

学位論文（博士）

Benzalkonium chloride–induced myofibroblastic
transdifferentiation of Tenon’s capsule fibroblasts is
inhibited by coculture with corneal epithelial cells or by
interleukin-10

（角膜上皮細胞やインターロイキン-10 が塩化ベンザルコニウムによるテノン囊筋線維芽細胞の筋線維芽細胞転化に及ぼす抑制的効果の研究）

氏名 山城 知恵美

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 眼科学講座

令和4年1月

目 次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	4
3. 目的	5
4. 方法	5
(1) 方法	5
(2) 解析	7
5. 結果	8
6. 考察	16
7. 結語	17
8. 謝辞	18
9. 参考文献	19

《要旨》

塩化ベンザルコニウム (BAC) は点眼防腐剤として広く用いられている。しかしながら、BAC を含む点眼薬の長期使用は結膜下組織の線維化を誘発し、緑内障濾過手術後の濾過胞維持を困難にさせる。また、濾過胞を構成するテノン囊線維芽細胞と角膜上皮細胞は涙液を介して互いに影響しているが、BAC 曝露時のこの細胞間の反応については明らかにされていない。本研究で我々は、共培養システムを用いて、BAC により誘導されたヒトテノン線維芽細胞 (HTF) の筋線維芽細胞転化に対するヒト角膜上皮 (HCE) 細胞の影響について、免疫蛍光染色ならびにウェスタンブロットで評価した。HTF の α -smooth muscle actin (α SMA) 発現は、BAC 添加により亢進し、HCE 細胞との共培養により抑制された。HTF の培養上清中の IL-10 濃度は、BAC により減少し、HCE 細胞との共培養により増加した。また、BAC による HTF の α SMA 発現亢進および myocardin-related transcription factor-A (MRTF-A) の核内移行は、IL-10 添加によって抑制された。これらのことから、角膜上皮細胞は涙液中の IL-10 濃度を維持し、HTF の MRTF-A の核移行の抑制を介して、BAC による濾過胞線維化を軽減させる可能性が示唆された。

【研究の背景】

緑内障は徐々に視野狭窄が進行し、最終的には失明に至る疾患である¹。本邦においては、緑内障は失明原因の第一位であり²、40歳以上での有病率は5.0%である³。また、世界的にも失明原因の上位であり、2010年における罹患者数は全世界で6050万人という報告がある。緑内障進行の重要な危険因子の一つは高眼圧であり、眼圧を下降させることが視覚障害の進行抑制に有用であるため、点眼や手術により眼圧を下降させることが、一般的な緑内障の治療法である¹。多くの緑内障点眼薬には防腐剤が含まれており⁴、塩化ベンザルコニウム（BAC）は最も広く用いられている防腐剤であるが^{4,5}、眼不快感の誘発、涙膜の不安定化、結膜の炎症、角膜および結膜上皮の損傷など、眼表面に有害な影響を及ぼすことがある⁵⁻⁸。緑内障に対する手術治療のうち、濾過手術は眼圧の持続的な低下をもたらすことを目的として、結膜下組織で濾過胞を形成する手術である。しかしながら、手術前のBAC含有点眼薬の長期使用により、術後の結膜下組織癒着による濾過胞機能不全をきたしやすくなること課題となっている^{9,10}。

線維芽細胞は、上皮細胞や内皮細胞と同様に、筋線維芽細胞に転化し組織線維化をもたらす^{11,12}。筋線維芽細胞は、傷害、感染、炎症、ストレスなどの様々な刺激に反応して、 α -smooth muscle actin（ α SMA）の過剰発現、アクチンストレスファイバーの形成、細胞外マトリックスタンパク質（extracellular matrix；ECM）の過剰産生をひきおこす。筋線維芽細胞の分化と活性化に重要な役割を果たしているMyocardin-related transcription factor-A（MRTF-A）シグナルについて^{13,14}、我々は以前、MRTFシグナルが網膜色素上皮細胞の上皮間葉転換（epithelial mesenchymal transition；EMT）に関与していることを明らかにした¹⁵。MRTF-Aはプロモーター領域に結合することで、 α SMA、フィブロネクチン、結合組織増殖因子などの筋線維芽細胞関連遺伝子の発現を制御している¹⁶。また、抗炎症性サイトカインであるインターロイキン（IL）-10は筋線維芽細胞の制御に寄与しており¹⁷、組織リモデリングにおける潜在的な治療ターゲットであると考えられている¹²。

緑内障手術後に形成不全となった濾過胞組織には、正常組織と比較して α SMA発現が亢進した細胞が高密度に認められている^{18,19}。また、ウサギに対する緑内障濾過手術後の濾過胞の生存期間を検討した報告では、BACは濾過胞維持期間を短縮するだけでなく、濾過胞における α SMA発現増加をもたらすことが示されている²⁰。角膜、結膜および眼瞼は病理学的に近接しており、相互作用により眼表面の恒常性を維持している²¹。角膜上皮と結膜下組織は、涙液を介して互いに影響を与えていると考えられているが²¹、BACによるテノン囊線維芽細胞の筋線維芽細胞転化における角膜上皮細胞の関与については明らかにされていない。

【目的】

本研究では、SV40 不死化ヒト角膜上皮 (HCE) 細胞との共培養システムにおいて、ヒトテノン囊線維芽細胞 (HTF) の筋線維芽細胞転化について BAC が与える影響を検討する。また、BAC が HTF に与える影響に対する、IL-10 による保護効果について検討する。

【方法】

(1) 方法

試料

Minimum essential medium (MEM)、Dulbecco's modified Eagle's medium-nutrient mixture F12 (DMEM-F12)、ウシ胎児血清 (FBS)、ゲンタマイシンおよび antibiotic-antimycotic mixture (15240-062) は、Invitrogen-Gibco (Rockville, MD, USA) のものを使用した。細胞培養ディッシュおよび 6 well プレートは Corning (Corning, NY, USA) の、Millicell Cell Culture Inserts は Merck KGaA (Darmstadt, Germany) のものを使用した。ウシ血清アルブミン (BSA)、コレラトキシン、ウシインスリン、抗 α SMA マウスモノクローナル抗体 (F3777) および抗 α -tubulin マウスモノクローナル抗体 (T5168)、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) のものを使用し、Recombinant Human EGF は Corning、抗 MRTF-A (Mlk-1) ウサギポリクローナル抗体 (ab113264) は Abcam (Cambridge, UK)、抗 lamin A/C ヤギポリクローナル抗体は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) のものを使用した。

Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン G (IgG)、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG および 10%ヤギ正常血清 (normal goat serum) は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)、ワサビペルオキシダーゼ標識二次抗体は Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA) のものを使用した。BAC は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、IL-10 組み換え体 (recombinant human IL-10) は Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA)、RNeasy Mini Kit は Qiagen (Venlo, the Netherlands)、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix は Toyobo (Osaka, Japan)、SYBR Green reagents は Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) のものを使用した。

細胞培養

ヒト初代角膜上皮細胞は可能継代数が少ないため、本研究では親細胞の表現型・形態・機能を保持した SV40 不死化ヒト角膜上皮細胞株を使用した²²。HCE 細胞は、理化学研究所バイオリソース研究センターから購入し、10%FBS、インスリン (5 μ g/ml)、コレラトキシン (0.1 μ g/ml)、上皮成長因子 (10ng/ml)、およびゲンタマイシン (40 μ g/ml)²³を添加した DMEM-F12 を培地として、37°C、5% CO₂、95% air の加湿環境下で培養した。HTF は、斜視手術を受けた患者で、結膜疾患や点眼薬・眼軟膏使用歴のない患者か

