In vivo および in vitro での角膜新生血管形成過程における 酸性および塩基性線維芽細胞成長因子の局在

林 信人1),中安 清夫2),沖坂 重邦1)

1)防衛医科大学校眼科学教室,2)順天堂大学医学部眼科学教室

要 約

5 N・NaOH を用いて家兎角膜中央にアルカリ化学腐食を作製し、新生血管を誘導した。3 日・7 日・14 日目に眼球摘出し、角膜新生血管形成過程における a-FGF (acidic fibroblast growth factor)、b-FGF (basic fibroblast growth factor)の局在の変化を免疫組織化学的に観察した。また、家兎角膜実質細胞とウシ副腎皮質由来の毛細血管内皮細胞と共培養することにより誘導された毛細血管様コードに対し、共培養後3日・7日・14日目に a-FGF、b-FGFの局在を免疫組織化学染色的に観察した。アルカリ腐食14日目では角膜実質層に新生血管の形成を認め、その周囲に a-FGF、b-FGFの陽性所見を認め

た.また特に,結膜上皮内の杯細胞には全経過にわたって a-FGF の強い陽性所見を認めた.無処置の正常家兎角膜 における a-FGF は角膜および結膜上皮に陽性所見を認 めた.共培養では7日・14日で培養実質細胞間に誘導さ れた血管様コード周囲に a-FGF, b-FGF 双方の陽性所 見を認めた.(日眼会誌 100:587—591,1996)

キーワード:線維芽細胞成長因子,角膜血管新生,免疫組織化学染色,アルカリ化学腐食,毛細血管様コード

Immunohistochemical Localization of Acidic and Basic Fibroblast Growth Factor through Corneal Neovascularization *In Vivo* and *In Vitro*

Nobuhito Hayashi¹⁾, Kiyoo Nakayasu²⁾ and Sigekuni Okisaka¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, National Defense Medical College ²⁾Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine

Abstract

Neovascularization on the center of rabbit cornea was induced by 5N·NaOH alkali burns. We studied the change in localization of acidic fibroblast growth factor (a-FGF) and basic fibroblast growth factor (b-FGF) through corneal neovascularization with immunohistochemistry, using eyes which we enucleated on the 3 rd, 7 th, and 14 th day. Moreover, by co-cultivation of rabbit corneal stromal cells and adrenal cortical vascular endothelium of bovine, a capillary-like code was induced, in which we also studied the localization of a-FGF and b-FGF on the 3 rd, 7 th, and 14 th day. On the 14 th day after the alkali burn we recognized intrastromal neovascularization and positive staining of a-FGF

and b-FGF around it. Strong staining of a-FGF was observed in goblet cells through the experimental period. In control eyes we recognized positive reaction of a-FGF in corneal and conjunctival epithelium. In co-cultured cells, we recognized positive staining of both a-FGF and b-FGF around the capillary-like code which was induced among the corneal stromal cells. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 587—591, 1996)

Key words: Fibroblast growth factor, Corneal neovascularization, Immunohisto-chemistry, Alkali burn, The code like capillary

I 緒 言

線維芽細胞成長因子(fibroblast growth factor, FGF)

は現在9つのタイプに分類されており、FGFファミリーと呼ばれる1つのポリペプチド群を作っている。このうち、最も古くから知られている酸性および塩基性 FGF

別刷請求先:504 岐阜県各務原市那加官有無番地 自衛隊岐阜病院眼科 林 信人 (平成7年11月17日受付,平成8年3月21日改訂受理)

Reprint requests to: Nobuhito Hayashi, M.D. Eye Clinic, Self Defense Forces Gifu Hospital. Mubanchi Kanyu Naka, Kakamigahara-shi, Gifu-ken 504, Japan

(Received November 17, 1995 and accepted in revised form March 21, 1996)

