

性と安全性を示したため、ここで示したような再生医療の技術が臨床治験として検証される日は遠くないと考えている。

#### IV Stevens-Johnson 症候群の病態解明と新規治療法の開発

##### 1. SJS, TEN, EM の鑑別診断

Stevens-Johnson 症候群 (Stevens-Johnson syndrome :

SJS) は、突然の高熱、咽頭痛に続いて全身の皮膚・粘膜にびらんと水疱を生ずる疾患であり、1922年に小児2症例の報告がなされたのが最初である<sup>52)</sup>。その後、中毒性表皮壊死融解症 (toxic epidermal necrolysis : TEN)、多型滲出性紅斑 (erythema multiforme : EM) が一連の皮膚粘膜症候群として認識されるようになった。これらの疾患について、欧州の皮膚科医を中心に大規模な臨床研究が行われ、SJS と TEN は重症度の異なる同一スペ

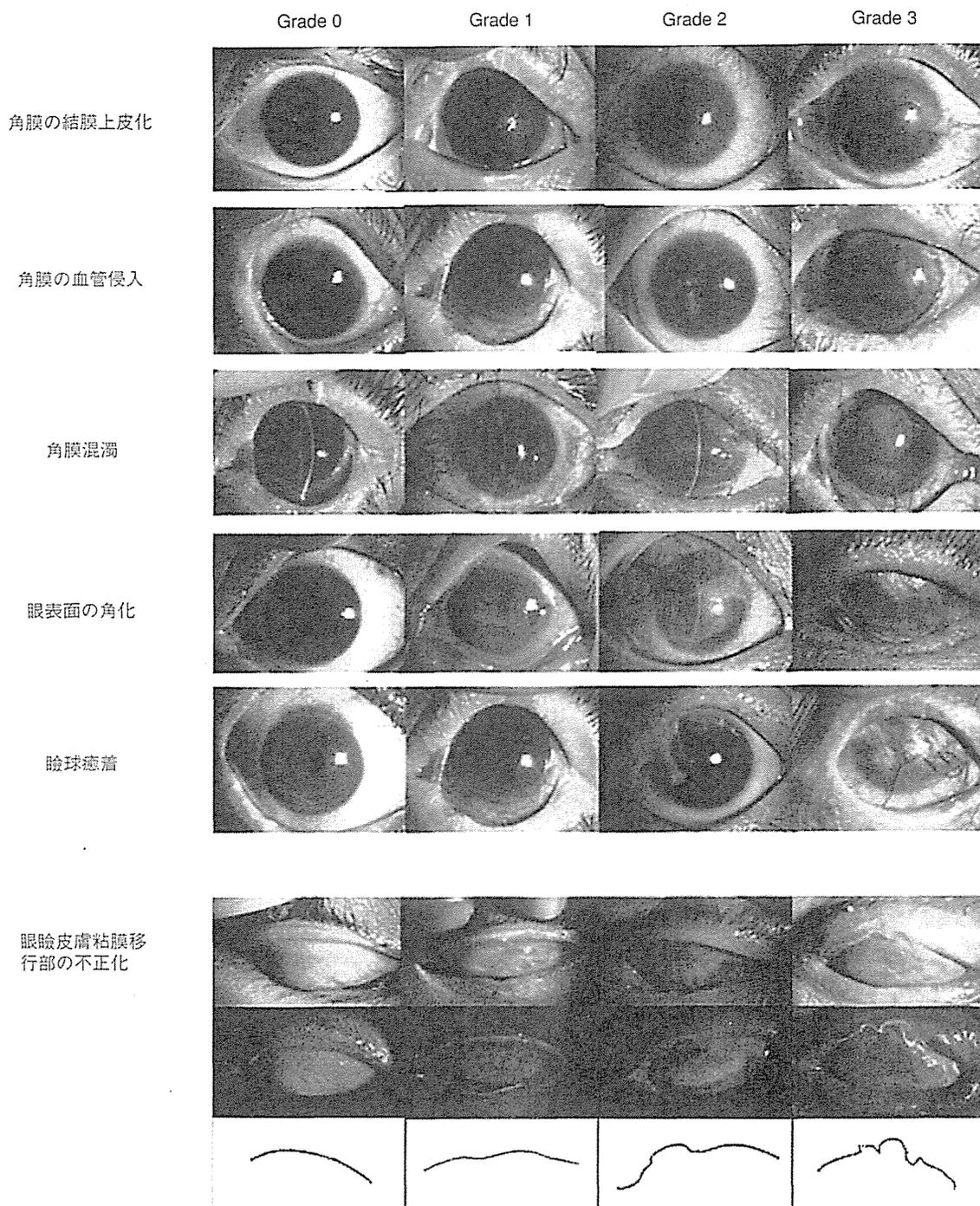


図 8 Stevens-Johnson 症候群 (SJS) 眼合併症のグレード分類。

角膜の結膜上皮化、角膜の血管侵入、角膜混濁、眼表面の角化、瞼球癒着、眼瞼皮膚粘膜移行部の不正化、の4段階の分類。

(文献 63 より許可を得て転載)

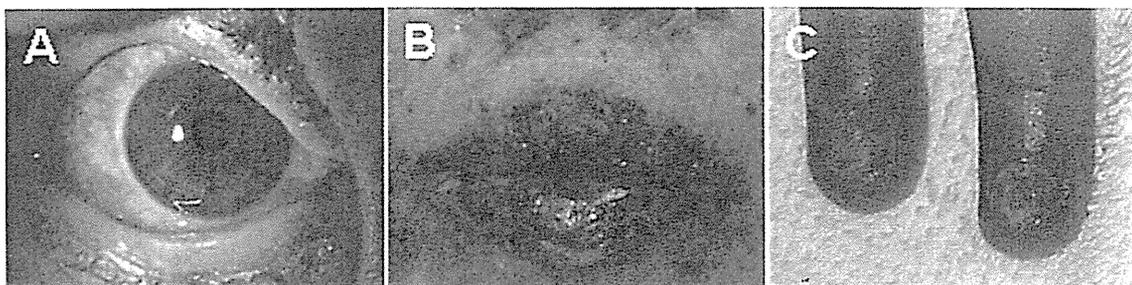


図 9 SJS 急性期の結膜炎, 口唇の発疹, 爪周囲炎。  
眼合併症を伴う SJS 患者急性期には, 結膜炎(A)の他, 口唇の発疹(B), 爪周囲炎(C)が全例に認められる。  
(文献 64 より許可を得て転載)

クトラムの疾患であり, EM は SJS/TEN とは病態が異なる疾患であることが明らかとなった<sup>53)</sup>。本邦でもこの概念の正当性を検証したのち, 厚生労働省難治性疾患克服研究事業研究班(「重症多形滲出性紅斑に関する調査研究」班長: 橋本公二)により SJS と TEN の診断基準が作成された<sup>54)</sup>。具体的には, 急性期の皮膚のびらん面積が全体表皮面積の 10% 未満を SJS, 10% 以上 30% 未満を overlap SJS/TEN, 30% 以上を TEN と診断することになっている。

SJS と TEN は発症率が人口 100 万人あたり 2~6 人/年とされる稀少かつ重症な疾患である。いずれも薬剤が誘因となって発症することが多いが, 病因・病態については未だ不明な点が多い。急性期には眼表面の著しい炎症, 角膜上皮欠損, 結膜上皮欠損を生じるとともに, 角膜穿孔や角膜感染症など重篤な眼合併症を生じうる。全身の炎症が沈静化しても, 瞼球癒着や角膜混濁などの瘢痕性変化が高頻度に生じ, 視力障害とドライアイが生涯にわたって持続する<sup>55)</sup>。視力障害はドライアイと密接に関係しており, 著しいドライアイのために長く開眼できないなど, 一般的な視力検査で比較的良い視力であっても日常的な視覚には困難を来していることが多い<sup>56)</sup>。慢性期の眼表面には炎症が持続し, 人工涙液点眼, 睫毛除去などの眼科治療を継続的に必要とする<sup>55)57)</sup>。

SJS と TEN の眼所見はきわめて類似しており, 眼科では両者を併せて広義の Stevens-Johnson 症候群(SJS)と呼称している(以下, 両者をまとめて SJS と記載する)。SJS の角膜混濁に対しては, 以前には全層角膜移植, 表層角膜移植が行われたが, 角膜潰瘍そして角膜穿孔を生じるなど, その予後は不良であった。近年は輪部移植, 培養粘膜上皮移植などが行われるようになり, 我々が継続して行っている培養角膜上皮移植, 培養口腔粘膜上皮移植は急性期から持続する遷延性上皮欠損, 慢性期の視力障害のいずれにおいても一定の成果をあげている<sup>22)37)41)~46)58)59)</sup>。一方で SJS に対する上皮移植の長期予後は未だ不良との報告もあり<sup>60)</sup>。いったん視覚障害に陥った患者が発症前の健康な視力を取り戻すことは未だ困難である。SJS を既に発症した患者に最良の治療を提

供するには臨床所見と病態の理解が不可欠であり, 病態が解明されれば良好な視力を温存できる治療, さらには疾患の発症予防が可能になると考えられる。

## 2. 眼障害の解析

我々は, 慢性期 SJS 患者の視力に影響する因子を検討するため, 眼表面再建術を施行されていない慢性期患者 73 名〔男性 33 名, 女性 40 名, 年齢 10~83 歳(平均 48 歳)〕の病歴, 視力, 眼所見を多施設スタディとして解析した。発症年齢は 2~69 歳(平均 28 歳), 罹患期間は 1~54 年(平均 19 年)であり, 解析した 138 眼の矯正視力は, 0.01 未満が 42 眼, 0.01 以上 0.1 未満が 32 眼, 0.1 以上 1.0 未満が 36 眼, 1.0 以上が 28 眼であり, 約半数の矯正視力が 0.1 未満ときわめて低視力であった。すなわち, 若年期に本症を発症して視力障害に陥り, その後眼科的療養ケアを長く必要とする患者の多いことが明らかとなった。これら 138 眼について眼合併症 13 項目を 4 段階にスコア化(図 8)して評価したところ, すべての項目が視力と相関し, なかでも角膜血管侵入, 角膜混濁, 結膜侵入が高い相関を示した。興味深いことには, palisade of Vogt (POV) の完全消失<sup>61)~63)</sup>, すなわち角膜上皮幹細胞の喪失が, 視力低下に大きく関係した<sup>63)</sup>。POV の消失は本症の急性期に生じるため, 急性期に POV の消失を回避すること, すなわち角膜上皮幹細胞の喪失を最小限にすることが, 良好な視力予後につながると思われる。

さらに, 上述した研究とは異なる臨床研究で, 眼合併症を伴う SJS 患者 94 名から発症時の症状, 薬剤履歴, 発症時の診断, 急性期の眼科治療について病歴を聴取したところ, 80% が最初に感冒様症状を自覚し, 91% が 39°C 以上の高熱を伴っていた。興味深いことに約 3 分の 2 の症例で, 結膜充血が皮疹に先行して生じていた。また, 結膜炎の他, 口唇・口腔内の発疹, 爪周囲炎が全例にみられた<sup>64)</sup>(図 9)。発症のごく初期に SJS を診断することは困難とされているが, 著しい高熱, 口唇・口腔内の発疹, 爪周囲炎を伴い, 結膜充血が先行あるいは同時に生じる皮疹は眼合併症を伴う SJS を示唆するといえる。

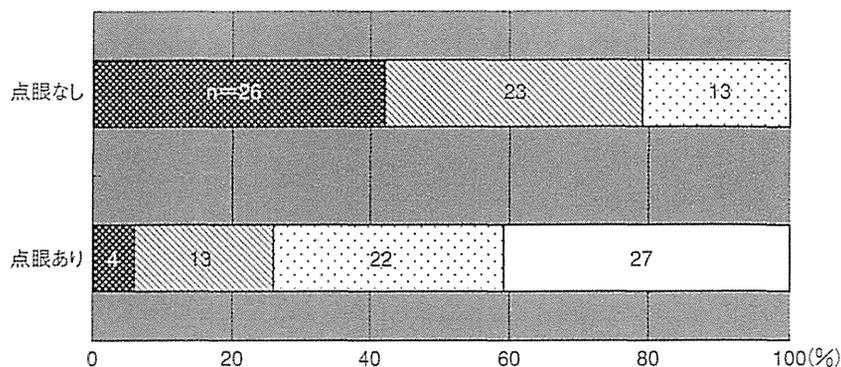


図 10 SJS 急性期の副腎皮質ステロイド薬眼局所投与の有効性.

発症 1 週以内に副腎皮質ステロイド薬の眼局所投与が行われた群の視力は、非投与群より有意に良好であった。視力は、■：0.01未満，▨：0.01以上0.1未満，▩：0.1以上1.0未満，□：1.0以上。

(文献 64 より許可を得て転載)

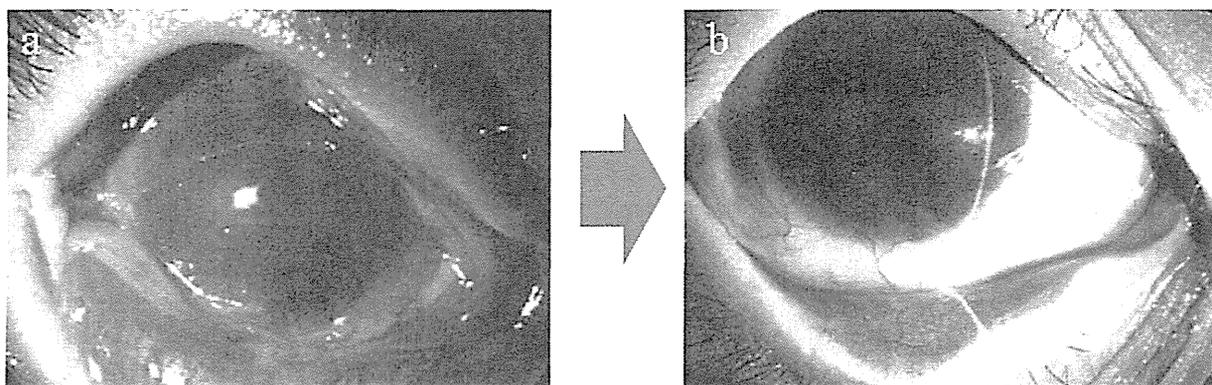


図 11 SJS 患者眼表面の眼表面炎症の増悪.

