

ヒアルロン酸の角膜実質細胞増殖能に及ぼす影響

細見 雅美, 片上千加子, 山本 節

神戸大学医学部眼科学教室

要 約

我々は、すでに家兎角膜穿孔創部の創傷治癒過程において、創部の活性化された角膜実質細胞(KC)の浸潤部位に一致してヒアルロン酸(HA)が出現することを報告し、HAがKCの増殖に関与している可能性を示唆した。今回はHAの角膜実質細胞増殖動態に及ぼす影響を調べる目的で、家兎角膜穿孔創に対するHAの点眼実験とHA添加のもとでのKCの培養実験とを行い、³H-チミジンオートラジオグラフィによりKCの細胞増殖能について検討した。点眼実験では、穿孔創部周囲の角膜実質に³H-チミジンを取り込んだKCが集積し、活発な細胞

増殖が認められ、HA点眼群では、対照群に比し取り込み細胞数が有意に増加していた。培養KCにおいてもHA添加群では細胞増殖が促進されていた。以上の結果から、HAが角膜実質細胞増殖促進作用を有することが明らかとなり、HAは角膜上皮のみならず、角膜実質の創傷治癒を促進する可能性が示唆された。(日眼会誌 100: 448-452, 1996)

キーワード：ヒアルロン酸, 角膜実質細胞, 角膜実質創傷治癒, オートラジオグラフィ, 細胞増殖

The Effect of Hyaluronic Acid on Keratocyte Proliferation

Masami Hosomi, Chikako Katakami and Misao Yamamoto

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kobe University

Abstract

Our previous study demonstrated that during healing of penetrating corneal incision, hyaluronic acid (HA) appears at the wound area with massive infiltration of activated keratocytes, suggesting a possible role of HA in keratocyte proliferation. In the present study, we investigated the effect of HA on keratocyte proliferation. A penetrating incision was made in the center of rabbit corneas. Wounded corneas were treated with HA eye drops or physiological saline every 2 hours for 24 hours. Then the corneas were excised, labeled with ³H-thymidine for 4 hours, and subjected to autoradiography. Rabbit keratocytes were cultured in chamber slides in TC199 medium alone or in TC199 containing HA for 24 hours, labeled with ³H-thymidine for 4 hours, and

subjected to autoradiography. In the corneas treated with HA, the number of keratocytes incorporating ³H-thymidine was significantly higher than in the control corneas. The rate of ³H-thymidine uptake in keratocytes cultured with any concentration of HA was higher than that of the control. Both *in vivo* and *in vitro* studies demonstrated stimulatory effect of HA on keratocyte proliferation. It is possible that HA might promote corneal stromal wound healing by stimulating keratocyte proliferation. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 448-452, 1996)

Key words: Hyaluronic acid, Keratocyte, Corneal stromal wound healing, Autoradiography, Keratocyte proliferation

I 緒 言

ヒアルロン酸(HA)は生体の細胞外マトリックスの重要な構成成分であるグリコサミノグリカンの一つで、組織の発達や分化、創傷治癒過程などの生体の種々の現象において、重要な役割を果たしていることが明らかと

なっている^{1)~4)}。

眼科領域においては、以前からHAの粘弾性と角膜内皮細胞保護作用⁵⁾を応用して、白内障手術、角膜移植手術をはじめとする内眼手術に広く利用されている⁶⁾⁷⁾が、近年、点眼薬としても応用され、優れた保水作用を有することからドライアイ患者の角膜上皮障害治療薬として試み

別刷請求先：650 兵庫県神戸市中央区楠町7-5-2 神戸大学医学部眼科学教室 細見 雅美
(平成7年8月25日受付, 平成8年1月30日改訂受理)

Reprint requests to: Masami Hosomi, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kobe University,
7-5-2 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo-ken 650, Japan

(Received August 25, 1995 and accepted in revised form January 30, 1990)

