

角膜実質細胞によるコラーゲン分解の 調節機序について

岡本 純之助

近畿大学医学部眼科学教室

Regulatory mechanism of collagen degradation by keratocytes

Junnosuke Okamoto

Department of Ophthalmology Kinki University School of Medicine,
Osaka, Japan

ABSTRACT

Excessive degradation of stromal collagen fibrils occurs in corneal ulceration. Keratocytes (corneal fibroblasts) seem to play a primary role in collagen degradation in corneal ulceration. However, the mechanisms of collagen degradation in corneal ulceration have not been fully understood. To understand the pathobiology of corneal ulceration, I developed a new in-vitro model in which keratocytes were cultured in a collagen matrix three dimensionally. Using this model, I searched for any factors which might regulate collagen degradation by keratocytes. Collagen degradation was measured by the amount of hydroxyproline in the hydrolysate. Collagen degradation by keratocytes depended on the number of cells, the concentration of collagen and the period of incubation. Among various cytokines and growth factors such as epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), interleukin 1 (IL-1) and interleukin 6 (IL-6) only IL-1 was found to enhance collagen degradation by keratocytes in a dose dependent manner. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) antagonized the stimulatory effect of IL-1 on collagen degradation by keratocytes. IL-1 also stimulated collagenase synthesis by keratocytes. When phagocytic activity or intracellular lysosomal enzyme activities were inhibited by the addition of cytochalasin B or chloroquine, collagen degradation showed a decrease in the presence of IL-1. These findings suggested that both extracellular and intracellular collagen degradation played important roles in the stimulatory effect of IL-1 on collagen degradation by keratocytes.

Key words : collagen degradation, keratocytes, collagenase, interleukin 1 (IL-1), interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra), cytochalasin B, chloroquine

緒 言

角膜は、5—6層の上皮細胞からなる上皮層、角膜全体の90%を占める角膜実質層および一層の細胞からなる内皮細胞層から構成されている。角膜に障害が生じた時、角膜上皮のみの欠損の場合は、速やかに創傷治癒が行われるが、種々の原因によって角膜実質にまで障害が及ぶと、時として実質コラーゲンの融解が生じ、臨床的には角膜潰瘍の状態となる。角膜潰瘍は、現在でも難治性で予後不良の疾患の1つである。実質の唯一の細胞成分である角膜実質細胞はI型コラーゲン線維間に存在し、角膜実質細胞は実質の主成分であるコラーゲンの合成と分解に重要な役割を演じている。コラーゲンの分解が合成に比し亢進している状態が角膜潰瘍の病態である。

細胞によるコラーゲン分解には、細胞から産生される collagenase をはじめとする1群の蛋白分解酵素 (Matrix metalloproteinases, MMPs) による細胞外での分解の経路と、細胞によりコラーゲン線維が貪食され細胞内消化により分解される経路の2つが示唆されている¹。角膜実質細胞は細胞外でのコラーゲン分解に関与する MMPs を産生し²⁻⁶、潰瘍を生じた角膜では実質細胞の周囲に collagenase が局在していることが観察されている⁵。さらに培養角膜実質細胞が collagenase (MMP-1) 以外にも stromelysin (MMP-3) や72 kD の gelatinase (MMP-2) などを産生することが報告されている⁶。しかし、これらの分解酵素はいずれも不活性型で細胞から分泌され、タンパク分解酵素 (プラスミノゲン等) の働きによりペプチド鎖が修飾されて活性化されるというメカニズムが必要である。しかし、生体においては collagenase 阻害物質である tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) などの分泌も同時に生じており、角膜潰瘍の病態には未だ不明な点が多い。一方、細胞内でのコラーゲン分解の経路についてはコラーゲン線維が細胞内へ取り込まれる機序 (貪食) と細胞内での lysosome

などによる細胞内での消化の機序が関与していると考えられている。皮膚線維芽細胞はコラーゲンを貪食することが報告されており⁷、著者の属する研究室でも角膜実質細胞もラテックス粒子や細菌を貪食することを明らかにした^{8,9}。さらに、実質細胞がコラーゲン線維を貪食する像も形態的に報告されている¹⁰。しかし、実質細胞によるコラーゲンの貪食と消化が実際の角膜潰瘍においてどの程度関与しているかは明らかではない。

角膜実質細胞によるコラーゲン分解に関する研究はプラスチック培養皿上に単層培養した実質細胞を用いて行われてきた。しかし、生体内では角膜実質細胞はI型コラーゲンをはじめとし、種々の細胞外マトリックスに囲まれて存在する。近年、細胞外マトリックスが種々の細胞の活性を調節する作用があることが明らかとなってきた^{11,12}。西田らは角膜実質細胞をコラーゲンゲル内に3次元的に培養する方法を確立し、コラーゲンゲル内では単層培養した時に比べて形態や増殖能において生体内により近い挙動を示すことを明らかにした¹³。

本研究の目的は、角膜実質細胞のコラーゲン内培養法を用いて新しい角膜潰瘍の *in vitro* モデルを作製し、そのモデルを用いて角膜潰瘍における実質コラーゲンの分解の機序とそれに影響する因子を明らかにしようとするものである。

方 法

1. 材料および試薬

白色家兎 (日本在来種、雌、体重2—3 kg) は北摂産業より購入した。リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.2; 以下 PBS と略す) は日水製薬、0.25% トリプシン溶液、0.02% EDTA 溶液、minimum essential medium (MEM) 培養液は阪大微生物病研究会、*Clostridium histolyticum* 由来 collagenase、サイトカラシン B、クロロキンはシグマ社、insulin-like growth factor 1 (IGF-1)、epidermal growth factor (EGF) はアース製薬、fibroblast growth fac-

tor (FGF) は宝酒造, interleukin 6 (IL-6), ウシ胎児血清 (FCS) は Boehringer Mannheim 社, 細胞培養用ブタ腱由来 I 型コラーゲン (Cell Matrix type Ia[®]) は新田ゼラチン社, ウシプラスミノーゲンは日本ケミカルリサーチ社, ³H 標識コラーゲン および液体シンチレーション液 (Econofluor[®]) は New England Nuclear Research 社, FITC 標識ラテックス粒子はポリサイエンス社, 遠心濾過チューブ (ウルトラフリー C3HK[®]) はミリポア社, ディスパーゼは合同酒精, プラスチック培養皿 (24穴培養皿) は Costar 社から購入した.

interleukin 1 (IL-1) および interleukin 1 receptor antagonist (IL-1 ra) は大塚製薬株式会社より供与された. ヒト線維肉腫細胞由来 collagenase は鐘紡株式会社より 供与された.