SJS の methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 保菌者で菌量が増えると、眼表面全体に炎症を生じて視力低下を来し(a)，MRSA の除菌により著しい炎症が沈静化する(b)。

(文献 58 より許可を得て転載)

### 3. 急性期の眼科的治療

急性期に角膜上皮幹細胞が完全消失すると、上皮欠損部は角膜上皮により修復されず、周囲から伸展する結膜組織で被覆され重篤な視力障害を来す、あるいは上皮修復遅延により遷延性上皮欠損を生じることになる。一方、角膜上皮欠損を生じて角膜上皮幹細胞が残存する場合には、上皮欠損は角膜上皮により修復され、最終的にはほぼ透明化する。したがって、SJS 急性期に眼局所を十分に消炎できれば、角膜上皮幹細胞の一部救済が可能となり、視力予後改善につながると推測される。そこで、我々は小規模ながらプロスペクティブ・スタディとして、2003 年 3 月から 2005 年 6 月までに京都府立医科大学附属病院で発症 4 日以内に SJS と診断できた 5 症例 (SJS 4 例，TEN 1 例) について、活動性のウイルス感染症とマイコプラズマ感染症のないことを確認したのちに、ステロイドパルス療法と眼局所ベタメタゾン投与を施行した。全例が両眼性の高度の眼表面炎症と角結膜上皮欠損を急性期に伴っていたが、10 眼すべてが発症 1 年後にも角膜上皮幹細胞の指標である POV を維持し、

視力 1.0 以上を保持した<sup>65)</sup>。これは、SJS の急性期に生じていると想像されるサイトカイン・ストームの抑制が治療として必須であることを示唆している。

また上述した SJS 患者 94 名を対象としたレトロスペクティブ・スタディでは、発症 1 週以内に副腎皮質ステロイド薬の眼局所投与が行われた群の視力は、非投与群より有意に良好であり<sup>64)</sup> (図 10)、急性期のステロイド眼局所投与が視力予後改善に有用であることが示唆された。

### 4. 自然免疫との関連

眼表面は常に外界と接しており、皮膚、口腔、腸内などと同様に常在細菌が棲息する。我々が、22~57 歳 (平均年齢 42 歳) までの健常人 40 人における結膜囊の細菌検出率を検討したところ、45% に表皮ブドウ球菌が、30% にアクネ菌が検出された<sup>66)</sup>。一方、SJS 患者の眼表面は、化学外傷などの瘢痕性角結膜上皮症患者の眼表面と比較して methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) または methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* (MR-CNS) を有意に保菌しており<sup>68)</sup>、こ

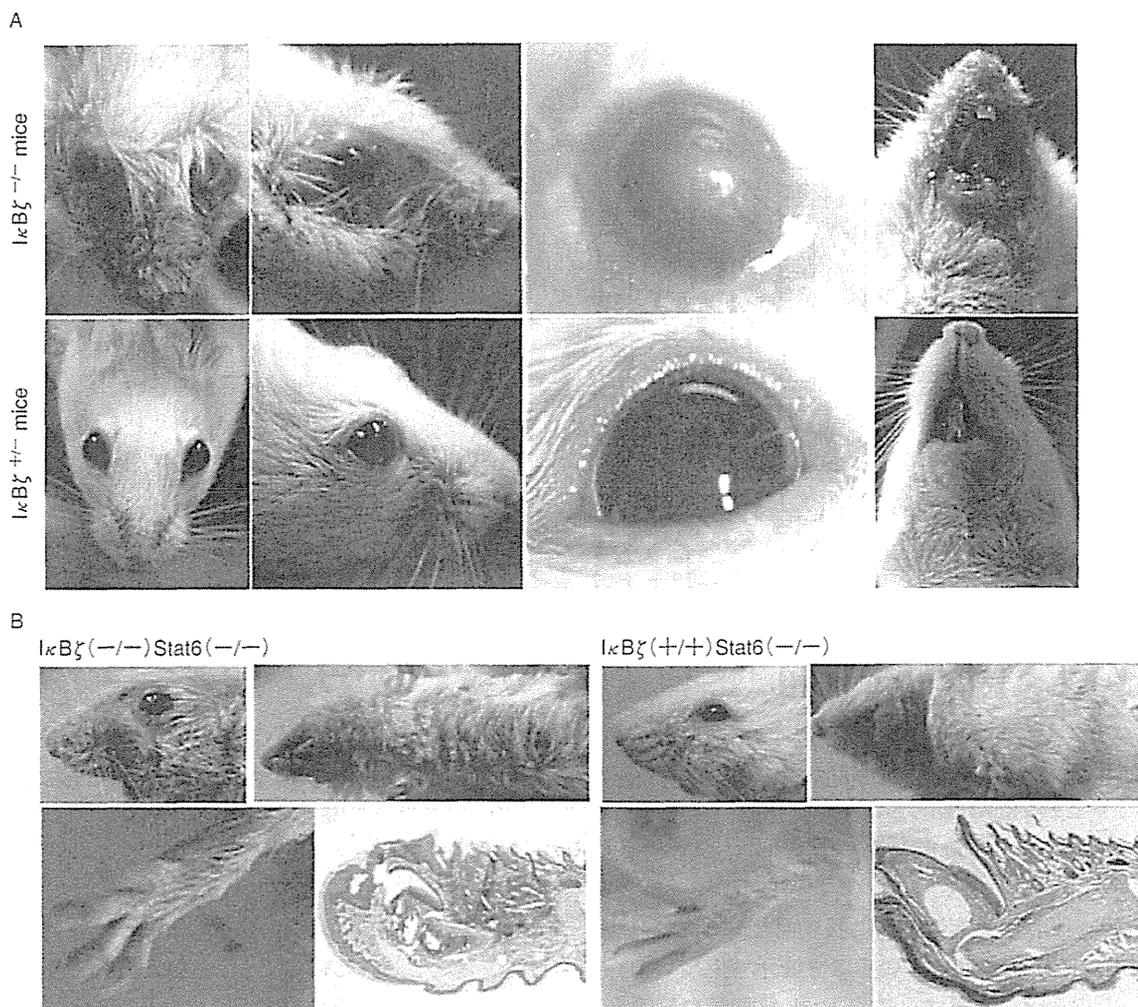


図 12 SJS 類似の眼表面炎症、口囲皮膚炎、爪周囲炎。

A : IκBζ 欠損マウスでは、SJS 類似の眼表面炎症ならびに口囲皮膚炎が認められる。B : Stat6/IκBζ ダブル欠損マウスでは爪周囲炎も認められる。

(文献 71 より許可を得て転載)

れら耐性菌による角膜感染症もしばしば経験する<sup>67)</sup>。

腸管では、腸内の常在細菌に関係する異常な炎症反応が、炎症性腸疾患の病態に関与していると考えられている。SJS 患者の眼表面でも、外科的治療の有無にかかわらず非特異的炎症が持続することがみられる。この非特異的炎症は低濃度副腎皮質ステロイド点眼薬の投与だけではコントロールが難しく、炎症制御が困難なために角膜上への結膜侵入を防止できないことがある。また、SJS の MRSA あるいは MR-CNS の保菌者で結膜囊における菌量が増加すると、眼表面全体に炎症に伴う細胞浸潤を生じて視力低下を来すが、この炎症は MRSA あるいは MR-CNS の除菌により沈静化し、視力も回復する<sup>58)</sup> (図 11)。眼表面からの MRSA 検出は、入院中の高齢者でも高頻度に認められるが、SJS 患者にみられるような著しい炎症を生じることはない。SJS の眼表面炎症には、未解明な機序とともに常在細菌が関与していることが示唆される。要約すると、眼合併症を伴う SJS では、

① 8 割が皮疹の出現する以前に感冒様症状を自覚し、② 眼表面が MRSA あるいは MR-CNS に易感染性であり、③ 常在細菌が存在する眼表面に炎症が持続するということになる。これらのことより、我々は、SJS の発症に自然免疫異常が関与する可能性があるとの仮説を立てている<sup>68)69)</sup>。

自然免疫は感染防御において重要なばかりではなく、種々の免疫疾患にも深く関与しており、例えば、自然免疫系の過剰活性化は、炎症性腸疾患の発症のトリガーとなる。眼表面においても、自然免疫応答の異常が眼表面炎症に関与しうるはずである。実際、toll like receptor (TLR) のシグナル因子であり nuclear factor (NF)-κB の regulator の一つである IκBζ の欠損マウスは、結膜杯細胞の消失を伴う眼表面炎症を自然発症する<sup>70)</sup>。IκBζ は、単球のみならず眼表面上皮細胞にも発現しており、siRNA を用いて角膜上皮細胞の IκBζ の発現を抑制すると interleukin (IL)-6 ならびに IL-8 の産生が亢進する<sup>71)</sup>。

候補遺伝子アプローチ

自然免疫関連遺伝子：TLR3, I $\kappa$ B $\zeta$   
 アレルギー関連遺伝子：IL4R, IL13  
 アポトーシス関連遺伝子：FasL

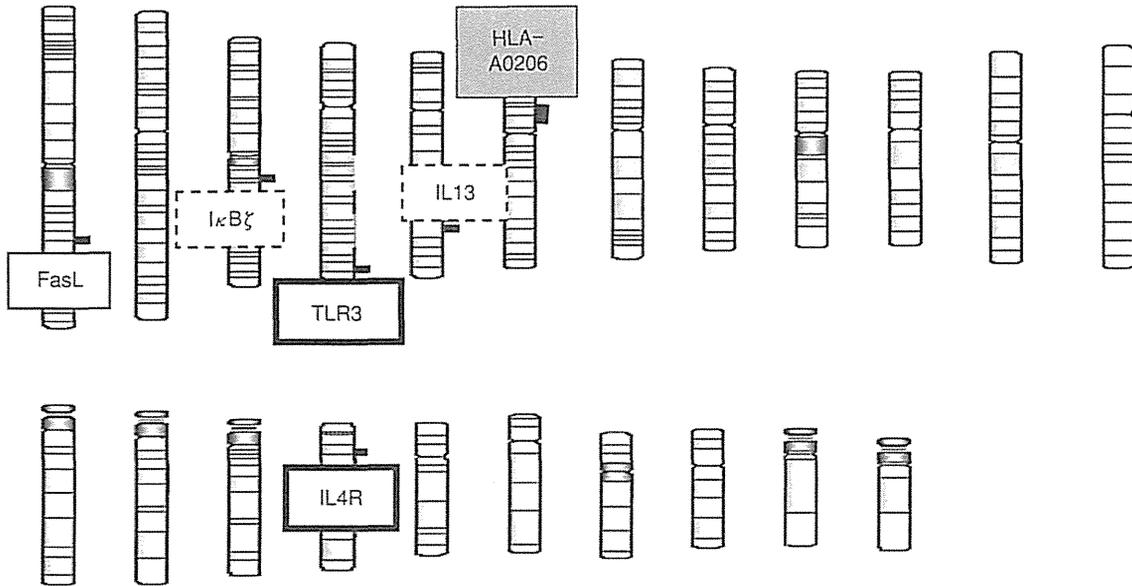


図 13 SJS 発症と有意に相関を示す複数の遺伝子多型.

SJS では、HLA-A0206, toll like receptor (TLR)3, interleukin-4 receptor (IL4R), FasL など複数の遺伝子多型との相関が認められた。

■: p<0.00005, ◐: p<0.0005, □: p<0.005, ▨: p<0.05.

このことは、眼表面炎症の制御に眼表面上皮細胞に発現している I $\kappa$ B $\zeta$  が関わっていることを示唆している。さらに、この I $\kappa$ B $\zeta$  欠損マウスを Balb/c 背景に純系化したところ、著しい眼表面炎症、口囲周囲の皮膚炎を生じ、気管支炎も認められた<sup>71)72)</sup>。さらに、Stat6/I $\kappa$ B $\zeta$  ダブル欠損マウスでは、爪周囲炎も認められた<sup>71)</sup>(図 12)。I $\kappa$ B $\zeta$  欠損マウスにみられる皮膚・粘膜炎症は、自然免疫応答の異常により SJS 類似の炎症が眼表面に生じる可能性を示している。

5. 遺伝子多型解析による SJS 関連遺伝子の同定

SJS 発症の遺伝的素因として自然免疫応答異常が関与しているとの仮説のもとに、遺伝子発現解析ならびに遺伝子多型解析を行った。その結果、末梢血単球を用いた遺伝子発現解析において、lipopolysaccharide (LPS) 刺激に対する interleukin-4 receptor (IL4R) 遺伝子の発現レベルが異なった。すなわち、LPS 刺激 1 時間後の IL4R の発現が非刺激群と比較して、健常対照では上昇すると対照的に、SJS 患者では減少した<sup>69)</sup>。さらに、この IL4R について、Val50Ile, Ser478Pro, Gln551Arg の 3 つの遺伝子多型について解析を行ったところ、Gln551Arg について患者群と非発症群の間に有意な差異を認めた。大変興味深いことに、喘息などのアレルギー疾患では、健常人と比較して Arg 551 が有意に増加するのに対して、SJS では健常人と比較して Gln 551 が有意に増加していた<sup>73)</sup>。また、IL4R のリガンドであ

る IL13 の遺伝子多型 Arg110Gln についても SJS との相関を認めた<sup>74)</sup>。このことは、IL13—IL4R を介した反応の異常が、SJS 発症に関与している可能性を示している。さらに、SJS 患者の 8 割において急性期に感冒様症状がみられたことから、発症にはウイルス感染が大きく関与している可能性が考えられる。そこでウイルス由来二本鎖 RNA を認識し、眼表面上皮に強く発現している TLR3 に関して遺伝子多型を解析した。その結果、TLR3 の rs.3775290 と rs.3775296 が SJS 患者との相関を示した<sup>71)75)</sup>。さらに、急性期 SJS で発現が上昇すると報告されている FasL についても 4 つの遺伝子多型を解析したところ、rs.3830150 と rs.2639614 に SJS と有意な相関を認めた<sup>76)</sup>。

次に、human leukocyte antigen (HLA) 解析を行ったところ、HLA-A0206 が日本人 SJS 患者と強い相関を示した<sup>77)78)</sup>。抗原提示細胞に発現し獲得免疫に関係する HLA-class II ではなく、すべての細胞に存在しウイルスに対する免疫応答と関係する HLA-class I である A 0206 と強い相関が認められたことは大変興味深い。皮膚科領域からは、重症薬疹と患者 HLA との相関が近年になり相次いで報告されている。抗てんかん薬であるカルバマゼピンによる全身の薬剤障害は、漢民族では HLA-B\*1502 と強い相関を示す。また、抗痛風薬であるアロプリノールによる障害は、漢民族だけでなく欧米人、日本人においても、HLA-B\*5801 と強い相関を示す

ことが報告されている<sup>79)</sup>。大変興味深いことは、眼合併症を伴う SJS 患者は、これらの抗てんかん薬や抗痛風薬で発症することは少なく、約 8 割がウイルス感染を思わす感冒様症状に対する投薬後に発症していることである<sup>64)</sup>。以上により、Stevens-Johnson 症候群の発症に遺伝子素因が関係し、自然免疫応答の異常がその発症に関係しているとの仮説は十分に批判に耐えられるものであると思われる。

