

感染における角膜線維芽細胞の機能

Role of Corneal Fibroblasts in Infection

西 田 輝 夫

Teruo Nishida

^a 山口大学大学院医学系研究科 眼科学

要 旨 光の取り入れ口である角膜において、線維芽細胞は角膜実質を構成するコラーゲンなどの合成や分解を通じて、その恒常性維持に関与している。一方、感染などの局面では、病原微生物の認識や MMPs の分泌や活性化を調節する司令塔の役割を演じている。

キーワード：角膜、線維芽細胞、感染、潰瘍、MMP

1. はじめに

地球上の生物は、様々な感覚機能を用いて環境の変化を認識し、生体機能を調節し変化に適応している。霊長類特にヒトにとっては、視覚がもっとも重要な感覚機能であり、外界からの情報の 80%以上を視覚により入手している。光を感じる受光器である眼球は、皮膚に由来する前眼部（角膜や水晶体）と脳に由来する網膜により主として構成されており、角膜や水晶体は光の導入口であり、網膜は感知器である。

ヒト角膜は、眼球の最前面に存在する直径約 11.5 mm、厚さ約 550 μm の透明組織で、外に向かって凸の構造をもつ。外界の光を眼内に導入し網膜に焦点を合わせる屈折系として、角膜は極めて重要な組織である。角膜の構造は、比較的単純であり、厚みの 1/10 を占める重層上皮細胞層が外界と直接接しており、厚みの 90%以上を占める実質層には角膜線維芽細胞（眼科領域では角膜実質細胞と呼称）が存在している。また内側には、一層の角膜内皮細胞が存在する。角膜上皮細胞は皮膚などと同じように約 1 週間の細胞回転で入れ替わるのに対し、角膜実質の線維芽細胞の細胞回転は 2 ないし 3 年である。またヒトでは、角膜内皮細胞は、生体内で増殖することなく、炎症や外科的侵襲などで傷害を受けると細胞数は減少し再び元の細胞数に戻ることはない。

角膜の解剖学的特徴は、1) 透明組織であること、2) 血管系を含まない無血管組織であること、3) 角膜輪部および取り巻く隣接強膜には豊富な係蹄血管が存在すること、4) 知覚神経終末が極めて豊富に分布していることなどである。ま

た角膜の表面は、涙液により覆われており、内面は前房水（眼房水）と接しており、涙液や前房水が酸素、栄養素などに加え様々な細胞調節因子であるサイトカインを含有し、上皮細胞や内皮細胞の細胞機能の調節を行っている¹⁾ (表 1)。

角膜は眼球の最前面に存在することから、しばしば外傷や感染の機会に曝されている。最近日本眼感染症学会が行った全国角膜感染症サーベイランスでは、角膜感染症は 20 代から 30 代と、60 歳以上の高齢者に発生する頻度が高く二相性である²⁾。角膜感染症は、適切な治療が行われないと、角膜実質コラーゲンの融解をきたし時に穿孔を生じ失明に至る重篤な疾患である。感染に対する角膜の反応を、構成する細胞レベルでより深く知ることが、治療方針の選択や新たな薬剤の開発という観点から重要である。

本稿では、角膜実質における線維芽細胞の構造と感染性角膜潰瘍を概説し、角膜感染症における角膜線維芽細胞の役割や細胞間相互作用について、我々の成績を中心に述べる。

2. 角膜実質と角膜線維芽細胞

角膜の透明性と形状は、基本的には角膜実質によって維持されていると言っても過言ではない。角膜実質の主たる構成物質は I 型コラーゲンであり、それ以外に、プロテオグリカン、IV 型コラーゲン、フィブロネクチンなどがある。コラーゲン線維は、他の生体組織（皮膚など）とは異なり、極めて整然と配列しており、コラーゲン線維の直径および線維間距離が均一である。コラーゲン線維間を充填しているプロテオグリカンは極めて水分を豊潤に吸収し膨潤する性質を有する。したがって、整然としたコラーゲン線維の配列を維持するために、上皮細胞層や内皮細胞層がバリアーとして機能し角膜実質中への水分の流入を防いでいる。さらに、角膜内皮細胞層は、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ により実質中の水分を排出するポンプとして機能している。このように、角膜実質の透明性

