

マウス角膜組織における腫瘍壊死因子 (Tumor
Necrosis Factor- α) の発現・分泌とその意義

関根麻紀

マウス角膜組織における腫瘍壊死因子 (Tumor
Necrosis Factor- α) の発現・分泌とその意義

関根 麻紀

目次

1 緒言		頁 3
2 方法と材料	1) マウス中央部角膜片の採取とその培養	5
	2) 角膜細胞の増殖と生存率の評価	7
	3) ELISA 法を用いた TNF- α 分泌の測定	8
	4) バイオアッセイ法を用いた TNF- α 分泌の測定	10
	5) マクロファージからの TNF- α 分泌	10
	6) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法を用いた TNF- α mRNA の分析	10
	7) 免疫組織染色	11
	8) 統計学的解析	12
3 結果	1) 中央部角膜片の細胞型の分析	13
	2) 角膜片からの TNF- α 分泌	17
	3) 角膜片における TNF- α mRNA の発現	24
	4) TNF- α のマウス角膜における局在の免疫組織学的検討	29
4 考按	1) TNF- α のマウス角膜組織における発現と産生	31
	2) マウス角膜組織において TNF- α を産生する細胞の同定	34
	3) TNF- α の角膜組織における生理的および病態生理的役割	34
	3)-1. サイトカイン産生細胞あるいはあるいは免疫調節細胞としての角膜細胞	34
	3)-2. TNF- α の角膜組織に及ぼす作用	35
	3)-3. 各種免疫性角膜疾患における TNF- α の意義	36
	4) 免疫抑制薬の角膜組織における TNF- α の産生に及ぼす効果とその作用機序についての考察	37
5 結語		40
6 文献		41

1 緒言

腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) は主として活性型マクロファージやT細胞から産生されるサイトカインであり、リーダーペプチド 76 残基中疎水性の高い20 残基を貫通領域として細胞膜に結合した 26.5kDa の膜型、あるいは51kDa の三量体分泌型として存在している。TNF- α は 1975 年、BCG あるいはリポポリサッカライド (LPS) などの免疫系賦活剤で処理した動物の血中に存在する、腫瘍壊死惹起物質として発見されたためこのように命名された (1)。しかし、実際にその生体内における活性として報告されているものは、抗腫瘍、抗微生物、炎症、組織修復、免疫系賦活、食欲低下、発熱、睡眠導入、ホルモン分泌・作用調節など多岐にわたり、様々な生理的・病的状態、例えば正常免疫反応、急性・慢性炎症および免疫疾患 (敗血症、脳マラリア、移植拒絶反応、虚血性障害、悪性腫瘍、悪液質) において重要な役割を果たすことが知られている (2-5)。

一方、TNF- α の受容体としては2種の異なるものが見出されており (5)、それぞれ Type I (p55)、Type II (p75) とされ、前者はとくに上皮系の細胞を中心として広い組織分布を示し、後者は造血組織 (とりわけ活性化B細胞・T細胞) に強く発現している。換言すれば、赤血球、非活性型T細胞、血小板を除く殆どの細胞膜上にいずれかの受容体が存在し、加えて近年、可溶性のTNF- α の結合蛋白の存在が報告されている (6)。

このような生体内での広範囲にわたる分布と多種多様の作用を考えると、TNF- α が眼組織においても何らかの作用を有し、種々の眼疾患に関わっている可能性は十分推測される。事実これまでに、TNF- α が網脈絡膜によって産生されることが確認され (7)、自己免疫性ぶどう膜炎の発症に関与しうることについては多数の報告がなされている (8-10)。一方、角膜組織における TNF- α の mRNA の発現は報告されているものの (7, 11, 12)、正常ないし障害された角膜による TNF- α の産生あるいは分泌について直接検討されたものはない。またTNF- α が角膜組織にどのような

作用を及ぼすのかについてはほとんど知られていないのが現状である。

以上の点をふまえ、炎症の成立および免疫制御に関与する重要なサイトカインとしての $\text{TNF-}\alpha$ の役割を考慮し、様々な炎症性疾患の場となる角膜組織においても $\text{TNF-}\alpha$ が産生され、それらの病態の主要な因子として作用するという仮説を立てた。角膜組織内において $\text{TNF-}\alpha$ を産生することが予想される細胞は、角膜周辺部に多く存在することが知られているランゲルハンス細胞である(13, 14)。しかしながら、角膜を構成する固有の細胞、すなわち上皮細胞、実質細胞、内皮細胞自体に $\text{TNF-}\alpha$ の産生能力があるかどうかということは知られていない。

この点を明らかにするために本研究ではマウス角膜の中央部より得られた組織片の培養を行ない、 $\text{TNF-}\alpha$ の mRNA の発現と産生について検討した。この際、強力な $\text{TNF-}\alpha$ 産生刺激物質としてしばしば用いられる細菌由来のリポポリサッカライド (LPS) でマウス角膜片の刺激を行なった。マウス中央部角膜には $\text{TNF-}\alpha$ を産生しうる血球系細胞がほとんど存在しないことから、この方法により角膜固有の細胞における $\text{TNF-}\alpha$ の発現・産生の検討が可能であると考えられた。本研究では、実際に中央部角膜が $\text{TNF-}\alpha$ の mRNA を発現し、 $\text{TNF-}\alpha$ を産生・分泌する能力を有することを示した。さらに角膜疾患に対して日常臨床でしばしば用いられる副腎皮質ステロイド (グルココルチコイド)、および代表的な免疫抑制薬として使用されるシクロスポリン A の、 $\text{TNF-}\alpha$ 発現・分泌に及ぼす効果も検討した。

2 方法と材料

1) マウス中央部角膜片の採取とその培養

生後 4-6 週の雌 C57BL/6 マウスより, The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) の規定に従い, 滅菌操作下にトレパンを用いて径 1.3 mm 大の切開組織片を採取した。培養液としては Ham 12 および Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) 1:1 混合培地を用い, 10% ウシ胎児血清, マウス上皮成長因子 (Epidermal Growth Factor, 1 ng/ml), ペニシリン (200 U/ml), ストレプトマイシン (200 µg/ml) を添加した。角膜片はまず同培養液中で 1 回洗浄し, 径 18 mm の培養用ウェル内に設置された径 10 mm のフィルター上に, 上皮側を上にした状態で置いた (図 1, 1 フィルターにつき RT-PCR 法のためには 5 個, それ以外の実験の場合には 10 個)。このフィルターは, 角膜片の接着固定のため, および角膜細胞の極性を一定に保つためのものである (15)。角膜片がフィルターに十分固定されるまで約 15 分間, 37°C, 滅菌下に放置した後, 1 ml の培養液を注意深く加え, 37°C, 5% CO₂ - 95% 大気に保たれたインキュベーター内に培養した。2 日後, 培地を新鮮な培養液 380 µl と交換し, 一部には *E. coli* 055:B5 由来の LPS 1 µg/ml を添加した。さらにそれぞれの実験に応じ, 一定の時間培養を行なった (RT-PCR のためには 6 時間, その他の場合には計 24 時間, 図 2)。

TNF- α の mRNA の発現を検討するためには, 角膜片はプラスチックチューブに収め, -80°C に保存した。また TNF- α の分泌測定のため, 培養上清を採集し -20°C 下に貯蔵した。免疫組織学的検討のためには後述のように, 角膜片を培養終了後直ちに Tissue-Tek OCT compound 中に包埋し, 液体窒素を用いて凍結, -20°C 下に貯蔵した。免疫抑制薬を用いた実験においては, 各薬剤は培養開始直後より培地中にそれぞれ示された濃度で添加した (図 2)。

各薬剤の調整は以下に行なった。プレドニゾロン・ブテゾニドは 10⁻⁵ M になるように 100% エタノールに溶解した。またシクロスポリン A はエタノールに溶解し (10 mg/ml), 培養液で 1 mg/ml の濃度に希釈した後 4°C に保存した (16)。

図1 マウス角膜片の採取と培養

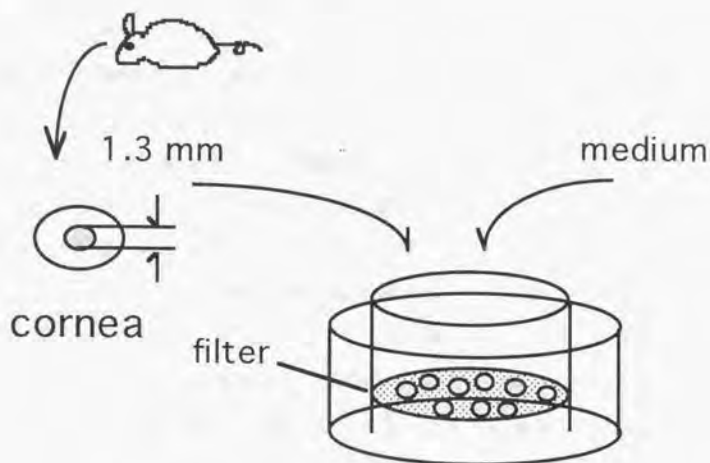
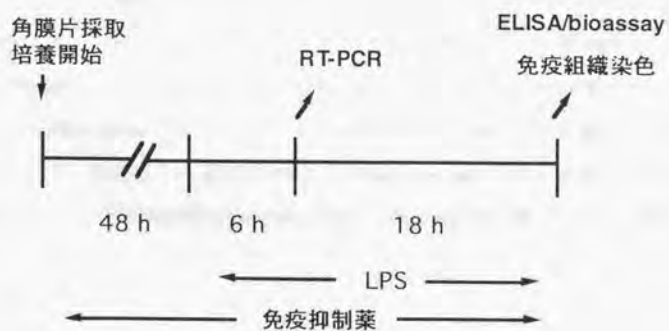


