, このような病態における病理組織学的変化に重要な働きをしていると考えられる<sup>24)~26)</sup>。さらに, TNF- $\alpha$  は, それ自体が角膜上皮細胞や実質細胞に作用し, interleukin (IL)-6 や IL-8 などのさらに炎症を助長するサイトカイン, ケモカインの産生, 分泌を亢進させる<sup>27)28)</sup>。そこで, 培養ヒト角膜上皮細胞のバリアー機能に対する TNF- $\alpha$  の作用を検討した。種々の濃度の TNF- $\alpha$  を培養ヒト角膜上皮細胞に添加し, 24 時間後の TER を測定した。対照群と比べて, 0.3 ng/ml 以上の TNF- $\alpha$  添加により, 有意に培養ヒト角膜上皮細胞の TER は低下した (図 2A)。さらに, TNF- $\alpha$  による培養ヒト角膜上皮細胞の TER 低下作用を経時的に検討した。TNF- $\alpha$  は, 培養ヒト角膜上皮細胞に添加後 2 時間から有意に TER を

低下させ, 添加後 12 時間経過するとその作用は最大となる (図 2B)。これらの結果は, TNF- $\alpha$  は濃度依存性および時間依存性に培養ヒト角膜上皮細胞のバリアー機能を低下させることを示唆している<sup>29)</sup>。

#### IV 炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ による角膜上皮バリアー機能低下の機序

1. TNF- $\alpha$  による NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路の活性化  
TNF- $\alpha$  は種々の細胞でその特異的な受容体を介して, mitogen-activated protein kinases (ERK, p38 MAPK, JNK), nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) などを介するシグナル伝達経路を活性化する<sup>30)31)</sup>。なかでも, NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路は免疫, 炎症, 細胞接着, アポトーシス

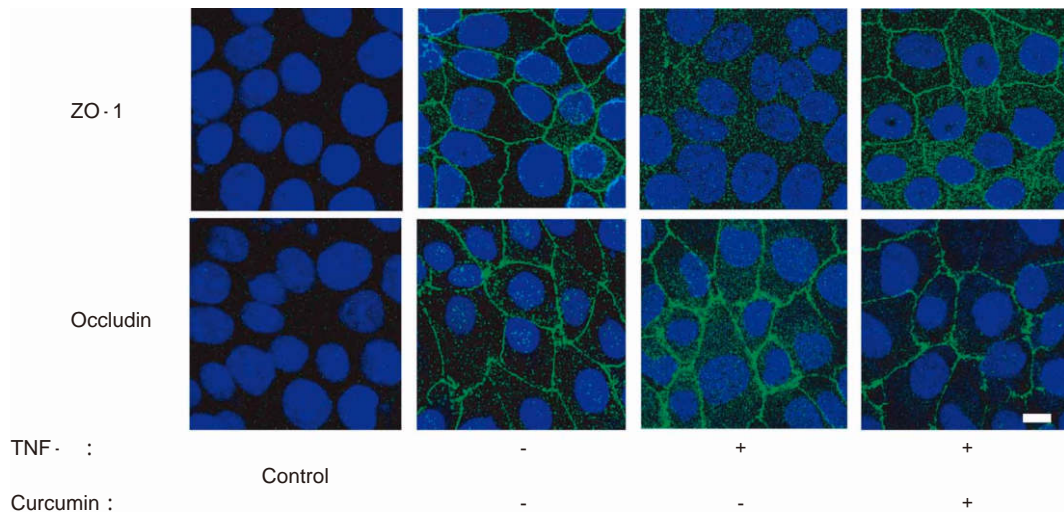
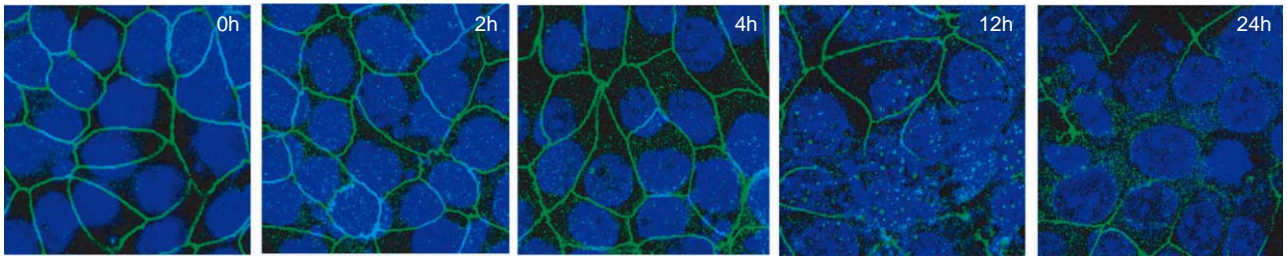


図 5 TNF- $\alpha$  による tight junction 構成分子 ZO-1, occludin の局在への影響.