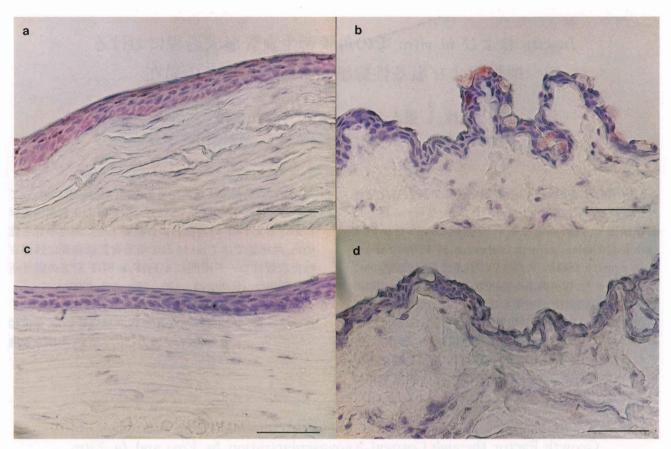


図1 無処置の家兎角膜および結膜の FGF 染色所見.

a:角膜上皮層, 特に表層付近に a-FGF の陽性所見を認める。b:結膜では上皮層の杯細胞を中心として a-FGF の陽性所見を認める。c:b-FGF では角膜上皮には陽性所見を認めない。d:結膜上皮には b-FGF 陽性 所見を認めない。いずれもバーは 50 μ m, a-FGF:acidic fibroblast growth factor, b-FGF:basic fibroblast growth factor

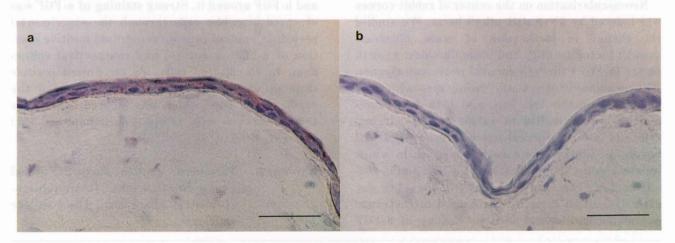


図2 アルカリ腐食後3日目角膜の FGF 染色所見.

a:a-FGF は角膜上皮に陽性所見を認める。b:b-FGF は陽性所見を認めない。いずれもバーは $50~\mu m$

(以下, a-FGF, b-FGF) はともに強力な血管新生促進物質と考えられており¹⁾²⁾, その構造や生体内での局在について様々な研究がなされ,多くの事実が明らかになりつつある²⁾. しかし, 眼球内での a-FGF および b-FGF の局在を論じた報告は比較的少ないものの, 角膜・網膜・前房水中などでその局在が確認されている. 角膜における FGF

に関するこれまでの報告は、主に創傷治癒の促進因子としての観点から論じられたものが多い。FGFが強い血管新生促進因子でありながら、角膜の血管新生過程におけるFGFの動態、役割についての報告は我々の知る限り数編にすぎない³³⁴⁾。角膜血管新生は角膜混濁を来し、視力低下の重要な原因の一つである。血管新生促進物質で

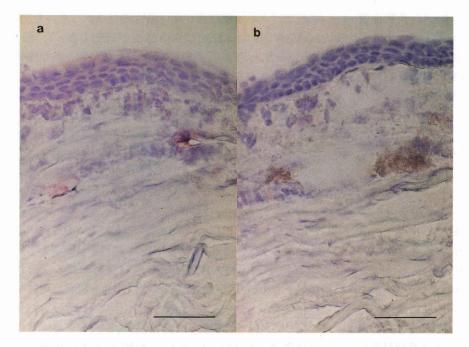


図3 アルカリ腐食後14日目角膜の FGF染色所見.

a:a-FGF は角膜実質浅層にできてきた新生血管と角膜上皮に陽性所見を認めるが、上皮の陽性所見はやや弱くなっている。b:b-FGF は実質浅層の新生血管に陽性所見を示すのみである。いずれもバーは50 μm

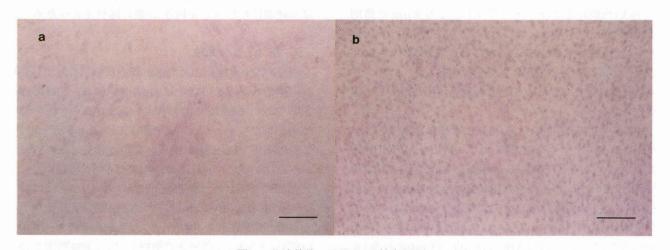


図4 共培養後3日目FGF染色所見.

a-FGF(a) • b-FGF(b) ともにまだ毛細血管様コードがはっきりしておらず、陽性所見の局在が判然としない。 いずれもバーは 200 μ m

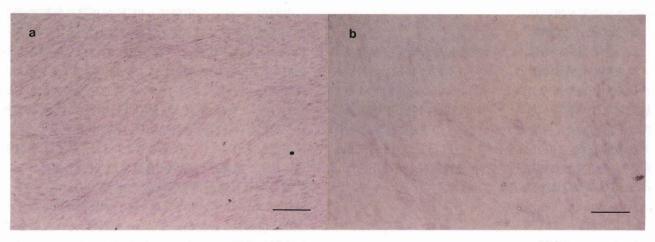


図5 共培養後14日目FGF染色所見.