## 6. SJS 研究の今後の展開

SJS 発症を早期に診断し、全身に生じているサイトカイン・ストームを抑えること、例えば発症初期からステロイドパルス療法とベタメタゾン局所投与による眼科治療を行うことが、眼後遺症を防ぐために重要であると考えられる<sup>64)</sup><sup>65)</sup>。ただし副腎皮質ステロイド薬の全身投与については国際的には賛否両論があり、未だ結論には至っていない。すなわち副腎皮質ステロイド薬投与が生命予後に悪影響を及ぼす、あるいは細菌やウイルス感染症を発症する可能性が懸念されている。発疹やびらんが拡大したあとに副腎皮質ステロイド薬を投与すると、二次感染により肺炎や敗血症などの重篤な合併症を招く可能性があると考えられているが、副腎皮質ステロイド薬投与に関するこれまでの報告は発症から診断までの時期、眼科的重症度、副腎皮質ステロイド薬投与量などがさまざまであり、これらを一概に比べて論じることは困難である<sup>80)</sup><sup>81)</sup>。大規模なプロスペクティブ・スタディによる急性期所見の集積とともにステロイド早期治療の有効性を検証することが社会的にも必要であると痛切に感じている。

SJS 発症には、薬剤投与などの環境因子に加えて、複数の遺伝子多型が関与することが明らかとなった<sup>69)</sup>(図 13)。我々は、現在さらに研究を進め、Affymetrix 社 500 K チップを用いた全遺伝子アプローチによる遺伝子多型解析(GWAS)を行っている。その結果、興味ある新たな疾患関連遺伝子群を同定した。今後は、これらの複数の疾患関連遺伝子と SJS 発症との関連について詳細な解析を行っていく予定である。

## V 眼表面におけるアレルギー炎症制御

### 1. 眼表面上皮によるアレルギー炎症制御

#### 1) アレルギー性結膜炎の概論

現在、アレルギー性角結膜疾患の発症機序では、I 型アレルギー反応が主体であると考えられている。アレルギー性結膜炎の一般的な症状は、抗原曝露後数十分以内に即時相の反応として生じる結膜浮腫、充血、かゆみ、眼瞼浮腫、粘液性の眼脂である。これらは、肥満細胞の脱顆粒によって放出されたヒスタミンにより主として引き起こされる。一方、これに引き続いて 8~24 時間後に遅発相の炎症反応が生じる。これは、結膜局所部位への好酸球の浸潤を主体とする。春期カタルやアトピー性角

結膜炎などの組織障害を伴うアレルギー性角結膜疾患は、I 型アレルギー遅発相がその病態の主体と考えられている。遅発相の好酸球浸潤は、肥満細胞によって誘導されると長年にわたって考えられてきた。しかし、最近では、好酸球浸潤に線維芽細胞や T 細胞が重要な役割を担うという報告がなされてきた。我々も、アレルギー性結膜炎マウスモデルを用いた解析により、肥満細胞欠損マウスにおいても、アレルギー性結膜炎遅発相に結膜好酸球浸潤が生じることを証明した<sup>82)</sup>(図 14)。このことは、アレルギー性結膜炎遅発相の結膜好酸球浸潤に肥満細胞以外の細胞が大きく関与していることを示唆するものである。

#### 2) アレルギーへの上皮細胞のかかわり

アレルギー疾患は、原因抗原が体内に取り込まれ、そこで各種免疫細胞の活性化を起こすために生じる疾患である。このため、我々は、体外の抗原と免疫細胞を含む体内体液系をつなぐ窓口として、皮膚粘膜を被覆する上皮系がアレルギー疾患にかかわる可能性に着目した。一方、プロスタグランジン(PG) E<sub>2</sub>の受容体の一つである EP3 は、アレルギー喘息を抑制することが報告されている。PG は、トロンボキサン(TX)とともに、プロスタノイドを構成し、さまざまな刺激に伴い、種々の細胞によって合成される生理活性物質である。プロスタノイドには、PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、PGI<sub>2</sub>、TXA<sub>2</sub>の 5 種類があり、それぞれに対する特異的な受容体として、DP、EP(EP1、EP2、EP3、EP4)、FP、IP、TP が存在することが解明されている。

そこで、我々は、アレルギー性結膜炎マウスモデルを用いて、眼表面炎症における EP3 の役割を解析した。EP3 欠損マウスにアレルギー性結膜炎を誘発したところ、抗原点眼 24 時間後の結膜好酸球浸潤が野生型マウスと比較して有意に増加した。また、抗原点眼 6 時間後の眼瞼エオタキシン mRNA 発現量も EP3 欠損マウスでは野生型マウスと比較して有意に増加した<sup>83)</sup>(図 15)。続いて、EP3 を欠損させ代わりに β-gal 遺伝子をノックインしたマウスを用いて、眼における EP3 の局在を調べたところ、EP3 は眼表面上皮に局限して存在し、特に結膜上皮細胞に強く発現していた。また、免疫組織染色においても結膜上皮細胞における EP3 の強い発現が確認された<sup>83)</sup>(図 16)。さらにアレルギー性結膜炎を誘発した野生型マウスに EP3 アゴニストを点眼投与すると、抗原点眼 24 時間後の結膜好酸球浸潤が有意に減少した。この EP3 アゴニストによる結膜好酸球浸潤抑制作用は、EP3 欠損マウスでは認められないことから、眼表面上皮に発現している EP3 を介した作用であることも確認された<sup>83)</sup>(図 17)。これらのことから、眼表面上皮細胞に発現している EP3 が眼表面炎症を抑制していることは明白である。また、アレルギー性結膜炎を誘導すると EP3 のリガンドである PGE<sub>2</sub>ならびにその合

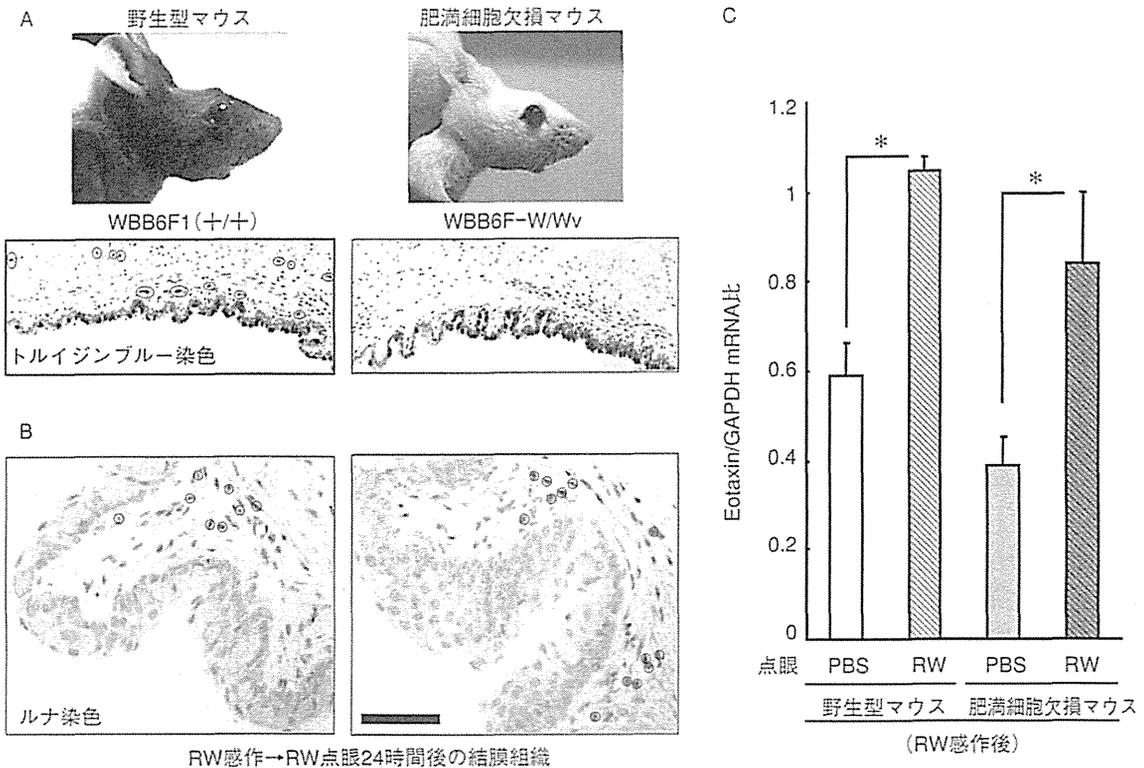


図 14 肥満細胞欠損マウスにおけるアレルギー性結膜炎遅発相の結膜好酸球浸潤。

A: 野生型マウスには結膜に多数の肥満細胞が確認できるが、肥満細胞欠損マウスには、肥満細胞は存在しない。○は肥満細胞。B: 肥満細胞欠損マウスでも、野生型マウスと同様に、ブタクサ花粉を用いてアレルギー性結膜炎の誘発により結膜好酸球浸潤を生じる。○は好酸球。スケールバーは50μm。C: マウス眼瞼の定量 polymerase chain reaction (PCR)。肥満細胞欠損マウスでも、野生型マウスと同様に抗原 (RW) 点眼によりエオタキシン (eotaxin) の発現が有意に上昇する。\*: p<0.05。

(文献 82 より許可を得て転載)

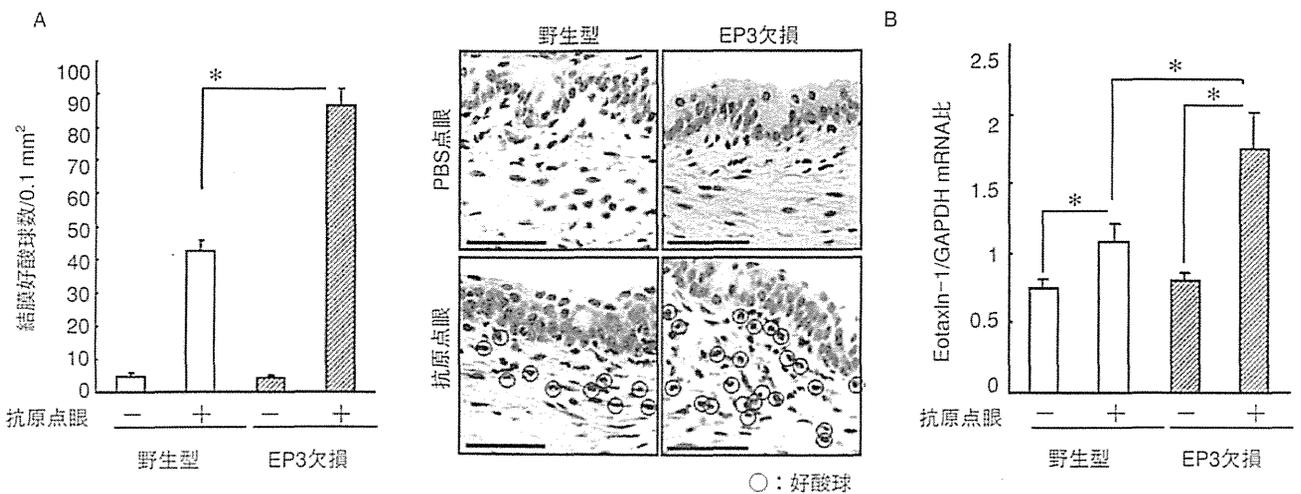


図 15 EP3 欠損マウスにおけるアレルギー性結膜炎遅発相の結膜好酸球浸潤。

A: 抗原感作マウスにおける抗原点眼 24 時間後の結膜好酸球数/0.1 mm<sup>2</sup>。EP3 欠損マウスでは、抗原点眼 24 時間後の結膜好酸球浸潤が野生型マウスと比較して有意に増加していた。\*: p<0.0005, n=19。スケールバーは50μm。B: 抗原感作マウスにおける抗原点眼 6 時間後の眼瞼中エオタキシン mRNA の発現。眼瞼エオタキシン mRNA 発現量も EP3 欠損マウスでは野生型マウスと比較して有意に増加した。\*: p<0.05, n=7。

(文献 83 より許可を得て転載)

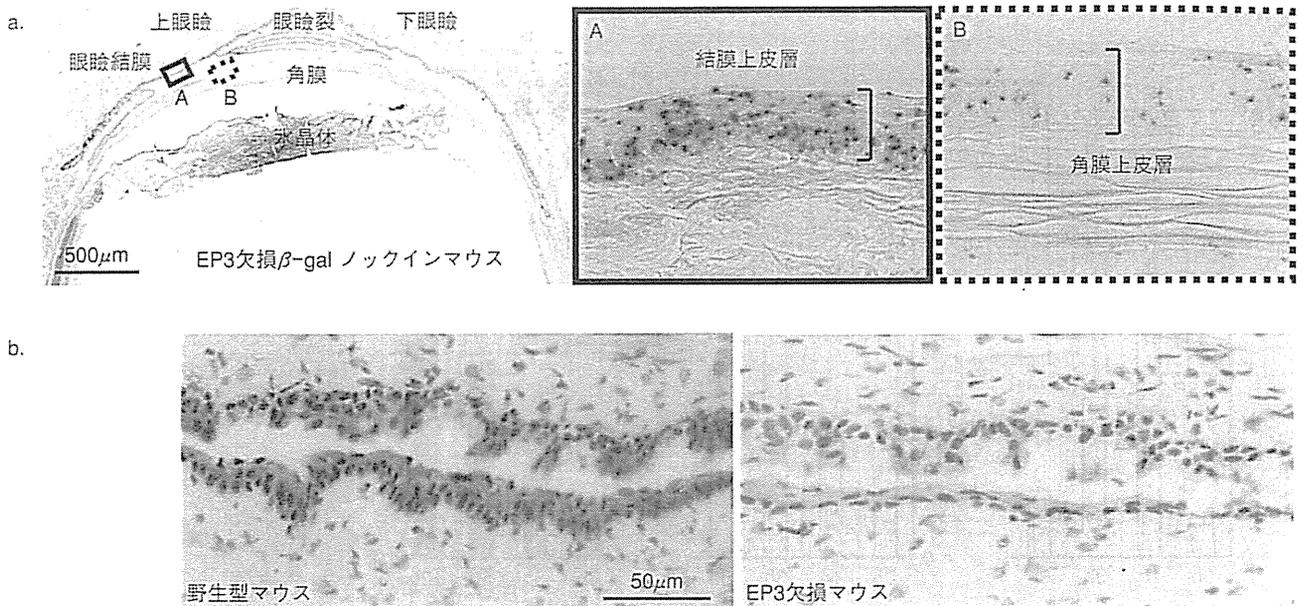


図 16 眼表面における EP3 の局在。

EP3 を欠損させ代わりに  $\beta$ -gal 遺伝子をノックインしたマウスを用いて、眼における EP3 の局在を調べたところ、眼表面上皮に限局して存在し、特に結膜上皮細胞に強く発現していた(a)。また、免疫染色にても結膜上皮細胞における EP3 の強い発現が確認された(b)。