2. 実験方法

2.1. 角膜実質細胞の培養

家兎をペントバルビタール静脈注射にて麻酔死させ, 速やかに眼球を摘出した. 滅菌した PBS で眼球を洗浄し, 角膜片を作成した. 内皮細胞をデスメ膜とともにピンセットで機械的に除去した後, 残った角膜をディスパーゼと反応させ上皮を剥離した. その後角膜実質に細菌性 collagenase 溶液 (3 mg/ml) を添加して培養し角膜実質のコラーゲンを溶解した. 遊離した角膜実質細胞を遠心 (1,000 rpm, 5分) にて回収し, 10% FCS を含む MEM 培養液中で培養した. その後, 1週間毎に1:2の割合で継代培養した. 今回の実験では培養4代から5代の細胞を用いた.

2.2. コラーゲンゲルの調整

角膜実質細胞のコラーゲンゲル内培養は既報のごとく行った¹³. すなわち低温下に保ったコラーゲン塩酸溶液 (3 mg/ml), 10倍濃度の MEM 培養液, およびゲル緩衝液 (0.05 N NaOH, 0.26 M NaHCO₃, 200 mM HEPES) を8:1:1の割合で混和し, 速やかに中性化させた後, 細胞浮遊液を加え24穴プレートに 500 μ l ずつ分注し, 37°C incubator 内でゲル化させた. その後血清を含まない培養液を重層し,

一定時間培養を行った.

2.3. 分解コラーゲン量の測定

角膜実質細胞によるコラーゲン分解能は, 培養液中に遊離した低分子のコラーゲン分解産物中のヒドロキシプロリン (HYP) 量を指標にして定量した. 実質細胞を一定時間培養した後, 培養液を遠心し細胞成分などを除去した上清を限外濾過し分子量10万以下の低分子の分画を分取した. 同容の低分子分画と濃塩酸を混和し加水分解をおこなった (24時間, 110°C). 次に試料を乾固し, 蒸留水で再溶解した. 加水分解産物中のヒドロキシプロリンの量は Bergman らの方法に準じて測定した¹⁴.

2.4. collagenase 活性の測定

培養液中の collagenase 活性は ³H 標識コラーゲンを基質として測定した. すなわち培養上清と ³H 標識コラーゲンを混和し, 25°Cで40時間反応させた. 未分解のコラーゲンをエタノールで沈殿させ, 上清中に存在するコラーゲン分解産物中の放射活性をシンチレーションカウンターで測定した. 精製ヒト由来の collagenase を用いて作成した検量線から, 培養液中の collagenase 活性 (U/ml) を算定した. 1 U は35°Cで1分間に 1 μ g のコラーゲンを溶かす量とした.

2.5. 貪食能の測定

FITC 標識ラテックス粒子 (直径 2.37 μ m) を Knowles らの方法に準じてコラーゲンコートした¹⁵. すなわち, FITC 標識ラテックス粒子 (2 \times 10¹¹個/ml) を酸性 I 型コラーゲン溶液に加え 4°Cで1時間反応させた後 PBS で中和した. 洗浄の後 MEM 培養液で調整した.

角膜実質細胞をプラスチック培養皿に播種し, 10%の FCS を含む MEM 培養液で24時間培養した. PBS で2回洗浄したのち, 無血清の MEM 培養液に交換した. コラーゲンコートした FITC 標識ラテックス粒子を添加し16時間培養した. その後, トリプシン溶液, EDTA 溶液を用いて細胞表面に付着したラテックス粒子を除去し, 細胞を回収した⁸. 細胞に取り込まれた粒子の蛍光強度をフローサイト

メーター (FACScan; Becton-Dickinson 社) にて測定を行った。全細胞に対するラテックス粒子を貪食した細胞の割合を算定し細胞の貪食能とした。

2.6. 統計処理

測定結果は平均値±標準誤差 (mean±SEM) にて表現した。有意性の検討は Student's T 検定にて行なった。

結 果

1. コラーゲンゲル内の角膜実質細胞のコラーゲン分解

角膜実質細胞によるコラーゲン分解能の経時的な変化をプラスミノゲンの存在下で検討した (Fig. 1)。何も添加していない MEM 培養液中で実質細胞を培養すると培養液中のヒドロキシプロリン量は培養72時間までわずかな増加傾向が認められるのみであった。しかし、プラスミノゲン (100 µg/ml) を添加すると、培養6時間以降よりヒドロキシプロリン量は培養

時間に比例して増加し、48時間から72時間にかけてプラトーに達した。

次に種々の細胞数の角膜実質細胞をコラーゲンゲル内で24時間培養し、コラーゲン分解量を測定した (Fig. 2)。無添加培養液群では培養液中の分解コラーゲン量は細胞数に比例してわずかな増加を示した。一方、プラスミノゲン添加群ではコラーゲンゲル内に包埋した角膜実質細胞の細胞数 (3.0×10^5 — 3.0×10^6) に依存して有意な分解コラーゲン量の増加を認めた。これらの結果より角膜実質細胞が培養時間や細胞数に比例して細胞外のコラーゲンを分解することが明らかになった。また角膜実質細胞によるコラーゲン分解はプラスミノゲンの存在により亢進することが明らかとなった。

2. コラーゲン分解に対する調節因子

2.1. コラーゲン分解に対する成長因子とサイトカインの影響

角膜実質細胞によるコラーゲン分解を制御する因子を知る目的で、各種の成長因子およびサ

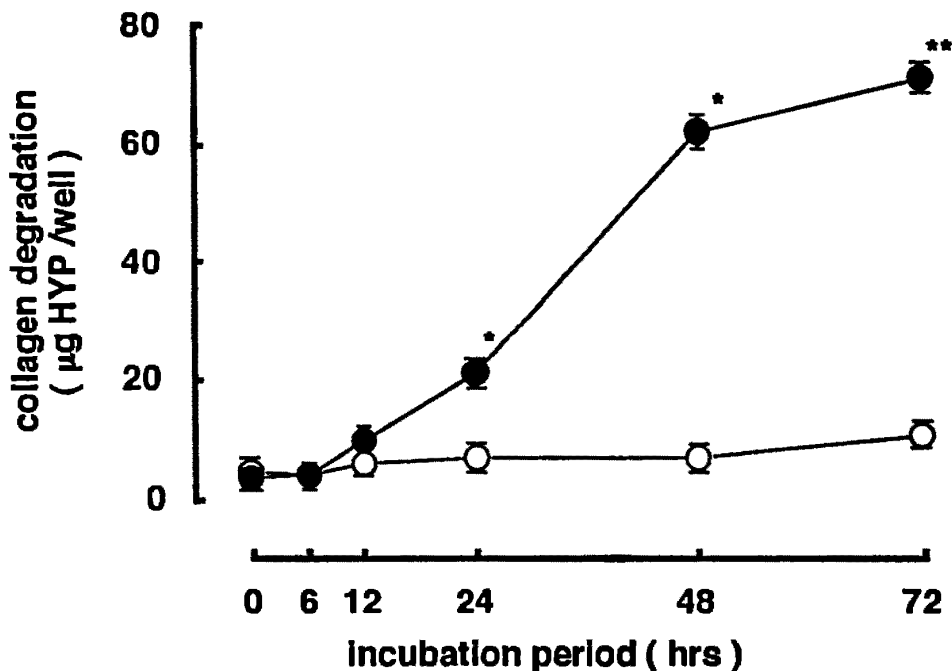


Fig. 1 Effects of incubation periods on collagen degradation by keratocytes. open circle ; without plasminogen, closed circle ; with plasminogen (100µg/ml), * ; $p < 0.005$, ** ; $p < 0.001$.