 $a ext{-}FGF(a) ext{-}b ext{-}FGF(b)$ とも毛細血管様コードに沿って陽性所見を認める。毛細血管様コードのない実質細胞上には $a ext{-}FGF, b ext{-}FGF$ ともに弱い陽性所見が観察される。いずれもバーは 200 μ m

ある FGF の角膜における局在を知ることは,角膜血管 新生を臨床的に調節しようとする試みの第一歩と考えら れる.今回,我々は in vivo および in vitro の角膜新生血 管モデルを用い,その過程における FGF の経時的変化 を免疫組織学的検索に観察し,若干の知見を得たので報 告する.

II 実験方法

1. In vivo の実験

白色家兎の耳静脈からペントバルビタールナトリウム (ネンブタール®)を静注して麻酔した後,塩酸オキシブプロカイン(ベノキシール®)で点眼麻酔し、5 規定の水酸化ナトリウムを含ませた直径 7 mm の濾紙を角膜中央に 10 秒間のせ,アルカリ化学腐食を作製し,新生血管を誘導した。3 日・7 日・14 日目に眼球摘出し,ザンボニ液で 1 時間 $(4^{\circ}C)$ 固定した後,眼球を赤道部において半割し,後面から虹彩毛様体・水晶体をはずして輪部強角膜を含む角膜片を作製し,OCT コンパウンドで凍結保存した。凍結角膜片をクライオスタットにより 8 μ m に薄切し,ゼラチンコーティングしたスライドグラスにのせた。その後,角膜新生血管形成過程における a-FGF,b-FGFの局在の変化を免疫組織化学染色で観察した。また,アルカリ腐食を行わなかった無処置の家兎角膜についても観察した。

免疫染色は風乾の後、3%過酸化水素により内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止し、マウス抗ヒト a-FGF 抗体 およびマウス抗ヒト b-FGF 抗体を一次抗体として 60分 反応させ(いずれの抗体も武田薬品から供与されたものを用いた。その精度などはすでに報告560されている)、二次抗体はウマビオチン化抗マウス抗体(Vector 社製)を30分反応させ、さらに、ABC complex (Vector 社製)を30分 同反応させた後、aminoethylcarbazole (AEC、Vector 社製)で発色させ、ヘマトキシリンで核染色を行った。なお、染色時の対照としては一次抗体の代わりに正常ウマ血清を用いた。

2. In vitro の実験

In vitro の実験では、すでに報告した角膜新生血管モデルを用いた⁷. すなわち、チャンバースライド上であらかじめ白色家兎角膜の第5~第10代培養実質細胞を重層化するまで培養した後、ウシ副腎皮質由来の毛細血管内皮細胞を加えて共培養することにより毛細血管様コードを誘導した. 共培養後3日・7日・14日目にa-FGF、b-FGFの局在を免疫組織化学染色で観察した. 免疫染色はin vivo の実験と同様の方法で行った.