TNF- $\alpha$  刺激により, tight junction 構成分子の一つである ZO-1 の tight junction への局在が阻害された. 一方で, 他の tight junction 構成分子である occludin の局在には影響を及ぼさなかった. さらに, NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路阻害剤(curcumin)添加により, TNF- $\alpha$  による ZO-1 の局在への影響が阻害された. Bar : 10  $\mu$ m.  
(文献 29 より許可を得て転載)

TNF- $\alpha$



TNF- $\alpha$  + Curcumin

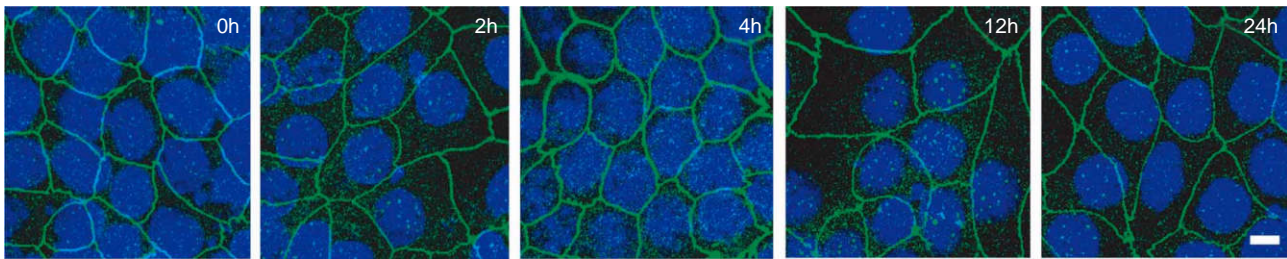


図 6 TNF- $\alpha$  による NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路依存性の tight junction 構成分子 ZO-1 の局在への影響.

角膜上皮細胞に TNF- $\alpha$  刺激を加えることにより, ZO-1 の tight junction への局在が刺激後 12 時間から有意に阻害された. TNF- $\alpha$  による ZO-1 の局在への影響が NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路阻害剤(curcumin)にて阻害された. Bar : 10  $\mu$ m.  
(文献 29 より許可を得て転載)

および細胞増殖などの種々の生物学的プロセスに広く関与している<sup>32)~34)</sup>. NF- $\kappa$ B は細胞質内で阻害分子である I- $\kappa$ B (I- $\kappa$ B) と結合し, 核内への移行を阻害されている. しかしながら, 細胞が種々の刺激を受けて活性化されると I- $\kappa$ B- $\alpha$  がリン酸化され, 引き続いて I- $\kappa$ B のユビキチン化が誘導される. 最終的に I- $\kappa$ B- $\alpha$  蛋白質が分解され NF- $\kappa$ B が核内に移行し, 種々の生物活性に寄与する<sup>35)36)</sup>. そこで, TNF- $\alpha$  を培養ヒト角膜上皮細胞に添加

することで, 実際に NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路が活性化されているかを検討した. 培養ヒト角膜上皮細胞に TNF- $\alpha$  を添加すると, I- $\kappa$ B- $\alpha$  のリン酸化, 分解が促進し発現量が低下した(図 3 A). さらに, 培養ヒト角膜上皮細胞を TNF- $\alpha$  で刺激すると, 細胞質に局在する NF- $\kappa$ B が有意に核移行することが免疫組織学的に明らかとなった(図 3 B). このことは, TNF- $\alpha$  は培養ヒト角膜上皮細胞において, NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路を活性化

することを示唆している。続いて、TNF- $\alpha$ によるNF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路活性化を阻害するため、NF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路の阻害作用のあるcurcuminを用い検討した<sup>37)</sup>。Curcuminは、慢性閉塞性肺疾患、喘息に伴う気道炎症や四塩化炭素による肝障害などの炎症モデルで抗炎症作用を有することが報告されている<sup>38)~40)</sup>。その結果、curcuminはTNF- $\alpha$ によるI $\kappa$ B- $\alpha$ のリン酸化、I $\kappa$ B- $\alpha$ の分解促進を抑制し、NF- $\kappa$ Bの核移行も有意に抑制した(図3)。