図2 角膜片培養プロトコール



2) 角膜細胞の増殖と生存率の評価

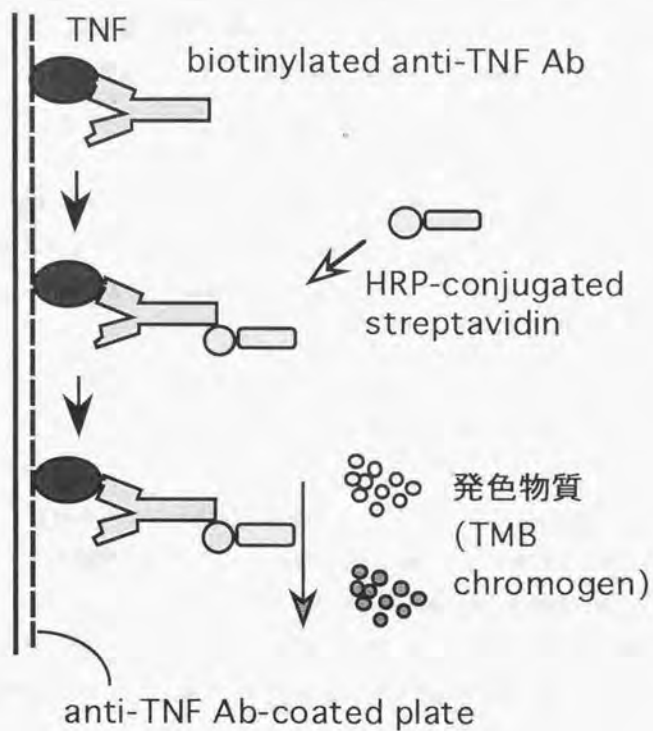
実験系を確立するにあたり、培養された角膜片中の細胞が実際に増殖能を有し、生存していることを確認することは重要である。その目的で、まず増殖能の検討を 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) によるラベリングで評価した。実際には、市販のキット (Boehringer Mannheim Biochemica 社製) を用い、培地中に BrdU (10 μ M) を加え一昼夜 37°C に静置後、リン酸緩衝液で 3 回洗浄、さらにエタノール固定 (-20°C) を行なった。それに Tris-グリシン緩衝液を加え、マウス抗 BrdU 抗体存在下に 45 分間置いた後、同バッファーで 3 回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体と反応させた。細胞増殖は顕微鏡下にペルオキシダーゼ染色された細胞の核を観察することにより判定した。

また本研究では角膜細胞における TNF- α の発現・産生に対する薬剤の効果を検討したが、その際各薬剤の角膜細胞の生存に与える影響を、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 tetrazolium bromide (MTT) を色素として用いた比色法 (MTT アッセイ) (17) によって評価した。この方法の原理は、生存する細胞内の酸化的代謝活性を、それに伴って生じる MTT 還元反応を定量することによって、間接的に細胞の生存率を判定するというものである。培養された 5 個の角膜片をリン酸緩衝液で 2 回洗浄した後、0.5 mg/ml MTT を添加した Krebs-Ringer 液 (10 mM HEPES, pH 7.4, 0.5 mM NaH_2PO_4 , 2 mM NaHCO_3 , 140 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 0.5 mM MgSO_4 , 1.5 mM CaCl_2 , 0.1% bovine serum albumin, 11.2 mM glucose) 中に 37°C, 30 分間インキュベートし、20% sodium dodecyl sulfate / 50% N,N-dimethylformamide を含む液を加えて角膜細胞を溶解させ、抽出された還元型 MTT (formazan crystal) による発色を 550 nm の波長で Labsystems Multiscan MS microplate reader (BioConcept 社製) を用いて測定した。

3) ELISA 法を用いた TNF- α 分泌の測定

マウス TNF- α の測定は Innogenetics 社による ELISA 法を応用したアッセイキット Innobasics-10 を用いて測定した。この方法は、サンドイッチタイプの酵素免疫アッセイ法に基づいたものである (図3)。検体中のマウス TNF- α は、マイクロプレートにコーティングされたウサギ抗マウス TNF- α ポリクローナル抗体と結合する。その後さらにビオチンを結合させた抗マウス TNF- α 抗体を添加すると、この抗体はマイクロプレート中で形成された TNF- α -抗体複合体に結合することになる。過剰なビオチン結合抗体を洗浄によって除き、horseradish peroxidase に結合したストレプトアビジンを加え、やはり余剰分を除いた後、最後に基質として tetramethylbenzidine-chromogen を添加する。この酵素反応は 2N H_2SO_4 を添加することによって停止させ、生成した発色物質を自動 ELISA スキャナーを用いて波長 450 nm にて定量した。この場合のマウス TNF- α の検出限界は 15 pg/ml である。

図3 TNF- α の高感度 ELISA 法による測定の原理



4) バイオアッセイ法を用いた TNF- α 分泌の測定

培養角膜片から分泌された TNF- α の生物学的活性を、TNF- α に高い感受性を持つ継代培養線維肉腫細胞株 WEHI 164 (subclone 13) (18) を用いた MTT アッセイ (上述) で測定した。6 x 10⁵ 個/ml に調整された同細胞を、検体 10 μ l あるいはマウス TNF- α スタンダードとともに転写阻害物質アクチノマイシン D 1 μ g/ml 存在下で、18 時間、37°C に培養した。さらに MTT (1 mg/ml) とともに 4 時間静置した後上清を除き、細胞を isopropanol-HCl 液中で溶解した。溶液中に得られた還元型 MTT を波長 570 nm で ELISA reader により測定した。この方法では 1 pg/ml までのマウス TNF- α の検出が可能である。

5) マクロファージからの TNF- α 分泌

腹腔内マクロファージを、thioglycollate を投与された C57BL/6 マウスより既報 (19) のごとく採取した。マウス 1 匹あたり 200 μ l の thioglycollate を腹腔内注入し、3 日後腹水中の細胞を DMEM で洗浄することにより採集し、マイクロプレート内に 4 時間培養した。この時点でなお浮遊している細胞は洗浄により除き、プレートに付着したマクロファージ (約 10⁶ cells/well) を 24 時間培養した。やはり TNF- α 分泌の刺激のため 1 μ g/ml LPS を添加し、場合により免疫抑制薬を同時に加え培養した。上清中に分泌された TNF- α は上述の ELISA 法で測定した。

6) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法を用いた TNF- α mRNA の分析

培養後の角膜片より RNA を Trizol 試薬を用いて抽出した。DNA の混入を避けるべく RNA 溶液に DNase 処理を加え、ランダムプライマーを用いて逆転写酵素反応を行った。さらに RNase で処理した後、フェノール中に抽出、沈殿物として得られた cDNA を再び溶解し比色法により定量、最終的に 0.2 μ g/ml に調整した。PCR 反応に用いたプライマーは、276 bp の TNF- α フラグメントを増幅産物とすべ

く作成された以下の2種である：5'-ATGAGCACAGAAAGCATGATC, 5'-TACAGGCTTGTCACCTCGAATT。スタンダードとしては β アクチン (230 bp), あるいはグリセルアルデヒドリン酸脱水素酵素 (GAPDH, 260 bp) を用いた。ハイブリダイゼーションを行なう際の温度は Baldino ら (20) の方法に従って算出した結果, 55°Cを適温として採用した。上記3種のそれぞれのRNAを, PTC-100 サーマルコントローラー (MY Research, BioConcept) を用い, 5サイクルのインターバルをもって20-40サイクルで増幅し, 反応が直線的に生じる範囲を確認した。mRNAの定量にあたっては, cDNA溶液 (5 μ l), dNTPs (0.2 mM), 両プライマー (0.25 μ M), [α - 32 P]ATP (2 μ Ci), DynaZyme DNA ポリメラーゼ (2 U) を含む溶液 (総量 50 μ l) を, ホットスタート法を用いて32サイクルの増幅を行なった。最終的に得られたサンプルはグリコーゲン・キャリアーの存在下に沈殿させ, 2% アガロースゲル上に泳動した。その後, ゲルをエチジウムブロマイドで染色し, 写真撮影した。また定量のためにバンドを切り出し, Optiphase Hisafe II シンチレーターでカウントした。