III 結 果

1. In vivo の実験

無処置の正常家兎角膜における a-FGF の局在は, 角膜および結膜上皮に陽性所見を認めた. 角膜上皮層では, 特

に表層付近の上皮細胞が強い陽性所見を示していた。ま た,結膜上皮では杯細胞の染色性が著明であった(図1 a,b).一方,b-FGF は角膜・結膜においては明らかな陽性 所見はいずれの層においても認めなかった(図1c,d). アルカリ腐食角膜では、3日目でa-FGF の角結膜上皮層 内での陽性所見は確認できた(図2)ものの,b-FGF に対 する陽性所見は認められなかった.7日目においては,ア ルカリによる障害が強い角膜中央部の上皮層に再生され ていない欠損部分があり、a-FGF、b-FGFとも陽性所見 を確認できなかった。14日目になると、上皮層はほとん ど再生されており,比較的上皮に近い実質前層に新生血 管の形成が認められた。その血管周囲,恐らく血管内皮細 胞であろう部分に a-FGF, b-FGF の陽性所見が認められ た.a-FGFの上皮内陽性所見は再び認められるように なったものの,正常およびアルカリ腐食後初期の角膜上 皮に比べると,やや弱くなっていた(図3).また,全経過 を通じて角膜実質細胞上には a-FGF, b-FGF とも陽性所 見は確認できなかった。しかし、結膜上皮、特に杯細胞に は全経過にわたって a-FGF の強い陽性所見が認められ た.

2. In vitroの実験

培養角膜実質細胞上に毛細血管内皮細胞を添加し共培養を開始した後3日目では、毛細血管様コードの形成が未熟であり、倒立顕微鏡を用いた観察でコード様の所見は確認できなかった。この時期のa-FGF,b-FGFに対する免疫染色では、ともに明らかな陽性所見は認められなかった(図4)。しかし、7日・14日と時間が経過するにつれ毛細血管様コードが形成・進展されると、それに伴いコード周囲にa-FGF,b-FGF双方の陽性所見が出現してくるのが観察された(図5)。また、毛細血管様コードのない部分、すなわち、角膜実質細胞上には、実験期間を通じてa-FGF,b-FGFともに弱い陽性所見が認められた。

IV 考 按

今回の in vivo の実験でa-FGF が正常の角膜や結膜上皮層に局在していることが確認されたが、この結果はBaudouin ら⁸⁾の報告と一致していた。ただ、角膜上皮層においては比較的表層部分により強い陽性所見が認められていた。これは上皮層の分化と何らかの関係があるかも知れない。また、結膜上皮層では杯細胞に著明な陽性所見を認めた。結膜杯細胞が a-FGF の産生細胞の1つである可能性を示している所見と考えられた。しかし、杯細胞内にはムコ多糖類が多量に含有されており、抗体がムコ多糖に吸着し偽陽性を呈したとも考えられる。今後、a-FGF の mRNA に対する in situ hybridization などでさらに検討する必要があるものと思われた。一方、b-FGFの正常角膜内の局在について、Folkmannら⁹⁾は、培養ウシ角膜内皮細胞を用いた実験から角膜内皮細胞がb-FGFを産生・分泌し、それらをデスメ膜のヘパラン硫酸

がトッラプし,潜在型のb-FGFとして蓄積しているので はないかと報告している。また、Wilson ら10)11)は、家兎お よびヒトの角膜上皮細胞は培養細胞のみならず, in vivo においても b-FGF をコードする mRNA を発現してい ることを polymerase chain reaction(PCR)法を用いて 証明している。一方, Noji ら³)は in situ hybridization の 手法を用いた実験で,正常ラット角膜には上皮細胞・実質 細胞・内皮細胞のいずれにおいても b-FGF の発現は全く 認めなかったと述べている。今回の我々の実験でも,正常 家兎角膜に b-FGF は全く同定されなかった。恐らく,正 常家兎角膜上皮細胞には,免疫組織化学や in situ hybridization 法のような組織学的方法では同定できず, PCR 法との感度の差が上述の各実験結果の不一致の原 因であろうと考えられた.In vivo における角膜実質細 胞には a-FGF, b-FGF のいずれも同定されなかったにも かかわらず,培養された実質細胞ではごく弱いながらも 両者ともに陽性所見が観察された。Wilson ら10)11)の報告 でも初代培養ヒト角膜実質細胞がb-FGFの mRNA を 発現していることを示している.したがって,少なくとも 培養した角膜実質細胞には b-FGF 産生能が存在すると 結論された.