られ、有効性が報告^{9)~10)}されている。我々はこれまでにHAが角膜上皮創傷治癒を促進すること¹¹⁾、およびその作用機序の一つとして、HAの角膜上皮細胞増殖促進作用¹²⁾を明らかにし、また、創傷角膜上皮におけるHA受容体の発現も明らかにした。これらの結果から、HAはその保水性のみならず、受容体を介した生物学的作用をもって角膜上皮創傷治癒を促進している可能性が示唆された。

一方、我々は家兎角膜穿孔創の治癒過程において、穿孔創部の活性化角膜実質細胞の浸潤部位に一致してHAが出現することを明らかにし¹³⁾、角膜上皮のみならず、角膜実質の創傷治癒に対してもHAが何らかの役割を果たしている可能性を示唆したが、その作用については未だ不明の点が多い。そこで、今回我々は家兎角膜実質創傷の治癒過程に及ぼすHAの影響を明らかにする目的で、HAの角膜実質細胞増殖に対する作用を*in vivo*, *in vitro*においてepidermal growth factor (EGF)の作用との比較を含めて検討したので報告する。

II 実験方法

実験には成熟白色家兎 (Japanese White, 体重2.5~3.0 kg) 8匹16眼を使用した。

1. 点眼実験

家兎に塩酸ケタミン(ケタラル®、30 mg/kg 筋注)で全身麻酔をかけ、さらに、0.4% 塩酸オキシプロカイン(ベノキシール®)で点眼麻酔を行った後、角膜中央部に尖刃刀で長さ6 mmの穿孔創を作成した。受傷直後から、HA、EGF、または対照として生理食塩水の点眼を2時間ごとに行った。HAは生化学工業から供与された分子量約86万のものを生理食塩水で希釈し、0.25%としたものを、EGFは遺伝子組み換えによって得られたヒトEGF(大塚製薬から供与)を生理食塩水で溶解し、10 µg/mlとしたものをそれぞれ用いた。受傷後24時間に家兎にペントバルビタールナトリウム(ネプタール®)の静脈内致死麻酔を行った後、ただちに強角膜片を摘出した。強角膜片は³H-チミジン(Amersham, 10 µCi/ml)を含むTC 199溶液中で37°C、4時間標識した後、10%ホルムアルデヒドで固定後、パラフィン切片を作成し、オートラジオグラフィーに供した。すなわち、既報¹⁴⁾に準じて暗室内で乳剤(50% Konica NR-M 2, コニカ)に浸したのちに乾燥させ、シリカゲル入りの暗箱の中で4°C、2~3週間露出させた。露出後、フジレンドール(富士フィルム)で現像、フジレンフィクス(富士フィルム)で定着させ、ヘマトキシリン・エオジン染色後、光学顕微鏡下において観察を行った。

2. 培養実験

家兎を上述の方法で致死麻酔後角膜を摘出し、上皮および内皮を剝離除去した後、コラゲナーゼ(Sigma)消化により角膜実質細胞を採取し、5%ウシ胎児血清添加

TC 199で培養した。3代目培養細胞を16穴チェンバースライドに0.5×10⁴細胞/穴播種し、無血清の環境において3日間培養した。Sub-confluentの状態ではHA(100, 400, 1,000 µg/ml)またはEGF(10, 30 ng/ml)を添加して24時間培養し、その後、³H-チミジンで4時間標識した後、カルノア固定液で15分間固定後上述の方法に準じてオートラジオグラフィーに供した。対照としては、HA、EGFを含まないTC 199のみで同様に培養したものをを用いた。

III 結果

1. 点眼実験

いずれの群においても受傷後24時間目の角膜穿孔創部にはフィブリンが出現し、上皮細胞が創部へ伸展しつつある所見が観察された(図1)。穿孔創周囲の角膜実質においては³H-チミジンを取り込んだ角膜実質細胞を多数認め、増殖が活発化している所見がみられた(図2)。HA点眼群、EGF点眼群および対照群の各群4眼16枚の切片において、1切片当たりの³H-チミジン取り込み角膜実質細胞数を計測し、統計学的に検討を加えた結果を表1に示す。HA点眼群では角膜実質細胞による³H-チミジンの取り込みが対照群に比較して有意に増加していた。EGF点眼群においても角膜実質細胞による³H-チミジンの取り込みは、対照群と比較して有意に増加していた。