7) 免疫組織染色

培養された中央部角膜片を小トレイに満たした Tissue-Tek OCT compound 中に包埋し, isopentane 中で液体窒素により急速に凍結させた。クリオスタットを用いて得られた厚さ 7 μ m の凍結切片を, ポリ-L-リジンでコーティングしたスライドガラス上に設置した。固定は冷アセトン (-20°C) を用いて行なった。同切片を 0.1% saponin を含む Tris 緩衝液 (TBS, 30 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl) 中に 3% bovine serum albumin で 30 分間ブロッキング, さらにラット抗マウス TNF- α モノクローナル IgM 抗体 (6.6 μ g/ml, ref. 21) を添加した同緩衝液中に4°Cで一昼夜インキュベートした。その後, ヒツジ抗ラット IgG-IgM 抗体 (1:400 希釈, Jackson-ImmunoResearch 社) を用いてマウス TNF- α の存在を検出した。検出はまず切片を Mowiol 4-88 中に封入し, Zeiss Axiophot 蛍光顕微鏡で観察, 写真撮影した。コントロールには, 抗マウス TNF- α 抗体 (第一抗体) を加えずに行なったものその他, ラ

ット抗マウスインターロイキン1 (IL-1) IgM 抗体を第一抗体と同じ Ig サブクラスのコントロール抗体として用いた。後者を用いた場合、本実験の条件では角膜における IL-1 は検出されなかったが、この抗体のウェスタンブロットあるいは ELISA における検出限界は 1 ng とされており、ごく微量の IL-1 が角膜に存在する可能性は否定できない。事実他の報告では、角膜組織における IL-1 の存在あるいは角膜単純ヘルペス後の IL-1 の発現などが認められている (22, 23)。角膜片における各細胞はそれぞれを認識する特異的抗体で確認した。すなわち、角膜上皮細胞は抗サイトケラチン 14 モノクローナル抗体 (LL002) (24)、Tリンパ球は抗 Thy-1.2 モノクローナル抗体 (30-H12) (25)、Bリンパ球は抗マウス μ 鎖モノクローナル抗体 (LO-MM-9) (26)、ランゲルハンス細胞は抗 I-A^b モノクローナル抗体 (25-9-17S) (27)、マクロファージは抗 Mac-1 モノクローナル抗体 (28) で確認された。このうち LL002 のコントロールとして同一のサブクラス (IgG₁) を有する抗 dinitrophenyl モノクローナル抗体 (29) を用いた。ランゲルハンス細胞を染色する際には、よりその確認を用意にするため、20 mM EDTA を含む PBS 中に角膜片を 30 分間、37℃ 下に浸し、上皮を剥離除去した条件でも検討した (30)。

8) 統計学的解析

結果は平均値 ± SEM で示した。統計処理は unpaired Student's *t*-test で行ない、*P* < 0.05 の場合に有意差ありと判定した。

3 結果

1) 中央部角膜片の細胞型の分析

培養3日後の中央部角膜片においては、上皮細胞が何層にも増殖し、さらにはトレパンによる切断面と内皮側縁を完全に覆っていた。角膜片の辺縁部において角膜上皮細胞の増殖が盛んであることは、同部位において BrdU による核のラベリングが著明であることにより確認された。この所見は角膜片中央部には認められなかった。角膜片において上皮細胞はサイトケラチン 14 を認識する抗体 LL002 で証明された(図4 a, b)。この抗体の特異性は、コントロールとして抗 dinitrophenyl モノクローナル抗体を使用することにより確認された(図4 c)。一方組織学的に明らかに内皮細胞と同定されるものは認められず、電子顕微鏡による分析でも上皮細胞がデス膜を越えて増殖し、内皮細胞側にも多数存在している所見が得られた。このように本研究において用いられた培養3日後のマウス中央部角膜片は、実際にはほぼ2種類のみで角膜細胞、すなわち上皮細胞と実質細胞から構成されていることがわかった。

しかしながら、その他の TNF- α を産生する可能性がある細胞としてTリンパ球、Bリンパ球、ランゲルハンス細胞、マクロファージなどが角膜組織にも存在しうるため、それらの有無について各々の細胞に特異的な抗体を用いた免疫組織染色により検討した。うちT細胞とB細胞のそれぞれに対する抗体の特異性は、マウス脾臓切片の染色(図5 a, b)により、またマクロファージのそれについてはマウス肺切片の染色によって確認した。このようにしてマウス角膜片の凍結標本を20切片確認したうちでは、T細胞(図5 c)およびランゲルハンス細胞は各5個確認され、マクロファージの存在は認められなかった。

図4 培養3日後マウス中央部角膜片の免疫染色。角膜片は3日間 LPS で刺激し、上皮細胞を特異的に認識する抗サイトケラチン 14 抗体 (LL002) で免疫染色を行った。(a) 角膜上皮細胞 (EP) は切創縁と角膜内皮細胞 (EN) 縁を被いつつ増殖している。S = 角膜実質。(b) aをさらに7倍拡大。(c) 抗 DNP 抗体を用いたコントロール染色。Bars = 100 μ m。

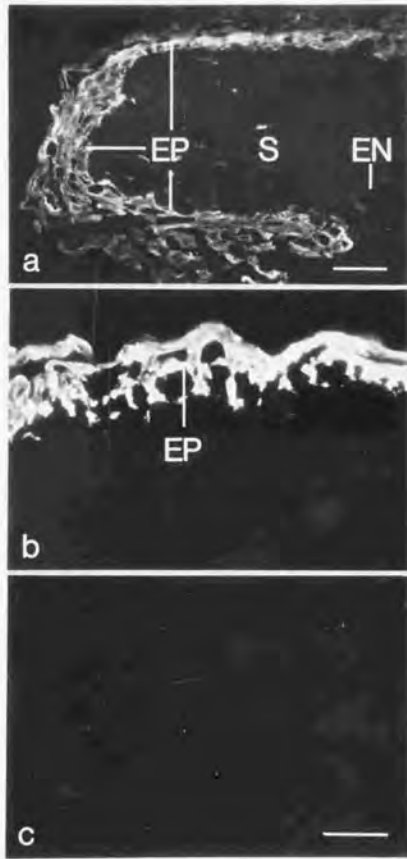
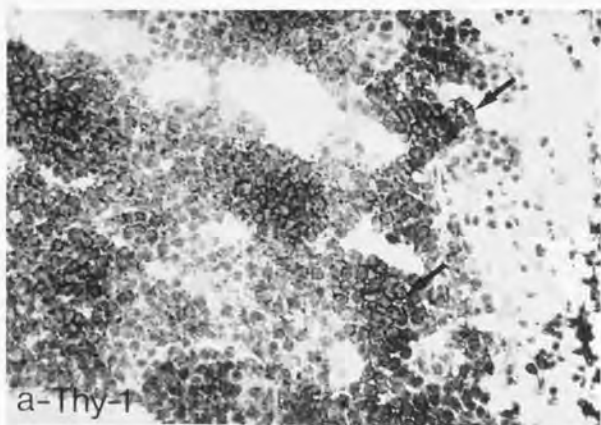


図5 マウス脾臓切片および角膜片におけるB・Tリンパ球の免疫染色。(a) マウス脾臓におけるBリンパ球を特異的に認識する抗マウス μ 鎖モノクローナル抗体(LO-MM-9)を用いた免疫染色。Bリンパ球(矢印)は髄索に集中して染色される。(b) マウス脾臓におけるTリンパ球を特異的に認識する抗Thy1.2モノクローナル抗体(30-H12)を用いた免疫染色。Tリンパ球(矢印)は白脾髄に集中して染色される。(c) 培養マウス角膜片(LPS刺激3日後)における30-H12によるT細胞(矢印)の染色。EP=角膜上皮細胞, ST=角膜実質, EN=内皮側縁。

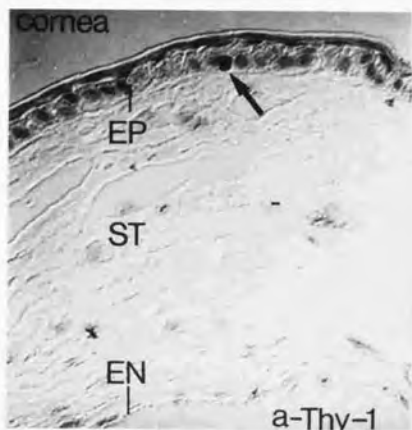
a



b



c

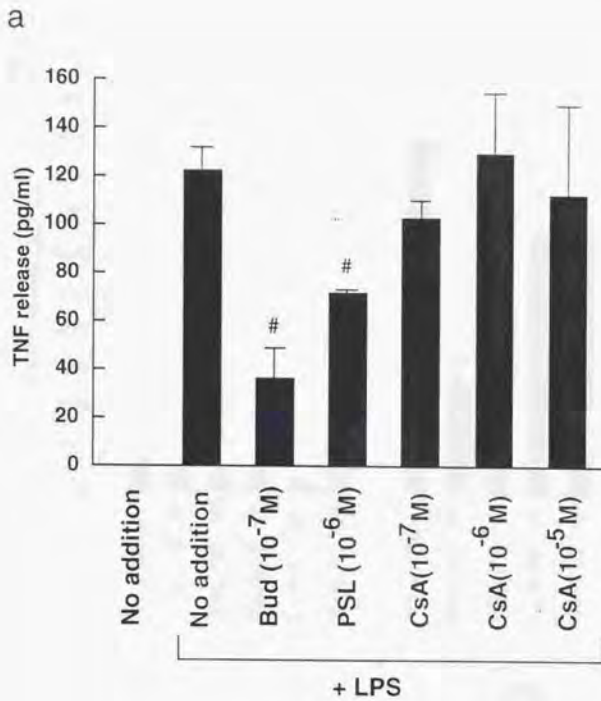


2) 角膜片からの TNF- α 分泌および TNF- α 分泌に対する各種免疫抑制薬の効果
培養角膜片からの TNF- α の分泌を、培養上清中に存在する TNF- α を高感度 ELISA 法を用いたアッセイで測定することにより検討した。LPS 非存在下に 24 時間培養された角膜片からの TNF- α の分泌は ELISA 法で検出されなかった (図 6 a)。一方、1 $\mu\text{g/ml}$ LPS により刺激された 10 個の角膜片の培養上清中には、 $122 \pm 10 \text{ pg/ml}$ (サンプル約 300 μl 中) の TNF- α が検出された。