ら、過去に報告しているとおりに細胞分離した²⁴。これらの細胞の使用については、ヘルシンキ宣言を遵守し、山口大学大学院医学系研究科のヒトを対象とした研究倫理審査委員会で承認され、各ドナーからインフォームドコンセントを得た。HTFは、10%FBSと抗生物質-抗真菌混合物を添加したMEMを培地として、37℃、5%CO₂、95%airの環境下で培養し、3~8回継代したものを本研究に使用した。HTFとHCE細胞の共培養システムは、ハンギングメッシュインサートで70~80%のサブコンフルエントまで培養したHTFを、HCE細胞を含む6wellプレートに移し、両細胞とも同じ培地(MEM)で維持した。

乳酸脱水素酵素(LDH)アッセイ

培養上清中の乳酸脱水素酵素(LDH; lactate dehydrogenase)は、Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)でサンプル調整し、マイクロプレートリーダー(PowerWave XS; BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)を用いて490nmで吸光度を測定した。

免疫蛍光染色

ガラスカバー上で培養した細胞4%パラホルムアルデヒド固定液を用いて室温で30分間固定後、PBSで洗浄し、0.1%Triton X-100で15分間透過処理を行った。ハンギングメッシュインサートで培養した細胞については、メタノールで-30℃で15分間固定を行った。全てのサンプルで、ブロッキングは1%goat serum/PBSで行い、4℃で一晩反応させた。 α SMAについては、一次抗体にはanti- α SMA(1:500/blocking solution, F3777; Sigma, MO, USA)を用いて4℃で一晩反応させ、その後、蛍光二次抗体Alexa Fluor 488(1:500/blocking solution, goat anti-rabbit IgG, Invitrogen, CA, USA)にて室温で1時間反応させた。MRTF-Aについては、一次抗体にはanti-Mrk-1(1:150/blocking solution, ab113264; Abcam, Cambridge, UK)で4℃で一晩反応させ、次に蛍光二次抗体Alexa Fluor 488(1:500/blocking solution)で室温にて1時間反応させた。核染色にはDAPI(4',6'-diamidino-2-phenylindole)を使用した。ガラス上の細胞の撮影は蛍光顕微鏡(BZ-X710; Keyence, Osaka, Japan)を用い、ハンギングメッシュインサート上の細胞の撮影は共焦点顕微鏡(Zeiss, LSM510META)を用いて行った。

ウェスタンブロッティング

サンプルを50mM Tris-HCl [pH 7.5]、165mM NaCl、10mM NaF、1mM バナジン酸ナトリウム、1mM PMSF、10mM EDTA、Aprotinin[10 μ g/ml]、leupeptin [10 μ g/ml]、1% NP-40を含む溶液で溶解、細胞溶解液をホモジナイズし、15,000 x g、4℃で30分間遠心分離し、得られた上清を回収した。サンプル(タンパク質5 μ g)は、5%-20%アクリルアミド

プレキャストゲル (SuperSep™ Ace; WAKO, Osaka, Japan) を用いて電気泳動により分離し、分離したタンパク質を PVDF 膜 (polyvinylidene difluoride; Immobilon-P membrane, Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した。メンブレンを室温で 1 時間ブロッキング (3%BSA/TBS) 後、0.1%Tween-20 を含む TBS で洗浄し、anti- α SMA (1:1000 / blocking solution) または α -Tubulin (1:1000 / blocking solution) 4°C で一晩反応させた。核細胞質分離後の核内タンパク質に対しては、MRTF-A (1:10000) および Lamin A/C (1:2000) に対する抗体を使用した。タンパク質転写後の PVDF 膜は、西洋ワサビペルオキシダーゼ (1:10,000, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., PA, USA) 標識抗体と室温で 1 時間反応させた。その後、ImmunoStar LD または Immunostar Zeta (WAKO) で化学発光させ、Bio-Rad ChemiDoc (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で検出した。各バンドの強度は、Image Lab software (Bio-Rad) を用いて解析した。

サイトカインアッセイ

ハンギングメッシュインサート上で培養した HTF の上清中のサイトカイン (IL-6, D6050; IL-10, D1000B; MCP-1; DCP00) の濃度を Quantikine ELISA キット (R&D Systems; Minneapolis, MN, USA) を用いて測定した。各ウェルの吸光度は、マイクロプレートリーダー (PowerWave XS, BioTek Instruments) を用いて 450nm に設定し、波長補正を 540nm に設定して測定した。

リアルタイム PCR

RNeasy Mini Kit を用いて 6well プレートまたはハンギングメッシュインサート中の細胞から Total RNA を単離し、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を用いて処置した。得られた cDNA を SYBR Green および StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて qPCR 分析を行った。qPCR プライマー (forward と reverse) は、IL-10 (NM_000572.3) の 5-TCTCCGAGATGCCTTCAGCAGA-3 (forward) と 5-TCAGACAAGGCTTGCCAACCCA-3 (reverse)、GAPDH (NM_002046.5) の 5-AAGCCTCAAGATCATCAGCAAT-3 (forward) と 5-TCCTCCACGATACCAAAGTTGT-3 (reverse) であった。IL-10 mRNA 量は GAPDH mRNA 量によって正規化した。

核細胞質タンパク質分離

核および細胞質画分は、NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) を使用して、細胞溶解液から調製した。

(3) 解析

定量データは平均値 + 標準誤差として示した。2 グループ間の比較には Student *t* test、2

つ以上のグループ間の比較には分散分析・Holm-Sidak *post hoc* test を用いた。統計分析は SigmaStat 13.0 software (Systat Software, San Jose, CA, USA) を用いて実施した。0.05 未満の p 値を統計的に有意であると定義した。

《結果》

HTF および HCE 細胞に対する BAC の細胞毒性

HTFs と HCE 細胞に対する BAC の細胞毒性を調べるため、培養液中に分泌される LDH 量を測定した。HTFs または HCE 細胞の培養液中の LDH 量は、BAC 濃度依存的に増加し、 $10 \times 10^{-6}\%$ 濃度以上で有意差を認めた (図 1)。以下の実験は、細胞毒性のない、 $5 \times 10^{-6}\%$ 濃度の BAC を用いて行った。