(文献 83 より許可を得て転載、改変)

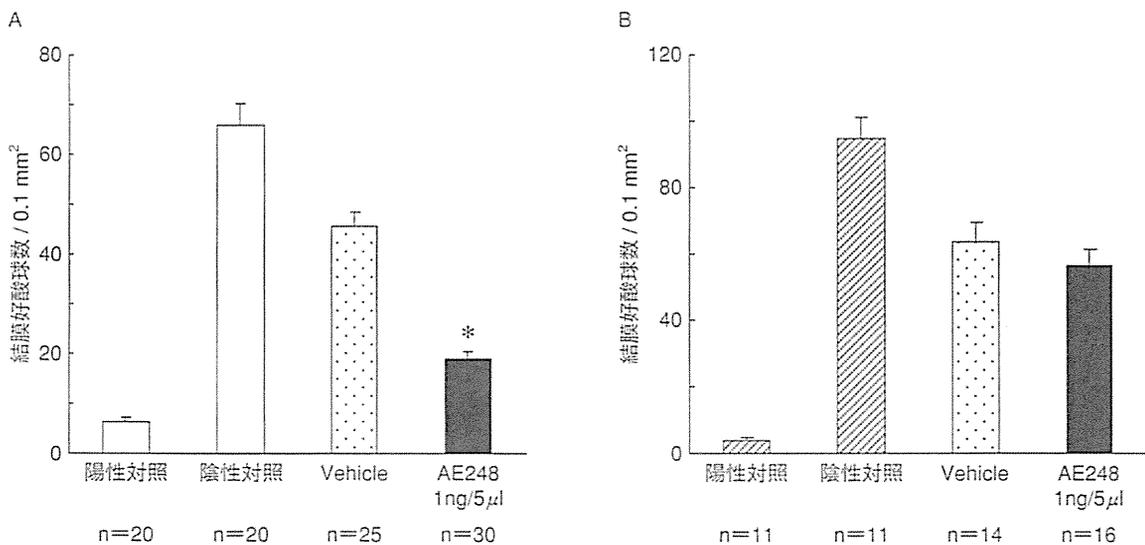


図 17 結膜好酸球浸潤に対する EP3 アゴニストの点眼効果。

A : アレルギー性結膜炎を誘発した野生型マウスに EP3 アゴニスト (AE 248) を点眼投与すると、抗原点眼 24 時間後の結膜好酸球浸潤が有意に減少した。\* :  $p < 0.0005$ 。 B : この結膜好酸球浸潤抑制作用は、EP3 欠損マウスでは認められない。

(文献 83 より許可を得て転載、改変)

成酵素の産生・発現が眼瞼中で上昇することから、EP3 を介したアレルギー炎症抑制作用が生理状態下でも作用していることが明らかとなっている<sup>83)</sup>(図 18)。

さらに我々は、ヒト結膜上皮細胞にも、この EP3 が発現していることを、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ならびに免疫染色で確認している(図 19)。さらに、EP3 の遺伝子多型が関与する炎症

性眼表面疾患が存在することを確認している。これらの知見は、ヒト眼表面炎症の制御に、結膜上皮細胞に発現している EP3 が大きく関与している可能性を示している。

眼表面上皮細胞に強く発現している toll like receptor (TLR)3 も、眼表面炎症制御に大きく関与している。アレルギー性結膜炎マウスモデルを用いて、眼表面炎症に

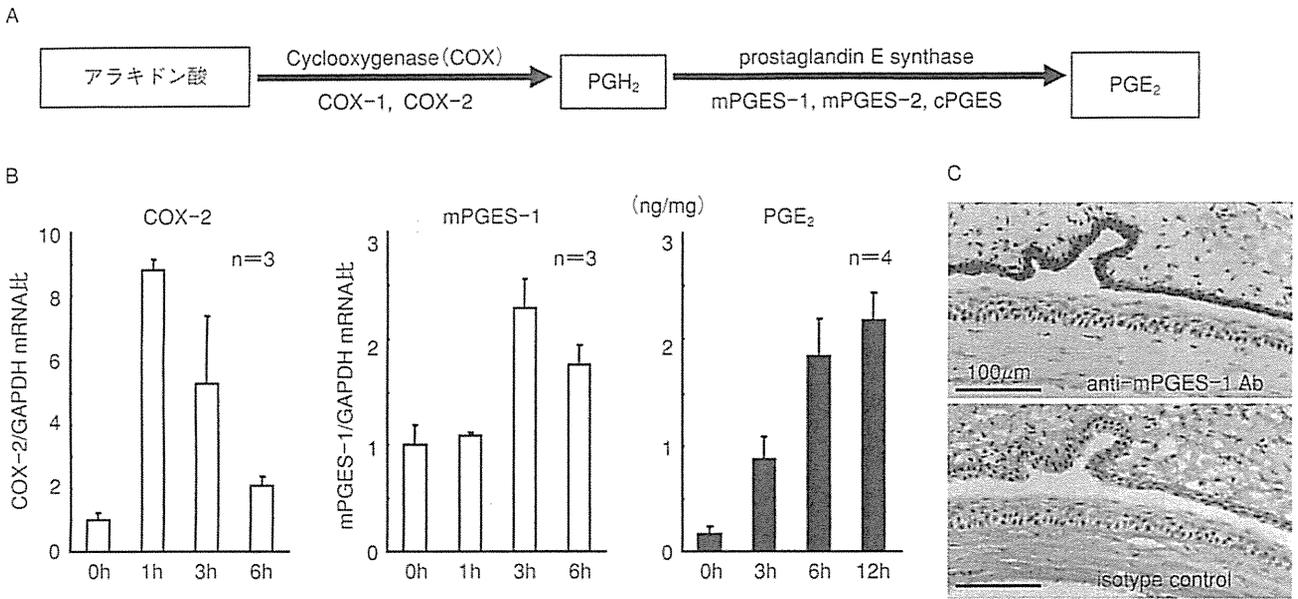


図 18 アレルギー性結膜炎におけるプロスタグランジン(PG)E<sub>2</sub>ならびにその合成酵素の産生・発現。アレルギー性結膜炎を誘導すると EP3 のリガンドである PGE<sub>2</sub>ならびにその合成酵素の産生・発現が眼瞼中で上昇する。  
 A：プロスタグランジン E<sub>2</sub>合成経路。 B：アレルギー性結膜炎における眼瞼中 COX-2, mPGES-1 mRNA 発現, ならびに PGE<sub>2</sub>含有量の経時変化。 C：眼表面での mPGES-1 の局在。  
 (文献 83 より許可を得て転載, 改変)

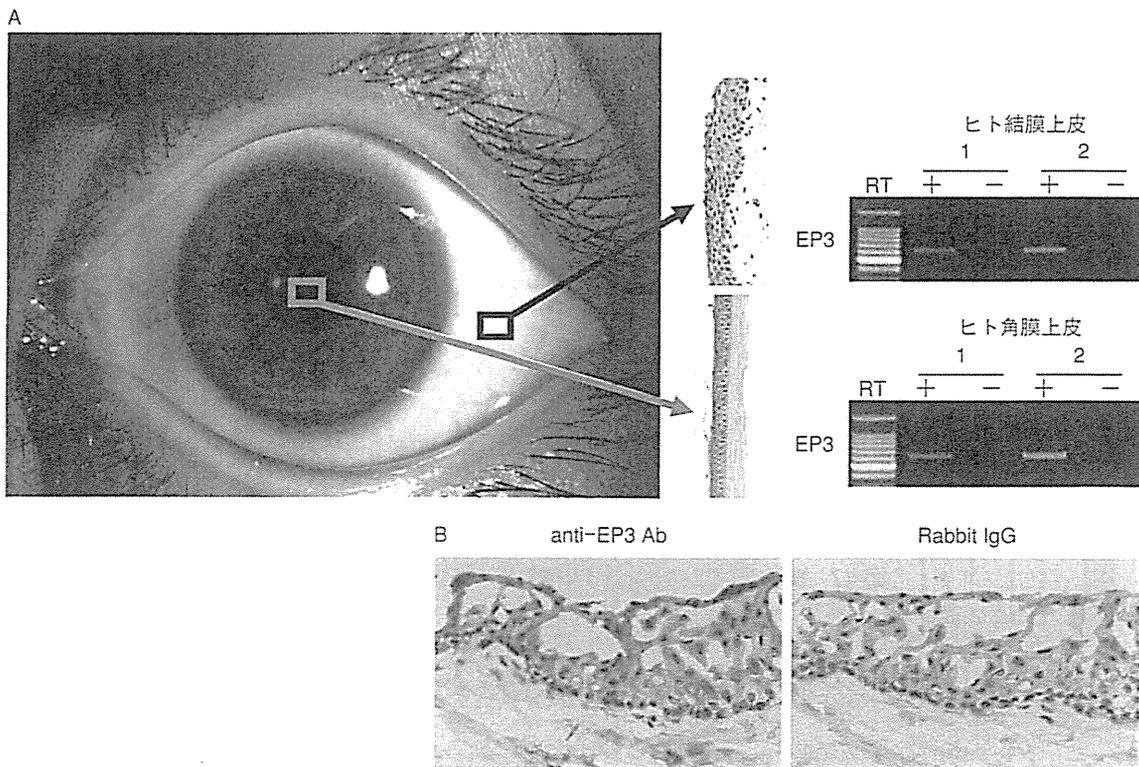


図 19 ヒト眼表面上皮細胞における EP3 の発現。  
 A：ヒト眼表面での EP3 mRNA の発現(RT-PCR)。 B：ヒト結膜組織の免疫染色。ヒト結膜上皮細胞, 角膜上皮細胞にも EP3 は発現している。

における TLR3 の役割を解析したところ, TLR3 欠損マウスでは, 抗原点眼 24 時間後の結膜好酸球浸潤が野生型マウスと比較して有意に減少した。一方, TLR3 過剰

発現マウスでは, 有意に増加していた<sup>84)</sup>(図 20)。我々は, 結膜上皮細胞に TLR3 が強く発現していること<sup>71)</sup>, さらに, 結膜上皮細胞を, TLR3 のリガンドである poly-

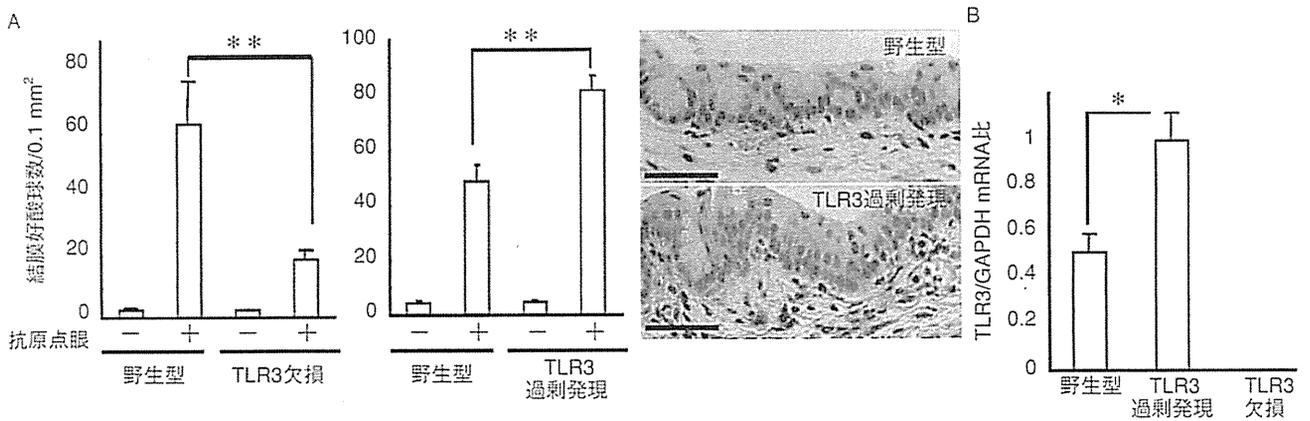


図 20 アレルギー性結膜炎遅発相の結膜好酸球浸潤における TLR 3 の役割。

A : 抗原感作マウスにおける抗原点眼 24 時間後の結膜好酸球数/0.1 mm<sup>2</sup>. \*\* : p<0.01. スケールバーは 50 μm. B : 抗原感作マウスにおける抗原点眼 6 時間後眼瞼中 TLR 3 mRNA の発現. \* : p<0.05. TLR 3 欠損マウスでは, 抗原点眼 24 時間後の結膜好酸球浸潤が野生型マウスと比較して有意に減少し, 一方, TLR 3 過剰発現マウスでは, 有意に増加した.

(文献 84 より許可を得て転載, 改変)

IC で刺激すると thymic stromal lymphopoietin (TSLP) を発現・産生することも確認している. TSLP は, アレルゲンやウイルスなどの刺激により, 上皮細胞から産生され, 樹状細胞に作用し Th 2 型細胞を誘導することにより間接的に好酸球遊走を誘導する. したがって, 結膜上皮細胞に発現している TLR 3 は, TSLP の産生を介してアレルギー炎症を制御していると考えられる.

上記の結果から, アレルギー性炎症が, 上皮細胞を介して制御されていることは明らかである. 上皮細胞によるアレルギー炎症制御機構が解明されれば, 現在の治療薬である肥満細胞や肥満細胞から放出されるヒスタミンを標的にした抗アレルギー薬に加えて, 上皮細胞を標的にした新しい治療薬の開発へ進展する可能性があり, 今後の発展が大きく期待される.