## 2. TNF- $\alpha$ によるNF- $\kappa$ B活性化を介したバリアー機能低下

続いて、TNF- $\alpha$ による培養ヒト角膜上皮細胞のバリアー機能低下に対するNF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路の関与を、curcuminを用いて検討した。前述のようにTNF- $\alpha$ は、刺激後2時間から有意にTERを低下させ、12時間でその作用は最大となる。そこで、種々の濃度のcurcumin存在下において、培養ヒト角膜上皮細胞をTNF- $\alpha$ にて刺激した後、2時間(early phase)および24時間(late phase)のTERを測定した。その結果、curcuminは、late phaseにおいて濃度依存性にTNF- $\alpha$ によるTER低下を抑制した。一方でearly phaseでのTER低下は抑制しなかった(図4)。これらの結果から、late phaseにおけるTNF- $\alpha$ による培養ヒト角膜上皮細胞のバリアー機能低下に、NF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路の活性化が必要であることが示唆された。一方で、early phaseにおけるTNF- $\alpha$ によるTER低下には、NF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路以外のMAPKsシグナル伝達経路が関与している可能性がある。

## 3. TNF- $\alpha$ によるtight junction構成分子ZO-1への作用

Tight junction構成分子は、主に細胞膜貫通型occludin, claudins, junctional associated membrane proteins (JAMs)などとこれら分子と細胞質で結合する細胞質局在型のZOs(ZO-1, -2, and -3), cingulinなどがあり、これらが互いに相互作用しtight junctionの機能を制御している<sup>7)</sup>。これまでの結果から、炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ は培養ヒト角膜上皮細胞のバリアー機能を低下させることが明らかとなった。そこで、上皮バリアー機能維持に重要な働きをするtight junctionに着目し、その構成分子であるZO-1, occludinの局在へのTNF- $\alpha$ の影響を検討した。ZO-1およびoccludinは、培養角膜上皮細胞のバリアー機能が維持されている状態では、細胞—細胞間つまりtight junctionに局在する。TNF- $\alpha$ 刺激存在下では、ZO-1のtight junctionへの局在は阻害され、そしてその作用はcurcuminによって抑制される(図5)。一方、occludinのtight junctionへの局在は、TNF- $\alpha$ によって影響を受けなかった。さらに、TNF- $\alpha$ によるZO-1のtight junctionへの局在に対する経時的変化ならびにそれに対するcurcuminによる作用を検討したところ、

TNF- $\alpha$ は刺激後2~4時間ではZO-1のtight junctionへの局在には影響を及ぼさないが、12~24時間ではtight junctionにおけるZO-1の局在を阻害することが明らかとなった(図6)。また、前述の結果同様、curcuminはTNF- $\alpha$ によるZO-1のtight junctionへの局在阻害の作用を抑制した。この結果から、12~24時間のlate phaseにおけるTNF- $\alpha$ によるZO-1のtight junctionへの局在阻害は、NF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路を介していることが示唆された。また、刺激後2~4時間のearly phaseにおけるTNF- $\alpha$ による角膜上皮バリアーの低下は、tight junctionからのZO-1の局在変化とは関係のない別の機構が関与していることを示唆している。

続いて、TNF- $\alpha$ のZO-1およびoccludinの蛋白質発現に対する影響を検討した。その結果、培養ヒト角膜上皮細胞において、TNF- $\alpha$ は、ZO-1およびoccludinの発現に対して影響を及ぼさなかった(図7)。これまで、我々は、TNF- $\alpha$ と同様な炎症性サイトカインIL-1 $\beta$ や低酸素などの因子により培養ヒト角膜上皮細胞のバリアー機能が低下することを報告してきた<sup>15)41)42)</sup>。IL-1 $\beta$ 刺激存在下では、ZO-1およびoccludinの蛋白質発現にはなんら影響を及ぼさなかった。さらに、adherens junctionの構成分子である、E-cadherinや $\beta$ -cateninの発現にも影響を及ぼさなかった。一方で、低酸素下でヒト角膜上皮細胞を培養するとバリアー機能低下を認めた。同時にZO-1の蛋白質発現の低下、およびZO-1のtight junctionへの局在阻害も認められた<sup>41)~43)</sup>。これらのことは、外的要因の違いにより角膜上皮細胞のバリアー機能に影響を与える標的分子やその作用機序が異なることを示唆しているかもしれない。また、ZO-1およびoccludin以外のtight junction構成分子への影響も今後検討していく必要があると思われる。