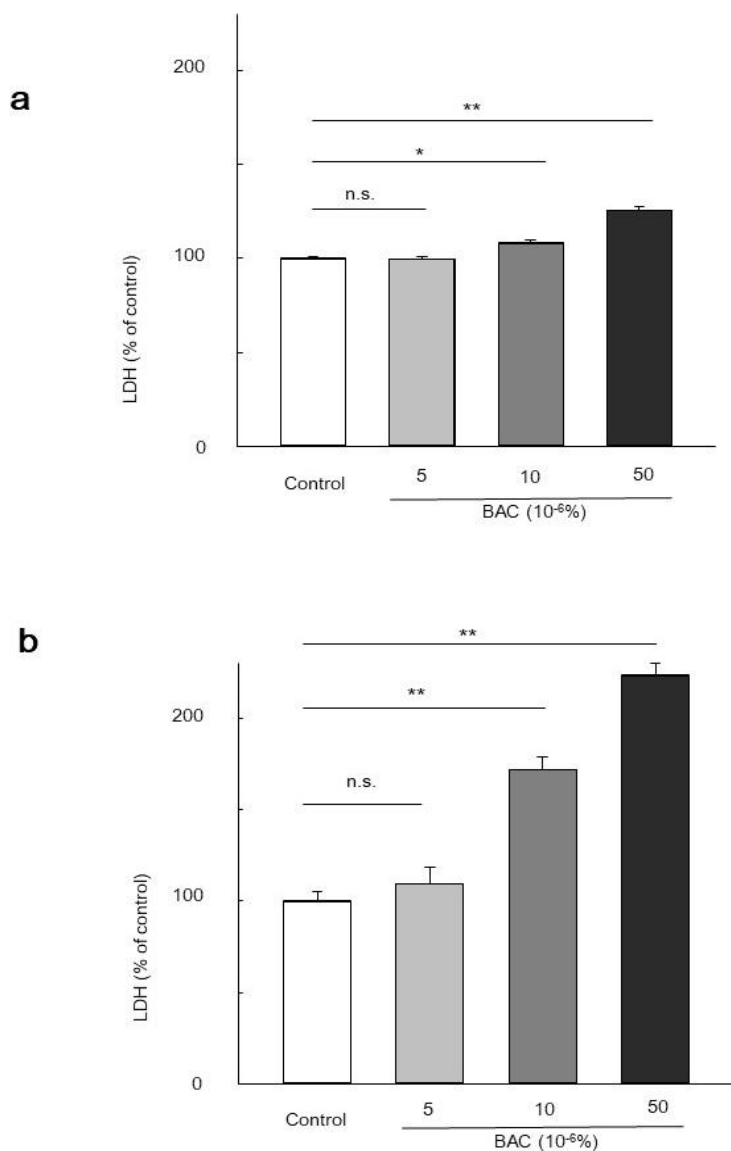


図 1. HTF と HCE 細胞に対する BAC の細胞毒性

HTF (a) および HCE 細胞 (b) は、無血清培地で 24 時間培養した後、それぞれの BAC 濃度下または BAC なし (Control) で 24 時間培養し、培養液中に放出された LDH 量を測定した。データはコントロール値のパーセンテージで示した。平均±標準偏差 (n=5)。*p<0.05, **p<0.01, n.s.; 有意差なし (Holm-Sidak *post hoc* test)。

HTF の筋線維芽細胞転化に対する BAC の影響

次に、細胞毒性のない濃度の BAC が HTF の表現型に及ぼす影響を、免疫蛍光染色を用いて検証した。BAC は筋線維芽細胞分化の重要なマーカーである α SMA^{9,10} の発現を著明に誘導した (図 2a)。ウェスタンブロットでも、BAC による α SMA 発現量の有意な増加が認められた (2.02 倍 vs. control、p = 0.011、図 2b)。

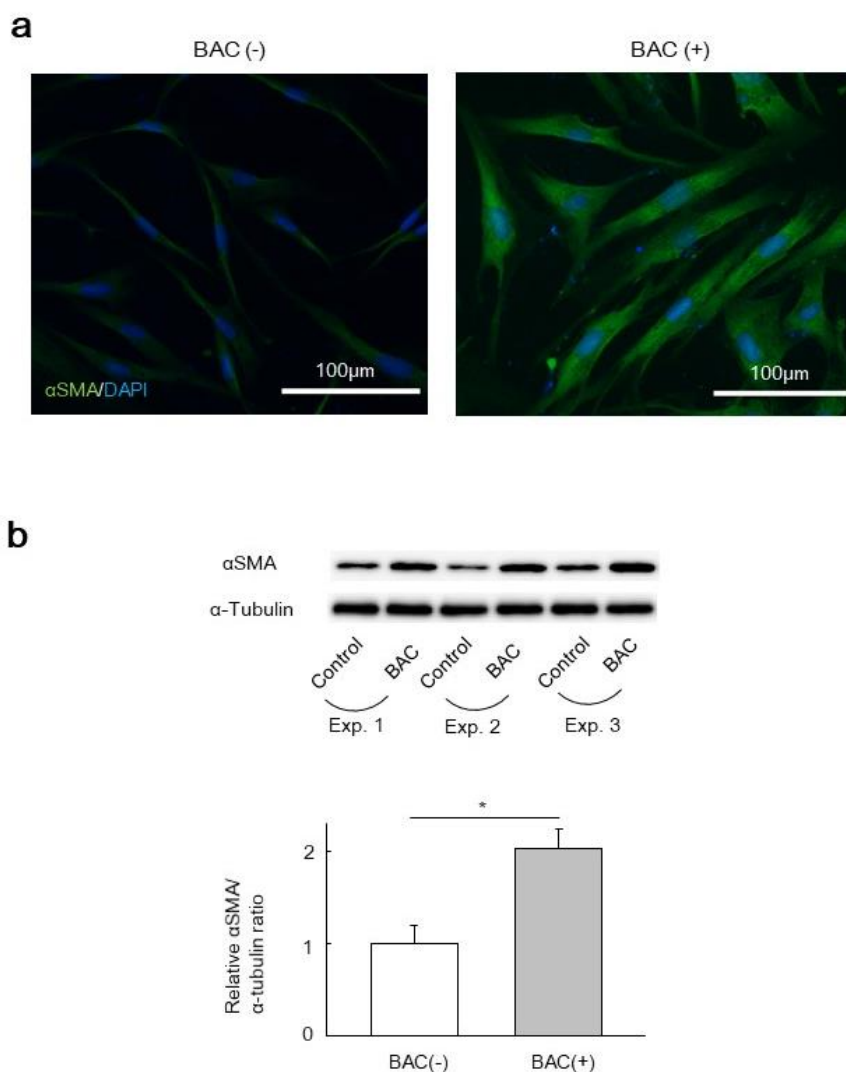


図 2. HTF の筋線維芽細胞転化に対する BAC の影響

a) HTF を無血清培地で 24 時間培養し、BAC (5 x 10⁻⁶%) 存在下または非存在下で 24 時間

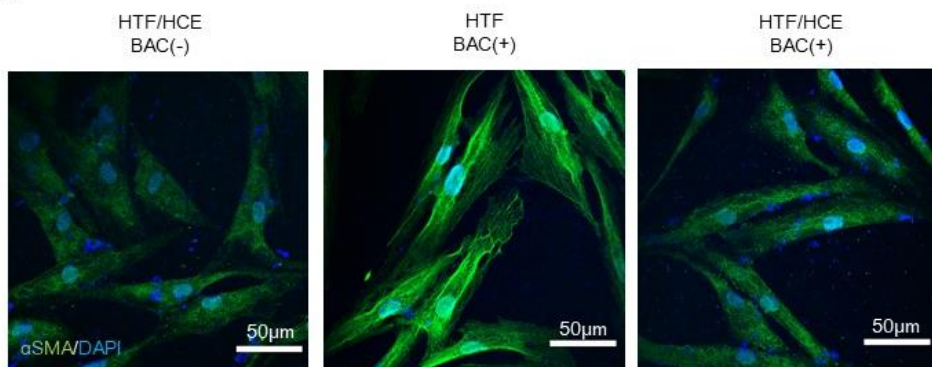
培養した後、 α SMA (green) に対して免疫蛍光染色を行った。核は DAPI (blue) で染色した。(scale bar : 100 μ m)

b) (a) と同様に処理した細胞を、 α SMA および α -tubulin (loading control) に対する抗体でウェスタンブロットを用いて分析した。ブロット (n=3) および α SMA/ α -tubulin 比による定量評価 (n=4) を示した。平均値+標準偏差。*p < 0.05 (Student t test)。