## 2. マクロファージの機能制御によるアレルギー炎症制御

近年, アレルギー疾患の増加が社会問題になっている. そこで, 我々は, アレルギー体質の本質的な改善を目標としたアレルギー制御・予防方法の開発についても, 免疫学的観点から取り組んできた. 特に, アレルギー応答に対する免疫学的研究を行うにあたり, 細胞内チオールレドックス理論に注目した. 主な活性化 CD 4<sup>+</sup> T リンパ球には, IL-2 や interferon (IFN)-γ を産生する T-helper 1 型 (Th 1) と IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 など産生する T-helper 2 型 (Th 2) の存在が知られている. Th 1/Th 2 バランスは抗原提示細胞 (APC) であるマクロファージ (MΦ) や樹状細胞 (DC) の細胞内チオールレドックス状態により制御される<sup>85)86)</sup>. 細胞内チオール基 (-SH 基) の大半は還元型グルタチオン (GSH) により担われ, 微小環境の電位状態により, 還元型 GSH と酸化型 GSSG との間に相互変換が起こる. 細胞内 GSH

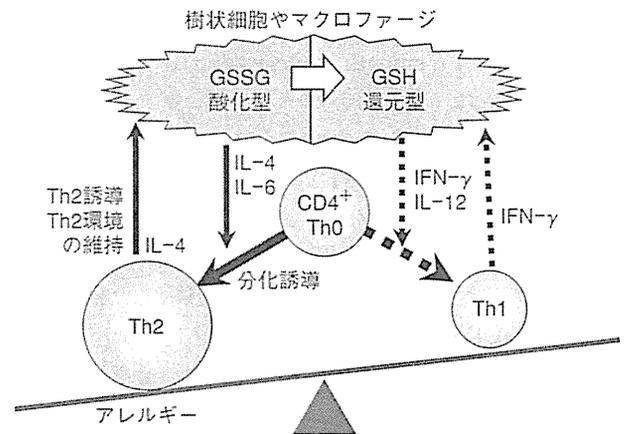


図 21 チオールレドックス偏倚によるアレルギー制御. 細胞内還元型グルタチオン (GSH) 誘導により, T-helper 2 型 (Th 2) 免疫応答を制御可能である. GSSG : 酸化型グルタチオン, IFN : interferon.

含量の高いものが還元型 APC, 低いものが酸化型 APC と呼称され, それぞれ Th 1, Th 2 の誘導にかかわる. 家ダニ抗原などのアレルゲンは細胞内チオールレドックス状態を酸化型に傾斜させる (羽室ら, 未発表データ). その結果, アレルゲン曝露により Th 1/Th 2 バランスは Th 2 に傾斜する. しかしながら, APC は機能的可塑性を有しており, APC 内の GSSG を GSH に変換 (還元型誘導) することで, Th 2 増幅ループの遮断が可能である (図 21). 気道アレルギー応答においては, 還元型を誘導する薬剤グルタミルシステインエチルエステル (GC-E) を用いることにより, 卵白アルブミンで惹起されるマウス喘息モデルでの気道抵抗性の著明な軽減, 好酸球浸潤の抑制が観察される. 一方, 酸化型を誘導する transforming growth factor (TGF)-β により, Smad 2/3 のリン酸化, connective tissue growth factor (CTGF) 発現,

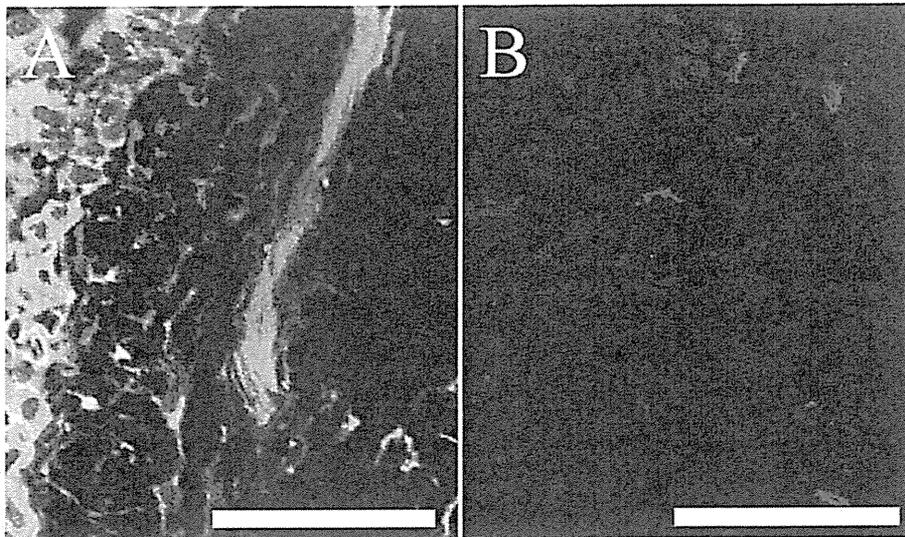


図 22 マウスアレルギー性結膜炎モデルにおける結膜での酸化型マクロファージ誘導。無処置マウス(A)と Ragweed を用いてアレルギー誘導したマウス(B)を準備し、採取した結膜を凍結包埋し、MCB(緑)、PI(青)、CD11b(赤)で染色した。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。

上皮間葉転換や線維芽細胞からの I 型コラーゲン、フィブロネクチン、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 産生の増大が観察され、細胞内チオールレドックス状態の制御が粘膜組織の肥厚抑制を含め広くアレルギー性症状の改善につながる可能性が判明している<sup>87)88)</sup>。

アレルギー性結膜炎の局所における酸化型 M $\Phi$  の誘導について、Ragweed を用いた実験的アレルギー性結膜炎マウスモデルを用いて検証した。採取した結膜を凍結包埋し、CD11b 表面抗原陽性のマクロファージにおけるチオールレドックス状態を評価した。その結果、無処置マウスの結膜と比較して、アレルギー性結膜炎で酸化型 M $\Phi$  が誘導されることや、周辺の細胞のグルタチオンも酸化型に偏倚していることが明らかとなった(図 22)。

APC の細胞内チオールレドックス状態を酸化型から還元型に偏倚させることは低分子薬剤以外に高分子性薬剤でも可能である。手術不能再発胃癌患者において延命効果が実証された世界発の自然免疫応答増強剤である  $\beta$ -1,3 グルカン「レンチナン」<sup>89)</sup> は還元型を、LPS は酸化型を誘導する。レンチナンは M $\Phi$ /DC の細胞表面受容体と結合して APC を酸化型から還元型に偏倚させる<sup>90)</sup>。このレンチナンは、現在、静脈注射用製剤として使用されている。 $\beta$ -グルカンは数百  $\mu\text{m}$  の粒子径の巨大な凝集体を形成するため経口摂取では効能を示さない。そこで、腸管粘膜のパイエル板から体内に取込み可能な数  $\mu\text{m}$  程度以下の粒子径で安定化させた  $\beta$ -グルカン(ミセラピスト<sup>®</sup>)を用いて APC を酸化型から還元型に偏倚させ、Th2 偏移を抑制することで眼表面アレルギー疾患が制御可能か否かを臨床研究として行った。倫理委員会の承認と文書同意によるインフォームド・コンセントを行った後に二重盲検比較臨床試験を施行した。季節性ア

レルギー性結膜炎を有しているボランティア 60 例を無作為二重盲検法にて 2 群に分け、一方にミセラピスト<sup>®</sup> (味の素製、以下、微粒子化群)、他方に微粒子化されていないプラセボ  $\beta$ -グルカン液(以下、プラセボ群)を 1 日 1 回連続 2 か月摂取させた。ともに、 $\beta$ -1,3 グルカンを 15 mg 含んでいるものを用いた。

自己評価での効果判定では、2 か月間の服用終了時点、および、服用終了 2 か月経過後において有意なアレルギー症状軽減効果が認められた。本臨床効果は末梢血 IgE 変化と相関しており、プラセボ群では効果がみられなかったのに対し、レンチナン微粒子化群では服用後 4 週と 8 週において、有意にアレルギー特異的 IgE/抗原非特異的 IgE の減少が認められた(図 23)。臨床効果との間に相関があるか否かを検討したところ、IgE 減少率と末梢血 CD 14 陽性単球へのレンチナン結合率に有意な相関がみられた(図 24)。以上により、レンチナンが単球に結合し、還元型を誘導し、Th2 偏移を抑制することでアレルギー症状の制御が可能となったと推測している<sup>91)</sup>。一般的に、アレルギー疾患に対する治療には抗アレルギー薬や免疫抑制剤が用いられているが、抗アレルギー薬はアレルギー発症機序の末梢部分を抑制する対症療法に近い治療であり、また、免疫抑制剤もアレルギー体質を根本的に改善させる治療とはいえない。免疫疾患に対する治療は免疫抑制ではなく免疫制御が重要と考えており、中等症以下のアレルギーが罹患患者の大部分を占めている現状において、体質改善を意図した安全かつ安価な治療指針を開発することは妥当な方向性であろうと考えている。

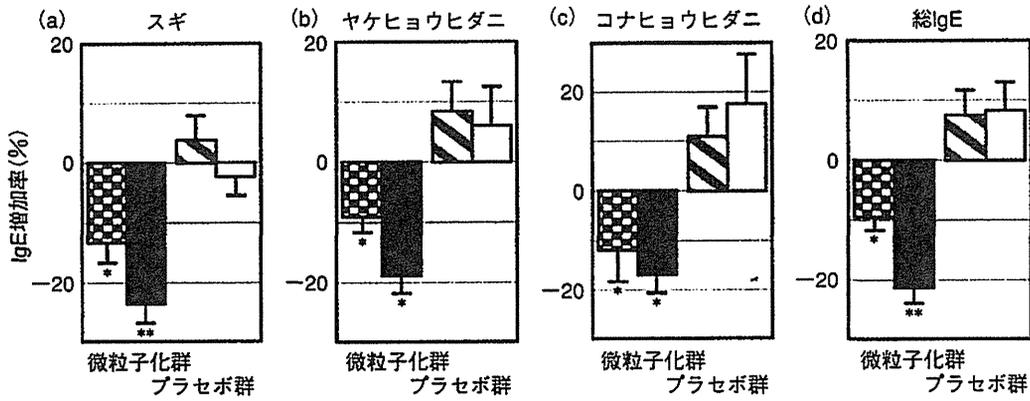


図 23  $\beta$ -1,3 グルカン服用による非特異的, アレルゲン特異的 IgE 変化。微粒子化  $\beta$ -1,3 グルカン, および, 非微粒子化プラセボ  $\beta$ -1,3 グルカン を 4 週間服用後 (■, ▨) と 8 週間服用後 (■, □) の末梢血を用いて評価。\* :  $p < 0.005$ , \*\* :  $p < 0.0001$ 。

(文献 91 より許可を得て転載)

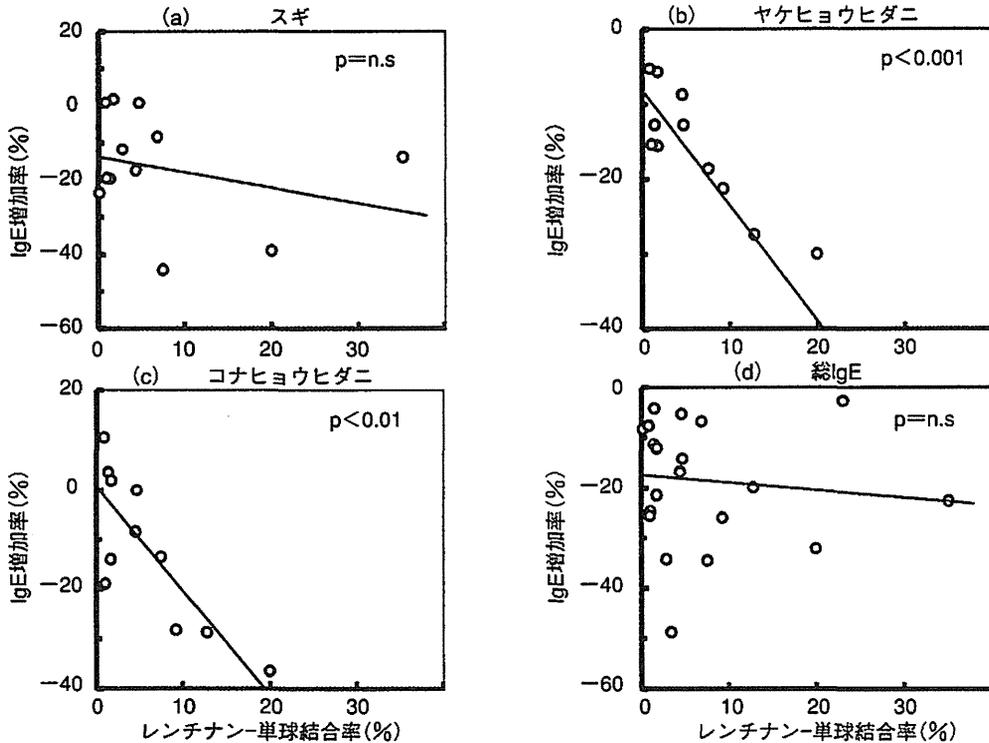


図 24 微粒子化  $\beta$ -1,3 グルカン服用群における, レンチナン-単球結合率と抗アレルギー効果との相関。FACS (fluorescence activated cell sorting) を用いて血中 CD 14 陽性細胞とレンチナンとの結合率を解析。n. s : 有意差なし。

(文献 91 より許可を得て転載)

## VI 眼表面上皮細胞の機能制御

### 1. 細胞内レドックス状態の重要性

一般に, マクロファージ (M $\Phi$ ) など抗原提示細胞 (APC) では, 細胞内の還元型グルタチオン (GSH) 含量の高いものを還元型 APC, 低いものを酸化型 APC と呼称し, この細胞内レドックス状態は Th1/Th2 バランスを制御する (図 25)。この概念を用いての Th2 制御

によるアレルギー性結膜炎に対する治療の試みは前項で紹介した。逆に, Th1 制御による角膜移植拒絶反応の抑制についてもモデル動物で明確な効果を観察している<sup>27)92)~94)</sup>。また, 細胞浸潤から組織破壊, そして血管障害による虚血の一連の応答によって生じる低酸素状態は酸化型 APC を誘導し, 慢性組織炎症と組織の線維化を誘導する (図 26)。免疫応答に伴う血管新生, リンパ管新生, そして炎症後の組織修復に伴う線維化の促進は抗

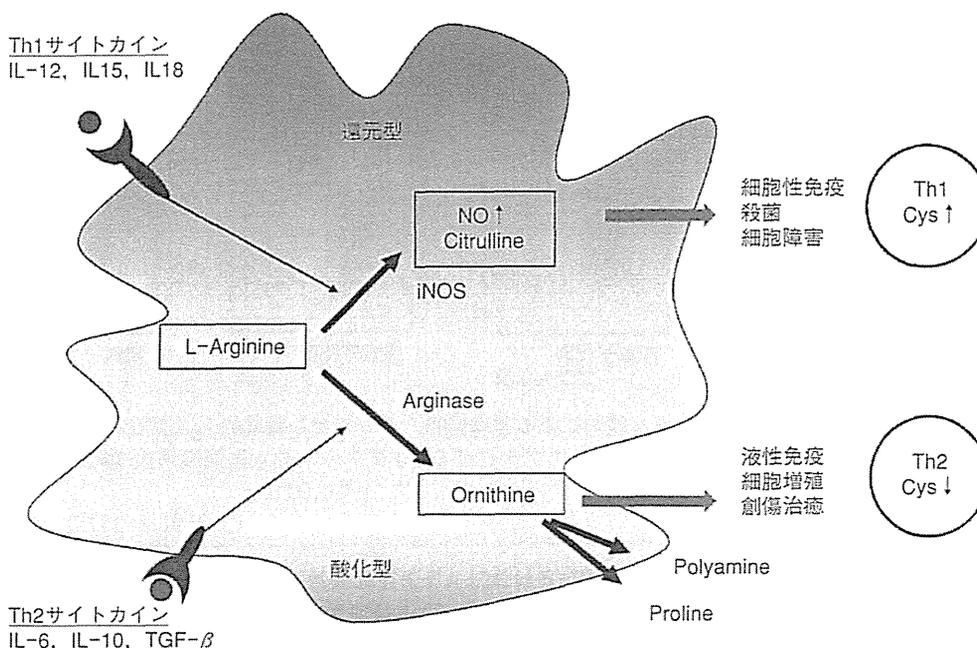


図 25 マクロファージ(MΦ)細胞内レドックス状態と Th 1/Th 2 バランスの制御。  
細胞内グルタチオンのレドックス状態(GSH/GSSG 比)により、還元型マクロファージ(RMΦ)と酸化型マクロファージ(OMΦ)に大別することができる。前者は Th 1, 後者は Th 2 免疫応答を誘導する。Th 1 サイトカインは RMΦ を Th 2 サイトカインは OMΦ を誘導する。