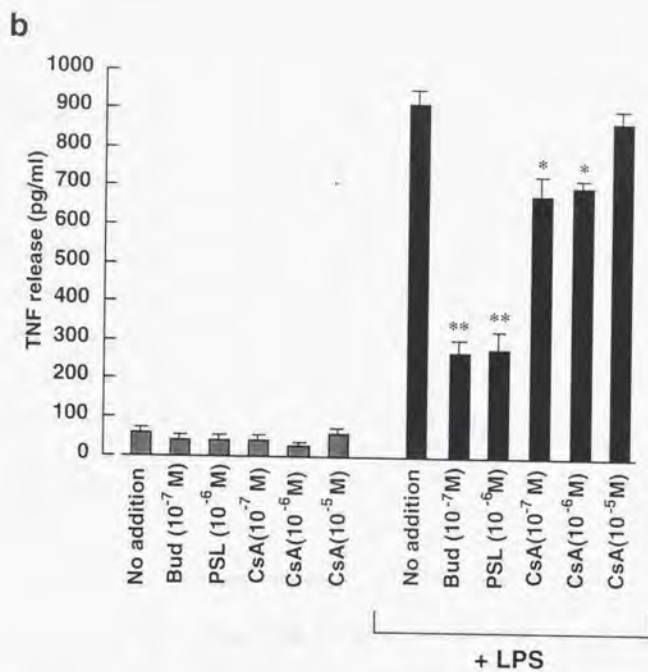
ここで測定された TNF- α が実際に生物学的活性を持っているかどうかを確認するため、同一のサンプルを用いて、TNF- α に感受性のある WEHI 164 細胞 (subclone 13) を利用したバイオアッセイを行なった。この方法によっても非刺激角膜片よりの TNF- α の分泌は検出しえなかったが、LPS 刺激によって TNF- α の分泌は刺激されることが示された (表 1)。しかし、バイオアッセイによって測定された、LPS で刺激された角膜片から分泌された TNF- α 活性は、ELISA 法によって測定されたそれの約 6 分の 1 に相当する $20.2 \pm 1.5 \text{ pg/ml}$ であった (表 1, 図 6 a)。

次に免疫抑制薬の角膜組織からの TNF- α の分泌に対する効果を調べた。本研究で使用した薬剤は 2 種類のグルココルチコイド、すなわちブデゾニド、プレドニゾン、およびシクロスポリン A である。このうち後 2 者は非化膿性炎症 (ぶどう膜炎、強膜炎、視神経炎)、アレルギー性疾患、その他の免疫疾患あるいは角膜移植時など種々の眼疾患の治療に使用されている。LPS 刺激開始 48 時間前より添加されたブデゾニド、プレドニゾンは両者とも LPS 刺激による TNF- α を、それぞれ -71%、-41% と著明に減少させた (図 6 a)。これに対してシクロスポリン A は、 10^{-7} 、 10^{-8} M のいかなる濃度においても、LPS によって刺激された角膜細胞からの TNF- α の分泌に有意な影響をおよぼさなかった (図 6 a)。これら免疫抑制薬の効果はバイオアッセイによる測定によっても確かめられた (表 1)。その抑制の程度は両測定法においてほぼ同様であった (図 6 a, 表 1)。

図6 高感度 ELISA 法によるマウス角膜片 (a), マウスマクロファージ (b) よりの TNF- α 分泌の測定。(a) 10 個の角膜片を 48 時間培養後, 1 μ g/ml LPS 刺激 24 時間における培養上清中への TNF- α 分泌を高感度 ELISA 法により測定した。また計 72 時間の培養中, 免疫抑制薬 (Bud, プデゾニド; PSL, プレドニゾロン; CsA, シクロスポリン A) を添加し, 非添加 (No addition) 群と比較した。# $P < 0.05$ vs. Control (No addition + LPS)。(b) マウス腹腔内より採取したマクロファージ (10^6 cells/well) を 4 時間培養し培養プレートに接着させた後, 24 時間 1 μ g/ml LPS 刺激を行った。また (a) 同様に免疫抑制薬の効果を検討した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Control (No addition + LPS)。



$p < 0.01$ vs. No addition+LPS



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. No addition+LPS

表1 バイオアッセイによるマウス角膜片からの活性型 TNF- α の測定

Culture condition*	TNF (pg/ml)†	P value#
No addition	< 1.0	
LPS alone	20.2 \pm 1.5	
LPS + Bud (10^{-7} M)	4.8 \pm 1.2	< 0.01
LPS + PSL (10^{-6} M)	8.1 \pm 0.8	< 0.01
LPS + CsA (10^{-7} M)	15.8 \pm 1.1	NS
LPS + CsA (10^{-6} M)	16.4 \pm 0.8	NS
LPS + CsA (10^{-5} M)	16.8 \pm 0.8	NS

†示された数値は、10個の角膜片を用いて独立に行われた3回の実験より得られた結果を mean \pm SEM で表したものである。

* Bud = budesonide; PSL = prednisolone; CsA = cyclosporin A

NS, not significant vs. "LPS alone".

以上の角膜における各薬剤の効果が他の TNF- α 産生組織においても認められるものであるかを検討するため、生体内における主要な TNF- α 産生細胞であるマクロファージを用いて同様の検討を行なった。マクロファージにおいては非刺激の状態でも TNF- α の分泌が検出されたが、LPS の添加により非刺激時の 16.5 倍にまでその分泌が増加した (図 6 b)。非刺激時にはブデゾニド、プレドニゾロン、シクロスポリン A いずれによっても、マクロファージからの TNF- α 分泌に有意の効果はみられなかった。しかし LPS によって刺激された TNF- α の分泌に対しては、2 種のグルココルチコイドが明らかに抑制作用を示した (図 6 b)。これに反して角膜において認められたと同様、シクロスポリン A は 10^{-5} M で効果がみられず、また 10^{-6} および 10^{-7} M でわずかに TNF- α 分泌を抑制した (図 6 b)。このようにシクロスポリン A の効果には明らかな容量依存性が認められなかった。

この場合、ブデゾニド、プレドニゾロンによってみられた TNF- α の分泌抑制効果が角膜細胞に対する直接の細胞毒性を介するものでないことを確認する目的で、同一の条件で MTT アッセイを施行した。まず LPS のみを添加した場合には非添加時に比して有意差はなかった。したがって、本実験で用いられた量の LPS には細胞毒性が認められなかった。さらにブデゾニド、プレドニゾロン、シクロスポリン A のいずれの添加によっても、角膜片による MTT 還元能に影響は見られなかった。(表 2)

表2 免疫抑制薬のマウス角膜細胞の生存におよぼす影響：MTT アッセイによる評価

Culture condition*	MTT reduction (OD ₅₇₀ × 10 ³)†	P value#
No addition	73.7 ± 2.3	
LPS alone	78.7 ± 4.2	NS
LPS + Bud (10 ⁻⁷ M)	72.0 ± 3.2	NS
LPS + PSL (10 ⁻⁶ M)	68.0 ± 1.5	NS
LPS + CsA (10 ⁻⁶ M)	73.3 ± 3.3	NS

†示された数値は、5個の角膜片を用いて独立に行われた3回の実験より得られた結果を mean ± SEM で表したものである。

* Bud = budesonide; PSL = prednisolone; CsA = cyclosporin A

NS, not significant vs. control ("No addition")

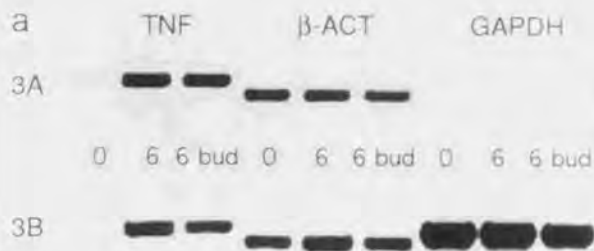
3) 角膜片における TNF- α mRNA の発現

角膜細胞における TNF- α の産生調節が転写レベルにおいて行なわれているのが、また TNF- α の産生に抑制的に作用するグルココルチコイドが TNF- α の転写にどのような影響を及ぼすかを検討するために、TNF- α の mRNA の角膜組織における発現を RT-PCR 法により検討した。発現量の定量的解析は、LPS によってその発現が影響されない β アクチンもしくは GAPDH をスタンダードとして用い、その mRNA の発現量を TNF- α のそれと比較検討することによって行なった。キャリブレーションのために行なった検討では、いずれの mRNA とも cpm としてカウントされた増幅産物が少なくとも 35 サイクルまで直線的に比例増加することが確認された。したがって実際に採用された 32 サイクルは十分この範囲内に含まれている。さらにマウス角膜における TNF- α mRNA 発現の時間的推移を確認するために予備実験を行なったところ、LPS による刺激開始後 6 時間でその発現誘導が平衡状態に達することが確認されたため、以後の検討はすべてこの時点で行なった。