2. 培養実験

各群の³H-チミジンオートラジオグラフィーの結果を図3~5に示す。各群無作意に選んだ10の顕微鏡視野において、培養角膜実質細胞100個当たりの³H-チミジン取り込み細胞数を計測し、平均したものを比較すると、

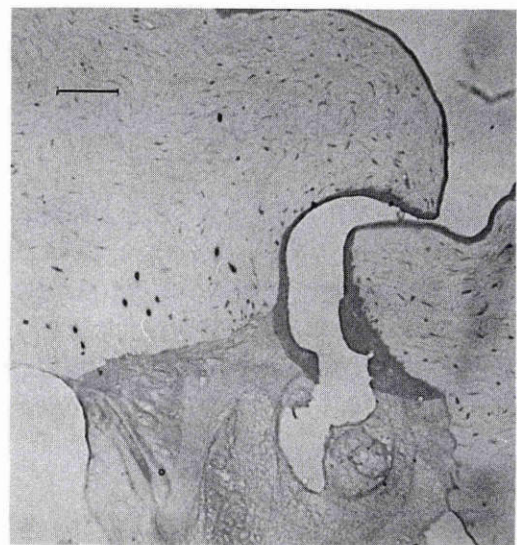


図1 家兎角膜穿孔創(受傷後24時間)の光学顕微鏡写真(ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色)。創部ではフィブリンの出現と上皮細胞の伸展、移動が観察される。バーは50 µm



図2 家兎角膜穿孔創(受傷後24時間)の ^3H -チミジンオートラジオグラフィー(HE染色).

創部付近の実質層において角膜実質細胞による ^3H -チミジンの取り込みが活発に認められた.バーは10 μm

表1

	1切片あたりの ^3H -チミジン取り込み角膜実質細胞数
HA (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	29.8 \pm 1.2*
EGF (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	47.0 \pm 1.6*
対照	21.7 \pm 2.3

HA: ヒアルロン酸 * $p < 0.01$
EGF: epidermal growth factor

HA添加群ではいずれの濃度においても対照群に比して ^3H -チミジンの取り込みが有意に増加していた。 ^3H -チミジンを取り込んだ角膜実質細胞の割合は, HA 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加群において最も多く, 濃度依存性は認められなかった. EGF添加群においても, 同様に角膜実質細胞による ^3H -チミジンの取り込みが促進されているのが観察された(表2).

IV 考 按

細胞外マトリックスが種々の生体反応において重要な役割を果たしていることが最近の研究で明らかになりつつあり¹⁵⁾, 細胞外マトリックスの一つであるHAが組織の発達, 分化, 創傷治癒過程に深く関与していることが明