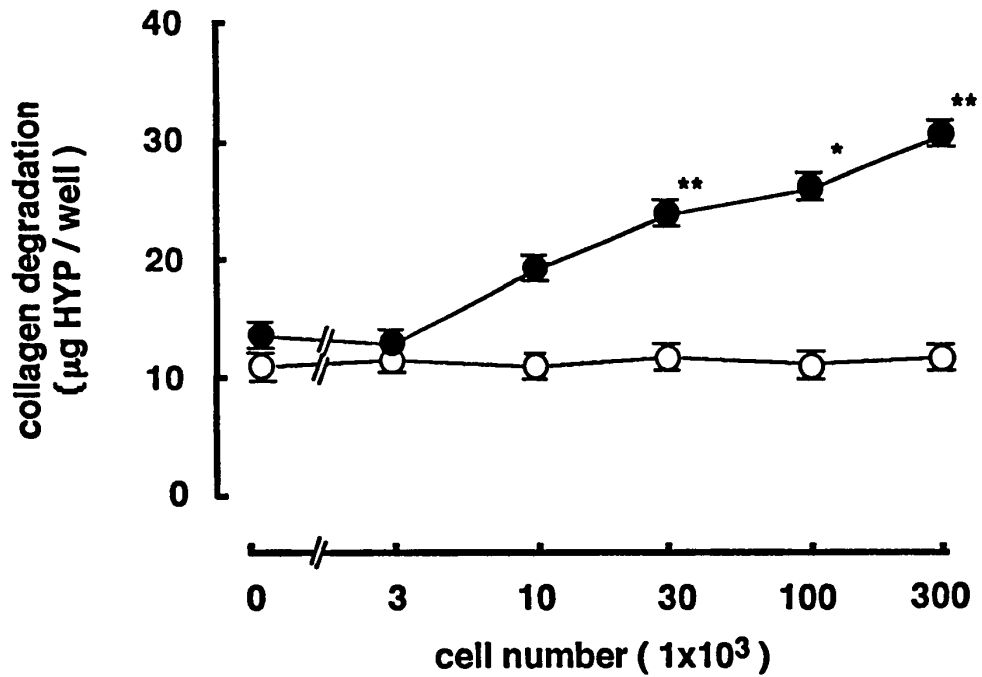


Fig. 2 Effects of the cell number on collagen degradation by keratocytes. open circle ; without plasminogen, closed circle ; with plasminogen (100µg/ml), * ; $p < 0.005$, ** ; $p < 0.001$,

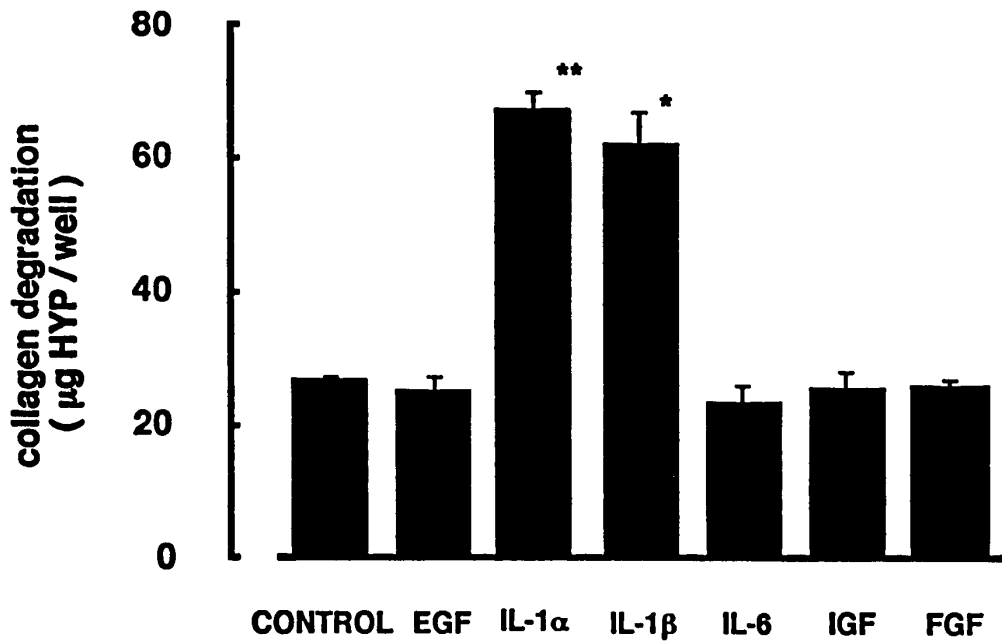


Fig. 3 Effects of cytokines and growth factors on collagen degradation. control ; MEM, EGF ; 10ng/ml, IL-1α ; 10ng/ml, IL-1β ; 10ng/ml, IGF ; 10ng/ml, FGF ; 10ng/ml, * ; $p < 0.005$, ** ; $p < 0.001$.

イトカインによる実質細胞のコラーゲン分解能に対する影響をプラスミノゲン存在下 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で検討した (Fig. 3). EGF, IGF-1 あるいは FGF を添加しても実質細胞によるコラーゲン分解は変化せず対照群と差を認めなかった. IL-1 α あるいは IL-1 β を添加すると実質細胞によるコラーゲン分解は有意に増加した. IL-1 α および IL-1 β の間には実質細胞のコラーゲン分解の促進作用に差は認められなかった.

2.2. コラーゲン分解に対する IL-1 の濃度の影響

コラーゲン分解能に対して IL-1 α の作用をさらに詳細に検討した (Fig. 4). プラスミノゲン非添加群では実質細胞の分解コラーゲン量に対し IL-1 α は何ら影響を与えなかった. プラスミノゲン存在下では, 添加した IL-1 α 濃度に依存して実質細胞によるコラーゲン分解量は増加し, 1 ng/ml の濃度以上で対照群に比し有意な増加が認められた. これらのことから IL-1 α は実質細胞によるコラーゲン分解を促

進し, その効果の発現にはプラスミノゲンの存在が必要であることが明らかとなった.

2.3. コラーゲン分解に対する IL-1ra の影響

角膜実質細胞のコラーゲン分解能に対する IL-1 α の促進作用の機序を知る目的で, IL-1 レセプターを競合阻害する IL-1ra を用いてプラスミノゲン存在下で検討した (Fig. 5). IL-1ra を単独に添加しても実質細胞によるコラーゲン分解には変化が認められなかった. 一方, IL-1 α 添加によって促進した実質細胞によるコラーゲン分解は, IL-1ra を同時に添加すると, 添加した IL-1ra の濃度に依存して減少した. IL-1ra 濃度 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で, IL-1 α によるコラーゲン分解の促進作用はほぼ完全に抑制された. これらのことから IL-1 α による実質細胞のコラーゲン分解の促進作用は細胞表面の IL-1 に対するレセプターを介して作用していることが明らかとなった.