アガロースゲル上で認められる TNF- α の mRNA は LPS 刺激によって明らかに増加した (図 7 a)。その mRNA の発現量を比較検討したものを図 7 b に示す。ここでは TNF- α の mRNA の発現は、同時に検討した β アクチンのそれに対する比をとって表わされている。また表 3 には実際に行なったすべての実験のそれぞれにおけるカウントを示す。非刺激下のマウス角膜における TNF- α mRNA の発現は極めてわずかであったが、LPS 刺激によってその発現量は 5 倍以上に増加した (図 7 b)。さらにブデゾニドを同時添加した場合には、ほぼ非刺激下同様のレベルにまで TNF- α mRNA の発現が抑制された ($p < 0.001$, 図 7 b)

図7 RT-PCR 法によるマウス角膜片における TNF- α mRNA 発現の検討。採取後 48 時間培養したマウス角膜片を、さらに6時間 LPS (1 μ g/ml) 刺激した後の TNF- α mRNA の発現 (“6”) を RT-PCR 法を用いて、非刺激角膜片 (“0”) および採取後ブデゾニド存在下で培養した LPS 刺激角膜片 (“6 bud”) と比較検討した。

(a) 実験 3A および 3B において認められた TNF- α mRNA 発現。スタンダードとして β アクチン (β -ACT), GAPDH を用いた。(b) マウス角膜片における TNF- α mRNA 発現の時間的推移。TNF- α / β アクチンの mRNA 比を mean \pm SEM で示す。



b

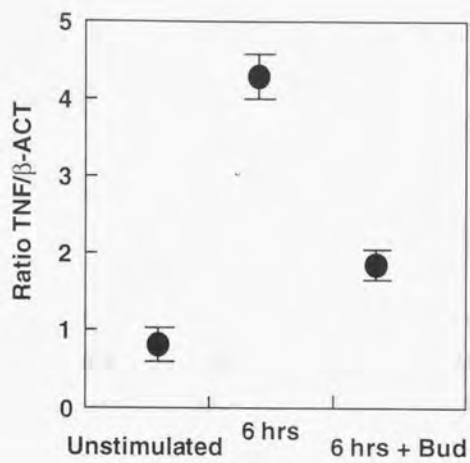


表3 RT-PCR 法による TNF- α mRNA の発現の定量

a cpm* per sample

	Series				
	1	2A	2B	3A	3B
<i>TNF</i>					
No addition	3079	5515	5198	1809	1148
LPS alone	19090	14376	13541	20000	24214
LPS + Bud	7827	10103	11626	8217	4630
<i>β-ACT</i>					
No addition	3387	5119	4029	4011	4300
LPS alone	5915	3412	2962	4679	4663
LPS + Bud	3942	4354	5910	4218	3942

*cpm は total cpm of the series / mean total cpm of all series を乗することによって算出した値。

β -ACT = β -actin; Bud = budesonide

b ratios TNF/ β -ACT

	Series					Mean \pm SEM
	1	2A	2B	3A	3B	
No addition	0.91	1.08	1.29	0.45	0.27	0.80 \pm 0.19
LPS alone	3.23	4.21	4.57	4.27	5.19	4.30 \pm 0.32
LPS + Bud	1.99	2.32	1.97	1.95	1.17	1.88 \pm 0.19

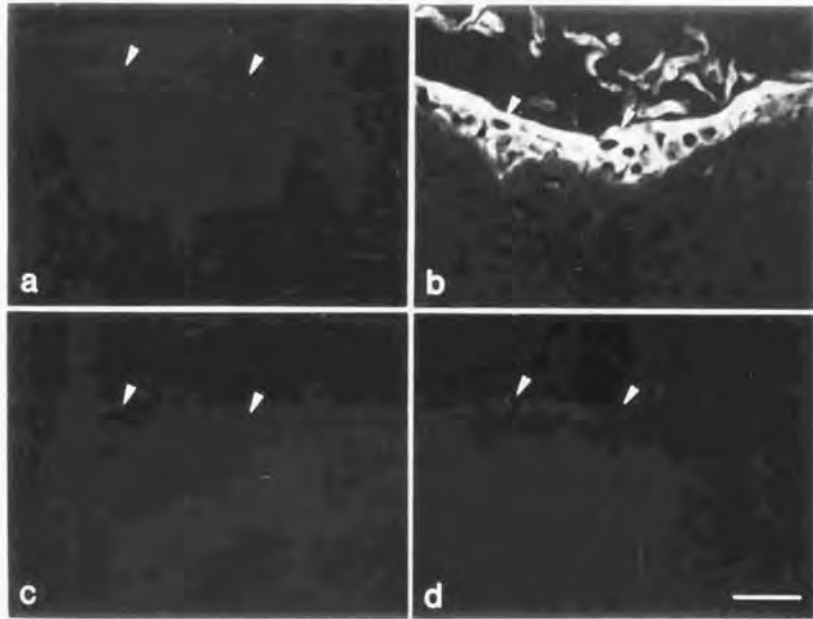
β -ACT = β -actin; Bud = budesonide

LPS (1 μ g/ml) 刺激6時間後の培養マウス角膜片における TNF- α mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて定量した。3つの独立に得られたサンプル (1, 2, 3) を用いて行ったすべての実験ごとにデータを示す。サンプル 2, 3については各2回 (A, B) の RT-PCR を施行した。

4) TNF- α のマウス角膜組織における局在の免疫組織学的検討

本研究で確認された角膜組織により分泌された TNF- α が角膜片のどの細胞から産生されるのかを調べる目的で、免疫組織化学の手法を用いて TNF- α の角膜組織における局在を検討した。まず LPS 非刺激下での角膜片においては、抗 TNF- α モノクローナル抗体による染色はみられなかった (図 8 a)。これに対して LPS で 72 時間刺激した後の角膜片では、上皮細胞の分布に一致して TNF- α に対する明らかな染色が認められた (図 8 b)。一方、角膜実質細胞であるケラトサイトにおいては TNF- α 染色は認められなかった。さらに本実験においてもブデゾニドの TNF- α の発現に対する効果を検討したところ、ブデゾニド同時添加により角膜上皮に発現された TNF- α がほぼ完全に消失した (図 8 c)。本検討で認められた染色が実際に TNF- α であることを確認するために、コントロールとして抗 TNF- α 抗体と同一の Ig サブクラスを有する抗マウス IL-1 α 抗体を用いた免疫染色を試みた。この場合には確かに染色がみられなかった (図 8 d)。

図8 マウス角膜片における TNF- α 蛋白の発現：免疫組織化学による検討。培養3日後のマウス角膜片における TNF- α 蛋白の発現を，LPS (1 μ g/ml) 刺激 (b, c, d)，非刺激 (a) のそれぞれにおいて，抗マウス TNF- α IgM モノクローナル抗体を用いた免疫染色により検討した。(b) TNF- α は LPS 刺激によって角膜上皮細胞 (矢印) に強く染色された。(c) プデゾニド (10⁻⁷ M) 添加によるTNF- α 染色の消失。(d) 抗IL-1 IgM モノクローナル抗体を用いたコントロール染色。