^a 〒 755-8505 山口県宇部市南小串 1-1-1
TEL: 0836-22-2277; FAX: 0836-29-3228
E-mail: tnishida@yamaguchi-u.ac.jp
2008 年 4 月 21 日受付

表 1 角膜線維芽細胞

I	生理的機能
	<ul style="list-style-type: none"> 光学系としての角膜の形状(屈折力)と透明性(光の透過性)の維持 コラーゲンや細胞外マトリックスの恒常性維持
II	正常時の機能と調節機構
	<ul style="list-style-type: none"> コラーゲン(主としてI型コラーゲン)およびプロテオグリカンの合成と分解 互いにGap Junctionsで結合して三次元網目状構造を形成し,細胞同士の機能が同調 上皮による線維芽細胞の機能制御(Epithelial-Mesenchymal Interactions)
III	炎症時(感染やアレルギー)の機能
	<ul style="list-style-type: none"> 炎症での司令塔(作動系であり同時に信号系) 感染の認識(TLRの発現) サイトカイン・ケモカインの分泌 細胞外マトリックスの破壊と再構築(過剰なコラーゲン分解)

の本体は、角膜実質のコラーゲンの配列であり、その維持には、無傷な上皮細胞層と角膜内皮細胞層による含水量の調節が必須である。

一方、角膜実質の構成細胞は、主として間葉系に由来する線維芽細胞とわずかな免疫系細胞である。細胞が占める容積は、角膜実質の約2ないし3%である³⁾。このように、角膜実質はほとんどが細胞外マトリックスで、細胞成分は極めて少ない(図1)。実際に、薄切切片で観察すると、細胞成分はコラーゲン線維の間に散在して観察される。角膜実質を構成するコラーゲンを、酸と熱で溶解し残存した細胞成分を走査型電子顕微鏡で観察すると、これらの実質細胞は互いに結合して三次元の網目状構造を取っている⁴⁾。また透過型電子顕微鏡で観察すると、コラーゲン線維間に存在する線維芽細胞の細胞突起の先で、隣接する細胞の突起とGap Junctionsで結合していることが観察される⁵⁾。したがって、角膜実質内で、線維芽細胞はその数は少ないものの互いにGap Junctionsで結合し、細胞内情報を交換しその機能を同調していると考えられる。

正常角膜では、角膜線維芽細胞はコラーゲンやプロテオグ

表 2 感染性角膜潰瘍

I	コラーゲン分解担当細胞
	<ul style="list-style-type: none"> 作動系細胞:角膜線維芽細胞(Effectors) 信号・制御系細胞:浸潤した好中球(Modulators)
II	コラーゲン分解酵素
	<ul style="list-style-type: none"> 細菌由来:Collagenase 細胞由来:Matrix Metallo-proteinases(MMPs)
III	治療薬開発の標的
	<ul style="list-style-type: none"> 酵素(MMPs)阻害剤:臨床的に有効性を認めない 角膜線維芽細胞機能調節機構へ作用する薬物の探索

表 3 角膜線維芽細胞によるサイトカイン, 接着分子の発現

1.	IL-4, IL-13, TNF- α 刺激
	IL-8, Eotaxin, RANTES, TARC, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 ^{24~27)}
2.	LPS (lipopolysaccharide) 刺激
	IL-6, IL-8, G-CSF, MCP-1, MIP-1 β , ICAM-1 ^{14,15,23)}

リカンなどの構成成分を合成しながら、同時にMatrix Metalloproteinases(MMP)を分泌活性化させ一定のコラーゲン分解を行い、角膜実質の恒常性を維持している。