3. IL-1 による細胞外コラーゲン分解への影響

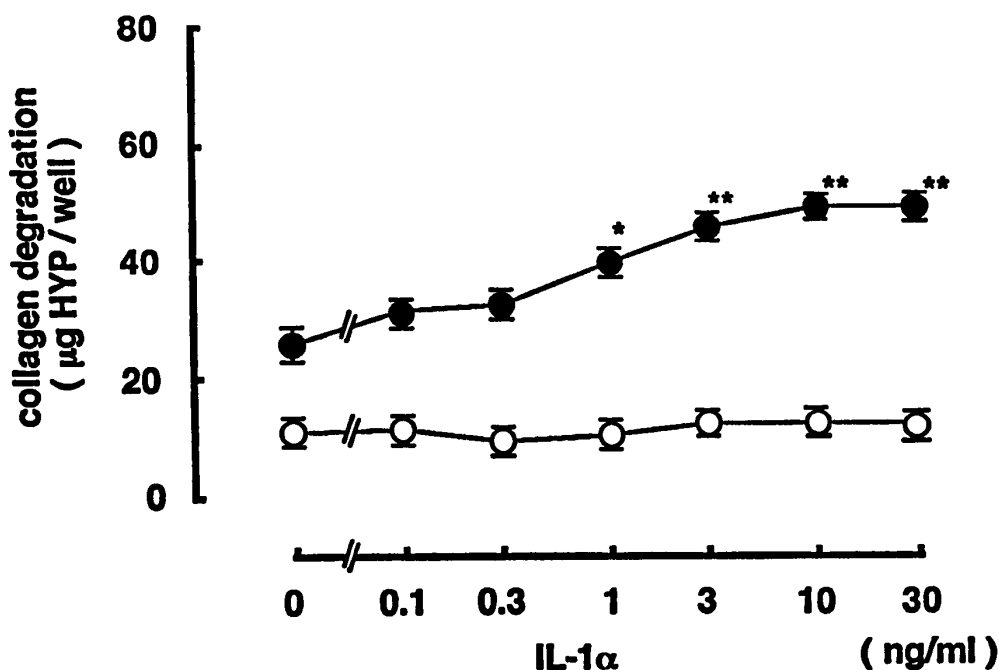


Fig. 4 Effects of IL-1 α on collagen degradation by keratocytes. open circle ; without plasminogen, closed circle ; with plasminogen (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,) * ; $p < 0.05$, ** ; $p < 0.005$.

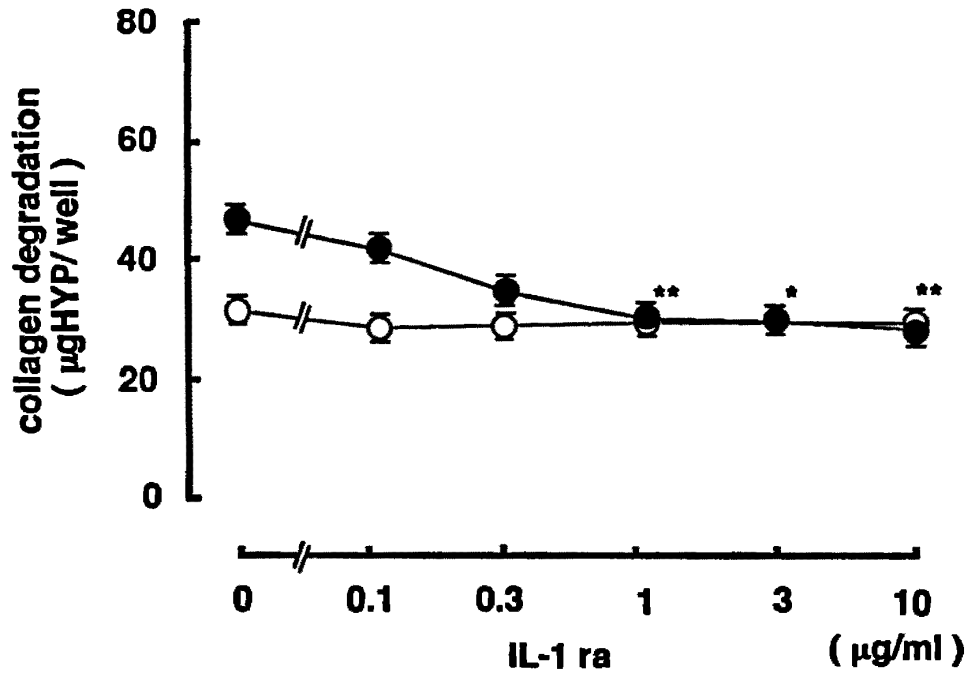


Fig. 5 Effects of IL-1ra on collagen degradation by keratocytes. open circle ; without IL-1α, closed circle ; with IL-1α (10ng/ml), * ; p<0.01, ** ; p<0.005.

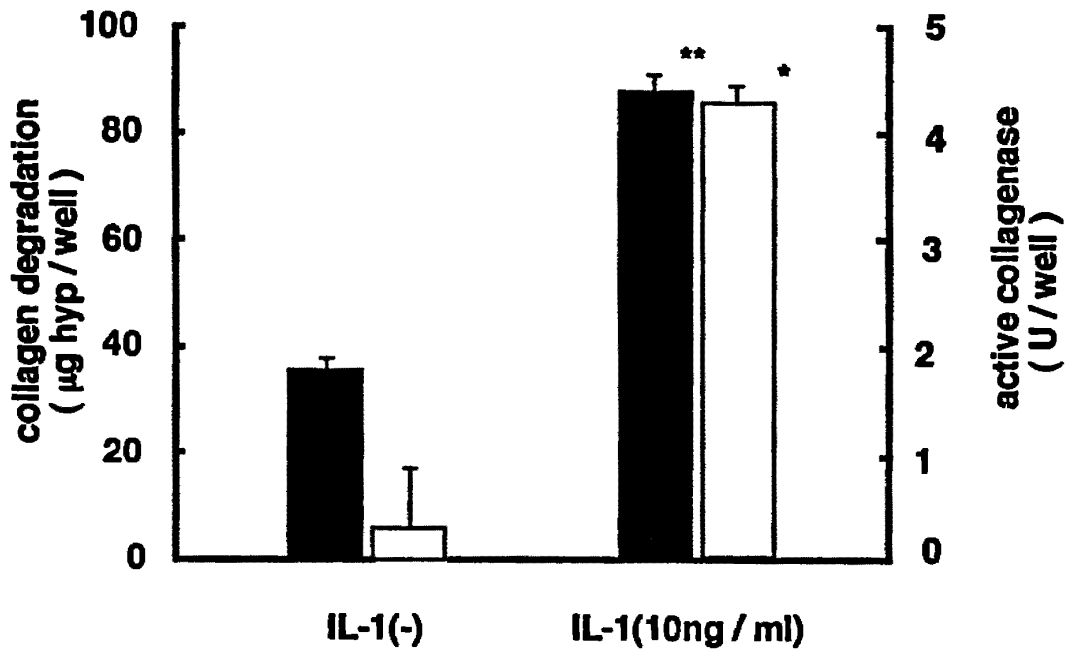


Fig. 6 Effects of IL-1 on collagen degradation and collagenase activity by keratocytes. open bars ; collagenase activity, closed bars ; collagen degradation * ; p<0.02, ** ; p<0.005.