## 4. TNF- $\alpha$ のアクトミオシン系への作用

Tight junctionを構成する蛋白質複合体は、細胞骨格であるアクチン線維に連結し、tight junctionの構造、機能が維持、安定化されている。例えば、他の細胞系において凝固系に関与するトロンピンは、アクチン骨格の再編成を来し、アクチンストレファイバーの形成を亢進させ、バリアー機能を低下させることが知られている<sup>44)</sup>。さらに、細胞辺縁のアクチン線維の減少、アクトミオシンの収縮に関与するmyosin light chain(MLC)のリン酸化の亢進も明らかとなっている。また、細胞質内のカルシウム濃度の増加やmyosin light chain kinase(MLCK)の活性化もtight junctionの形成維持に影響を及ぼし、バリアー機能を低下させる<sup>45)</sup>。我々は、ヒト角膜上皮細胞を低酸素下で培養することにより上皮バリアーが破壊され、同時にアクチンストレファイバーの形成が亢進することを報告している<sup>41)</sup>。さらに、TNF- $\alpha$ を添加した培養ヒト角膜上皮細胞におけるMLCのリン酸化が亢進し、そのリン酸化がcurcuminにて抑制されることを

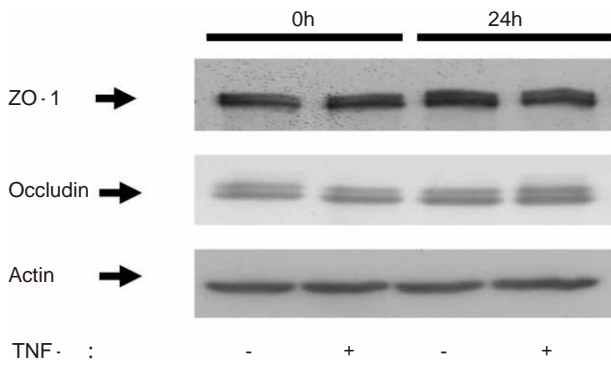


図 7 TNF- $\alpha$  による tight junction 構成分子 ZO-1, occludin の蛋白質発現への影響。

角膜上皮細胞では TNF- $\alpha$  の存在の有無にかかわらず ZO-1, occludin の蛋白質発現には明らかな影響を及ぼさない。(文献 29 より許可を得て転載)

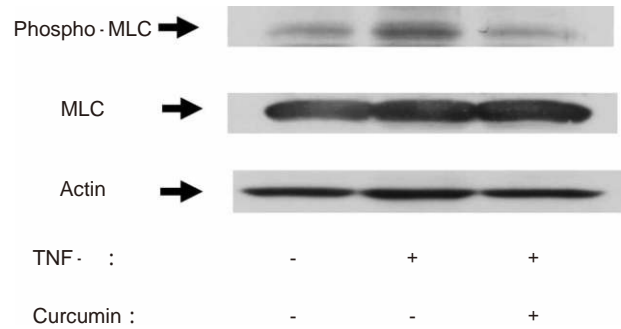


図 8 TNF- $\alpha$  による myosin light chain (MLC) のリン酸化への影響。

TNF- $\alpha$  を加えることにより MLC のリン酸化が亢進するのに対して、NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路阻害剤 (curcumin) を同時に添加するとそのリン酸化は抑制された。(文献 29 より許可を得て転載)

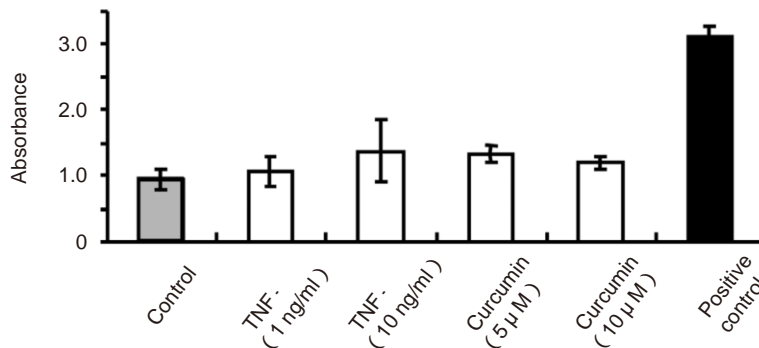


図 9 TNF- $\alpha$  の角膜上皮細胞に対する細胞障害性の検討。

種々の濃度の TNF- $\alpha$  を添加あるいは NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路阻害剤 (curcumin) 添加による、角膜上皮細胞の細胞障害性は認められなかった。(文献 29 より許可を得て転載)