BAC による HTF の筋線維芽細胞転化に対して HCE 細胞が与える影響

テノン囊線維芽細胞を含む結膜下組織と角膜上皮は涙液を介して互いに影響している¹⁹ ことから、BAC による HTF の筋線維芽細胞転化に対する HCE 細胞の影響について、共培養システムを用いて検討した。HCE 細胞は、6well プレートの底で培養し、HTF はハンギングメッシュインサート上で培養した。免疫蛍光染色の結果、単独培養した HTF では、BAC による α SMA 発現がみられたが、HCE 細胞と共培養した HTF では α SMA 発現が抑制された (図 3a)。ウェスタンブロットでも同様の結果が得られた (図 3b)。

a



b

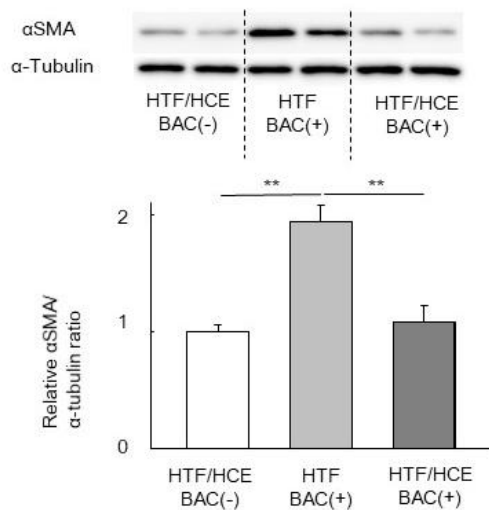


図 3. 共培養システムにおける HTF の BAC 誘発性筋線維芽細胞転化に対する HCE 細胞の効果

a) HCE 細胞と共培養または単独で 6well プレーートのハンギングメッシュインサートで培養した HTF を、無血清状態で 24 時間培養し、BAC ($5 \times 10^{-6}\%$) の非存在下または存在下でさらに 24 時間培養し、 α SMA (green) に対して免疫蛍光染色を行った。核は DAPI (blue) で染色した。スケールバー：50 μ m。

b) (a) と同様に処理した HTF について α SMA に対してウェスタンブロットを行った。 α SMA/ α -tubulin 比による定量評価をグラフで示した (n=5)。平均値+標準偏差。**p < 0.01 (Holm-Sidak *post hoc* test)。

HTF/HCE 細胞共培養システムにおけるサイトカイン産生に対する BAC の影響

BAC による HTF の α SMA 発現に対して、HCE 細胞が抑制的に作用するメカニズムを調べるため、培養液中に放出された IL-6、MCP-1、および IL-10 の濃度を測定した。BAC 処理した HTF 単独培養時の上清中 IL-6 と MCP-1 の濃度は、BAC 処理した HTF/HCE 細胞共培養時に比べて有意に高かった (p < 0.01、図 4a)。HTF/HCE 細胞の共培養時には、BAC の有無で、IL-6 と MCP-1 の濃度に有意差はなかった。一方、BAC 処理した単独培養 HTF の上清中の IL-10 濃度は、同じく BAC 処理した HTF/HCE 細胞の共培養時の IL-10 濃度の 5.79% に過ぎなかった (p < 0.001、図 4a)。HTF/HCE 細胞の共培養時の上清中 IL-10 濃度には、BAC の有無により差はなかった。HTF と HCE 細胞のどちらが IL-10 の産生に関与しているかを調べるため、HTF と HCE 細胞の IL-10 mRNA 量を RT-qPCR を用いて測定した。HTF の IL-10 mRNA 量は、BAC の有無によって差はなかったが、HCE 細胞の IL-10 mRNA 量は BAC により有意に増加した (1.32 倍、p = 0.033、図 4b)。

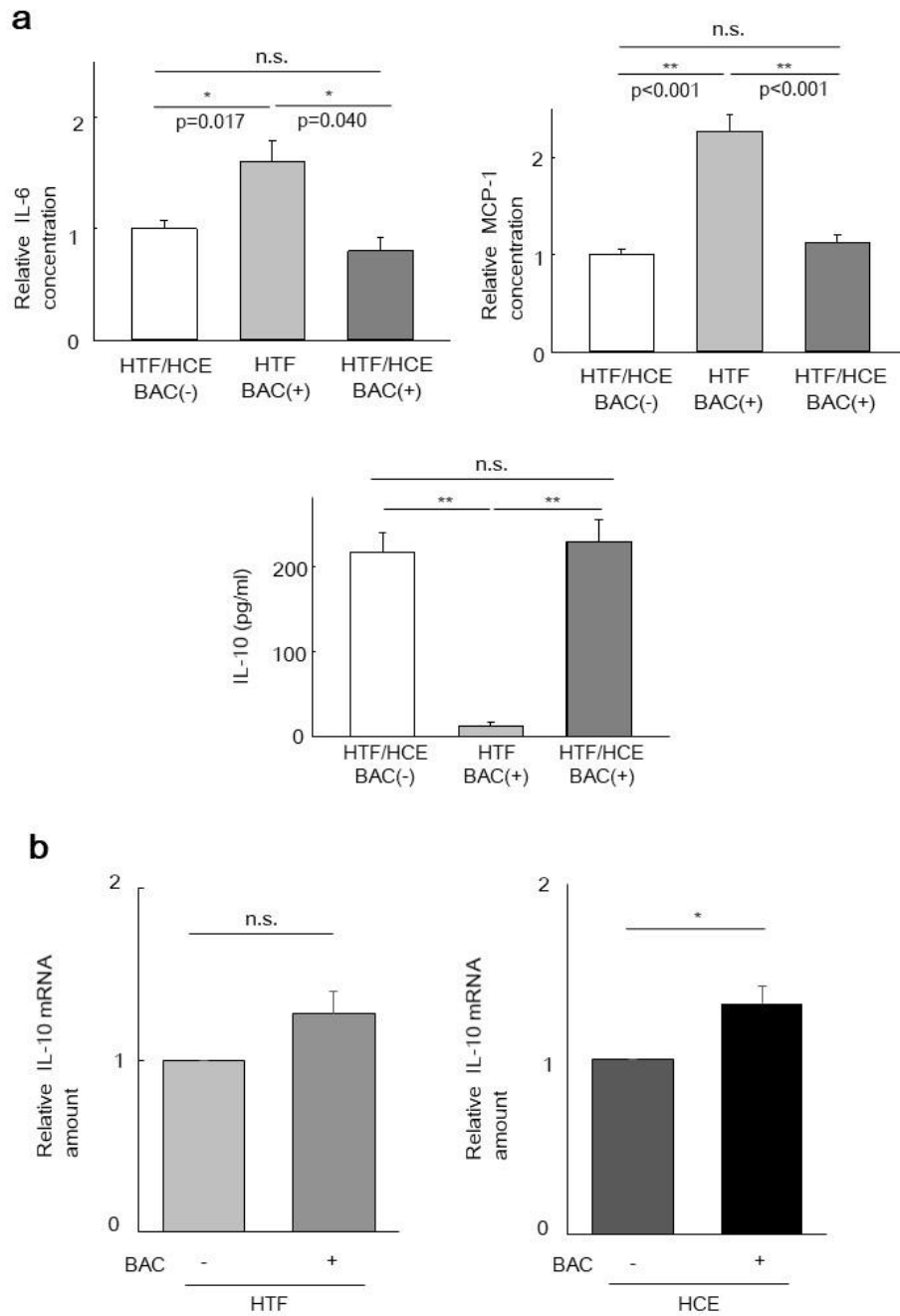


図 4. HTF/HCE 細胞共培養システムにおけるサイトカイン産生に対する BAC の影響

a) HCE 細胞と共に（または単独で）6well プレーートのハンギングメッシュインサート上で培養した HTF を 24 時間血清除去し、BAC ($5 \times 10^{-6}\%$) の非存在下または存在下で 24 時間培養した後、HTF の培養上清中の IL-6、MCP-1 および IL-10 の濃度を測定した ($n=4$)。平均値+ 標準偏差。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、n.s. : 有意差なし (Holm-Sidak *post hoc* test)。