角膜実質細胞によるコラーゲン分解と実質細胞の collagenase 産生との関係を知る目的で、培養上清中の分解コラーゲン量と collagenase 活性をプラスミノゲン存在下で測定した (Fig. 6). IL-1 α 非添加群では培養24時間後の上清中に約 30 μg HYP/well の分解コラーゲン量が認められたが, collagenase の活性はほとんど検出されなかった. しかし, IL-1 α を添加すると, 分解コラーゲン量は約 80 μg HYP/well に増加し, 培養上清中には約 4 U/well の collagenase の活性が認められた. これらのことから IL-1 α による実質細胞のコラーゲン分解促進作用には IL-1 α が実質細胞の collagenase 産生を促進する機序が関与していることが明らかとなった.

4. IL-1 による細胞内コラーゲン分解への影響

4.1. コラーゲン分解に対するサイトカラシン B の影響

実質細胞によるコラーゲン分解における実質細胞の貪食作用の関与について知る目的で、細

胞内のアクチンの重合を阻害し貪食作用を抑制するサイトカラシン B を培養上清に添加してコラーゲン分解に対する影響を検討した (Fig. 7). サイトカラシン B の単独添加ではコラーゲン分解に変化は認められなかった. 一方, IL-1 α の添加によって促進された実質細胞のコラーゲン分解は添加したサイトカラシン B の濃度に依存して減少した.

4.2. コラーゲン分解に対するクロロキンの影響

次に細胞の貪食には影響せず細胞内のライソゾーム酵素活性を阻害するクロロキンを培養上清に添加し, コラーゲン分解に対する影響を検討した (Fig. 8). クロロキンの単独添加では, 濃度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までは実質細胞によるコラーゲン分解にはなんら変化は認められず, 検討した最高濃度 (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) でコラーゲン分解が減少した. 一方, IL-1 α によって促進された実質細胞によるコラーゲン分解はクロロキンの添加によって濃度依存的に阻害され, クロロキン濃度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では対照群との間に差を認

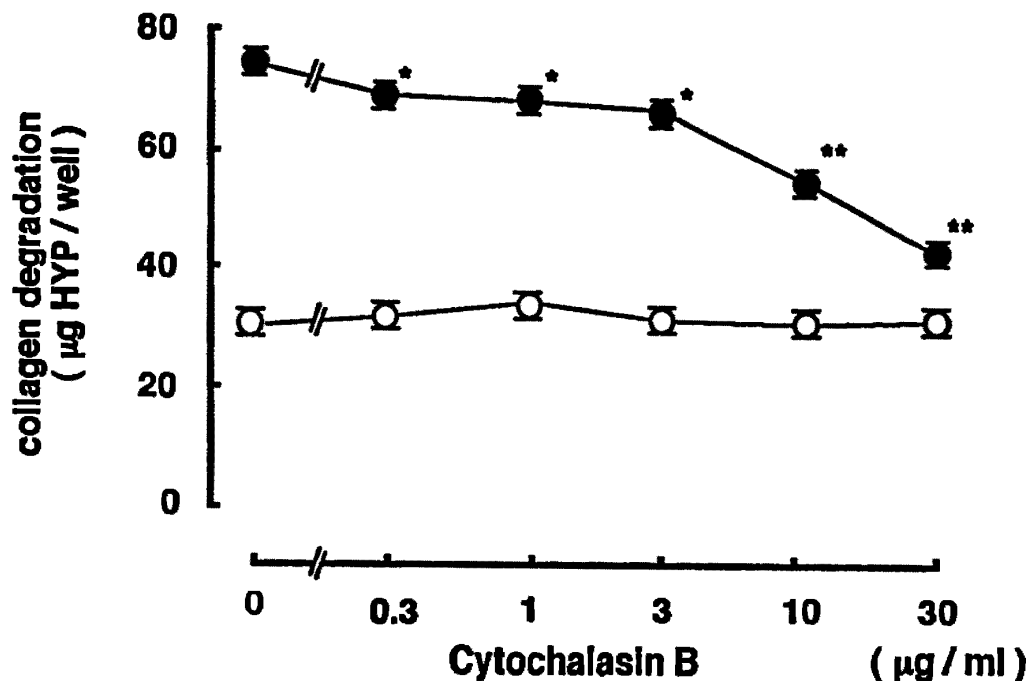


Fig. 7 Effects of cytochalasin B on collagen degradation by keratocytes. open circle ; without IL-1 α (10ng/ml), closed circle ; with IL-1 α (10ng/ml), * ; $p < 0.05$, ** ; $p < 0.005$.

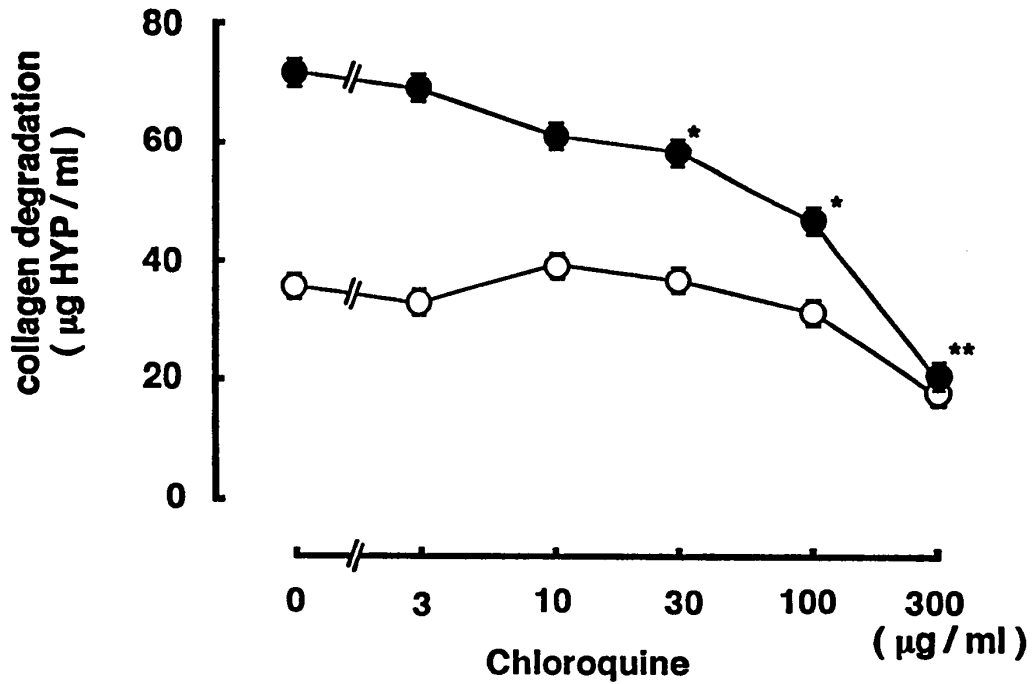


Fig. 8 Effects of chloroquine on collagen degradation by keratocytes. open circle ; without IL-1 α , closed circle ; with IL-1 α (10ng/ml), * ; p<0.05, ** ; p<0.001.