明らかにした(図 8)。このような結果から、TNF- $\alpha$  の角膜上皮バリアーの低下にはアクチン骨格の再編成が重要な役割を果していることが示唆される。細胞内におけるアクチン骨格の再編成は時空間的に種々の分子によって制御されているが、なかでも低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho ファミリーは重要な働きをする<sup>46)</sup>。実際、Rho ファミリーの活性化が、種々の細胞でバリアー機能の制御に関与するということが報告されている<sup>47)48)</sup>。培養ヒト角膜上皮細胞における TNF- $\alpha$  による角膜上皮バリアーの低下に Rho ファミリーが関与するか今後の検討が必要だと思われる。

#### 5. TNF- $\alpha$ の角膜上皮細胞の細胞障害性への作用

TNF- $\alpha$  は、種々の細胞で増殖、分化といった生存シグナルを制御している一方で、アポトーシスも誘導しうる<sup>49)50)</sup>。実際、小腸上皮細胞などでは、TNF- $\alpha$  によるアポトーシスが上皮バリアー機能の低下に関与している<sup>51)52)</sup>。TNF- $\alpha$  による培養ヒト角膜上皮細胞に対する細胞障害性によって、角膜上皮バリアー機能が低下している可能性も考えられることから、培養細胞上清中の lactate dehydrogenase (LDH) を測定した。角膜上皮細胞

では、TNF- $\alpha$  による LDH 上昇は認められなかった(図 9)。このことは、TNF- $\alpha$  による細胞障害や細胞死によって角膜上皮バリアーが破綻しているのではないことを示している。しかしながら、TNF- $\alpha$  によるアポトーシスが角膜上皮細胞の障害をもたらすことによって、角膜上皮バリアー機能の低下が誘導されていることをこの実験系では完全には否定できない。この点については、さらなる検討が必要であると思われる。

## V おわりに

本総説では、前眼部炎症における角膜上皮障害のメカニズムについて、主に炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  の角膜上皮バリアーへの作用およびその分子機序を中心に概説した。オキュラーサーフェスを取り巻く環境における炎症では、そこにある resident cells と浸潤してくる infiltrated cell, さらに感染症では病原微生物が互いに相互作用しあい、複雑なクロストークのもと種々のサイトカイン、ケモカインおよび成長因子の発現、分泌が亢進すると考えられる。そして、角膜上皮のバリアーがいったん破綻するとこれら炎症性の関連因子の透過性が亢進

し角膜実質へ到達することで、角膜実質細胞が活性化されさらに炎症関連分子を発現、分泌し角膜での炎症を助長すると思われる。つまり、いかにして角膜上皮のバリアー機能を維持するかがその後の炎症の拡大あるいは治癒に大きく影響すると考えられる。角膜上皮バリアーの維持や破綻の機序についてはまだまだ不明な点が多いが、今後さらなる研究により角膜上皮バリアーを維持し、強固にすることができるような薬物を見出すことができれば、角膜上皮障害治療のあらたな治療法の選択肢となると確信している。

稿を終えるにあたり、受賞講演の機会を与えてくださいました学術奨励賞選考委員の先生方、第 114 回日本眼科学会総会長寺崎浩子教授に心より感謝申し上げます。また、すべての研究に関しご指導、ご助言を賜りました山口大学大学院医学系研究科眼科学講座西田輝夫教授をはじめとする多くの実験を一緒に行ってきた山口大学大学院医学系研究科眼科学講座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深謝いたします。