4 考按

1) TNF- α のマウス角膜組織における発現と産生

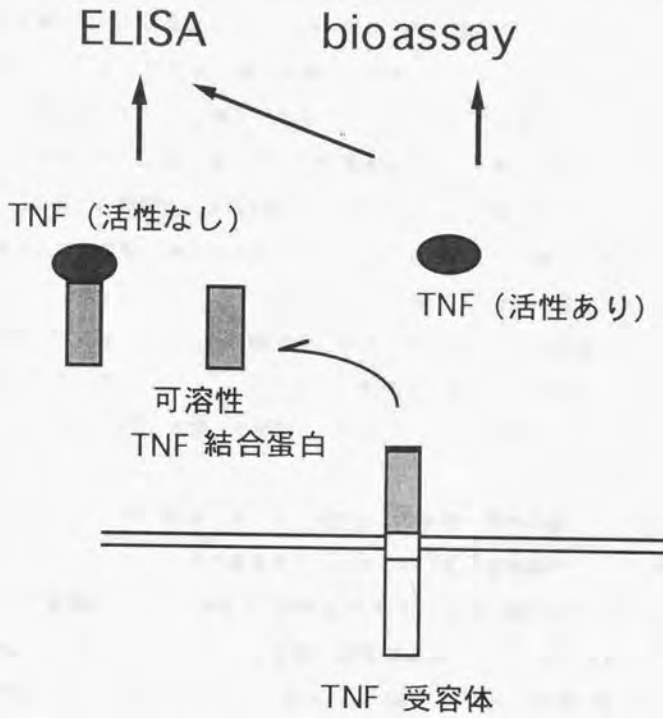
生体内に広く分布し、多彩な作用を有することが知られている TNF- α が、眼組織における免疫反応の成立に主要な役割を果たしている可能性が指摘されている(9)。この仮説は主として自己免疫性ぶどう膜炎における TNF- α の役割という観点から提唱されている。齧歯類動物を用いて作成された実験的ぶどう膜炎モデルでの検討では、TNF- α の mRNA は眼組織中の何種類かの細胞において検出されているものの(7, 11, 12)、その蛋白産生については直接確認されていない。LPS を全身投与されたラットでは TNF- α の mRNA は虹彩・毛様体において速やかに増加し、網膜ではより遅れて TNF- α mRNA の誘導が認められる(7, 12)。しかしながら、無血管組織である角膜においては同様の現象は認められなかった。この成績からは、角膜による TNF- α の産生・分泌の可能性はあっても、眼組織の中では少なくとも主要な産生組織ではないことが示唆される。しかしこの実験系においては LPS が全身的に投与されており、実際に角膜組織に TNF- α の発現を誘導するに十分な LPS が到達していなかった可能性もある。

本研究では、角膜組織における TNF- α の産生をより直接的に検討するためにマウス角膜片の *in vitro* 培養系を確立し、さらに LPS による角膜組織の直接刺激を行なった。したがって細胞は TNF- α の産生・分泌を刺激するに十分な濃度の LPS にさらされることになり、また角膜組織から分泌された TNF- α の絶対量を正確に定量できる。また *in vivo* 実験では他の組織系の影響、例えば血流あるいは涙液によって角膜に到達する様々な細胞(リンパ球など TNF- α 産生細胞)や液性因子(ホルモン・増殖因子・サイトカイン)などの関与が生じうるが、本実験系においてはそれらを排除できることが利点である。ただしこの *in vitro* 実験系で得られた成績が、実際に生体の角膜組織において生じうる現象をどこまで再現するものであるかについての解釈には慎重を要する。

本研究で確立された実験系により、角膜における LPS による TNF- α mRNA の明らかな誘導が確認された。さらに高感度 ELISA 法を用いることにより、LPS で刺激された角膜よりの TNF- α の分泌を初めて測定することができた。しかし非刺激角膜からの TNF- α の分泌は検出されず、生理的状态においては角膜における TNF- α の産生はむしろわずかであることが示唆された。この点については *in vivo* でのより詳細な検討によって確認されるべきものと思われる。

さらに本研究では角膜片より分泌された TNF- α の生物学的活性を、同時にバイオアッセイ法を行なうことにより検討した。その結果、ELISA で測定された TNF- α のうち 10-20% のみが活性を有していることがわかった。この理由として考えられるのは、ELISA で検討された TNF- α の多くが可溶性 TNF- α 受容蛋白に結合した、すなわち生物活性をもたない形で存在している可能性である。TNF- α には2種の異なる細胞膜受容体が存在することが知られているが、うち Type I の受容体の細胞外ドメインと同一の構造を示す可溶性 TNF- α 受容蛋白の存在が確認されている(6)。したがって本実験系においても LPS 刺激が角膜組織に存在する TNF- α の受容体細胞外ドメインの流出を引き起こし、それが分泌された TNF- α と結合して検体中に存在し、フリー(活性型)の TNF- α と同時に ELISA によって検出された可能性が考えらる(図9)。別の説明としては、アッセイを行なうまでの段階で TNF- α の破壊が生じ、免疫学的活性を保持しつつも生物学的活性が失われた可能性や、角膜から非活性型の TNF- α あるいは(未知の) TNF- α 類似の構造を有する因子が同時に分泌された可能性など推測されるが、その確認のためには検出された TNF- α の構造の詳細な検討が必要である。いずれにせよ本研究の結果から、中央部角膜組織が LPS 刺激に反応して実際に生物活性を有する TNF- α を産生し、分泌しうる能力をもつことが初めて明らかになった。

図9 可溶性 TNF- α 結合蛋白と TNF- α の生物活性との関連



2) マウス角膜組織において TNF- α を産生する細胞の同定

次に角膜における TNF- α の産生がどの細胞によるものかという点に着目し、免疫組織学的な検討を行なった。TNF- α に対する特異的モノクローナル抗体を用いて検討した結果、TNF- α の蛋白は角膜上皮細胞に局在することが確認された。一方角膜実質細胞においては検出されず、これらの細胞は TNF- α の産生に関与しないものと考えられた。本研究で用いた角膜組織片には角膜内皮細胞がほとんど存在しないことから、同細胞による TNF- α の産生については明らかにしえなかった。さらに角膜固有の細胞以外のものが TNF- α を分泌していた可能性も考慮し、マクロファージ、Tリンパ球 (2)、ランゲルハンス細胞 (11) などの存在をそれぞれに対する特異的抗体を用いた免疫組織学的に検討したが、これらの細胞はごくわずかの数認められるにすぎなかった。したがって本研究において ELISA 法により測定された TNF- α は、実際に角膜上皮細胞より分泌されたものであると考えられた。

3) TNF- α の角膜組織における生理的および病態生理的役割

3)-1. サイトカイン産生細胞あるいはあるいは免疫調節細胞としての角膜細胞

角膜組織のうち上皮細胞が TNF- α の産生・分泌に携わっていることに関係して特記すべきことは、表皮の主要構成細胞であるケラチノサイトによっても TNF- α が産生され、分泌されることである (31, 32)。これら上皮性細胞が、ともに単なる外界に対する防御組織としての物理的意義をもつのみならず、TNF- α あるいはその他サイトカインの産生という機能を有することは、これらの細胞の新たな生理的意義を示唆して興味深い。事実最近の報告では、培養角膜上皮細胞および角膜実質細胞がいくつかのサイトカイン、例えばインターロイキン (IL)-6 (33) あるいは IL-8 (34, 35) を産生しうることが示されている。さらに興味深いことに、これらのサイトカインは TNF- α の刺激に反応して誘導されることが確認されている (33-35)。このことから、角膜細胞は自身 TNF- α を産生し、分泌された TNF- α がオートク

リン作用により IL-6, IL-8 など他のサイトカインをも誘導するという、一種のサイトカイン・ネットワークが角膜組織においても存在する可能性が推測される。これらの報告と考え合わせ、本研究で得られた結果は角膜組織がサイトカイン産生器官として免疫反応に積極的に関与し、生理的あるいは免疫性眼疾患の成立に主要な役割を有する一種の免疫調節細胞である可能性を強く示唆するものである。

3)-2. TNF- α の角膜組織に及ぼす作用

実際に TNF- α が角膜細胞自身に及ぼす作用については、上述した角膜上皮細胞およびケラトサイトにおけるサイトカイン産生誘導を除けばほとんど知られていない。

Leibovich らは TNF- α で直接処理したラット角膜組織に血管新生が出現するという現象を見いだした (36)。また Rosenbaum らの検討によれば、ウサギの眼内に TNF- α を注入した場合、血液・房水嚢の破綻によると考えられる前房水中の蛋白増加とともに、角膜輪部の血管侵入および新生血管の出現が確認されている (37)。角膜血管新生は外傷、コンタクトレンズ障害、細菌性・真菌性角膜炎、実質型角膜ヘルペスなど様々な角膜疾患において認められるが、これらの所見は他の炎症惹起因子例えばエンドトキシンや IL-1 などを注入することによって誘発されるもの (38, 39) とは区別されるものである (37)。したがって血管新生を生ずる種々の病態における血管新生促進因子 (40) のひとつとして TNF- α が関与している可能性は十分に考えられる (36, 37)。

ごく最近、TNF- α は角膜内皮細胞の透過性を亢進させることが報告された (41)。同作用はおそらく F-アクチンフィラメントの破壊によるものと考えられ、血管内皮細胞におけると同様、角膜内皮細胞においても TNF- α がそれらのバリアー機能を消失させるという点で意義をもつものと推測される。しかしこの現象が実際に角膜上皮より分泌された TNF- α によって生じうるかどうかは不明である。TNF- α が角膜の他の細胞 (上皮および実質細胞) にいかなる影響を及ぼすのかについては、今後さらに検討が必要である。

以上に加え、TNF- α が他のサイトカインと相乗的に作用して、ある種の病態を起しうることが知られている。とりわけ TNF- α と IL-1 の相乗作用についてはいくつかの組織で報告され (42)、眼組織もその例外ではない。硝子体内に両者を同時に注入すると炎症反応が惹起され、前部ぶどう膜、前房水中に炎症性細胞の増加が認められる (37, 39, 43, 44)。同様の効果はまだ角膜については報告されてはいないが、角膜組織における IL-1 の存在や角膜単純ヘルペス後の IL-1 の発現が認められている (22, 23) ことと考え合わせ、角膜においても両サイトカインが相乗的に作用して何らかの病態の成立に関与しうる可能性は否定できない。