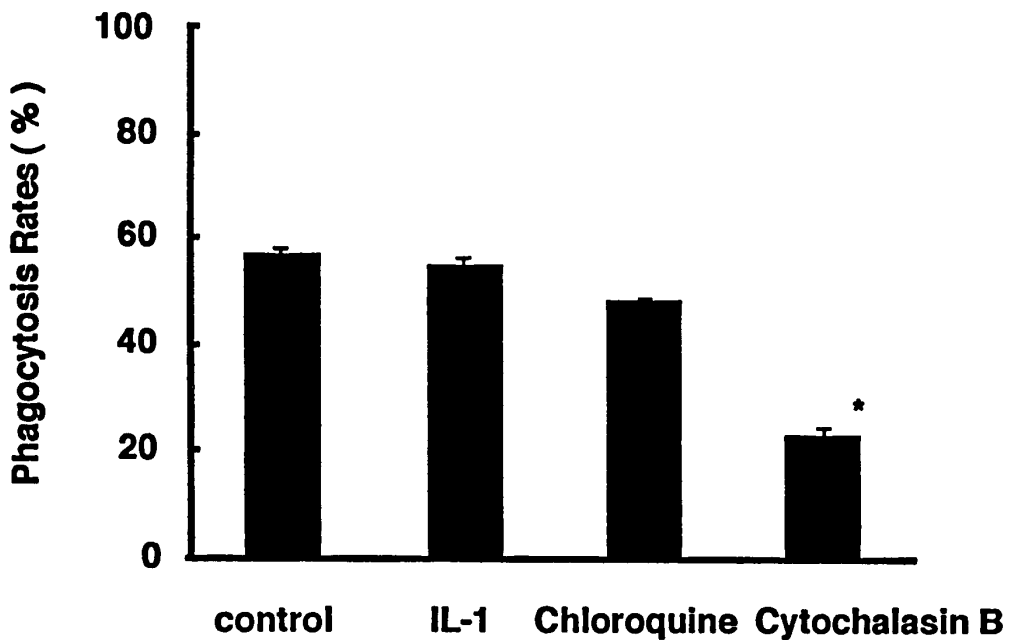


Fig. 9 Effects of IL-1, chloroquine or cytochalasin B on phagocytosis by keratocytes. IL-1 α ; 10ng/ml, chloroquine ; 10µg/ml, cytochalasin B ; 30µg/ml, * ; p<0.05.

めずほとんど完全に阻害された。

4.3. 種々の薬物のラテックス粒子貪食に対する影響

IL-1 α , サイトカラシンB, クロロキンの角膜実質細胞の貪食能に対する影響を検討した。プラスチック培養皿上で培養した角膜実質細胞にコラーゲンでコートしたラテックス粒子を添加して16時間後にラテックス粒子を貪食した細胞の割合を計測した。Fig. 9で示すように、無添加培養液中では実質細胞の約60%で貪食が認められた。IL-1 α またはクロロキン存在下での実質細胞の貪食は対照群との間に差を認めなかった。一方、ラテックス粒子を貪食した角膜実質細胞の割合はサイトカラシンBの添加によって有意に減少した。これらのことから、角膜実質細胞が貪食能を有し、この貪食能をサイトカラシンBが阻害的に作用することが明らかとなった。

考 察

角膜潰瘍においては角膜実質細胞により積極的に実質のコラーゲンが分解される一方、浸潤してきた炎症性細胞由来の collagenase によってもコラーゲンが分解されると考えられてきた²⁻⁶。しかし、角膜潰瘍における実質細胞の役割の詳細やとくにその調節機構については未だ明らかではない。角膜潰瘍の病態の研究に適当な実験モデルが無いことが一つの理由であると考えられる。角膜潰瘍の *in vivo* 実験モデルとして今まで alkali burn 角膜を用いた実験が多く報告されているが^{16,17}、定量的な再現性が乏しく、また alkali burn は角膜全体に対する侵襲が強いため炎症性細胞が強く浸潤し、実質細胞の役割や細胞活性の変化を調べるのが困難であった。また *in vitro* において角膜実質細胞をプラスチック培養皿上で単層培養し、種々の細胞機能が検討されてきた。近年コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外マトリックスに関する研究が進歩し、細胞外マトリックスが細胞の増殖能などの種々の細胞活性に影響を与えることが明らかとなってきた^{11,12}。著者の属

している研究室では角膜実質細胞をコラーゲンゲル内に3次元的に培養する方法を確立し、コラーゲンゲル内で培養すると実質細胞は増殖能が抑制され¹³、また細胞間に生体内で認められる様な gap junction を形成することも明らかになった⁹。このように、角膜実質細胞をコラーゲンゲル内に培養すると生体に近い挙動を示すことが示唆された。これらのことから、今回作成したコラーゲンゲル内に培養した角膜実質細胞が実際に分解したコラーゲン量を測定する実験モデルは、生体内の実質細胞によるコラーゲン分解により近似した実験モデルであると考えられる。

今回報告したように、角膜実質細胞がコラーゲンを分解する活性を有することおよび IL-1 α が角膜実質細胞によるコラーゲン分解を促進することが明らかとなった。また IL-1 α による角膜実質細胞のコラーゲン分解に対する促進作用発現のためにはプラスミノゲンの存在が必要であることが示された。細胞の貪食あるいは貪食後の細胞内消化を阻害するサイトカラシンBあるいはクロロキンの添加によって角膜実質細胞のコラーゲン分解および IL-1 による促進作用が抑制されたことから、角膜実質細胞では細胞内コラーゲン分解が重要な役割を演じることが考えられた。

IL-1 は炎症性サイトカインの1つで、アミノ酸配列の違いから α と β の二種類あることが知られている¹⁸。IL-1 の生物活性は多彩で、炎症や創傷治癒において細胞活性を制御する。線維芽細胞や滑膜細胞による collagenase 産生を IL-1 が促進することが報告されている^{19,20}。また IL-1 は線維芽細胞に対してコラーゲンの合成やプロスタグランディンの産生も促進することが報告されている^{21,22}。眼組織の炎症にも IL-1 が関与していることが報告されている。眼球内に IL-1 を注射することによって眼内炎の症状を呈する²³。また、角膜に IL-1 を注入すると血管新生が生じる²⁴。さらに、培養した角膜上皮細胞は IL-1 を産生する²⁵。これらのことから、角膜の炎症や創傷治癒において IL-

