

ヒト眼の線維柱帯における蛋白分解酵素抑制因子の発現

福地 健郎, 沢口 昭一, 羽入 貴子, 阿部 春樹

新潟大学医学部眼科学教室

要 約

ヒト眼の線維柱帯における蛋白分解酵素抑制因子の分布と遺伝子発現について、免疫組織化学染色、*in situ* hybridization 法、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて検出した。免疫組織化学染色によって α 1-プロテイナーゼインヒビター (PI), α 1-アンチキモトリプシン (ACT), α 2-マクログロブリン (MG) のいずれもが線維柱帯に分布し、特にぶどう膜網で強く発現していることが明らかとなった。*In situ* hybridization 法では、軽度であるが線維柱帯のビームをとりまく線維柱帯細胞などに陽性と考えられる感光銀粒子の集積を認めた。ただし、部位特異性、細胞選択性などは明らかにできなかった。ヒト眼の培養線維柱帯細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR 法を行ったところ、PI, ACT, MG に加えて、アンチトロンビン (AT), プラスミノゲンアクチベーターインヒビター

-1 (PAI-1) のメッセンジャーRNA (mRNA) の発現が検出された。線維柱帯においても、角膜や毛様体と同様にいくつかの蛋白分解酵素抑制因子が分布し、それらはおそらく少なくとも一部は線維柱帯に分布する局所の細胞によって産生されていることが明らかとなった。線維柱帯における蛋白分解酵素と、その抑制因子のバランスは房水流出路の恒常性の維持に重要と考えられ、各種緑内障における役割が注目される。(日眼会誌 101: 265-271, 1997)

キーワード：線維柱帯, 蛋白分解酵素抑制因子, 免疫組織化学, *In situ* hybridization, Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

Expression of Proteinase Inhibitors in the Human Trabecular Meshwork

Takeo Fukuchi, Shoichi Sawaguchi, Takako Hanyuu
and Haruki Abe

Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine

Abstract

We examined the distribution and expression of three proteinase inhibitors, α 1-proteinase inhibitor (α 1-PI), α 1-antichymotrypsin (α 1-ACT), and α 2-macroglobulin (α 2-M) in the human trabecular meshwork. Immunohistochemistry, *in situ* hybridization, and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were used. By immunostaining, all three inhibitors were identified in the human trabecular meshwork with enhanced staining in the uveal meshwork. *In situ* hybridization showed mild but positive accumulation of the silver grains on the trabecular meshwork cells, which indicates mRNA expression. Specific distribution or cell selectivity were not detectable probably due to weak expression of these inhibitors in this tissue. Instead mRNAs for α 1-PI, α 1-ACT, and α 2-M as well as antithrombin III, plasminogen activator inhibitor-1 could be

identified by RT-PCR using trabecular meshwork culture cells. In this study, we concluded that some proteinase inhibitors were distributed in the human trabecular meshwork as well as in the cornea and the ciliary body. At least part of these were probably produced by the trabecular meshwork cells. The balance between proteinases and proteinase inhibitors might play an important role even in the human trabecular meshwork to maintain the outflow route. The alterations in the primary or secondary glaucomatous eyes are curious. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 265-271, 1997)

Key words: Trabecular meshwork, Proteinase inhibitor, Immunohistochemistry, *In situ* hybridization, Reverse transcription-polymerase chain reaction

別刷請求先：951 新潟県新潟市旭町通1-757 新潟大学医学部眼科学教室 福地 健郎

(平成8年7月15日受付, 平成8年10月24日改訂受理)

Reprint requests to: Takeo Fukuchi, M.D. Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine, 1-757 Asahi-machi, Niigata-shi, Niigata-ken 951, Japan

(Received July 15, 1996 and accepted in revised form October 24, 1996)

I 緒 言

組織の維持,炎症,傷害,修復などの組織現象の際に,蛋白分解酵素とその抑制因子の微妙で,かつ動的なバランスによる調節は極めて重要な要素^{1)~3)}で,近年,眼組織においてもその重要性が改めて認識されてきている.その代表的な例として,マトリクスメタロプロテナーゼ(matrix metalloproteinase, MMP)と,そのインヒビター(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)による細胞外マトリックスの調節があり,基礎研究の分野と同様,眼科領域でも注目されている^{4)~7)}.一方,血清中の蛋白分解酵素と,その抑制因子の存在は古くから知られており,血液凝固,溶血などの調節だけでなく,局所における組織の調節にも重要な役割を果たしていると考えられている^{8)~10)}.さらに,これらの分子は決して部位特異的なものでなく,多くの細胞で産生されていること,また,いくつかの分子に関しては眼組織にも分布,発現していることが明らかにされている^{11)~15)}.