角膜線維芽細胞の形態や機能は細胞を取り巻く細胞外マトリックスであるコラーゲンにより制御されている⁶⁾。角膜線維芽細胞の増殖は、コラーゲンの濃度により抑制され、高濃度のコラーゲン内では、細胞増殖が抑制されるのに対し、低濃度のコラーゲン濃度では、活発な細胞増殖が見られる。角膜内に、異物を注入すると、角膜実質細胞内に異物を取り込んでいる像が観察され⁷⁾、角膜線維芽細胞は異物などをEndocytosisし、その場で静的な細胞に変化して、異物による炎症反応を抑制していると推測される⁸⁾。

また単層培養した角膜実質細胞では、隣接する細胞との間にGap Junctionの構成タンパク質であるConnexin 43が認められ、Lucifer Yellowを用いたDye Coupling法で隣接する細胞への蛍光色素の拡散が観察される。しかしながら、炎症性サイトカインの一つであるTNF- α を添加すると濃度に応じてConnexin 43の発現が抑制され、さらにDye Coupling法での蛍光色素の拡散が減少し⁹⁾、炎症の条件では、細胞同士の機能同調が外れ極めて活発な細胞に変化しうることを示している。

3. 角膜と感染症

角膜感染症は失明につながる重篤な疾患である(図2)。臨床的には、何らかの外傷により上皮のバリア機能が傷害され、病原微生物が角膜実質に侵入して感染が成立する。感染性角膜潰瘍の場合には、居住細胞である角膜線維芽細胞が活性化され、本来存在しない好中球などの炎症性細胞が浸潤してきている。感染性角膜潰瘍では、病原微生物が出す蛋白分解酵素がコラーゲン分解の一因であると考えられる。しかしながら、抗微生物薬の投与により感染が沈静化した後にも角膜実質の融解が進行し、ステロイド薬を追加することで治癒する例を臨床的に経験する。したがって、微生物由来のコラーゲナーゼによる角膜実質の融解のみならず、角膜実質の居住細胞である角膜線維芽細胞や浸潤した炎症細胞などが微生物由来の因子により刺激され一連の反応の結果、過剰なコラーゲン分解が生じるのではないかと推測された。これらの知見を基に、角膜感染症における実質の過剰分解の機序を考える時、1)感染の認識機構、2)細菌そのものによるコラーゲン分解、3)菌体由来成分による居住細胞(角膜線維芽細胞)の刺激、および4)浸潤細胞と居住細胞の相互作用などが重要である(表2, 図3)。

3.1 角膜での病原微生物の認識

リポポリサッカライド (LPS) はグラム陰性菌の細胞外膜を構成する糖脂質で、いわゆるエンドトキシンである。菌体成分の中でも最も強く宿主の自然免疫機構を活性化し、同時に炎症細胞や居住細胞から炎症性サイトカインやケモカインを産生させる¹⁰⁾。実験動物で、LPS を点眼しても炎症反応は生じないが、上皮を傷害し LPS を点眼するかあるいは直接角膜実質内に LPS を注入すると、好中球浸潤を伴う角膜潰瘍が生じる^{11,12)}。

感染微生物に対する脊椎動物の生体防御反応には、自然免疫と獲得免疫があるが、近年 TLR (Toll-like receptor) が発見され、LPS が自然免疫反応を誘導することが明らかになってきた¹³⁾。実際、角膜線維芽細胞には、LPS の受容体である TLR-4 が発現しており¹⁴⁾、細菌由来の LPS は、TLR4 を介して角膜線維芽細胞に作用し、好中球や単球に対するケモカインである IL-8 や MCP-1 などの産生および接着分子 ICAM-1 の発現を促進させる¹⁵⁾。したがって、角膜線維芽細胞は TLR 受容体を介して LPS すなわち細菌感染を認識し、自然免疫応答により角膜実質への炎症細胞浸潤を引き起こしていると考えられる (表 3)。