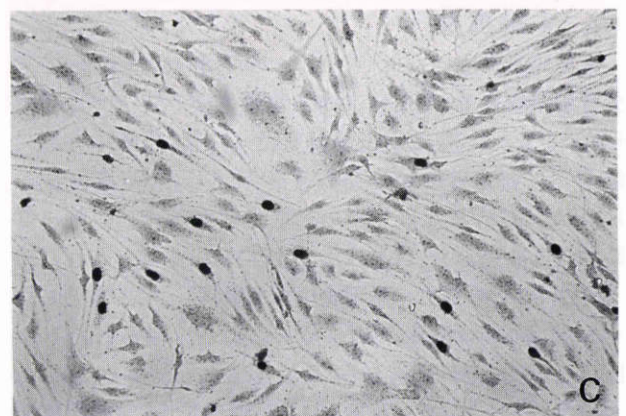
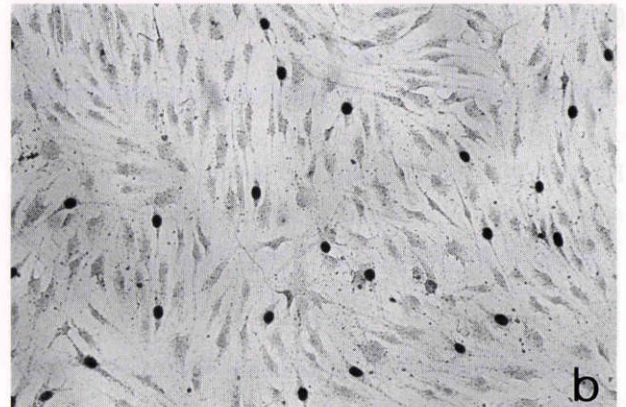
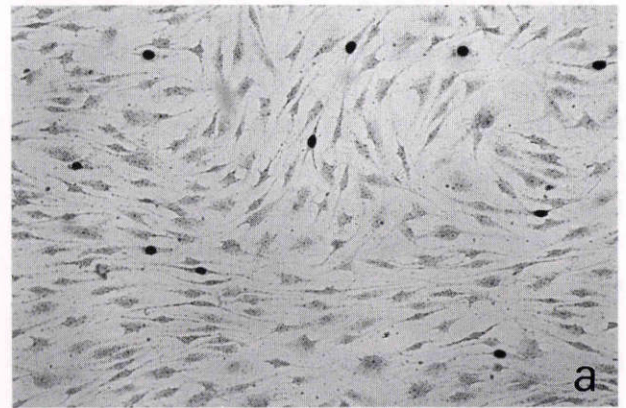


図3 培養家兎角膜実質細胞(ヒアルロン酸(HA)添加群)の ^3H -チミジンオートラジオグラフィー(HE染色).

Hyaluronic acid(HA)濃度. a: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, b: 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, c: 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$

らかになっている¹⁾⁻⁴⁾.

我々は, これまでに角膜上皮創傷治癒過程におけるHAの作用を検討し, 受傷後24時間以内という創傷治癒過程のごく早期においてHAが角膜上皮細胞増殖促進作用を有することを報告¹²⁾した. また, ヒアルロニダーゼ消化試験法を用いて家兎角膜穿孔創におけるHAの局在を調べた結果, 再構築されつつある創部実質にHAが出現してくることが明らかとなり, ヒアルロン酸が角膜実質の創傷治癒過程においても重要な役割を果たしている可能性が明らかとなった.

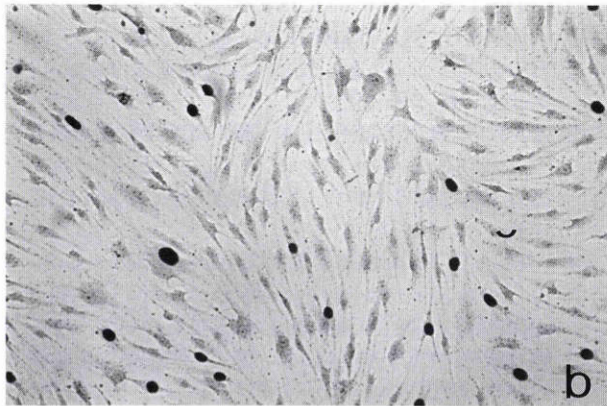
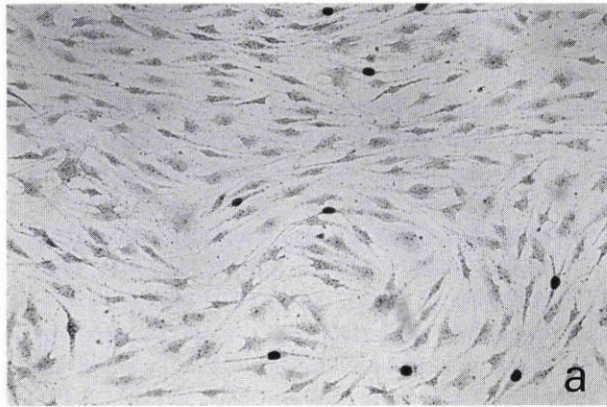