3)-3. 各種免疫性角膜疾患における TNF- α の意義

本研究では、LPS によって角膜における TNF- α の産生・分泌が著明に刺激されることが明らかにされたが、他の刺激によっても TNF- α が産生・分泌されるかという点については今のところ明らかではない。

TNF- α の産生亢進が臨床的に意義を持ちうると推測される例のひとつは、角膜移植における移植片拒絶反応である。同病態においては、宿主側の要因としてインターフェロン γ や IL-1 など種々のサイトカインが関与することが報告されているが、TNF- α についての報告はまだない。本研究で得られた結果は、移植角膜片自体からもサイトカインの産生が生じうることを示唆しており、これが実際の移植片拒絶反応に作用しうるのかどうかについてさらなる検討が必要である。この点に関連して、ドナー由来抗原提示細胞すなわちランゲルハンス細胞を含んだ角膜移植片を移植した場合には遅延型過敏反応が生じ、拒絶反応がより強く起こりやすいことが報告されている (45)。加えて興味深いことには、サイトケラチン 14 プロモーターを用いて TNF- α を扁平上皮に発現させたトランスジェニックマウスでは、皮膚に炎症細胞浸潤、線維化、壊死など、Graft-versus-Host 反応に類似した変化が現れるということであり (46)、移植片拒絶反応における TNF- α の関与の可能性をさらに支持する証拠と考えられる。

またすでに述べたように角膜単純ヘルペスの病態における TNF- α の関与については、いくつかその可能性を示唆する事実が知られている。前房内に単純ヘルペスウイルス (HSV-1) を注入し、その後のサイトカインの発現を網膜グリア細胞で検討した結果、IL-6 および TNF- α の発現が誘導されたという報告がある (47)。従って角膜の代表的なウイルス感染症のひとつである角膜単純ヘルペスにおいても、すでに角膜細胞で産生が報告されている IL-6 および TNF- α がその病態の進展に大きな役割を果たしうることは十分考えられる。実際、単純ヘルペス角膜炎後の三叉神経節へのウイルス浸潤に関わるサイトカインの意義について Liu らが検討している (48)。彼らの検討によれば、ナチュラルキラー細胞あるいは $\gamma\delta$ T細胞より産生されるインターフェロン γ が三叉神経節における HSV-1 増殖に抑制的に作用するのに対し、CD8⁺ T細胞あるいはマクロファージより産生される TNF- α は同ウイルスの不顕性持続感染の維持に働きうるという (48)。

最後に、本研究においては LPS による TNF- α の明らかな産生・分泌刺激が認められたことから、細菌性角膜炎の少なくとも一部にはエンドトキシンによって誘発される TNF- α の分泌がその病態成立に関与している可能性が考えられる。

4) 免疫抑制薬の角膜組織における TNF- α の産生に及ぼす効果とその作用機序についての考察

日常臨床免疫抑制薬として用いられている薬物、グルココルチコイドおよびシクロスポリン A の作用機序に関して、角膜よりの TNF- α 産生という点から検討した。これらの薬物は免疫性角膜疾患あるいは角膜移植術時の拒絶反応の防止のために頻りに用いられるものの、その作用機序および標的組織については不明の部分も多い。そこで、その作用機序のひとつとしてサイトカイン分泌の抑制を介して作用するのではないかという仮説をたて、検討を行なった。

その結果、グルココルチコイドはマクロファージおよび単球におけると同様 (49, 50, 51)、角膜による TNF- α の産生・分泌を有意に抑制した。同作用が薬剤の角膜

細胞に対する毒性によるものではないことは MTT アッセイによる viability の評価によって確認された。さらに、グルココルチコイドは角膜片およびマクロファージの TNF- α の mRNA の発現を抑制することが明らかにされた。同様の結果は LPS または抗ヒトイミヌグロブリン抗体で刺激された単球 (51)、あるいは腎皮質上皮細胞においても報告されている (52)。角膜においてブデゾニドは TNF- α の mRNA 発現を約 70% 減少させた。したがって同薬剤の作用機序として、少なくとも一部には TNF- α 遺伝子の転写レベルでの抑制作用があることがわかった。

これに対し、シクロスポリン A は LPS によって刺激された角膜における TNF- α の発現・分泌を抑制しなかった。同様の結果は他の組織でも報告されており (53)、上述のグルココルチコイドの抑制作用と合わせて、TNF- α の発現・産生調節が異なる組織において共通の機序で行なわれていることを示唆するものである。ここで興味深いことに単核球を用いて行なわれた検討では、シクロスポリン A および同様の作用機序を有する免疫抑制薬 FK506 が、ブドウ球菌エンテロトキシン A によって刺激された TNF- α の産生には抑制的に作用するという事実である (53)。同一の系において LPS を刺激物質として用いた場合には抑制は認められないことから、これらの薬剤の作用は TNF- α の産生・分泌刺激によって異なることがわかる。おそらくはエンテロトキシン A による TNF- α の産生刺激機序と LPS によるそれとは異なるものであり、前者を特異的にシクロスポリン A あるいは FK506 が抑制するものと考えられる。

グルココルチコイドによるサイトカイン発現抑制作用の機序として提唱されていることは、その受容体が細胞内で NF κ B その他の転写因子の機能を阻害するという点である (54, 55)。TNF- α の遺伝子のプロモーター領域には NF κ B の DNA 結合部位である κ B site が存在することが知られており (56)、おそらくグルココルチコイドは NF κ B の機能阻害という機序によって TNF- α の発現を抑制するものと思われる。事実、LPS は他の系において NF κ B の活性化を引き起こすことが示されている (57)。

シクロスポリン A の作用機序については近年の研究の飛躍的な進歩により、多くの新しい知見が得られている (58, 59)。シクロスポリン A は細胞内でシクロフィリンに結合して複合体を形成し、さらにタンパク質セリン/スレオニン脱リン酸化酵素であるカルシニューリンに結合することによってその脱リン酸化活性を阻害する。このことはカルシニューリンによる転写因子 NF-ATc の細胞質内から核内への移行を抑制することにつながり、その結果、遺伝子 (サイトカインのそれを含む) の転写が阻害される。カルシニューリンが TNF- α の遺伝子発現に関与することは、すでに活性化された T および B リンパ球において知られている (60) が、角膜片あるいはマクロファージにおいて LPS によって刺激された TNF- α の産生がシクロスポリン A で抑制されなかったことは、それがシクロスポリン A 非感受性の機序、すなわち上述のごとくおそらく NF κ B の活性化によってもたらされるためと考えられる。

5 結語

本研究では、マウス中央部角膜片の組織培養系を確立し、角膜組織における TNF- α の発現・産生を検討することが可能であった。この方法によって明らかにされたことをまとめると以下の点に要約される。(1) マウス角膜組織を LPS で直接刺激することにより同組織から TNF- α が分泌されることが、高感度 ELISA 法を用いたアッセイで測定しえた。(2) マウス角膜組織には非刺激下においても TNF- α の mRNA の存在が認められ、LPS の刺激によってその発現が著明に増加した。(3) 免疫組織学的検討によって、マウス角膜組織において実際に TNF- α の産生を行なう細胞は角膜上皮細胞であることが判明した。(4) 日常臨床において免疫抑制薬として汎用される2種のグルココルチコイド(プレドニゾン・ブデソニド)およびシクロスポリンAのうち、前者が角膜による TNF- α の発現および分泌を明らかに阻害したのに対し、シクロスポリンAはそれらに影響を与えなかった。従って、グルココルチコイドの角膜における免疫抑制作用機序のひとつとしてサイトカイン産生の抑制によるものが考えられ、またグルココルチコイドおよびシクロスポリンAの作用機序が TNF- α の産生という点について異なることが示された。

以上本研究で得られた結果と、最近の角膜組織におけるいくつかの他のサイトカイン産生の報告をあわせ考えると、角膜細胞が単に眼組織の防御機構を担う1構成成分としての役割を果たすだけでなく、ある種の生理的・病的刺激に応じてサイトカインを産生することによって同組織における免疫の成立・調節に積極的に関与する機能を有していることが強く示唆された。このように本研究は、「免疫担当細胞としての角膜細胞の役割」という新しい概念の確立に寄与するという点で興味深く、意義深いものと思われる。

今後さらに角膜によって産生されるサイトカインを含む様々な因子が明らかにされその意義が解明されれば、角膜組織における免疫・炎症反応の調節機序の理解、ひいては免疫・炎症性角膜疾患の病態の把握と治療の確立に多大な貢献がなされるものと期待される。