1 が何らかの重要なトリガーであることが考えられ、今回の成績と合わせると角膜潰瘍においては IL-1 が実質細胞のコラーゲン分解を促進していると考えられる。

IL-1ra は IL-1 とアミノ酸配列で約20%の相同性を持つ IL-1 フェミリーの一つである²⁶。IL-1ra は細胞表面の IL-1 レセプターに結合するが、IL-1 のような細胞に対する生物活性を示さず、IL-1 の作用を阻害することが知られている²⁶。IL-1 と同時に IL-1ra を添加すると IL-1 による角膜実質細胞のコラーゲン分解促進効果が阻害された。したがって、角膜上皮細胞によって産生された IL-1 による角膜実質細胞のコラーゲン分解促進作用は IL-1 レセプターを介して作用していることが明らかとなった。また、生体内ではサイトカインや成長因子は相互に影響しあっているいわゆるサイトカインネットワークを形成している²⁷。IL-1 は線維芽細胞の IL-6 産生を刺激することが知られているが²⁸、IL-6 を培養上清中に添加してもコラーゲンによるコラーゲンの分解が上昇しなかったことから、IL-1 による角膜実質細胞の角膜実質細胞分解促進作用には IL-6 は直接には関与していないと考えられる。

本研究ではコラーゲングル内に培養した角膜実質細胞が collagenase を産生し、また IL-1 が角膜実質細胞の collagenase 産生を促進することが明らかとなった。角膜実質細胞によるコラーゲン分解の機序については、collagenase をはじめとする蛋白分解酵素の研究がなされてきた。Gordon らは角膜潰瘍において実質細胞の周囲に collagenase が局在することを免疫組織学的に観察した⁵。また、Berman らは角膜潰瘍より採取した角膜実質細胞が collagenase を産生することを報告している³。Sakai らは切開した角膜で実質細胞に collagenase の mRNA が上昇していることを報告している¹⁰。また、Fini らは collagenase と同様に matrix metalloproteinase に属する 72 kD の gelatinase を角膜実質細胞が産生し、また IL-1 が gelatinase 産生に促進的に作用することを報告してお

り⁶、今回の実験結果はこれらの報告とよく一致する。

本研究において、プラスミノゲンの存在下における角膜実質細胞によるコラーゲン分解促進作用が認められた。また、プラスミノゲンの存在下で活性型の collagenase が測定され、IL-1 の添加によって培養液中の collagenase 活性の亢進が認められた。従来の研究では角膜実質細胞によって分泌される collagenase は不活性型であり、分泌された collagenase が実際にコラーゲンを分解するためには活性化される必要がある。in vivo では、plasmin, kallikrein, cathepsin B が collagenase の活性化に寄与している可能性が示唆されているが、その機構は明らかにされていない。また、in vitro において collagenase は trypsin, plasmin などの serine protease や stromelysin などの metalloproteinase によって活性化されることが知られている。正常でも涙液中にはわずかな plasmin が存在し、炎症眼では涙液中の plasmin 活性が上昇しており²⁹、角膜実質細胞や角膜上皮細胞が urokinase 型 plasminogen activator (u-PA) を産生する³⁰。また、Berman らは角膜潰瘍において collagenase 活性化のメカニズムとして Plasminogen activator/Plasmin 系の関与を提唱しているが³¹、今回の成績から実際に角膜実質細胞のコラーゲン分解において Plasminogen activator/Plasmin 系が collagenase の活性化に寄与していることが明らかになった。

collagenase を介した細胞外での分解の機構以外に、細胞がコラーゲンを貪食し細胞内で分解する機構が考えられている。実際、Everts らは線維芽細胞がコラーゲン線維を貪食することを電子顕微鏡下に観察している⁸。また Sakai らは角膜創傷治癒過程での実質細胞によるコラーゲン線維の貪食を報告している¹¹。さらに角膜実質細胞は他の線維芽細胞に比べて貪食能が高いことが知られている³⁵。そこで細胞外のコラーゲン分解経路以外に細胞内でのコラーゲン分解の可能性について検討した。サイトカラシ

ンBはアクチンの重合を阻害することによって細胞の動きや貪食を抑制する物質である³²。サイトカラシンBの添加によってIL-1で促進される等の実質細胞によるコラーゲンの分解が抑制されることが明らかとなった。また、クロロキンはゴルジ体からライソゾームに輸送する酵素をマンノース6リン酸のレセプターの回収を阻害することにより、細胞内に貪食された物質の細胞内での分解を抑制することが知られているが^{33,34}、クロロキンによっても実質細胞によるコラーゲン分解が阻害された。これらの実験結果は、今回用いた実験モデルでの角膜実質細胞によるコラーゲン分解の機序に実質細胞による貪食および細胞内消化の機構が関与していることを強く示唆している。しかし、角膜実質細胞の貪食によるコラーゲンの細胞内分解経路と従来から考えられているcollagenaseによる細胞外分解系が互いにどの程度の役割を角膜潰瘍の病態で演じているのかについては今後さらに研究する必要がある。今回、IL-1によって促進が期待される角膜実質細胞のコラーゲン分解能がサイトカラシンBやクロロキンによって阻害されたことは、角膜実質細胞の貪食作用が細胞によるコラーゲン分解を調整する因子である可能性を示していると考えられる。

本研究の結果、角膜実質細胞をコラーゲンゲル内に培養することが角膜潰瘍の*in vitro*の実験モデルとして有用であることが明らかとなった。さらに、IL-1が角膜実質細胞によるコラーゲン分解を促進し、角膜潰瘍で重要な役割を演じていることが示唆された。またIL-1による角膜実質細胞のコラーゲン分解促進作用には、実質細胞が産生するcollagenaseを介した細胞外での分解経路と細胞の貪食作用による細胞内での分解経路の2つのコラーゲン分解経路が関与していることが示唆された。

角膜潰瘍の治療には現在主としてプロテアーゼ阻害薬が試みられているが、角膜潰瘍のトリガーとしてIL-1が重要な役割を演じている可能性があり、今後IL-1raや貪食あるいは細胞内消化を抑制するサイトカラシンBやクロロキ

ンのような物質が角膜潰瘍の新しい治療薬になる可能性が示唆された。今後これらの薬剤を用いた新しい治療法の臨床的効果を検討する必要がある。

謝 辞

稿を終えるにあたり、懇切なる御指導ならびに御校閲を賜りました恩師大鳥利文教授に深甚なる謝意を表します。また終始御助言、御指導を賜りました西田輝夫講師ならびに三島弘講師に感謝の意を表します。本論文の一部はThe 32th Association for Research in Vision and Ophthalmology年次総会(Sarasota, Florida, 1991年5月)、The 33th Association for Research in Vision and Ophthalmology年次総会(Sarasota, Florida, 1992年5月)、The 34th Association for Research in Vision and Ophthalmology年次総会(Sarasota, Florida, 1993年5月)、第95回日本眼科学会総会(京都, 1991年, 5月)、第45回細胞生物学会(徳島, 1992年, 10月)において発表した。