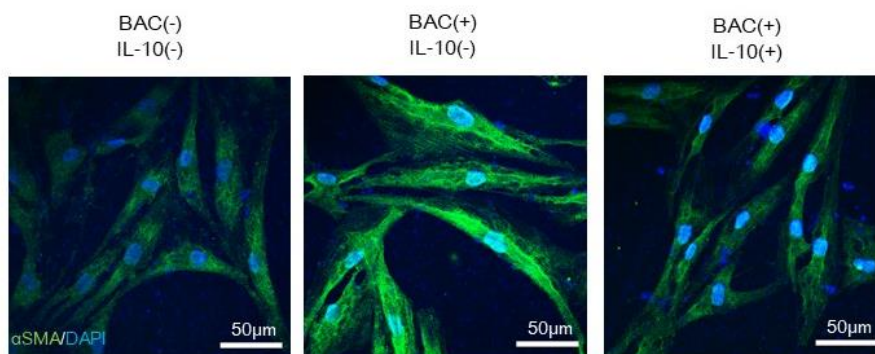
b) HTF と HCE 細胞を共培養し、(a) のように処理した後、RT-qPCR を用いて IL-10 の mRNA 量を測定した。GAPDH の mRNA 量で正規化し、BAC なしの場合との相対値で表し

た。n=3。平均±標準偏差。*p<0.05、n.s. : 有意差なし (Student *t* test)。

BAC による HTF の筋線維芽細胞転化に対する IL-10 の効果

BAC 処理時、HTF/HCE 細胞共培養時の上清中 IL-10 濃度が HTF 単独培養時に比べて高かったことから、BAC によって誘発された HTF の筋線維芽細胞転化の抑制に IL-10 が関与している可能性が考えられた。そこで、IL-10 添加により HTF の筋線維芽細胞転化が抑制されるか検討した。HTF を無血清培養液中に IL-10 (300 pg/ml) を添加して 24 時間培養後、さらに 24 時間 BAC に反応させた。免疫蛍光染色 (図 5a) およびウェスタンブロット (図 5b) で、BAC による HTF の α SMA 発現が、IL-10 の存在により抑制されることがわかった。

a



b

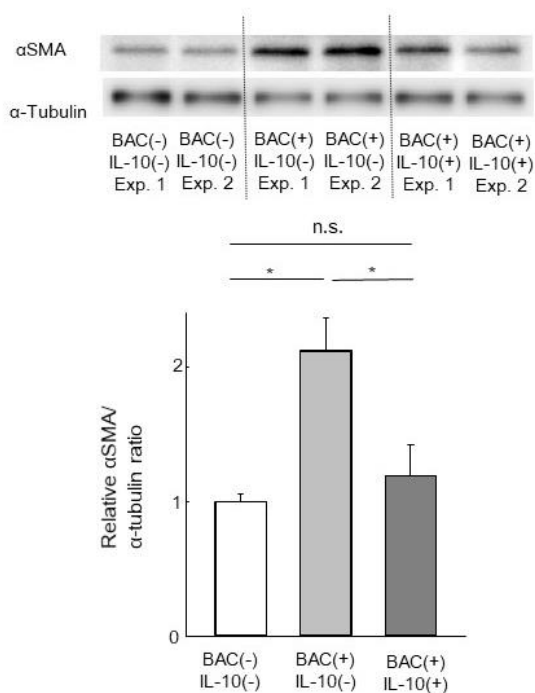


図 5. BAC による HTF の筋線維芽細胞転化に対する IL-10 の効果

- a) HTF を IL-10 (300 pg/ml) の有無に関わらず 24 時間培養し、その後 BAC (5 x 10⁻⁶%) の有無に関わらず 24 時間培養し、α SMA (green) に対して免疫蛍光染色を行った。核は DAPI (blue) で染色した。スケールバー：50μm。
- b) (a) と同様に処理した細胞を、α SMA についてウェスタンブロットを行った。ブロット (n=2) および αSMA/α-tubulin 比による定量評価 (n=5) を示した。*p < 0.05、n.s. : 有意差なし (Holm-Sidak *post hoc test*) 。

BAC による HTF の炎症性サイトカイン分泌に対する IL-10 の効果

我々はさらに、BAC による HTF の IL-6 および MCP-1 分泌は IL-10 投与により抑制されるかについて検証した。HTF を無血清培養液中に IL-10 (300 pg/ml) を添加して 24 時間培養し、さらに 24 時間 BAC に曝露させ、培養液中に放出された IL-6、MCP-1 の濃度を測定した。BAC により増加した HTF の培養上清中の IL-6 および MCP-1 の濃度は、IL-10 を投与群では低下した (図 6) 。

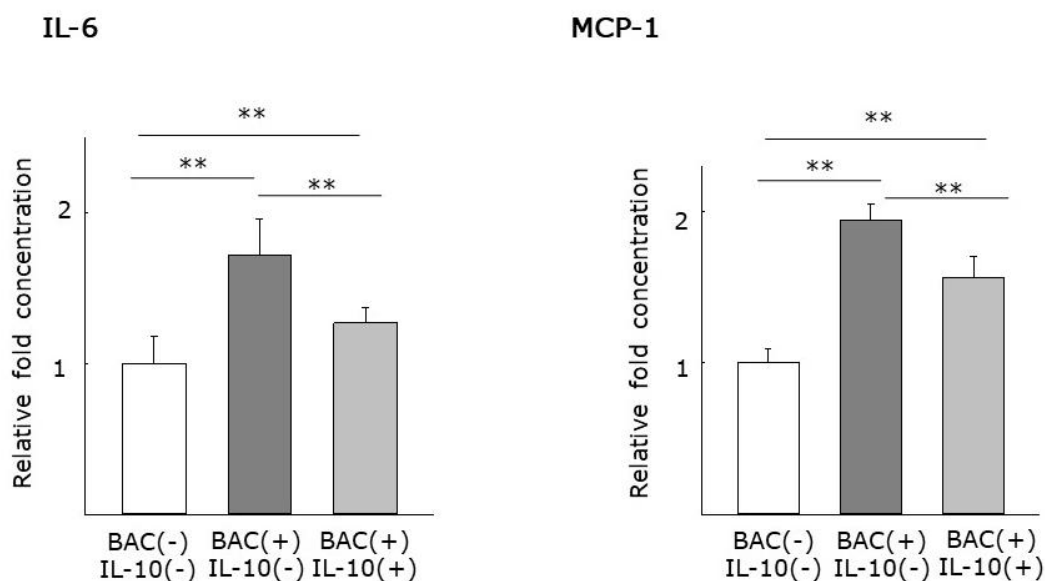


図 6. BAC のよる HTF の炎症性サイトカイン分泌に対する IL-10 の効果

12well プレートで培養し HTF において、IL-10 (300pg/ml) の有無にかかわらず 24 時間無血清培地で培養し、BAC (5 x 10⁻⁶%) の非存在下または存在下で 24 時間培養した後、上清中の IL-6 および MCP-1 の濃度を測定した。n=3。平均値+標準偏差。**p < 0.01、n.s. : 有意差なし (Holm-Sidak *post hoc test*) 。

HTF における MRTF-A の細胞内局在に対する BAC と IL-10 の効果

我々は過去に網膜色素上皮細胞における EMT が MRTF-A シグナル伝達を介していることを報告した¹⁵。そこで今回、HTF の BAC 誘導性の筋線維芽細胞への転化において、MRTF-