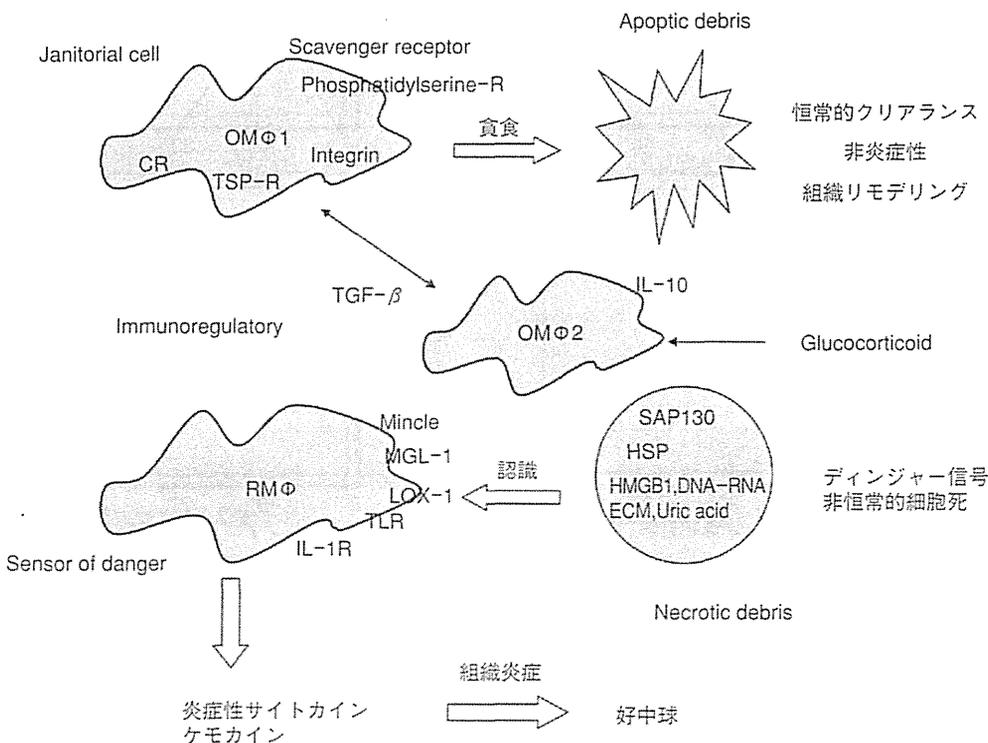


図 26 マクロファージ機能の多様性。  
マクロファージの機能は可塑性をもつ。酸化型 MΦ 型 1(OMΦ1)は定常的な異物の貪食処理に働き枯死した細胞の処理に働く。細胞表面にスカベンジャー受容体、補体受容体(CR), トロンボスポンジン受容体(TSP-R)などを発現する。IL-10 の発現が特徴的である。還元型 MΦ(RMΦ)はディンジャー信号 [SAP 130, heat shock protein(HSP), high-mobility group box(HMGB), advanced glycation end product(AGE)など] を感知して活性化され炎症性メディエーターを産生し組織炎症を惹起し、組織破壊に至る。細胞表面に toll like 受容体(TLR 3/9), IL-1 受容体(IL-1 R), macrophage-inducible C-type lectin(Mincle), macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 1(MGL-1)などを発現する。IL-12 の発現が特徴的である。酸化型 MΦ 型 2(OMΦ2)は組織修復・再構築に働く。Transforming growth factor-β(TGF-β)の産生を介して機能すると予想されるが詳細は解明されていない。

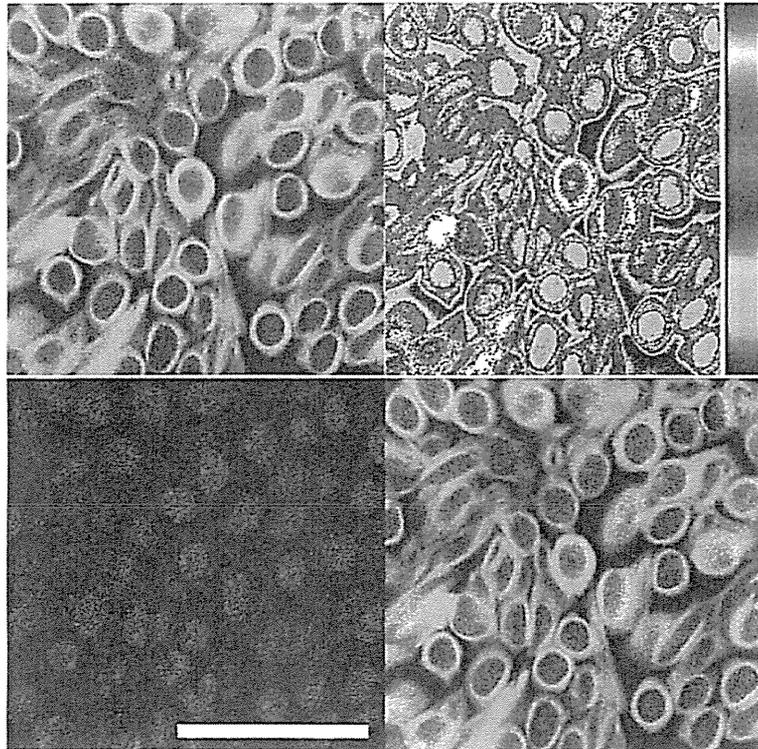


図 27 インプレッションサイトロジーの結膜サンプルにおけるチオールレドックス評価。MCB 染色による蛍光(左上)、MCB 染色による蛍光をフルカラー表示(右上)、PI 核染色(左下)、MCB と PI との合成(右下)を示す。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。

原提示細胞のチオールレドックス偏倚に規定されていることが判明している<sup>88)</sup>。チオールレドックスは、自然免疫による炎症、組織線維化そして上皮間葉転換の制御にも密接に関与しているが、角膜の場においてこのような解析はなされていない。そこで、免疫担当細胞のみならず眼表面粘膜上皮細胞もあわせて細胞内レドックス状態を細胞内グルタチオン量から評価することはきわめて重要な課題であると考えられる。

## 2. 眼表面上皮のレドックス状態のイメージング

そこで、我々は角膜上皮細胞の健全性および酸化ストレス状態をグルタチオン(GSH)量の観点から評価し、臨床における治療方法の指針とすることを検討しはじめています。GSH は細胞が生存するのに欠かせないトリペプチドであり、自らが二量体の酸化型(GSSG)に変化することにより細胞内における酸化ストレス防御を行う。また、細胞内の GSH/GSSG 比は炎症病期におけるサイトカイン・ケモカインの産生に影響を与えている。GSH 量測定には生化学的手法が用いられるが、生体における局在を顕微鏡レベルで評価することは困難である。そこで我々はチオール基に特異的に結合して発色する MCB 試薬で染色し、共焦点顕微鏡で観察することにより、凍結包埋した組織標本や<sup>92)</sup>、インプレッションサイトロジーで採取した細胞サンプルにおける GSH 量を相対的に評価することを可能とする方法を確立した。マウス角膜の検討では、縫合糸による物理的な角膜炎症などにより

GSH 量が低下する一方、GSH 含有の多いマクロファージの浸潤が角膜実質にみられることなどが観察できている。また、インプレッションサイトロジーで採取したヒト結膜上皮を評価する技術が確立できたため、生体の結膜上皮細胞のレドックス状態の経時的な評価が可能となった。図に示すように、GSH は細胞質に多く存在し、蛍光強度を疑似カラー表示することも可能である(図 27)。健常人の結膜上皮においては、性差、部位などによる差異は認められなかった。

GSH 量の低下には以下のような種々の要因、すなわち ④ GSH 生合成の低下、⑤ 炎症などによる細胞機能障害、⑥ 活性酸素捕捉による GSH 消費、⑦ 酸化型マクロファージの誘導などの GSSG への変換、⑧ 薬剤による GSH 産生低下もしくは GSSG 誘導、⑨ 低酸素による GSH 低下、などが想定される。特に、GSH 生合成の低下には、加齢に伴う GCLC(グルタミルシステインリガーゼ触媒単位)の遺伝子発現低下が一つの原因となる。酸化ストレスを含む小胞体ストレスは多くの生活習慣病の原因の一つであり、老化の一因として重要視されている。実際、高齢者における結膜上皮 GSH 量には有意な低下がみられている。このような GSH 量の低下は、酸化ストレス防御能の低下を生じ、極端な低下では細胞死が誘導される。

細胞内 GSH は軽度の結膜炎であっても低下し、眼表面の脆弱性と防御機構の迅速性に感嘆させられる。ドラ

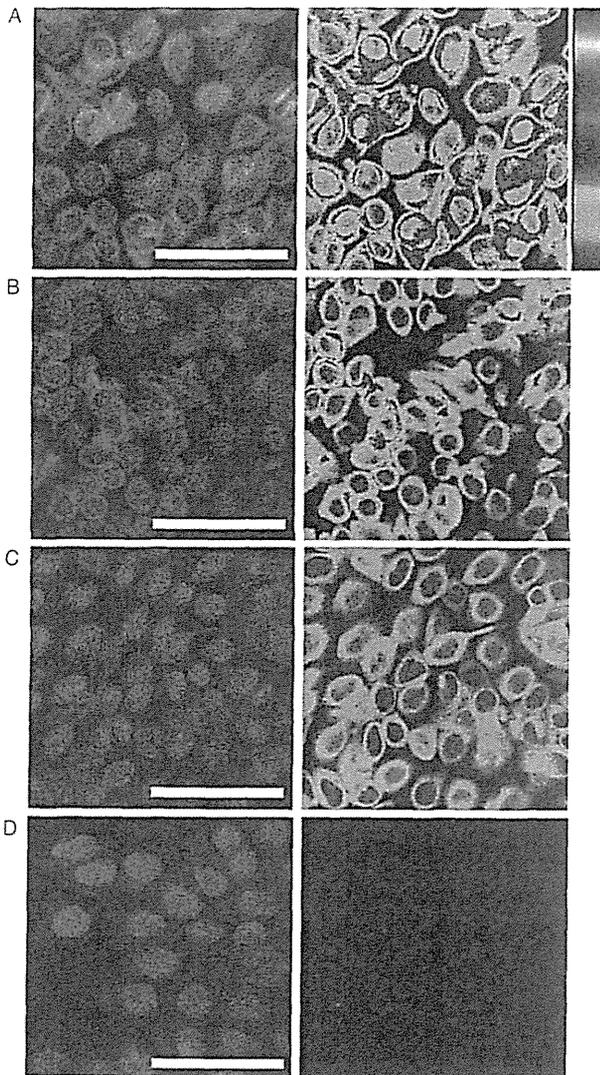


図 28 ドライアイにおける結膜上皮のグルタチオン低下。健常高齢者(A)、涙液層破壊時間(BUT)短縮型ドライアイ(B)、涙液減少型ドライアイ(C)、Sjögren 症候群(D)、それぞれの結膜サンプルについて評価した。MCB 染色と核染色との合成(左)と MCB 染色のフルカラー表示(右)を示す。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。

ドライアイには眼表面の炎症と酸化ストレスの関与が示唆されているため、GSH の状態を検討したところ、涙液層破壊時間(BUT)短縮型では軽度の GSH 量低下、非 Sjögren 症候群における涙液分泌減少型ドライアイではさらなる GSH 量の低下が認められ、細胞機能が正常でないことを示唆した(図 28)。しかし、これらの疾患に涙点プラグを使用した後は、GSH 量は正常域に回復していた。一方、Sjögren 症候群の結膜上皮においては、GSH 量の低下はさらに著明であり、涙点プラグ治療では GSH 量の改善は認められなかった。結膜上皮深層を評価してみると、Sjögren 症候群以外では健常者と同等の GSH 量であるのに対し、Sjögren 症候群では結膜上皮深層に至るまで GSH 量の低下が認められた。すなわち、Sjögren 症候群では、涙液減少という結膜上皮

表面からの要因とともに、結膜上皮深層における炎症の存在が関与していることが示唆された。このように、細胞内 GSH 量という新たな客観的パラメータを臨床診断のパラメータに加えることで、斬新な細胞機能評価が行えるはずである。

### 3. 角膜上皮細胞のメタボローム：涙液中アミノ酸の視座

生体を構成する細胞・組織は、酸素、栄養(糖、アミノ酸)の適切な供給のもとでホメオスタシスを維持する。グルコースからグリコーゲン、アミノ酸から蛋白質への同化作用とその逆反応としての異化作用のバランスで細胞・組織が維持される。図 29 に例示する筋肉細胞のように、細胞内のアミノ酸が不足し、細胞外からの取り込みに障害がある場合には、自己構成蛋白質を異化してアミノ酸とし、これを ATP の供給源として生命活動のエネルギー源とする。細胞内のレドックス状態が酸化型に傾斜するとアミノ酸とトランスポーター機能に障害が起こり、体液からアミノ酸を取り込む能力が低下する。これは、廃用性筋萎縮や老衰状態における筋萎縮や末期癌患者の急速な体重減少などの一因とされている。オートファジーやプロテアソームによる蛋白質処理機構と密接に関連する。