3.2 角膜実質コラーゲンの分解

線維芽細胞を取り巻くコラーゲンの存在が細胞の機能に大きく影響していることを考え、より生体に近い条件でコラーゲン分解能を測定する実験系が必要である。角膜線維芽細胞

を I 型コラーゲングル内で三次元的に一定時間培養した後、培養上清を回収し、限外濾過により分子量 10 万以下の分解されたコラーゲン分子のみを回収し、塩酸と熱で加水分解した後に、ヒドロキシプロリンを測定することで細胞などによるコラーゲン分解能を測定する実験系を確立した^{16,17)}。

3.2.1 炎症性サイトカインによるコラーゲン分解

角膜線維芽細胞は、細胞外マトリックス特にコラーゲンの合成と分解の両者のバランスを取っており、角膜潰瘍では分解系優位の方向へ傾いていると考えられる。血管のない角膜であるが、いったん感染などの炎症が生じると、炎症性サイトカインの発現が上昇する。炎症性サイトカインである IL-1, TNF- α , IL-6 などの内、IL-1 のみがコラーゲン分解を促進することが明らかとなった¹⁸⁾。

3.2.2 緑膿菌によるコラーゲン分解

細菌の代表として緑膿菌について、角膜線維芽細胞によるコラーゲン分解への作用について検討した¹⁹⁾。緑膿菌の培養上清を添加すると、コラーゲン分解は促進される。しかしこの時、角膜線維芽細胞を存在させると、細胞がない状態に比し極めて多量のコラーゲンが分解された。この結果は、緑膿菌由来コラーゲナーゼによる直接的なコラーゲン分解作用と、角膜線維芽細胞の存在により増強される間接的な分解作用の二つの経路が存在することを示している。緑膿菌由来の病原因子である LPS, elastase, exotoxin A についてそれぞれのコラーゲン分解作用に対する効果を検討した。elastase が角膜