A シグナル伝達の介在の可能性について検討した。免疫蛍光染色では、BAC 存在下では MRTF-A が HTF の細胞核内に存在していたのに対し、BAC の非存在下では細胞質に主に存在していた (図 7a)。さらには、この BAC による MRTF-A の細胞内局在に対する影響は、IL-10 により抑制された。ウェスタンブロットでは、BAC による MRTF-A の核内移行が、IL-10 添加により有意に減衰された ($p < 0.001$, 図 7b)。

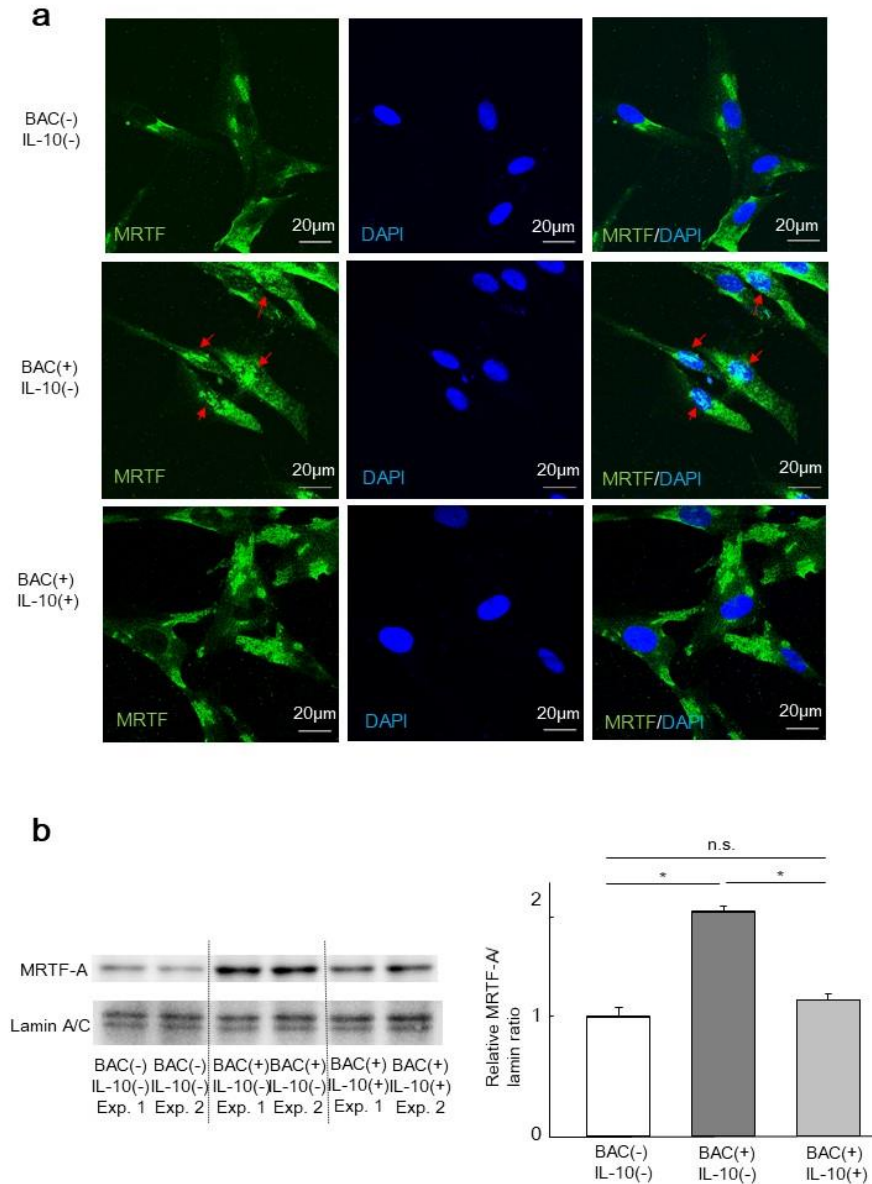


図 7. HTF における MRTF-A の細胞内局在に対する BAC と IL-10 の効果

a) HTF を IL-10 (300 pg/ml) の有無に関わらず 24 時間培養し、その後 BAC ($5 \times 10^{-6}\%$) の有無に関わらず 6 時間培養し、MRTF-A (green) に対して免疫蛍光染色を行った。核は DAPI (blue) で染色した。矢印は核内への MRTF-A の局在を表す。スケールバー：20 μ m。

b) (a) のように細胞処理し、BAC 存在下または非存在下で 24 時間反応させ、細胞核分離を行い、核内分画を MRTF-A および Lamin A/C (核マーカー) に対する抗体を用いてウェスタンブロットを行った。ブロット(n=2)および α SMA/lamin 比による定量的評価(n=4)を示した。平均値+ 標準偏差。* $p < 0.05$ 、n.s. : 有意差なし (Holm-Sidak *post hoc* test)。

《考察》

線維芽細胞は様々な刺激に反応して筋線維芽細胞に移行する。筋線維芽細胞は、ECM 分泌、蓄積、および収縮することで線維化に関与している^{11,25}。HTF もまた、筋線維芽細胞へ転化し、結膜下組織線維化に関与する^{11,18,19,26}。過去の報告で、BAC は結膜および結膜下組織の線維化を誘導することが示されており^{5,8,27,28}、BAC 添加したウサギのドライアイモデルにおいても濾過手術後の濾過胞で α SMA 発現が亢進していたと報告されている²⁰。我々は今回、BAC が HTF の筋線維芽細胞への転化を誘発し、それによって結膜下組織の線維化が促進される可能性があること、BAC が HTF の α SMA 発現を増加させることを示した。

BAC は眼表面への毒性効果をもち、アレルゲンとなることがある⁸。BAC は角膜上皮細胞、結膜細胞、および結膜下細胞の障害することで、涙膜の不安定性を含む眼表面障害をもたらす^{8,29}。一般的な点眼液中の防腐剤としての BAC の濃度は 0.004~0.02%であるが^{30,31}、本研究では、点眼薬中に存在するよりもさらに低濃度である $5 \times 10^{-6}\%$ においても、BAC が HTF の筋線維芽細胞の転化を誘導しうることを示した。

眼表面は、角膜、結膜、涙腺および眼瞼で構成されており、それらは機能的な相互作用をもつ³²。角膜上皮は外的因子からの防御機能を有し、免疫応答において重要な役割を果たしている²¹。角膜上皮細胞と HTF が生体内で相互作用することで、眼表面の恒常性維持に寄与している可能性がある。

MRTF-A の核内移行は、筋線維芽細胞の表現型と線維化に関連する遺伝子の発現の活性化をもたらす^{11,13,14}。MRTF-A 経路は、結膜線維芽細胞による α SMA 発現と癒痕組織形成を促進し^{33,34}、また、網膜下線維化にも関与していることが報告されている¹⁵。MRTF-A は G-actin と複合体を形成し、非活性時には主に細胞質内に局在しているが^{35,36}、細胞刺激が加わると G-actin から MRTF-A が解離し、MRTF-A が一過性に核内へ移行する^{35,36}。MRTF-A は、血清応答因子 (serum response factor : SRF) に結合し、 α SMA などの遺伝子発現を誘導する^{35,36}。MRTF-A の核内移行は、細胞質と核の間の MRTF-A の分布のバランス変化であると考えられ³⁷、本研究で得た免疫蛍光染色とウェスタンブロットの結果から、コントロール条件下の HTF では MRTF-A は基本的に細胞質に局在し、核には存在していないが、BAC 刺激により核内に移行することが明らかになった。このことから、BAC が MRTF-A- α SMA 軸を活性化し、筋線維芽細胞への転化を誘導すると考えられた。