アミノ酸は従来、主として、蛋白質を構成する原料、あるいは、生体成分の前駆体といった栄養素として考えられてきた。しかしながら、細胞機能の制御に重要な役割を果たしていること、換言すれば、細胞が置かれている環境中のアミノ酸/アミノ酸代謝が、シグナル伝達物質/シグナル機能としての役割をもち、そのアミノ酸濃度のバランスを感知する機構が細胞に備わっていることが分子レベルで解明されつつある<sup>95)96)</sup>。体液中に含まれる種々のアミノ酸が、糖尿病、肝疾患、腎疾患の病態や、筋肉の老化、代謝に深く関与することが明らかにされている。眼科領域においても結膜上皮細胞内のグルタチオン量(細胞内レドックス状態)がその機能に大きな影響を与えることが最近になって報告され<sup>97)</sup>、Harada らはグルタミン酸、システインの取り込み障害によるグリア細胞内グルタチオン量低下によるグリア細胞の枯死が正常眼圧緑内障の一因ではないかと報告している<sup>98)</sup>。

最近、角膜上皮細胞にアミノ酸トランスポーターの存在することが報告されており<sup>99)</sup>、涙液中に存在する種々のアミノ酸が上皮細胞の健常性の維持さらには上皮疾患の病態に関連すると推測される。涙液中の蛋白質構成成分や電解質バランスなどが血漿と異なっているように、涙液中のアミノ酸プロファイルも全身(血漿)とは異なり、そのことが病態に密接に関与するのではないかと仮説を我々は持っている。ただ、涙液は血液、体液とは異なり、1 回に採取できる量が微量なことから構成微量成分の解析が困難であり、これまでに涙液中のアミノ酸発現を詳細に検討した報告はなかった。しかし、近年、

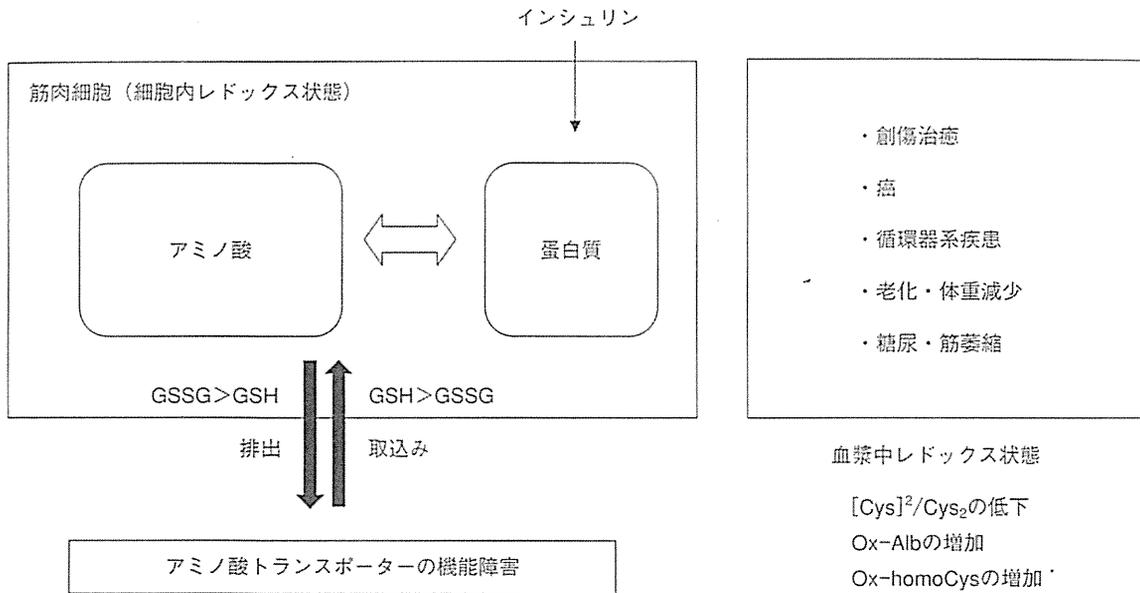


図 29 寿命シグナルとレドックス制御.

細胞外からのアミノ酸の取込みにかかわるアミノ酸トランスポーターの機能維持には細胞内チオールレドックス状態が重要であり、直接、間接に、老化や生活習慣病の発症とかかわると考えられる。

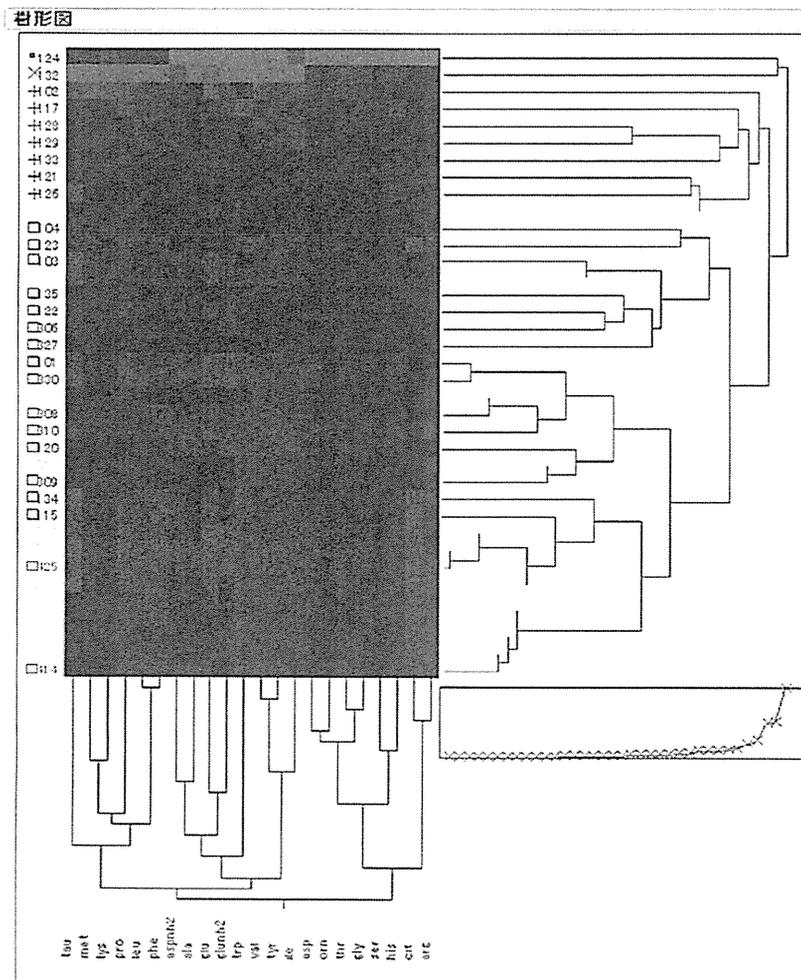


図 30 涙液中のアミノ酸に関するクラスター解析結果.

Stevens-Johnson 症候群, 化学外傷, 熱傷など炎症を伴う眼表面疾患と健常人涙液中の 23 種アミノ酸を検討した. Stevens-Johnson 症候群, 化学外傷などの難治性炎症性疾患のグループがクラスターを形成している。

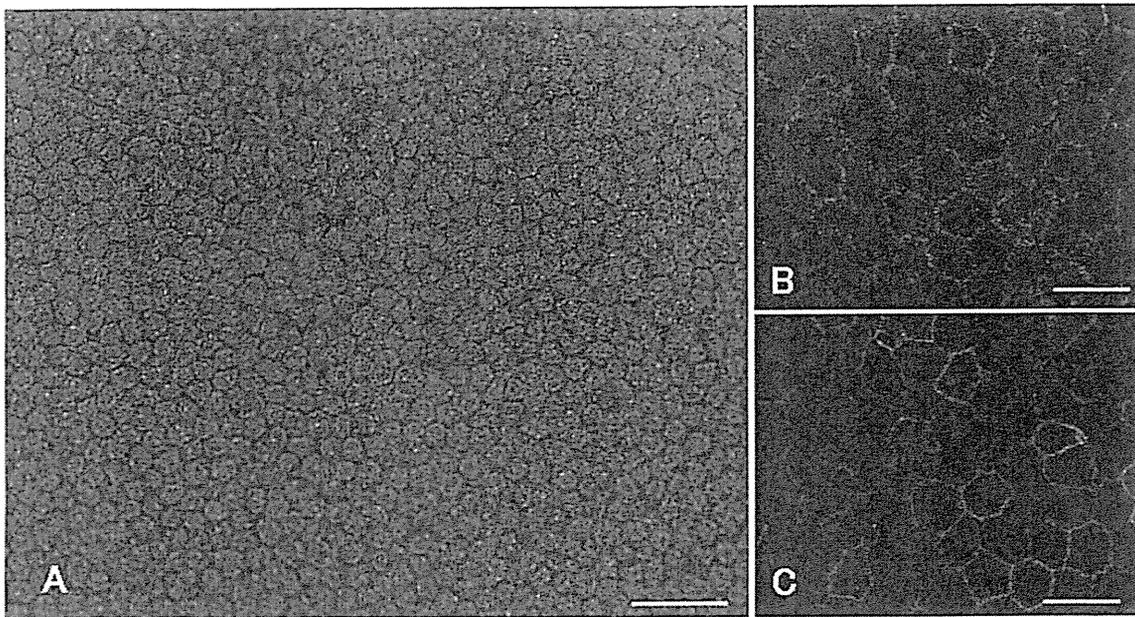


図 31 I型コラーゲンシートを基質として作製したサル培養角膜内皮シート。

A: 細胞密度は約 2,800 個/mm<sup>2</sup>で、角膜内皮細胞として良好な形態を維持していた(アリザリン染色写真)。免疫染色により、角膜内皮細胞の機能に関連する蛋白質である zonula occludens(ZO)-1(B)および Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase(C)を発現していた(緑)。スケールバーは、50 μm(A), 30 μm(B, C)。

(文献 102 より許可を得て転載)

キャピラリー電気泳動/質量分析計などを用いる解析技術の発展により、微量検体での網羅的アミノ酸解析が可能となった。

我々は、体液中の微量アミノ酸の解析技術を確立した味の素社の研究者との共同研究により、眼表面疾患患者および年齢、性別を異にする正常ボランティアより採取した涙液、ドライアイ患者や眼精疲労モデルボランティアより採取した涙液を用いて 23 種のアミノ酸を網羅的に解析した。その結果、涙液中のアミノ酸プロファイルは血漿とはまったく異なるものであった。炎症眼において高度に発現が亢進していたアミノ酸は酸化型のレドックス応答と考えられ、眼局所の炎症を抑制する方向に涙液のアミノ酸プロファイルがシフトしていると推測された。Stevens-Johnson 症候群、化学外傷、熱傷など炎症を伴う眼表面疾患では、正常あるいは非炎症性疾患に比べて Tau, Arg, Orn, Glu, Gln, Gly, Ala, Ser の濃度が著しく増加していることが判明した。眼表面炎症疾患では Arg が arginase により Orn に代謝される酸化型レドックス応答が明瞭であった(論文投稿中)。図 30 にクラスター解析の結果を例示する。23 種アミノ酸の濃度によってクラスター解析したものであり、上位に Stevens-Johnson 症候群、化学外傷などの難治性、炎症性疾患が位置した。この中には炎症疾患であるものの、臨床所見上は炎症のない時期の症例も含まれたことは興味深い。涙液中に存在する種々のアミノ酸は血漿とは異なる濃度で存在し、炎症制御、創傷治癒、感染防御、血管新生、免疫応答に深く関与している可能性が高いと考え

られた。

眼疾患とアミノ酸発現プロファイルとの関係が詳細に明らかになれば、生体にとって安全なアミノ酸を補充することは容易であることから、眼疾患の新しい具体的治療に結びつく可能性がある。例えば、難治性の眼表面疾患の多くは重症ドライアイを伴っているが、治療のために用いられる人工涙液にはアミノ酸が配合されていない。このため人工涙液の点眼が、眼表面のホメオスタシスを大きく変動させている可能性がある。アミノ酸は、腸管粘膜上皮細胞において解明されている研究から概想すると、眼表面の感染防御や創傷治癒にも関与している可能性が高く、本研究は新規な治療用点眼薬、眼科用薬の開発につながり、新しい概念の眼科治療に結びつく可能性がある。また眼科において、全身疾患での血液検査、髄液検査に該当するように、涙液を用いたアミノ酸発現プロファイルの有用性が明らかになれば、客観的な病態把握が可能となり、眼疾患の病態あるいは疾患ステージを客観的に判断できる新しい診断技術の開発につながる可能性がある。

## VII 角膜内皮障害の治療

### 1. 研究の背景

ヒトやサルなどの霊長類の角膜内皮細胞は、生体内における増殖能がきわめて乏しいことが知られており、種々の原因によって角膜内皮細胞が広範に障害されると水疱性角膜症による重篤な視力障害を来す。水疱性角膜症は、先進諸国における角膜移植の主要原因疾患であ

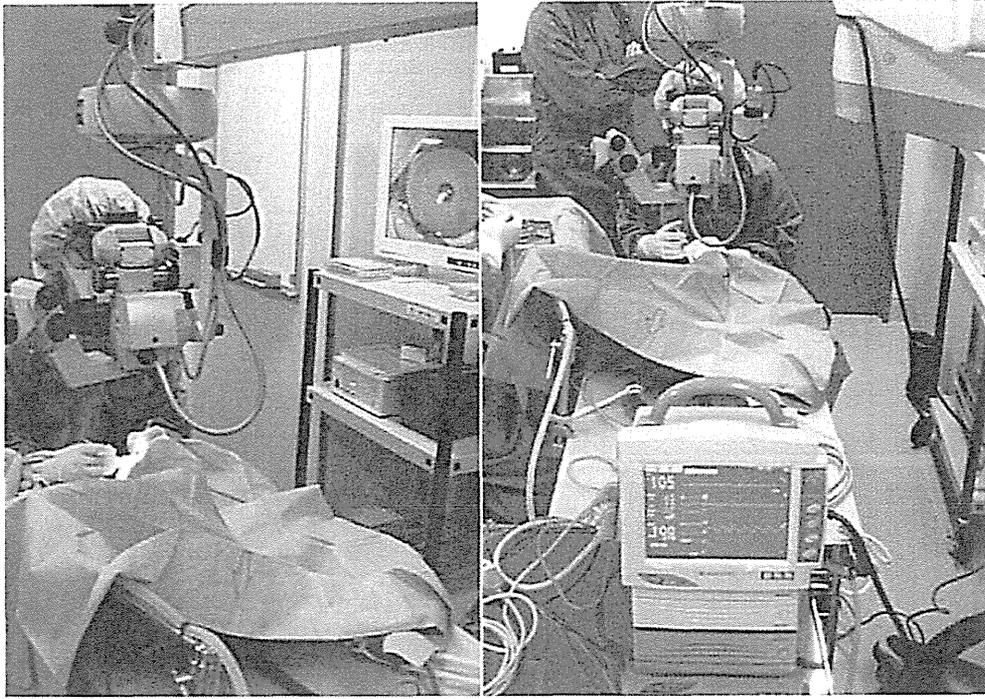


図 32 霊長類を用いた移植実験。

ヒトの角膜移植に準じる設備を用いてカニクイザルの移植実験を行っている(滋賀医科大学動物生命科学研究所にて)。

(文献 104 より許可を得て転載)