一方,線維柱帯¹⁶⁾¹⁷⁾は前房隅角に局在し,コラーゲン線維,弾性線維様物質,さらに基質成分などを含むシート状の層状構造によって構成されている.線維柱帯は房水の流出の調節に働いており,この組織の様々な異常,また,正常機能の維持機構の失調が各種緑内障の際の眼圧上昇に密接に関与していると推定されている.この組織の層状構造の表面は,線維柱帯細胞が不規則に覆っており,この細胞が正常眼における房水流出システムの維持に特殊な役割を果たしていると考えられている.この細胞は貪食能を持ち,代謝酵素の分泌や細胞外マトリックスの産生を行っている.眼圧という要素を介して間接的に眼球の正常環境の維持に働いている線維柱帯にとって,局所的にも組織の形態,機能の維持は重要な問題である.したがって,蛋白分解酵素とその抑制因子による調節は,おそらくこの組織においても非常に重要な要素として働いていることが推定される.近年,この組織における MMP の存在,機能に関する研究⁴⁾が散見されるのに対して,蛋白分解酵素を含むライソゾーム酵素,その抑制因子に関する研究は Sawaguchi ら¹⁸⁾の報告など,ごくわずかである.そこで,本研究では免疫組織化学的方法,さらに *in situ* hybridization 法, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて,ヒト眼の線維柱帯におけるいくつかの蛋白分解酵素抑制因子の分布と遺伝子発現について検討した.

II 対象と方法

免疫組織化学および *in situ* hybridization による実験には,正常ヒト眼 10 例 10 眼(17~92 歳)を用いた.眼球は米国,イリノイ眼球銀行(Chicago, 米国)から提供された.いずれの眼球も死後 36 時間以内に処理された.角膜,線維柱帯を含む前眼部を切り出し,10% 緩衝ホルマリン

で一昼夜固定し,型のごとくパラフィン包埋した.厚さ 5 μm の切片を作製した.なお,この研究は米国シカゴ,イリノイ大学眼科において行われた.

1. 免疫組織化学

免疫組織化学染色の方法は既報¹⁸⁾に従った.切片は脱パラフィン,再水化,0.01 M PBS(phosphate buffer saline, pH 7.2)で洗浄した後に,3% 過酸化水素で 15 分間処理した.以後,洗浄には 0.01 M PBS を用いた.10% 正常ウサギ血清を 30 分間,続いて一次抗体を 90 分間作用させた.一次抗体は,ウサギ抗ヒト α 1-プロテイナーゼインヒビター(PI)抗体,ウサギ抗ヒト α 1-アンチキモトリプシン(ACT)抗体,ウサギ抗ヒト α 2-マクログロブリン(MG)抗体(いずれも DAKO 社, Carpenteria, 米国)を 1:100 に希釈して用いた.陰性対照として,正常ウサギ IgG を用いた.続いて二次抗体としてビオチン化抗ウサギ IgG 抗体(1:250),さらに,アビジン化ペルオキシダーゼ(VECTASTAIN ABC KIT, Vector, Burlingame, 米国)をとともに 45 分間作用させた.発色にはジアミノベンチジン(DAB, Sigma, St Louis, 米国)を用いた.エタノール系列で脱水,キシレンに透徹し,プリマウント(Fisher, Itasca, 米国)で封入し,光学顕微鏡で観察した.