## 文 献

- 1) **Klintworth GK** : The cornea—structure and macromolecules in health and disease. A review. *Am J Pathol* 89 : 718—808, 1977.
- 2) **Gipson IK, Watanabe H, Zieske JD** : Corneal wound healing and fibronectin. *Int Ophthalmol Clin* 33 : 149—163, 1993.
- 3) **西田輝夫** : 角膜：その静と動. *日眼会誌* 112 : 179—213, 2008.
- 4) **Kinoshita S, Adachi W, Sotozono C, Nishida K, Yokoi N, Quantock AJ, et al** : Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog Retin Eye Res* 20 : 639—673, 2001.
- 5) **Cutler TJ** : Corneal epithelial disease. *Vet Clin North Am Equine Pract* 20 : 319—343, vi, 2004.
- 6) **Miyoshi J, Takai Y** : Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Adv Drug Deliv Rev* 57 : 815—855, 2005.
- 7) **Denker BM, Nigam SK** : Molecular structure and assembly of the tight junction. *Am J Physiol* 274 : F 1—9, 1998.
- 8) **Giepmans BN, van Ijzendoorn SC** : Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. *Biochim Biophys Acta* 1788 : 820—831, 2009.
- 9) **Yoshida Y, Ban Y, Kinoshita S** : Tight junction transmembrane protein claudin subtype expression and distribution in human corneal and conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 : 2103—2108, 2009.
- 10) **Ban Y, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Tsuzuki M, Koizumi N, et al** : Comparison of ultrastructure, tight junction-related protein expression and barrier function of human corneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane with and without air-lifting. *Exp Eye Res* 76 : 735—743, 2003.
- 11) **Wang Y, Zhang J, Yi XJ, Yu FS** : Activation of ERK 1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 78 : 125—136, 2004.
- 12) **Takaoka M, Nakamura T, Ban Y, Kinoshita S** : Phenotypic investigation of cell junction-related proteins in gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 1095—1101, 2007.
- 13) **Moore P, Ogilvie J, Horridge E, Mellor IR, Clothier RH** : The development of an innervated epithelial barrier model using a human corneal cell line and ND 7/23 sensory neurons. *Eur J Cell Biol* 84 : 581—592, 2005.
- 14) **Yi X, Wang Y, Yu FS** : Corneal epithelial tight junctions and their response to lipopolysaccharide challenge. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 4093—4100, 2000.
- 15) **Kimura K, Teranishi S, Nishida T** : Interleukin-1 $\beta$ -induced disruption of barrier function in cultured human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 : 597—603, 2009.
- 16) **Imanishi J** : Expression of cytokines in bacterial and viral infections and their biochemical aspects. *J Biochem* 127 : 525—530, 2000.
- 17) **Leonardi A, Motterle L, Bortolotti M** : Allergy and the eye. *Clin Exp Immunol* 153 Suppl 1 : 17—21, 2008.
- 18) **Stern ME, Siemasko KF, Niederkorn JY** : The Th 1/Th 2 paradigm in ocular allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 5 : 446—450, 2005.
- 19) **Yoon KC, Jeong IY, Park YG, Yang SY** : Interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  levels in tears of patients with dry eye syndrome. *Cornea* 26 : 431—437, 2007.
- 20) **Ferguson TA, Griffith TS** : The role of Fas ligand and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in the ocular immune response. *Chem Immunol Allergy* 92 : 140—154, 2007.
- 21) **Leonardi A** : Vernal keratoconjunctivitis : pathogenesis and treatment. *Prog Retin Eye Res* 21 : 319—339, 2002.
- 22) **Muşat O** : [The role of tumor necrosis factor in inflammation]. *Oftalmologia* 49 : 23—26, 2005.
- 23) **Wakefield D, Lloyd A** : The role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory eye disease. *Cytokine* 4 : 1—5, 1992.
- 24) **Larsson C, Bernstrom-Lundberg C, Edstrom S, Bergstrom T** : Tumor necrosis factor- $\alpha$  response and herpesvirus infection in Bell's palsy. *Laryngoscope* 108 : 1171—1176, 1998.
- 25) **Seo KY, Lee HK, Kim EK, Lee JH** : Expression of tumor necrosis factor  $\alpha$  and matrix metalloproteinase-9 in surgically induced necrotizing scleritis. *Ophthalmic Res* 38 : 66—70, 2006.
- 26) **Vesaluoma M, Teppo AM, Gronhagen-Riska C,**