り<sup>23)100)</sup>、今後ますます増加することが予想されている。水疱性角膜症に対する治療法としては、Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK) あるいは Descemet's membrane endothelial keratoplasty (DMEK) と呼称される角膜内皮移植術が、全層角膜移植に代わる水疱性角膜症の外科的治療法として急速に広まりつつある。DSAEK や DMEK には、角膜乱視が少なく早期に視力回復が得られるメリットがある一方で、周辺部の角膜内皮細胞も障害されている水疱性角膜症においては、移植後の角膜内皮細胞密度の低下が問題となることは全層角膜移植と同様である。このような背景のもとに、我々は水疱性角膜症に対する新規治療法の開発を目指して、生体外で培養した角膜内皮細胞を用いた再生医学的治療法の開発に取り組んできた<sup>101)</sup>。特に昨今では、ヒトへの臨床応用を目指した角膜内皮研究を行うためには、生体内における角膜内皮細胞の増殖能が乏しいサルを用いた移植実験が必要であると考え、サル水疱性角膜症モデルを用いた研究を行っている<sup>102)~104)</sup>。

## 2. カニクイザル培養角膜内皮シートの作製と移植術

カニクイザルの角膜から角膜内皮細胞を採取し、コーティングを施した細胞培養用プレート上に播種して初代培養を行った。さらに 3, 4 継代培養した角膜内皮細胞を I 型コラーゲンシートに播種し、培養角膜内皮細胞シートを作製した。培養には、ウシ胎仔血清 (FBS)、bFGF (basic fibroblast growth factor) を加えた DMEM 培地を用いている。I 型コラーゲンシート上で培養した

カニクイザル角膜内皮細胞は、細胞密度約 2,800 個/ $\text{mm}^2$ の六角形細胞を主とする多角形細胞からなり、角膜内皮細胞のバリアー機能およびポンプ機能に関連する蛋白質を発現していることを確認した<sup>102)</sup>(図 31)。

全身麻酔下で、カニクイザルの角膜内皮細胞を可能な限り周辺部まで機械的搔爬により除去し、直径 6 mm の培養サル角膜内皮シートを角膜裏面に移植した(図 32)。培養角膜内皮シート移植眼では、翌日にはすべての個体で培養角膜内皮シートがホストの Descemet 膜に接着しており、角膜浮腫は軽度であった。2 週間には移植した培養角膜内皮シートが前房内に脱落したにもかかわらず、ホストの角膜は良好な透明性を回復した(図 33)。我々は DiI 標識シート移植眼の観察により、DiI 陽性のドナー角膜内皮細胞が、移植後眼の Descemet 膜上に生着していることを確認した<sup>102)</sup>。本実験の結果から、間接的にはあるが、移植したドナーの角膜内皮細胞が移植後の眼内で増殖し、ホスト眼の Descemet 膜上に移動し生着した可能性が示唆された。一方、コラーゲンシートのみを移植、あるいは培養サル角膜内皮細胞の懸濁液の前房内注入を行った対照眼では、移植翌日から著明な角膜浮腫を認め、その後も角膜は透明性を回復することなく水疱性角膜症となった。このことは、過去に報告されているとおり、生体内におけるカニクイザル角膜内皮細胞の増殖能は限られており、周辺部に残存したホストの角膜内皮細胞のみからでは角膜の透明性を回復することができず、角膜内皮再生医療研究を行ううえでの有用

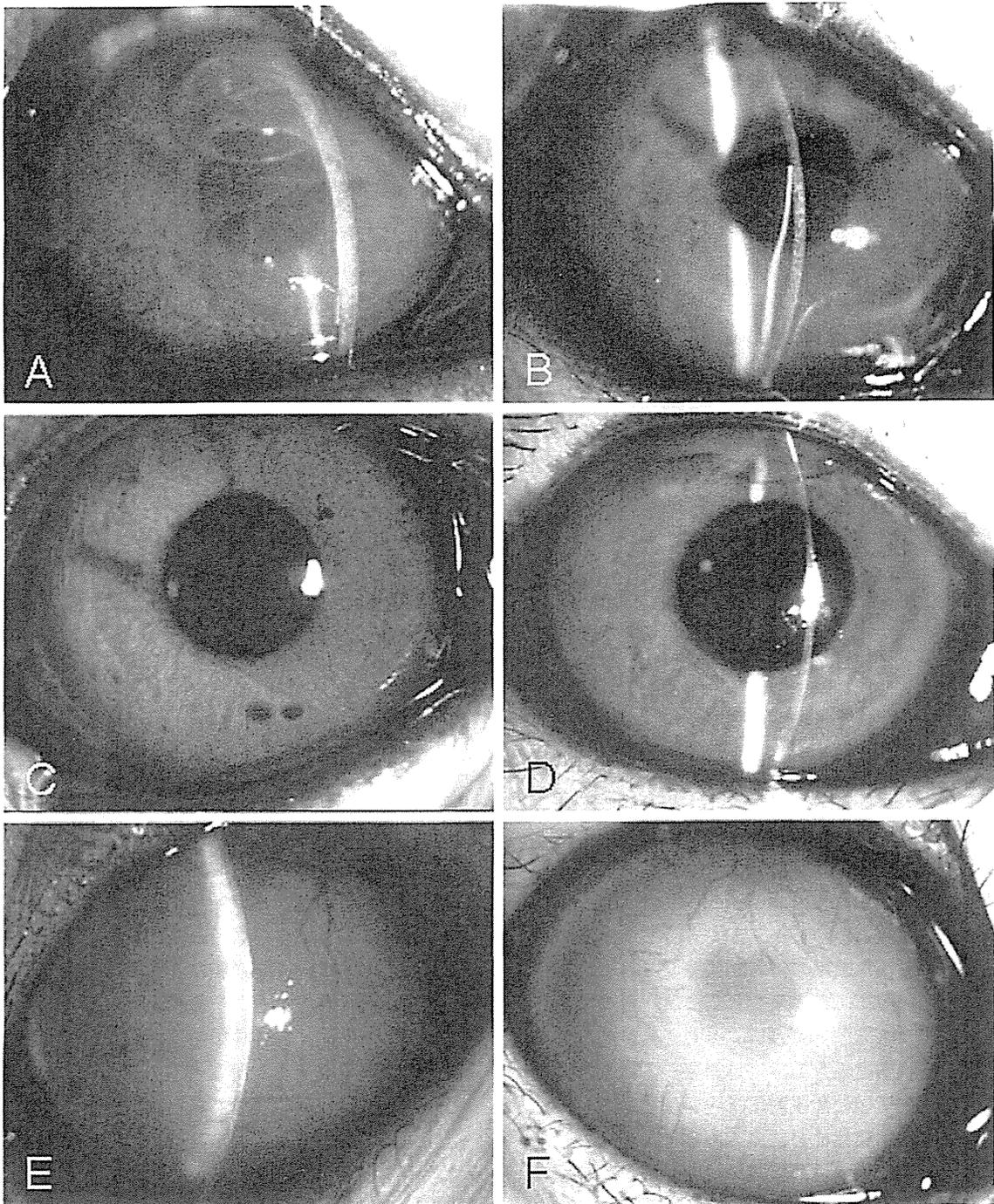


図 33 サル培養角膜内皮シート移植術.

A: 移植後の培養角膜内皮シートは角膜裏面に良好に接着し、角膜浮腫は軽度であった。B: 移植 14 日後には角膜は透明性を回復したが、培養角膜内皮シートは前房内に脱落した。C: 移植 6 か月後にも角膜は透明性を維持した(脱落したシートは摘出)。D: 培養内皮シート移植を行った別の個体でも同様の経過をたどり、6 か月まで角膜は透明性を維持した。E: コラーゲンシート移植のみを行った対照眼では、6 か月後には強い角膜浮腫と血管新生を認めた。F: 培養角膜内皮細胞の懸濁液を前房注入した対照眼でも、6 か月後には同様に強い角膜浮腫と血管新生を認めた。これらの対照眼では、いずれも手術後早期から不可逆性の角膜内皮機能不全となり、1 年以上にわたって回復することはなく、ヒトの水疱性角膜症と類似した経過となった。

(文献 102 より許可を得て転載)

な動物モデルとなることを示している。培養角膜内皮シート移植眼では、移植後 6 か月の角膜内皮スペキュラーで  $1,992 \sim 2,475$  個/mm<sup>2</sup> の正常角膜内皮細胞に類

似した多角形細胞が観察され、摘出した角膜組織の電子顕微鏡による観察でも、形態的に正常角膜に類似した多角形細胞が認められた。長期観察を行っている個体で

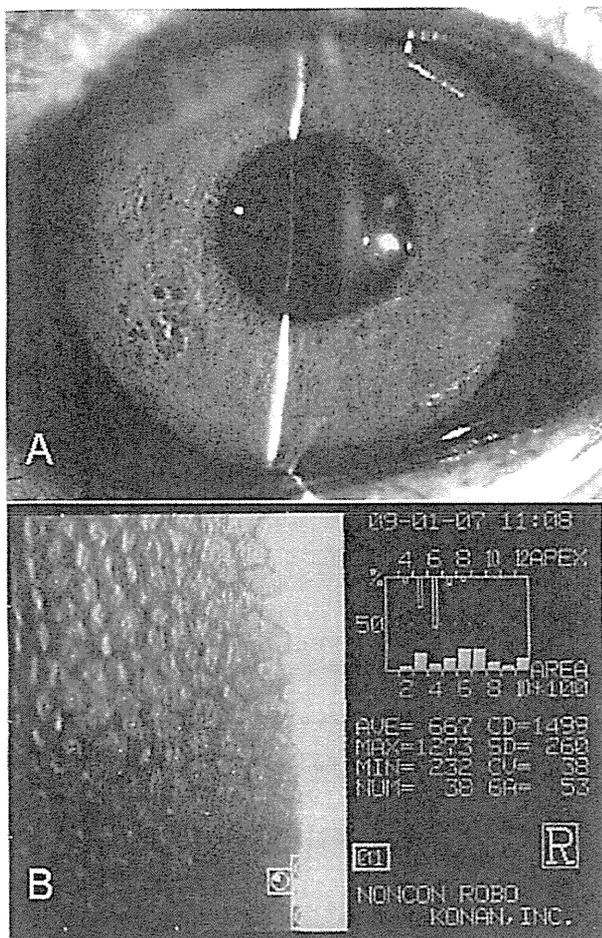


図 34 サル培養角膜内皮シート移植後 4 年の角膜所見。角膜は透明性を維持しており(A)，内皮スペキュラーでは密度約 1,500 個/mm<sup>2</sup>の角膜内皮細胞が観察された(B)。

(文献 104 より許可を得て転載)

は、移植後 4 年が経過した現在も透明角膜を維持しており、培養角膜内皮シート移植の長期の有用性を示唆している<sup>102)</sup>(図 34)。

現在我々は、マイクロケラトームを用いて作製したヒト角膜実質グラフトを基質として、DSAEK に準じる手法でサル培養角膜内皮細胞シートを移植<sup>102)</sup>する、培養 DSAEK の開発に着手しており、ウサギおよびカニクザルを用いた移植実験で角膜が透明性を回復する結果を得ている<sup>105)</sup>。培養角膜内皮シート移植では、増殖能力が高く細胞機能の良いドナー角膜内皮細胞をマスター細胞として移植用内皮シートを作製できること、高密度に培養した角膜内皮シートを移植することができること、移植後の眼内においても一定の期間、増殖能をもち続ける角膜内皮シートを移植することができること、さらに HLA を適合させることができることなどのメリットがあると考えられ、今後も臨床応用を目指した研究を進めたいと考えている。

### 3. 選択的 Rho キナーゼ阻害剤を用いた霊長類角膜内皮細胞培養法の確立

サルを用いた研究で上記のような成果が得られている一方で、我々の方法ではヒト角膜内皮培養法の確立は容易ではなかった。ヒト角膜内皮細胞を *in vitro* で培養することが可能であることは過去に報告されているが、我々の培養条件では *in vitro* で培養したヒト角膜内皮細胞を継代培養すると、容易に線維芽細胞様の形態に変化してしまっただ。そこで我々は、ヒト角膜内皮細胞を正常の形態を保持したまま、効率的に培養することを目指して、薬剤の併用や培養方法の改良を行っている。その一つは、ヒト胚性幹細胞の培養に対する有用性が報告されている選択的 Rho キナーゼ阻害剤の一種である Y-27632 である<sup>106)</sup>。Rho キナーゼは低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho の標的蛋白質として同定されたセリンスレオニンリン酸化酵素である<sup>107)108)</sup>。最近の研究では、Rho キナーゼをターゲットとした種々の薬剤の開発が行われており、心血管系疾患、神経疾患、癌、緑内障などさまざまな疾患に対して選択的 Rho キナーゼ阻害剤の有用性が報告されている。そこで、我々は Rho キナーゼ阻害剤による霊長類角膜内皮細胞への影響について検討した<sup>109)</sup>。

カニクザルの角膜内皮細胞を Descemet 膜とともに剝離し、ディスパーゼを用いて回収後、培養を行った。培地は 10% FBS と 2 ng/ml bFGF を添加した DMEM 培地を対照として用いて、選択的 Rho キナーゼ阻害剤である Y-27632 を培地に加えた。Y-27632 添加群では、対照と比べて培養開始 24 時間後の接着細胞数が有意に増加し、均一な角膜内皮細胞からなる大きなサイズのコロニーが形成され、早期にコンフルエントに到達した。細胞形態も良好で、高密度で均一な六角形細胞からなる単層細胞層が得られた(図 35)。増殖細胞のマーカーである Ki 67 を用いたフローサイトメトリーによる解析では、継代後 24 時間、48 時間ともに Y-27632 添加群における Ki 67 の陽性率が有意に高く、Y-27632 は角膜内皮細胞の細胞増殖を促進することが示された(図 36)。Annexin V を用いたフローサイトメトリーによるアポトーシスに対する影響の検討では、継代後 24 時間の解析で、対照群では 12.4±4.6(平均値±標準偏差)% の細胞が Annexin V 陽性のアポトーシス細胞であったのに対し、Y-27632 群では Annexin V 陽性細胞の割合は 2.0±1.6% と有意に減少しており、Y-27632 は角膜内皮細胞のアポトーシスを抑制することも示された(図 37)。

我々の検討において、選択的 Rho キナーゼ阻害剤である Y-27632 は、霊長類の角膜内皮細胞に対して細胞接着の促進、細胞増殖の促進、アポトーシスの抑制といった効果を有することが明らかになった。我々は、Y-27632 を培養系に用いることでヒト角膜内皮細胞を良好な形態を維持したまま効率的に培養することができるようになっており、ヒト培養角膜内皮細胞シート移植は