図4 培養家兎角膜実質細胞(epidermal growth factor (EGF)添加群)の³H-チミジンオートラジオグラフィー(HE染色).
EGF濃度. a: 10 ng/ml, b: 30 ng/ml

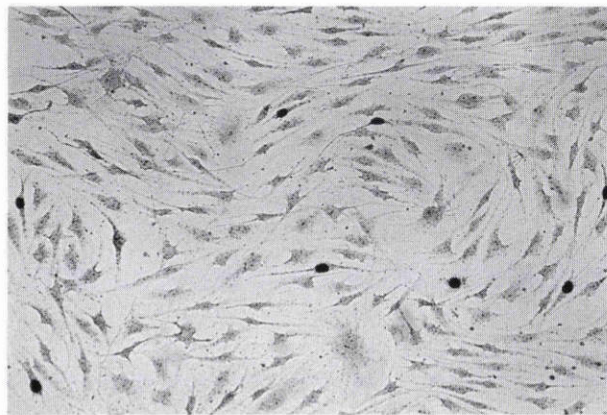


図5 培養家兎角膜実質細胞(対照群)の³H-チミジンオートラジオグラフィー(HE染色).

EGFは、1962年にCohen¹⁶⁾により発見された増殖因子であり、角膜上皮細胞のみならず、角膜実質細胞の増殖を促進することが家兎アルカリ外傷や¹⁷⁾家兎角膜穿孔創を用いた実験¹⁸⁾や、培養角膜実質細胞を用いた研究によって報告されている。今回我々は、角膜実質の創傷治癒過程におけるHAの作用を調べる目的で、HAの角膜実質細胞に及ぼす影響をその細胞増殖動態に焦点を当ててEGFとの比較を含めて検討を行った。その結果、HAの

表2

濃度	³ H-チミジン取り込み角膜実質細胞数 /角膜実質細胞 100 個
HA	
100 μg/ml	8.0±0.7*
400 μg/ml	10.8±1.7*
1,000 μg/ml	8.8±0.5*
EGF	
10 ng/ml	7.4±1.4*
30 ng/ml	9.5±1.4*
対照	5.0±0.8

*p<0.01

点眼により角膜実質細胞の増殖が促進されること、また、培養液にHAを添加すると角膜実質細胞の増殖が促進されることが明らかとなった。

HAの受容体は多くの組織において確認されており、特に、活発に分裂、増殖をしている細胞において受容体の発現が増強しているとの報告¹⁹⁾がある。我々も家兎角膜穿孔創治癒過程において、受傷後早期に角膜上皮にHA受容体が発現することを報告²⁰⁾し、HAが角膜においても受容体を介して細胞に作用を及ぼしている可能性を示唆した。

一方、定常状態(confluent)の培養細胞にHAを添加すると、細胞増殖を再開するという報告²¹⁾があり、細胞の増殖には細胞表面へのHAの結合が必要であると考えられている。HAが角膜創傷治癒のごく早い時期の、通常細胞増殖がまだ開始されていない時期に細胞増殖促進作用を発現することを考えあわせると、角膜創傷治癒過程におけるHAの細胞増殖促進作用はEGFとは異なり、細胞周囲のHAの存在が細胞を増殖状態に導入させることによるものではないかと考えられる。

今回の実験結果から、HAは角膜実質細胞に対しても増殖促進作用を有することが明らかとなり、その増殖促進作用は、HAが細胞周囲の環境を整え、細胞を増殖期に導入することによるものであると推察された。以上から、HAが角膜上皮のみならず、角膜実質の創傷治癒も促進することが考えられ、角膜実質の障害に対する治療薬としてもその効果が期待される。HAの角膜実質細胞に対する作用については、さらなる検討を重ねる必要があると思われる。