- Tervo T** : Increased release of tumour necrosis factor- $\alpha$  in human tear fluid after excimer laser induced corneal wound. *Br J Ophthalmol* 81 : 145—149, 1997.
- 27) **Cubitt CL, Lausch RN, Oakes JE** : Differences in interleukin-6 gene expression between cultured human corneal epithelial cells and keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 330—336, 1995.
- 28) **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.
- 29) **Kimura K, Teranishi S, Fukuda K, Kawamoto K, Nishida T** : Delayed disruption of barrier function in cultured human corneal epithelial cells induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in a manner dependent on NF- $\kappa$ B. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 565—571, 2008.
- 30) **Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H** : TRAIL signalling : decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol* 39 : 1462—1475, 2007.
- 31) **Vanden Berghe W, Vermeulen L, De Wilde G, De Bosscher K, Boone E, Haegeman G** : Signal transduction by tumor necrosis factor and gene regulation of the inflammatory cytokine interleukin-6. *Biochem Pharmacol* 60 : 1185—1195, 2000.
- 32) **Dobrovolskaia MA, Kozlov SV** : Inflammation and cancer : when NF- $\kappa$ B amalgamates the perilous partnership. *Curr Cancer Drug Targets* 5 : 325—344, 2005.
- 33) **Hazlett LD** : Pathogenic mechanisms of *P. aeruginosa* keratitis : a review of the role of T cells, Langerhans cells, PMN, and cytokines. *DNA Cell Biol* 21 : 383—390, 2002.
- 34) **De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA** : The transcription factor NF- $\kappa$ B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 : E 83—88, 2000.
- 35) **Abraham E** : NF- $\kappa$ B activation. *Crit Care Med* 28 : N 100—104, 2000.
- 36) **Stancovski I, Baltimore D** : NF- $\kappa$ B activation : the I $\kappa$ B kinase revealed? *Cell* 91 : 299—302, 1997.
- 37) **Lin JK** : Molecular targets of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595 : 227—243, 2007.
- 38) **Moghaddam SJ, Barta P, Mirabolfathinejad SG, Ammar-Aouchiche Z, Garza NT, Vo TT, et al** : Curcumin inhibits COPD-like airway inflammation and lung cancer progression in mice. *Carcinogenesis* 30 : 1949—1956, 2009.
- 39) **Sharafkhaneh A, Velamuri S, Badmaev V, Lan C, Hanania N** : The potential role of natural agents in treatment of airway inflammation. *Ther Adv Respir Dis* 1 : 105—120, 2007.
- 40) **Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Vergara P, Moreno MG, Muriel P** : Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF- $\kappa$ B, proinflammatory cytokines production and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1770 : 989—996, 2007.
- 41) **Kimura K, Teranishi S, Kawamoto K, Nishida T** : Protection of human corneal epithelial cells from hypoxia-induced disruption of barrier function by hepatocyte growth factor. *Exp Eye Res* 90 : 337—343, 2010.
- 42) **Teranishi S, Kimura K, Kawamoto K, Nishida T** : Protection of human corneal epithelial cells from hypoxia-induced disruption of barrier function by keratinocyte growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 2432—2437, 2008.
- 43) **Yanai R, Ko JA, Morishige N, Chikama T, Ichijima H, Nishida T** : Disruption of zonula occludens-1 localization in the rabbit corneal epithelium by contact lens-induced hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 : 4605—4610, 2009.
- 44) **Kawkitinarong K, Linz-McGille L, Birukov KG, Garcia JG** : Differential regulation of human lung epithelial and endothelial barrier function by thrombin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31 : 517—527, 2004.
- 45) **Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB** : Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci* 1123 : 134—145, 2008.
- 46) **Hall A, Paterson HF, Adamson P, Ridley AJ** : Cellular responses regulated by rho-related small GTP-binding proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 340 : 267—271, 1993.
- 47) **Samarin S, Nusrat A** : Regulation of epithelial apical junctional complex by Rho family GTPases. *Front Biosci* 14 : 1129—1142, 2009.
- 48) **Wojciak-Stothard B, Ridley AJ** : Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol* 39 : 187—199, 2002.
- 49) **Cosman D** : A family of ligands for the TNF receptor superfamily. *Stem Cells* 12 : 440—455, 1994.
- 50) **Aggarwal BB** : Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF- $\kappa$ B. *Ann Rheum Dis* 59 Suppl 1 : i 6—16, 2000.
- 51) **Schulzke JD, Bojarski C, Zeissig S, Heller F, Gitter AH, Fromm M** : Disrupted barrier function through epithelial cell apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 1072 : 288—299, 2006.
- 52) **Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M** : Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF- $\alpha$ -induced single-cell apoptosis. *FASEB J* 14 : 1749—1753, 2000.