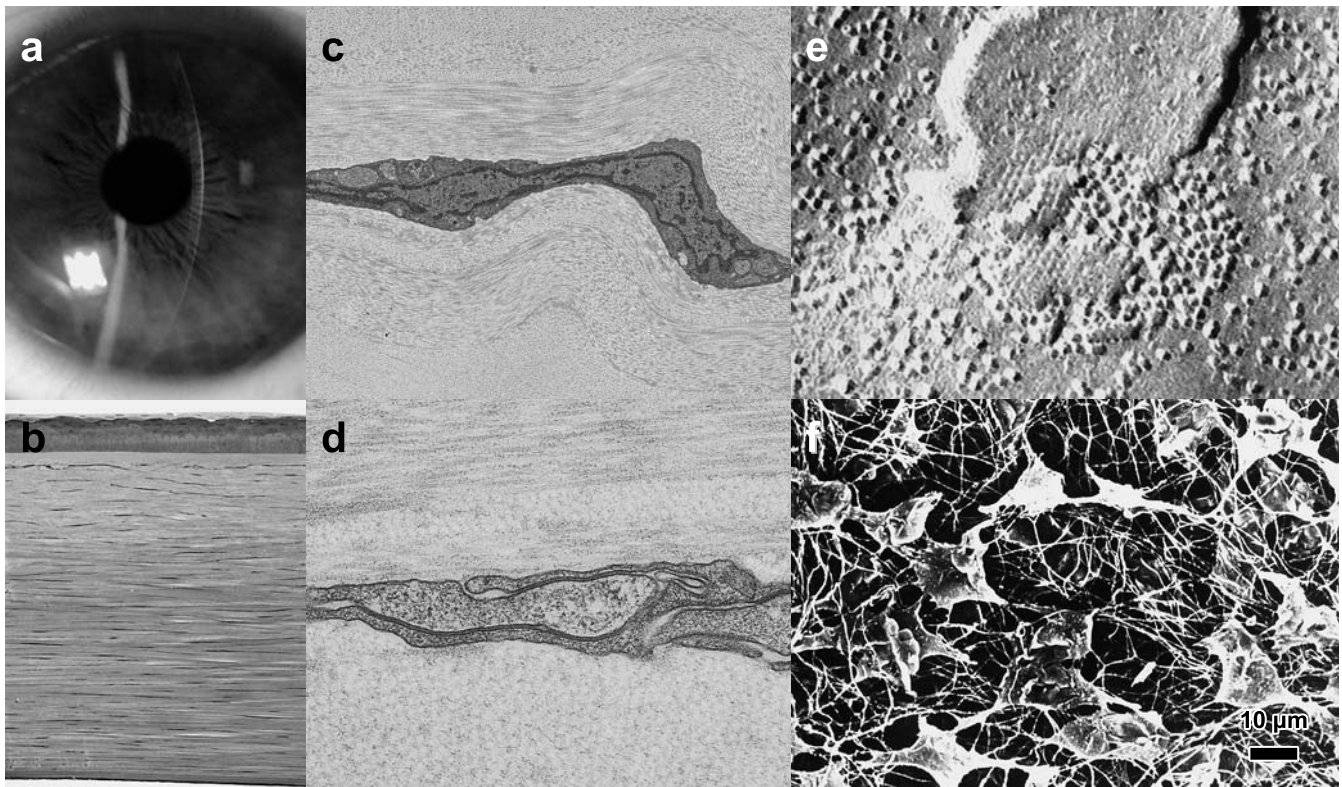


図1 角膜の構造。a: 細隙灯顕微鏡による観察。b: トルイジンブルー染色。c: 透過型電子顕微鏡による観察。整然と配列しているコラーゲン線維と線維芽細胞。d: 透過型電子顕微鏡による観察。線維芽細胞間に Gap Junction が観察される。e: Freeze Fracture 法による観察。f: 角膜線維芽細胞の三次元網目状構造。