6 参考文献

1. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:3666-3670, 1975
2. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Ann Rev Cell Biol* 9:317-343, 1993
3. Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC. Role of tumor necrosis factor- α in disease states and inflammation. *Crit Care Med* 21(Suppl):S447-S463, 1993
4. Beutler B, Grau GE. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. *Crit Care Med* 21(Suppl):S423-S435, 1993
5. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 334:1717-1725, 1996
6. Nophar Y, Kemper O, Brakebusch C, Engelmann H, Zwang R, Aderka D, Holtmann H, Wallach D. Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. *EMBO J* 9:3269-3278, 1990
7. de Vos AF, Klaren VNA, Kijlstra A. Expression of multiple cytokines and IL-1RA in the uvea and retina during endotoxin-induced uveitis in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:3873-3883, 1994
8. Nakamura S, Yamakawa T, Sugita M, Kijima M, Ishioka M, Tanaka S-I, Ohno S. The role of tumor necrosis factor-alpha in the induction of experimental autoimmune uveoretinitis in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:3884-3889, 1994
9. Wakefield D, Lloyd A. The role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory eye disease. *Cytokine* 4:1-5, 1992
10. de Vos AF, Hoekzema R, Kijlstra A. Cytokines and uveitis: A review. *Curr Eye Res* 6:581-597, 1992

11. Ferguson TA, Herndon JM, Dube P. The immune response and the eye: A role for TNF α in anterior chamber-associated immune deviation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:2643-2651, 1994
12. Planck SR, Huang X-N, Robertson JE, Rosenbaum JT. Cytokine mRNA levels in rat ocular tissues after systemic endotoxin treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:924-930, 1994
13. Jager MJ. Corneal Langerhans cells and ocular immunology. *Reg Immunol* 4:186-195, 1992
14. Larrick JW, Morhenn V, Chiang YL, Shi T. Activated Langerhans cells release tumor necrosis factor. *J Leukoc Biol* 45:429-433, 1989
15. Takeuchi S. The rearrangement of cytoskeletal systems in epithelial cells accompanying the transition from a stationary to a motile state at the start of epithelial spreading. *J Cell Sci* 88:109-119, 1987
16. Bloemena E, Van Oers RHJ, Weinreich S, Stilma-Meinesz AP, Schellekens PTA, Van Lier RAW. The influence of cyclosporin A on the alternative pathways of human T cell activation *in vitro*. *Eur J Immunol* 19:943-946, 1989
17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63, 1983
18. Espevik T, Nissen-Meyer J. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* 99-105, 1986
19. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141:2407-2412, 1988
20. Baldino F, Chesselet MF, Lewis ME. High resolution *in situ* hybridization histochemistry. *Methods Enzymol* 168:761-777, 1989
21. Lucas R, Heirwegh K, Neiryck A, Remels L, Van Heuverswyn H, De Baetselier P. Generation and characterization of a neutralizing rat anti-rmTNF- α monoclonal antibody.

Immunology 71:218-223, 1990

22. Staats HF, Lausch RN. Cytokine expression in vitro during murine herpetic stromal keratitis: Effect of protective antibody therapy. *J Immunol* 151:277-283, 1993

23. Tumpey TM, Elnor VM, Chen S-H, Oakes JE, Lausch RN. Interleukin-10 treatment can suppress stromal keratitis induced by Herpes simplex virus type 1. *J Immunol* 153:2258-2265, 1994

24. Purkis PE, Steel JB, Mackenzie IC, Nathrath WBJ, Leigh IM, Lane EB. Antibody markers of basal cells in complex epithelia. *J Cell Sci* 97:39-50, 1990

25. Ledbetter JA, Herzenberg LA. Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immunol Rev* 47:63-90, 1979

26. Bazin H, Cormont F, De Clercq L. Purification of rat monoclonal antibodies. *Methods Enzymol* 121:638-652, 1986

27. Ozato K, Sachs DH. Monoclonal antibodies to mouse MHC antigens. III. Hybridoma antibodies reacting to antigens of the H-2b haplotype reveal genetic control of isotype expression. *J Immunol* 126:317-321, 1981

28. Springer T, Galfréa G, Secher DS, Milstein C. Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 9:301-306, 1979

29. Spertin F, Coulie PG, Van Snick J, Davidson E, Lambert PH, Izui S. Inhibition of cryoprecipitation of murine IgG3 anti-dinitrophenyl (DNP) monoclonal antibodies by anionic DNP-amino acid conjugates. *Eur J Immunol* 19:273-278, 1989

30. Gillette TE, Chandler JW. Immunofluorescence and histochemistry of corneal epithelial flat mounts: use of EDTA. *Curr Eye Res* 1:249-253, 1981

31. Köck A, Schwarz T, Kirnbauer R, Urbanski A, Perry P, Ansel JC, Luger TA. Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor α : Evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J Exp Med* 172:1609-1614, 1990

32. Piguet PF. Keratinocyte-derived tumor necrosis factor and the physiopathology of the skin. *Springer Semin Immunopathol* 13:345-354, 1992

33. 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
34. Elnor VM, Strieter RM, Pavilack MA, Elnor SG, Remick DG, Danforth JM, Kunkel SL. Human corneal interleukin-8: IL-1 and TNF-induced gene expression and secretion. *Am J Pathol* 139:977-988, 1991
35. 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
36. Leibovich SJ, Polverini PF, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis factor alpha. *Nature* 329:630-632, 1987
37. Rosenbaum JT, Howes EL Jr, Rubin RM, Samples JR. Ocular inflammatory effect of intravitreally-injected tumor necrosis factor. *Am J Pathol* 133:47-53, 1988
38. Howes EL Jr., Wong KL, Hartiala KT, Webster RO, Rosenbaum JT. Complement and polymorphonuclear leukocytes do not determine the vascular permeability induced by intraocular LPS. *Am J Pathol* 118:35-42, 1985
39. Rosenbaum JT, Samples JR, Hefeneider SH, Howes EL Jr. Ocular inflammatory effects of intravitreal interleukin-1. *Arch Ophthalmol* 105:1117-1120, 1987
40. Gospodarowicz D, Bialck H, Thakral TK. The angiogenic activity of the fibroblast and epidermal growth factor. *Exp Eye Res* 28:501-514, 1979
41. Watsky MA, Guan Z, Ragsdale DN. Effect of tumor necrosis factor alpha on rabbit corneal endothelial permeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:1924-1929, 1996
42. Le J, Vileck J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: Cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 56:234-244, 1987
43. Fleisher LN, Ferrell JB, McGahan MC. Ocular inflammatory effects of intravitreally injected tumor necrosis factor-alpha and endotoxin. *Inflammation* 14:325-335, 1990

44. Fleisher LN, Ferrell JB, AcGahan MC. Synergistic effects of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β . *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33:2120-2127, 1992
45. Niederkorn JY, Peeler JS, Mellon J. Phagocytosis of particulate antigens by corneal epithelial cells stimulates interleukin-1 secretion and migration of Langerhans cells into the central cornea. *Reg Immunol* 2:83-90, 1989
46. Cheng J, Turksen K, Yu Q-C, Schreiber H, Teng M, Fuchs E. Cachexia and graft-vs.-host-disease-type skin changes in keratin promoter-driven TNF- α transgenic mice. *Genes Dev* 6:1444-1456, 1992
47. Drescher KM, Whittum-Hudson JA. Herpes simplex virus type 1 alters transcript levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in retinal glial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:2302-2312, 1996
48. Liu T, Tang Q, Hendricks R. Inflammatory infiltration of the trigeminal ganglion after herpes simplex virus type 1 corneal infection. *J Virol* 70:264-271, 1996
49. Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: Mechanisms of endotoxin resistance. *Science* . 1986;232:977-980.
50. Waage A, Bakke O. Glucocorticoids suppress the production of tumour necrosis factor by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *Immunology* 63:299-302, 1988
51. Debets JMH, Ruers TJM, van der Linden MPMH, van der Linden CJ, Buurman WA. Inhibitory effect of corticosteroids on the secretion of tumour necrosis factor (TNF) by monocytes is dependent on the stimulus inducing TNF synthesis. *Clin Exp Immunol* 78:224-229, 1989
52. von Asmuth EJU, Dentener MA, Ceska M, Buurman WA. IL-6, IL-8 and TNF production by cytokine and lipopolysaccharide-stimulated human renal cortical epithelial cells in vitro. *Eur Cytokine Netw* 5:301-310, 1994
53. Andersson J, Nagy S, Groth C-G, Andersson U. Effects of FK506 and cyclosporin A on cytokine production studied in vitro at a single-cell level. *Immunology* 75:136-142, 1992
54. Ray A, Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the

p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:752-756, 1994

55. Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, Van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koendermaan L, Okret S, Gustafsson JA, Van der Saag PT. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: A possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoid. *Mol Endocrinol* 9:401-412, 1995

56. Collart MA, Baeuerle P, Vassalli P. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF- κ B. *Mol Cell Biol* 10:1498-1506, 1990

57. Takasuka N, Matsuura K, Yamamoto S, Akagawa KS. Suppression of TNF- α mRNA expression in LPS-primed macrophages occurs at the level of nuclear factor κ B activation, but not at the level of protein kinase C or CD14 expression. *J Immunol* 154:4803-4812, 1995

58. Schreiber SL. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 251:283-287, 1991

59. Liu J, Farmer JD Jr., Jane WS, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66:807-815, 1991

60. Goldfeld AE, Tsai E, Kincaid R, Belshaw PJ, Schreiber SL, Strominger JL, Rao A. Calcineurin mediates human tumor necrosis factor alpha gene induction in stimulated T and B cells. *J Exp Med* 180: 763-768, 1994



inches 1 2 3 4 5 6 7 8 9
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