角膜上皮と結膜下組織は、涙液と涙液中の様々な因子によって互いに影響している²¹。本研究では、BAC が HTF の培養上清中の IL-6 と MCP-1 の濃度上昇をもたらし、こ

これらの炎症性サイトカインの濃度上昇は、HCE 細胞と HTF の共培養によって抑制されたことを明らかにした。一方、BAC に暴露された HTF は IL-10 の産生が減少したが、これは HCE 細胞との共培養によって抑制された。抗炎症性サイトカインである IL-10 は、免疫応答のバランスを維持する役割を担っており³⁸、真皮細胞、肺細胞や腎細胞では増殖組織やコラーゲンの合成を阻害する¹²。眼表面組織の線維化におけるサイトカインの役割については様々な研究が行われているが、BAC 含有点眼薬による治療を長期間うけた群では涙液中の IL-10 と IL-6 濃度が高いという報告もあり⁷、BAC が眼表面にあたえる変化には IL-10 が積極的に関与している可能性が考えられた。

結膜細胞は TNF- α や IL-63 などのサイトカインを産生しており、これらはヒトテノン線維芽細胞の筋線維芽細胞への転化に関与している^{7,39}。眼表面炎症性疾患をもつ患者から得られた結膜癒痕標本でこれらの炎症性サイトカインの増加が認められている^{40,41}。一方で、角膜上皮細胞は BAC により IL-10 を含む抗炎症性サイトカインを分泌している⁴²。角膜上皮細胞と結膜下線維化との関連については、これまで *in vitro* や *in vivo* では検討されたことはなかった。今回の結果は、BAC 曝露時における眼表面組織の恒常性維持にはサイトカインが関与していることを示唆している。HCE 細胞の IL-10 mRNA 量は BAC に曝露することで有意に増加した。また、HCE 細胞と共培養条件下では、HTF の IL-10 mRNA 量は BAC によって減少しなかった。この結果から、HCE 細胞は IL-10 自体を産生するだけでなく、HTF からの IL-10 分泌の阻害を減衰させることで HTF を保護している可能性が示唆された。さらに、HTF を単独培養した場合でも、IL-10 投与により BAC 誘発性の IL-6 と MCP-1 の放出を抑制すること示すことができた。これらの結果は、IL-10 が結膜下組織を含む眼表面の炎症反応や免疫反応を改善する可能性を示唆している。さらに、IL-10 添加には、BAC 誘発性の HTF の α SMA 発現増加と MRTF-A の核内移行を抑制した。これらの結果は、IL-10 が組織リモデリングの有力な治療薬としての可能性をもっていることを示唆するものである。

本研究の結果は、BAC によるテノン線維芽細胞の筋線維芽細胞転化に対する保護機能として、角膜上皮細胞が重要な役割を果たしている可能性を示した。さらに、IL-10 が眼表面組織の恒常性維持に重要な生物学的メディエーターであり、IL-10 投与により、テノン線維芽細胞を BAC 曝露によって誘導される筋線維芽細胞への転化から保護することができる可能性を示した。BAC 曝露に伴う緑内障手術後の濾過胞不全を防ぐための新しい治療戦略となる可能性がある。また、薬剤誘発性角膜上皮障害は、緑内障濾過手術の予後因子となるかもしれず、IL-10 の局所投与は、手術後の結膜下組織線維化をコントロールするための新しい有用なアプローチとなる可能性がある。

〈結語〉

本研究は、初めて HTF と HCE 細胞の相互作用を共培養システムで検討したものである。そ

の結果、HCE 細胞は BAC によって誘発された HTF の筋線維芽細胞への転化を阻害し、HCE 細胞によるこの効果は IL-10 によっても似た効果が得られた。この 2 種類の細胞間相互作用の正確なメカニズムは不明であるが、HCE 細胞の存在下で HTF の上清中の IL-10 濃度が上昇したことから、IL-10 の産生が関与している可能性がある。また、BAC により促進された HTF の MRTF-A の核内移行は IL-10 により抑制されたことから、MRTF-A は BAC が HTF の転化に及ぼす影響に少なからず関連していることが示唆された。この経路において MRTF-A の上流に作用するタンパク質を同定するためのさらなる研究が必要であり、また BAC による結膜下線維化に対する IL-10 が与える抑制効果について *in vivo* でも検討する必要がある。

《謝辞》

本研究にあたって、指導教官としてご指導を頂いた山口大学大学院医学系研究科眼科学講座教授 木村和博先生、山口県立大学看護栄養学部栄養学科教授 徳田和央先生、実験にご協力頂いた同講座技術補佐員 水野由香里氏、片岡彩加氏に対して、ここに深謝の意を表す。

《関連論文との関係性》

本研究は、著者執筆の関連論文 (Benzalkonium chloride-induced myofibroblastic transdifferentiation of Tenon's capsule fibroblasts is inhibited by coculture with corneal epithelial cells or by interleukin-10) に基づいて、BAC 曝露時における HTF において HCE 細胞が与える影響に関して、特に IL-10 について検討したものである。

《参考文献》

- 1 日本緑内障学会緑内障診療ガイドライン作成委員会. 緑内障診療ガイドライン (第4版). *日眼会誌* **122**, 7-53 (2017).
- 2 Y, M. *et al.* Incidence and causes of visual impairment in Japan: the first nationwide complete enumeration survey of newly certified visually impaired individuals. *Jpn J Ophthalmol* **63**, 26-33 (2019).
- 3 T, Y. *et al.* Tajimi Study Group, Japan Glaucoma Society. The Tajimi Study report 2: prevalence of primary angle closure and secondary glaucoma in a Japanese population. *Ophthalmology* **112**, 1661-1669 (2005).
- 4 佐治, 守. *et al.* 点眼薬の防腐剤としての塩化ベンザルコニウムの抗菌力についての検討. *医療薬学* **29**, 341-345 (2003).
- 5 Baudouin, C., Labbe, A., Liang, H., Pauly, A. & Brignole-Baudouin, F. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res* **29**, 312-334, doi:10.1016/j.preteyeres.2010.03.001 (2010).
- 6 Baudouin, C. *et al.* The ocular surface of glaucoma patients treated over the long term expresses inflammatory markers related to both T-helper 1 and T-helper 2 pathways. *Ophthalmology* **115**, 109-115, doi:10.1016/j.ophtha.2007.01.036 (2008).
- 7 Malvitte, L. *et al.* Measurement of inflammatory cytokines by multicytokine assay in tears of patients with glaucoma topically treated with chronic drugs. *Br J Ophthalmol* **91**, 29-32, doi:10.1136/bjo.2006.101485 (2007).
- 8 Yang, Q. *et al.* A Comparison of the Effects of Benzalkonium Chloride on Ocular Surfaces between C57BL/6 and BALB/c Mice. *Int J Mol Sci* **18**, doi:10.3390/ijms18030509 (2017).
- 9 Broadway, D., Grierson, I., O'Brien, C. & Hitchings, R. Adverse effects of topical antiglaucoma medication. II. The outcome of filtration surgery. *Arch Ophthalmol* **112**, 1446-1454, doi:10.1001/archophth.1994.01090230060021 (1994).
- 10 Sherwood, M. B., Grierson, I., Millar, L. & Hitchings, R. A. Long-term morphologic effects of antiglaucoma drugs on the conjunctiva and Tenon's capsule in glaucomatous patients. *Ophthalmology* **96**, 327-335, doi:10.1016/s0161-6420(89)32888-0 (1989).
- 11 Pardali, E., Sanchez-Duffhues, G., Gomez-Puerto, M. C. & Ten Dijke, P. TGF-beta-Induced Endothelial-Mesenchymal Transition in Fibrotic Diseases. *Int J Mol Sci* **18**, doi:10.3390/ijms18102157 (2017).
- 12 Sziksz, E. *et al.* Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family. *Mediators Inflamm* **2015**, 764641, doi:10.1155/2015/764641