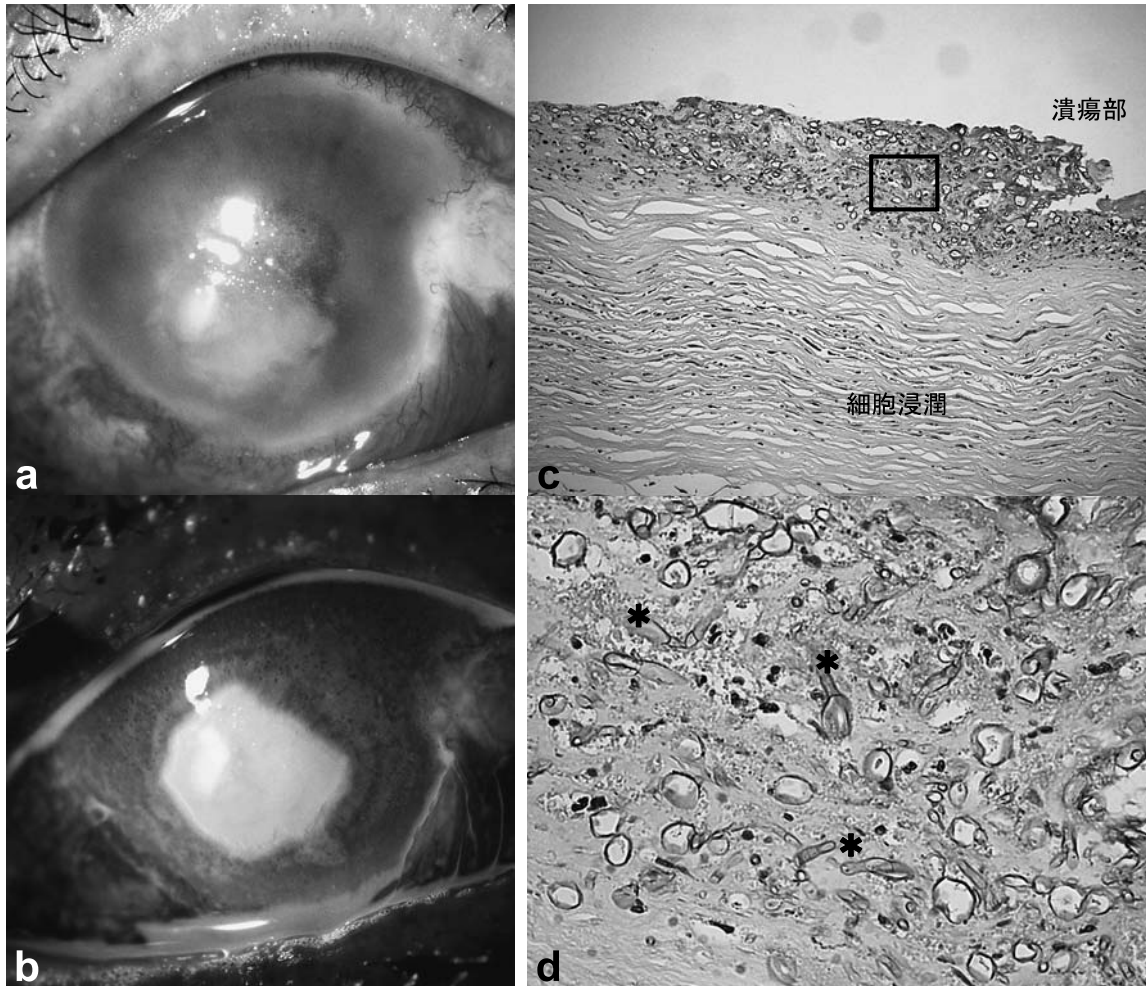


図2 感染性角膜潰瘍（真菌性）。a：前眼部写真。境界部辺縁がやや不正な病巣を呈している。著明な充血とともにびまん性の角膜浮腫を呈している。b：フルオレセイン染色。実質混濁が見られる部位に一致して上皮欠損を伴っている。c：切除角膜病理切片では、上皮細胞層・Bowman膜の構造は破壊され、実質内にも炎症細胞の浸潤を伴った病巣部が確認される。d：c枠内の拡大像。病巣部には寄生形態をした菌糸（*）が多数見られる。（PAS染色）

線維芽細胞によるコラーゲンの分解を促進させ、逆に遺伝子改変により elastase を分泌しないようにした緑膿菌株の培養上清ではコラーゲン分解が促進されなかった。また、elastase が角膜線維芽細胞より分泌された不活性型の pro-matrix metalloproteinase (pro-MMP) を活性型に変換した。したがって、緑膿菌由来の elastase が、角膜線維芽細胞を介したコラーゲン分解を促進する因子であることが明らかとなった。

3.2.3 浸潤細胞によるコラーゲン分解の調節

従来浸潤した好中球が角膜潰瘍の病態では最も重要であり、実質コラーゲンを分解する作動系であると考えられてきた。そこで、浸潤した好中球がコラーゲン分解にどのように関与しているのかを知る目的で、角膜線維芽細胞と好中球の相互作用についてコラーゲンゲル内培養法を用いて検討した²⁰⁾。好中球を単独でコラーゲンゲル内で培養しても、コラーゲン分解はほとんど認められなかった。一方、角膜実質細胞と好中球を同時にコラーゲンゲル内で培養するとコラーゲン分解は相乗的に促進した。細胞同士の接触が必要かどうかを検討するために、それぞれの培養上清を用いて検討する

と、好中球由来の培養上清は角膜線維芽細胞によるコラーゲン分解を促進するが、線維芽細胞由来の上清は好中球によるコラーゲン分解に影響を与えなかった。さらにその後の検討で、好中球の培養上清に含まれている炎症性サイトカインである IL-1 が角膜線維芽細胞を刺激し、線維芽細胞による MMP 産生および活性化が亢進することが明らかとなった。

角膜へ浸潤した好中球は、感染初期には感染微生物の貪食など生体防御に働く一方で、感染が沈静化した後も遊離された LPS などにより角膜実質細胞からのケモカインの産生が持続すると、角膜実質への好中球浸潤が遷延しコラーゲン融解を促進するという生体にとって不利益な反応を起こす。これらの結果は、居住細胞である角膜線維芽細胞が作動系の細胞 (Effector Cells) であり、浸潤してきた好中球は調節系の細胞 (Modulator Cells) であることを示している。