家兎角膜にアルカリ腐食を作製し,新生血管を誘導し た in vivo の実験において, a-FGF, b-FGF はともに角膜 実質内新生血管の伸展に伴い,その周囲に局在の増強を 認めた。また、in vitro の実験においても、角膜実質細胞 と血管内皮細胞の共培養3日目の陽性所見はごく弱いも のであったのに対し、7日目、14日目と毛細血管様コー ドが明瞭になるにつれて a-FGF, b-FGF ともにコードに 沿って増強した。これらの所見は,恐らく血管内皮細胞が コード状に分化した後に、a-FGF および b-FGF の産生 能を獲得したことを示していると思われた.したがって, in vivo においても、また我々の in vitro の実験系におい ても,角膜新生血管の伸展には血管内皮細胞が産生・分泌 した a-FGF, b-FGF が autocrine に血管内皮細胞自身に 作用していることが重要ではないかと思われた。また,無 処置の正常状態の角膜上皮層に局在していた a-FGF は アルカリ腐食後,新生血管の角膜侵入の時期にはやや低 下していた.このことは、アルカリ腐食後に再生された上 皮細胞が未だ未熟であり、a-FGFの産生が少ないためな のか、また、上皮細胞内の a-FGF が新生血管の発生およ び伸展に動員されたため減少したとも考えられた.しか し,正常の角膜上皮細胞に局在している a-FGF が,どの ような条件下で分泌され,活性化されるのか,その一次的 な誘因については今回の実験から全く推測することはで きなかった。a-FGFもb-FGFも分泌のためのシグナル ペプチドを欠いており、その分泌のメカニズムは全く不 明のままである。また、生体における角膜血管新生には FGF以外, 涙液内に局在する EGF (epidermal growth

factor),角膜上皮細胞,実質細胞および実質内に遊走した炎症細胞から分泌されるプロテアーゼ類, TGF (transforming growth factor)- β , IL (interleukin)-1, 2, 6, TNF (tumor necrosis factor)- α , β , PDGF (plateletderived growth factor)やプラスミノーゲンアクチベーターなど種々の要因が関与しているものと考えられる 12 . FGF は生体における角膜血管新生に関し,これら様々な因子の一つにしかすぎないことを最後に付記しておきたい.

文 献

- 1) **岡部哲郎**:血管内皮細胞増殖因子(VEGF)。臨床免疫 22:1687—1693,1990.
- 2) 坪井良治,小川秀興:線維芽細胞増殖因子(ヘパリン 結合性成長因子)。臨床免疫 22:1537-1543,1990.
- 3) Noji S, Matsuo T, Koyama E, Yamaai T, Nohno T, Matsuo N, et al: Expression pattern of acidic and basic fibroblast growth factor genes in adult rat eyes. Biochem Biophys Res Commun 168: 343—349,1990.
- 4) Assouline M, Hutchinson C, Morton K, Mascarelli F, Jeanny JC, Fayein A, et al: *In vivo* binding of topically applied human FGF on rabbit corneal epithelial wound. Growth Factors 1: 751, 1989.
- 5) Ichimori Y, Kinoshita Y, Watanabe T, Seno M, Kondo K: Establishment of monoclonal antibodies against human acidic fibroblast growth factor. Biochem Biophys Res Commun 175: 291—297, 1991.
- 6) Seno M, Iwane M, Sasada R, Moriya N, Kurokawa T, Igarashi K: Monoclonal antibodies against human basic fibroblast growth factor. Hybridoma 8: 209-221, 1989.
- 7) 中安清夫, 林 信人, 佐藤 昇, 沖坂重邦: 培養角膜 実質細胞は, 血管内皮細胞が毛細血管様構造物を形 成するよう誘導する. 日眼会誌 96:695-701, 1992.
- 8) Baudouin C, Fredj-Reygrobellet D, Caruelle JP, Barritault D, Gastaud P, Lapalus P: Acidic fibroblast growth factor distribution in normal human eye and possible implications in ocular pathogenesis. Ophthalmic Res 22: 73—81, 1990.
- 9) Folkmann J, Klagsburn M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodavsky I, et al: Storage of a heparin-binding angiogenic factor in the cornea. A new mechanism for corneal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci 28: 230, 1987.
- 10) Wilson SE, He Y-G, Lloyd SA: EGF, basic FGF and TGF beta messenger RNA production in rabbit corneal epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 33: 1987—1995, 1992.
- 11) Wilson SE, He Y-G, Lloyd SA: EGF, EGF receptor, basic FGF, TGF beta-1 and IL-1 alpha mRNA in human corneal epithelial cells and stromal fibroblasts. Invest Ophthalmol Vis Sci 33: 1756—1765, 1992.
- 12) 中安清夫:角膜新生血管の病理. あたらしい眼科 12:12-20,1995.