文 献

- 1) Toole BP, Underhill CB: Cell interaction and Development. In: Yamada KM (Ed): Molecular Mechanisms. Wiley Interscience, New York, 201-230, 1982.
- 2) Wiegel PH, Frost SJ, McGary CT, LeBoeuf RD: The role of hyaluronic acid in inflammation and wound healing. Int J Tissue React 10: 355-365, 1988.
- 3) Wiegel PH, Fuller GM, LeBoeuf RD: A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the

- early events during the inflammatory response and wound healing. *J Theor Biol* 119: 219—234, 1986.
- 4) **Knudson CB, Tool BP**: Hyaluronate-cell interactions during differentiation of chick embryo limb mesoderm. *Dev Biol* 124: 82—90, 1987.
 - 5) **Graue EL, Polack FM, Balazs EA**: The protective effect of Na-hyaluronate to corneal endothelium. *Exp Eye Res* 31: 119—127, 1980.
 - 6) **Pape LG, Balazs EA**: The use of sodium hyaluronate (Healon®) in human anterior segment surgery. *Ophthalmology* 87: 699—705, 1980.
 - 7) **Miller D, Stegmann R**: Use of sodium hyaluronate in human IOL implantation. *Ann Ophthalmol* 13: 811—815, 1981.
 - 8) **Polack FM, McNiece MT**: The treatment of dry eyes with Na Hyaluronate (Healon®). A preliminary report. *Cornea* 1: 133—136, 1982.
 - 9) 伏見典子, 吉村 久, 崎元 卓, 北野周作: ヒアルロン酸あるいはムチンを主成分とする人工涙液の点眼効果について. *眼科* 31: 747—756, 1989.
 - 10) **Nakamura M, Hikida M, Nakano T, Ito S, Hamano T, Kinoshita S**: Characterization of water retentive properties of hyaluronan. *Cornea* 12: 433—436, 1993.
 - 11) 井上雅美, 片上千加子, 山本 節: ヒアルロン酸の角膜上皮創傷治癒に及ぼす影響. *あたらしい眼科* 10: 1247—1250, 1993.
 - 12) **Inoue M, Katakami C**: The effect of hyaluronic acid on corneal epithelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2313—2315, 1993.
 - 13) 井上雅美, 片上千加子, 山本 節: 角膜創傷治癒過程におけるヒアルロン酸の局在. *眼紀* 4: 847—850, 1992.
 - 14) **Katakami C, Perkins T, Dorfman N, Spaulding AG, Kao WW-Y**: Polymorphonuclear leukocytes inhibit proliferation of epithelial cells of rabbit cornea. *日眼会誌* 92: 798—805, 1988.
 - 15) 畑隆一郎: 細胞外マトリックス系による細胞増殖制御. 細胞増殖因子の基礎と臨床, 蛋白質, 核酸, 酵素, 臨時増刊, 共立出版, 1069—1077, 1991.
 - 16) **Cohen S**: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237: 1555—1562, 1962.
 - 17) 藤沢久美子, 片上千加子, 山本 節: 角膜アルカリ外傷治癒過程における keratocyte の動態について. *日眼会誌* 95: 59—66, 1991.
 - 18) 薄木佳子, 片上千加子, 山本 節: 角膜穿孔創治癒過程における epidermal growth factor (EGF) の角膜実質細胞に及ぼす影響. *日眼会誌* 99: 1209—1213, 1995.
 - 19) **Alho AM, Underhill CB**: The hyaluronate receptor is preferentially expressed on proliferating epithelial cells. *J Cell Biol* 108: 1557—1565, 1989.
 - 20) 細見雅美, 片上千加子, 山本 節: 角膜創傷治癒過程におけるヒアルロン酸レセプターおよび EGF レセプターの局在. 第98回日本眼科学会総会講演抄録集: 157, 1994.
 - 21) **Yoneda M, Yamagata M, Suzuki S, Kimata K**: Hyaluronic acid modulates proliferation of mouse dermal fibroblasts in culture. *J Cell Sci* 90: 265—273, 1988.