4. 感染性角膜潰瘍治療薬開発の可能性

感染による角膜潰瘍の治療の大原則は適切な抗生物質や抗菌剤の使用である。抗微生物薬により、感染の初期に細菌を

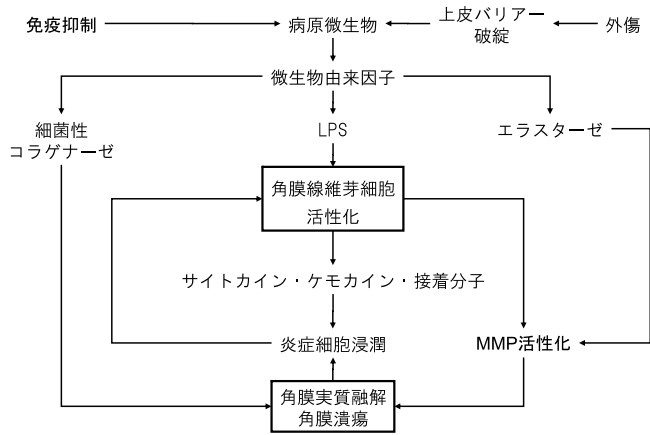


図3 角膜感染症の病態

死滅させることができれば、細菌由来によるコラーゲン分解すなわち組織破壊を最小限にでき癒痕も少なく治癒せしめうる。しかしながら、いったん角膜線維芽細胞が感染を認識し、自らコラーゲン分解系に傾き、さらに炎症性細胞の浸潤を亢進する方向に作用し始めると、もはや抗生剤や抗菌剤は潰瘍の進行を止めることはできない。現在入手できる薬剤の中では、ステロイド剤のみがこの反応系を打ち切ることができるものである。しかしながら、ステロイドは免疫系を抑制することから感染症での使用は極めて難しい。ここにあたらしい観点から、線維芽細胞の機能を調整し、組織破壊を抑制する薬剤の開発が臨床的に求められている。我々は、中国でリウマチなどの自己免疫疾患の治療に用いられている雷公藤の活性主成分であるトリプトライドが、角膜線維芽細胞によるMMP産生を抑制し、コラーゲン分解を抑制すること²¹⁾や、LPSにより刺激される角膜線維芽細胞からのケモカイン産生や接着分子の発現を抑制することを報告し^{22,23)}、将来トリプトライドが角膜潰瘍の治療薬となる可能性を探索している。

5. おわりに

感染による組織破壊である角膜潰瘍は、単に炎症細胞や病原微生物が一方向的に角膜実質を破壊しているのではなく、感染微生物、角膜線維芽細胞、炎症細胞、細胞外マトリックスあるいはサイトカイン・ケモカインなどの複雑な相互の作用により生じ、進行していく。正常な角膜では、角膜線維芽細胞は、視覚に重要な位置を占める角膜の透明性と形状を維持するために、基本的に細胞外マトリックスの合成と分解を担当し、静かな代謝を行っている。角膜上皮の破綻による感染がいったん成立すると、角膜線維芽細胞は引き続き生じる炎症反応の司令塔として中心的な機能を果たしているものと考えられる。一方で、居住細胞である角膜線維芽細胞がコラーゲン分解に対する作動系の細胞として機能し、線維芽細胞が分泌したサイトカインやケモカインにより浸潤した炎症性細胞はこれらの反応を増強させる調節系細胞として機能しており、角膜線維芽細胞が正常あるいは病的をとわずかなめの役割を演じている重要な細胞であると考えられる。