文 献

1. Murphy G, Reynard JJ. Current views of collagen degradation process towards understanding the resorption of connective tissues. *BioEssays* 1984; 2: 55-60.
2. Berman MB, Dohlman CH, Gnadinger MC, Davion P. Characterization of collagenolytic activity in the ulcerating cornea. *Exp Eye Res* 1971; 11: 255-257.
3. Slansky HH, Gnadinger MC, Itoi M, Dohlman CH. Collagenase in corneal ulceration. *Arch Ophthalmol* 1969; 82: 108-112.
4. Brown SI. Collagenase and corneal ulcer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1971; 10: 203-209.
5. Gordon JM, Brauer EA, Eisen AZ. Collagenase in human cornea; immunologic localization. *Arch Ophthalmol* 1980; 98: 341-345.
6. Fini ME, Girard MT. Expression of collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinases by normal cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31: 1789-1798.
7. Everts V, Beertsen W. The role of microtubules in the phagocytosis of collagen by fibroblast. *Coll Relat Res* 1987; 7: 1-15.
8. Mishima H, Yasumoto K, Nishida T, Otori T. Fibronectin enhances the phagocytic activity of cultured rabbit keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 28: 1521-1526.

9. Ueda A, Nishida T, Otori T, Fujita H. Electron microscopic studies on the presence of gap junction between corneal fibroblasts in rabbits. *Cell Tissue Res* 1987 ; 249 : 473-475.
10. Sakai J, Hung J, Zhu G, Katakami C, Boyce S, Kao WWY. Collagen metabolism during healing of lacerated rabbit cornea. *Exp Eye Res* 1991 ; 52 : 237-244.
11. Hay ED. Cell-matrix interaction in the embryo: Cell shape, cell surface, cell skeletons, and their role in differentiation. In: Trelstrad RL, Ed. *The Role of Extracellular Matrix in Development*: New York: Alan R Liss, 1984 ; 1-31.
12. Unemori EN, Web Z. Reorganization of polymerized actin: a possible trigger for induction of procollagenase in fibroblasts cultured in and on collagen gels. *J Cell Biol* 1986 ; 103 : 1021-1031.
13. Nishida T, Ueda A, Fukuda M, Yasumoto K, Otori T. Interaction of extracellular collagen and corneal fibroblasts: morphologic and biochemical changes of rabbit corneal cells cultured in a collagen matrix. *In Vitro Cell Dev* 1988 ; 24 : 1009-1014.
14. Bergman I, Loxley R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal Chem* 1963 ; 35 : 1961-1965.
15. Knowles GC, Mcknown M, Sodek J, Macclloch CAG. Mechanism of collagen phagocytosis by human gingival fibroblasts: importance of collagen structure in cell recognition and internalization. *J Cell Sci* 1991 ; 98 : 551-558.
16. Matsuda H, Smelser GK. Epithelium and stroma in alkali burned cornea. *Arch Ophthalmol* 1973 ; 89 : 396-401.
17. Pfister RR, Burenstein N. The alkali burned cornea: I. Epithelial and stromal repair. *Exp Eye Res* 1976 ; 23 : 519-535.
18. March CL, Mosley B, Larsen A, et al. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 1985 ; 315 : 641-647.
19. Postlethwaite AE, Lachman LB, Mainardi CL, Kang AH. Interleukin 1 stimulation of collagenase production by cultured fibroblast. *J Exp Med* 1983 ; 157 : 801-806.
20. Dayer JM, Russel RGG, Krane SM. Collagenase production by rheumatoid synovial cells: stimulation by a human lymphocyte factor. *Science* 1977 ; 195 : 181-183.
21. Postlethwaite AE, Raghov R, Stickin GP, Poppleton H, Seyer JM, Kang AH. Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other function but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 α and β . *J Cell Biol* 1988 ; 106 : 311-318.
22. Mizel SB, Dayer JM, Krane SM, Mergenhagen SE. Stimulation of rheumatoid cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocytes-activating factor (interleukin 1). *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 ; 78 : 2474-2477.
23. Bhattacharjee P, Henderson B. Inflammatory responses to intraocular injected interleukin 1. *Curr Eye Res* 1987 ; 6 : 929-934.
24. 松原 司. 慢性関節リウマチ (RA) 滑膜炎における血管新生系. 折茂肇編. 血管壁細胞の機能とその制御機構. 東京: 共立出版, 1990 ; 141-159.
25. 坂本真栄, 稲田捷也, 千葉可芽里, 吉田昌男, 田澤 豊. 人眼角膜上皮細胞によるインターロイキン 6 およびインターロイキン 1 α の産生. *日眼会誌* 1990 ; 95 : 728-732.
26. Dinarello CA, Thompson RC. Blocking IL-1: interleukin-1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunol Today* 1991 ; 12 : 404-410.
27. Kahase M, May LT, Tamm I, Vilcek J, Sehgal PB. A cytokine network in human diploid fibroblasts; interactions of β -interferons, tumor necrosis factor, platelet-derived growth factor and interleukin 1. *Mol Cell Biol* 1987 ; 7 : 273-280.
28. Walther Z, May LT, Sehgal PB. Transcriptional regulation of the interleukin β 2/B cell differentiation factor BSF-2/hepatocyte-stimulation factor gene in human fibroblasts by other cytokines. *J Immunol* 1988 ; 140 : 974-977.
29. Tervo T, Salonen EM, Vahen A, Immonen I, van Setten GB, Himberg JJ, Tarkkanen A. Elevation of tear fluid plasmin in corneal disease. *Acta Ophthalmol* 1988 ; 66 : 393-399.
30. Morimoto K, Mishima H, Nishida T, Otori T. Role of urokinase type plasminogen activator (u-pa) in corneal epithelial migration. *Thromb Haemot* 1993 ; 69 : 387-391.

31. Berman M, Lealy R, Gage J. Evidence for a role of the plasminogen activator-plasmin system in corneal ulceration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980 ; 19 : 1204-1221.
32. Wagner R, Rosenberg M, Estensen R. Endocytosis in liver cells Quantitation by sucrose-³H uptake and inhibition by cytochalasin B. *J Cell Biol* 1971 ; 50 : 804-817.
33. Duncan J, Kornfeld S. Intracellular movement of two mannose 6 phosphate receptor : return to the Golgi apparatus. *J Cell Sci* 1988 ; 106 : 617-628.
34. Brown WJ, Goodhouse J, Farquhar MG. Mannose-6-phosphate receptor for lysosomal enzymes cycle between the Golgi complex and endosomes. *J Cell Biol* 1986 ; 103 : 1235-1247.
35. Lande MA, Birk DE, Nagpal ML, Rader RL. Phagocytic properties of human keratocytes cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981 ; 20 : 481-489.