- (2015).
- 13 Miralles, F., Posern, G., Zaromutidou, A. & Treisman, R. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* **113**, 329-342 (2003).
 - 14 Vartiainen, M., Guettler, S., Larijani, B. & Treisman, R. Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science* **316**, 1749-1752 (2007).
 - 15 Kobayashi, M. *et al.* Suppression of Epithelial-Mesenchymal Transition in Retinal Pigment Epithelial Cells by an MRTF-A Inhibitor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **60**, 528-537, doi:10.1167/iovs.18-25678 (2019).
 - 16 Wang, D. Z. *et al.* Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 14855-14860 (2002).
 - 17 van Caam, A., Vonk, M., van den Hoogen, F., van Lent, P. & van der Kraan, P. Unraveling SSc Pathophysiology; The Myofibroblast. *Front Immunol* **9**, 2452, doi:10.3389/fimmu.2018.02452 (2018).
 - 18 Mietz, H., Arnold, G., Kirchhof, B., Diestelhorst, M. & Kriegelstein, G. K. Histopathology of episcleral fibrosis after trabeculectomy with and without mitomycin C. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol* **234**, 364-368 (1996).
 - 19 How, A. *et al.* Combined treatment with bevacizumab and 5-fluorouracil attenuates the postoperative scarring response after experimental glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**, 928-932, doi:10.1167/iovs.09-3949 (2010).
 - 20 Ji, H. *et al.* The Effect of Dry Eye Disease on Scar Formation in Rabbit Glaucoma Filtration Surgery. *Int J Mol Sci* **18**, doi:10.3390/ijms18061150 (2017).
 - 21 Kumagai, N., Fukuda, K., Fujitsu, Y., Yamamoto, K. & Nishida, T. Role of structural cells of the cornea and conjunctiva in the pathogenesis of vernal keratoconjunctivitis. *Prog Retin Eye Res* **25**, 165-187, doi:10.1016/j.preteyeres.2005.09.002 (2006).
 - 22 Araki-Sasaki, K., Ohashi, Y., Sasabe, T., Hayashi, K., Watanabe, H., Tano, T., Handa, H. Am SV40-Immortalized Human Corneal Epithelial Cell Line and Its Characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**, 614-621 (1995).
 - 23 Kimura, K., Teranishi, S. & Nishida, T. Establishment of human corneal epithelial cells stably expressing human connexin43. *Exp Eye Res* **90**, 4-9, doi:10.1016/j.exer.2009.09.002 (2010).
 - 24 Fujitsu, Y., Fukuda, K., Kumagai, N., Nishida, T. IL-4 induced cell proliferation and production of extracellular matrix proteins in human conjunctival fibroblasts.

- Exp Eye Res* **76**, 107-114 (2003).
- 25 Hinz, B. *et al.* Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol* **180**, 1340-1355, doi:10.1016/j.ajpath.2012.02.004 (2012).
- 26 Lin, X *et al.* Nintendanib inhibits TGF- β -induced myofibroblasts transdifferentiation in human Tenon's fibroblasts. *Mol Vis* **24**, 789-800 (2018).
- 27 Li, C. *et al.* Research on the stability of a rabbit dry eye model induced by topical application of the preservative benzalkonium chloride. *PLoS One* **7**, e33688, doi:10.1371/journal.pone.0033688 (2012).
- 28 Soriano-Romani, L., Garcia-Posadas, L., Lopez-Garcia, A., Paraoan, L. & Diebold, Y. Thrombospondin-1 induces differential response in human corneal and conjunctival epithelial cells lines under in vitro inflammatory and apoptotic conditions. *Exp Eye Res* **134**, 1-14, doi:10.1016/j.exer.2015.03.004 (2015).
- 29 Xiong, C. *et al.* A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**, 1850-1856, doi:10.1167/iovs.07-0720 (2008).
- 30 Noecker, R. Effects of common ophthalmic preservatives on ocular health. *Adv Ther* **18**, 205-215, doi:10.1007/bf02853166 (2001).
- 31 Pisella, P. J., Fillacier, K., Elena, P. P., Debbasch, C. & Baudouin, C. Comparison of the effects of preserved and unpreserved formulations of timolol on the ocular surface of albino rabbits. *Ophthalmic Res* **32**, 3-8, doi:10.1159/000055579 (2000).
- 32 Stern, M. E. *et al.* The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea* **17**, 584-589, doi:10.1097/00003226-199811000-00002 (1998).
- 33 Fernando, O. *et al.* Development of Targeted siRNA Nanocomplexes to Prevent Fibrosis in Experimental Glaucoma Filtration Surgery. *Mol Ther* **26**, 2812-2822, doi:10.1016/j.ymthe.2018.09.004 (2018).
- 34 Yu-Wai-Man, C. *et al.* Local delivery of novel MRTF/SRF inhibitors prevents scar tissue formation in a preclinical model of fibrosis. *Sci Rep* **7**, 518, doi:10.1038/s41598-017-00212-w (2017).
- 35 Johnson, L. A. *et al.* Novel Rho/MRTF/SRF inhibitors block matrix-stiffness and TGF-beta-induced fibrogenesis in human colonic myofibroblasts. *Inflamm Bowel Dis* **20**, 154-165, doi:10.1097/01.MIB.0000437615.98881.31 (2014).
- 36 Hayashi, K., Watanabe, B., Nakagawa, Y., Minami, S. & Morita, T. RPEL proteins are the molecular targets for CCG-1423, an inhibitor of Rho signaling. *PLoS One* **9**, e89016, doi:10.1371/journal.pone.0089016 (2014).

- 37 Hayashi, K. *et al.* A novel inhibitory mechanism of MRTF-A/B on the ICAM-1 gene expression in vascular endothelial cells. *Sci Rep* **5**, 10627, doi:10.1038/srep10627 (2015).
- 38 Raychaudhuri, B. *et al.* Interleukin 10 (IL-10)-mediated inhibition of inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Cytokine* **12**, 1348-1355, doi:10.1006/cyto.2000.0721 (2000).
- 39 Seong, G. J. *et al.* Tgf- β -induced interleukin-6 participates in transdifferentiation of human Tenon's fibroblasts to myofibroblasts. *Mol Vis.* **15**, 2123-2128 (2009).
- 40 AM., A. E.-A. *et al.* Immunopathogenesis of conjunctival scarring in trachoma. *Eye* **12**, 453-460 (1998).
- 41 Kechagia, J. Z., Ezra, D. G., Burton, M. J. & Bailly, M. Fibroblasts profiling in scarring trachoma identifies IL-6 as a functional component of a fibroblast-macrophage pro-fibrotic and pro-inflammatory feedback loop. *Sci Rep* **6**, 28261, doi:10.1038/srep28261 (2016).
- 42 Epstein, S. P., Chen, D. & Asbell, P. A. Evaluation of biomarkers of inflammation in response to benzalkonium chloride on corneal and conjunctival epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther* **25**, 415-424, doi:10.1089/jop.2008.0140 (2009).