- 1) Nishida, T.: in Krachmer, J.H., Mannis, M.J., Holland, E.J. (Ed.), *Cornea: Fundamentals of cornea and external disease*, Mosby, New York, 2005, p. 3-26
- 2) 感染性角膜炎全国サーベイランス・スタディグループ：日本眼科学会雑誌, 110, 961-972 (2006)
- 3) Otori, T.: *Exp. Eye Res.*, 6, 356-367 (1967)
- 4) Nishida, T., Yasumoto, K., Otori, T. and Desaki, J.: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 29, 1887-1890 (1988)
- 5) Ueda, A., Nishida, T., Otori, T. and Fujita, H.: *Cell Tissue Res.*, 249, 473-475 (1987)
- 6) Nishida, T., Ueda, A., Fukuda, M., Mishima, H., Yasumoto, K. and Otori, T.: *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 24, 1009-1014 (1988)
- 7) Fujita, H., Ueda, A., Nishida, T. and Otori, T.: *Cell Tissue Res.*, 250, 251-255 (1987)
- 8) Nishida, T., Ueda, A., Otori, T. and Fujita, H.: *Cornea*, 10, 532-535 (1991)
- 9) Hao, J.L., Suzuki, K., Lu, Y., Hirano, S., Fukuda, K., Kumagai, N., Kimura, K. and Nishida, T.: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46, 1195-1200 (2005)
- 10) Caroff, M. and Karibian, D.: *Carbohydr. Res.*, 338, 2431-2447 (2003)
- 11) Schultz, C.L., Morck, D.W., McKay, S.G., Olson, M.E. and Buret, A.: *Exp. Eye Res.*, 64, 3-9 (1997)
- 12) Schultz, C.L., Buret, A.G., Olson, M.E., Ceri, H., Read, R.R. and Morck, D.W.: *Infect. Immun.*, 68, 1731-1734 (2000)
- 13) Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S.: *Annu. Rev. Immunol.*, 21, 335-376 (2003)
- 14) Kumagai, N., Fukuda, K., Fujitsu, Y., Lu, Y., Chikamoto, N. and Nishida, T.: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46, 114-120 (2005)
- 15) Fukuda, K., Kumagai, N., Yamamoto, K., Fujitsu, Y., Chikamoto, N. and Nishida, T.: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46, 3095-3101 (2005)
- 16) Hao, J.L., Nagano, T., Nakamura, M., Kumagai, N., Mishima, H. and Nishida, T.: *Exp. Eye Res.*, 69, 595-601 (1999)
- 17) Hao, J.L., Nagano, T., Nakamura, M., Kumagai, N., Mishima, H. and Nishida, T.: *Exp. Eye Res.*, 68, 565-572 (1999)
- 18) Nagano, T., Nakamura, M. and Nishida, T.: *Curr. Eye Res.*, 24, 240-243 (2002)
- 19) Nagano, T., Hao, J.L., Nakamura, M., Kumagai, N., Abe, M., Nakazawa, T. and Nishida, T.: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 42, 1247-1253 (2001)
- 20) Li, Q., Fukuda, K., Lu, Y., Nakamura, Y., Chikama, T., Kumagai, N. and Nishida, T.: *J. Leukoc. Biol.*, 74, 412-419 (2003)
- 21) Lu, Y., Fukuda, K., Seki, K., Nakamura, Y., Kumagai, N. and Nishida, T.: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44, 5082-5088 (2003)
- 22) Lu, Y., Fukuda, K., Nakamura, Y., Kimura, K., Kumagai, N. and Nishida, T.: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46, 2346-2352 (2005)
- 23) Lu, Y., Liu, Y., Fukuda, K., Nakamura, Y., Kumagai, N. and Nishida, T.: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 47, 3796-3800 (2006)
- 24) Okada, N., Fukagawa, K., Takano, Y., Dogru, M., Tsubota, K., Fujishima, H., Matsumoto, K., Nakajima, T. and Saito, H.: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46, 4512-4518 (2005)
- 25) Kumagai, N., Fukuda, K., Ishimura, Y. and Nishida, T.: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41, 1448-1453 (2000)
- 26) Tran, M.T., Tellaetxe-Isusi, M., Elnor, V., Strieter, R.M., Lausch, R.N. and Oakes, J.E.: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 37, 987-996 (1996)
- 27) Takano, Y., Fukagawa, K., Shimmura, S., Tsubota, K., Oguchi, Y. and Saito, H.: *Br. J. Ophthalmol.*, 83, 1074-1076 (1999)