2. *In situ* hybridization

各抑制因子のメッセンジャーRNA(mRNA)を検出するために,*in situ* hybridization を行った.その方法は既報¹³⁾¹⁵⁾に従った.脱パラフィン,再水化,ジエチルピロカルボン酸(DEPC, Sigma)で処理した 0.01 M PBS (DEPC-PBS, pH 7.4)で洗浄の後,プロテイナーゼ K (10 mg/ml, 緩衝液は 0.05 M トリス塩酸/0.01 M EDTA, Boehringer Mannheim, Indianapolis, 米国)を 15 分間作用させた.次に,4% パラフォルムアルデヒド/DEPC-PBS で 15 分間後固定を行い,さらに,3% グリシン/DEPC-PBS で洗浄した.アセチル化を 0.25% 無水酢酸/100 mM 塩酸トリエタノールアミン(pH 8.0, いずれも Sigma)で 10 分間行った.切片は 2 \times SSC で洗浄し,脱水,風乾し,バキュームデシケーター内に入れ,冷室内で保管した.

プローブには cDNA クローンである phAT 85(PI, 1.4 KB)¹⁹⁾, phACT 235(ACT, 1.0 KB)²⁰⁾, pha 2 m 1(MG, 2.1 KB)²¹⁾(いずれも American type culture collection, Rockville, 米国)を用い,PI に対しては³H-dATP(ICN, Irvin, 米国)を,ACT, MG に対しては³³P-dATP(DuPontNEN, Boston, 米国)を, multiprime DNA labelling system(Amersham, Arlington Heights, 米国)によるランダムプライム法によってラベルした.プローブ(いずれも 2 \times 10⁶cpm/ml)をハイブリダイゼーション溶液とともに,各 30 μl ずつ切片にのせ,滅菌したシリコンコートカバーガラスをかぶせた.ハイブリダイゼーションは 45°C で,16 時間行った.

洗浄は0.5×SSC/1 mM EDTA(室温), DNA洗浄液(50% フォルマミド, 0.15 M 塩化ナトリウム, 0.5 mM EDTA, 5mM トリス塩酸pH 7.4, 室温), 0.5×SSC(55°C), 0.2×SSC(55°C), 0.2×SSC(室温)の順で行った. 切片はS1ヌクレアーゼ(960 U/ml, Sigma)で処理し, 0.05% トリトン X-100/0.5×SSC(室温)で洗浄し, エタノール系列で脱水, 風乾し, バキュームデシケーター内に入れ, 再度, 冷室内で保管した.

組織オートラジオグラフィのために50% Kodak NTB-2 乳剤(IBM, New Haven, 米国)をコートし, 冷暗室内で保管した. PIの実験では45日後に, ACT, MGの実験では21日後に現像を行った. 最後にヘマトキシリン(Sigma)で対比染色をし, プリマウントで封入し, 光学顕微鏡の明視野下, 暗視野下, さらに位相差顕微鏡下で観察した.

3. RT-PCR

別なドナー3眼の線維柱帯細胞を既報に従って型のごとく細胞培養した²²⁾. 第二継代の細胞をコンフルエントの状態(約 1×10^6 個)でtotal RNAを抽出した. RNAの

抽出にはTRI REAGENT(Molecular Research Center, Cincinnati, 米国)を用いた. RT-PCRにはGeneAmp RNA PCR kit(Prrkin Elmer, Norwalk, 米国)を用いた. mRNAから相捕的DNA(cDNA)への逆転写のプライマーとして, キットに含まれているランダムヘキソマーを用いた. それぞれの分子に対するPCRのためのプライマーはOligo 4.0(National Biosciences, Plymouth, 米国)を用いてシーケンスを決定し, DNA synthesizer(Pharmacia)で作製した. この実験で検出した蛋白分解抑制因子はPI, ACT, MG, さらにアンチトロピンIII(AT), プラスミノゲンアクチベーター-1(PAI)の5つである. RT-PCRの反応は, Programmed Thermal Controller(MJ Research, 米国)を用いて行った. 逆転写は37°C—60分, 95°C—10分, 15°C—5分で行った. また, PCRは95°C—2分を1サイクル, 95°C—45秒, 60°C—45秒, 72°C—2分を30サイクル, 72°C—10分を1サイクルで行い, 10°Cで保管した. 増幅されたDNAは1%アガロースゲルで電気泳動し, 紫外線下で確認した. また, それぞれのDNAを制限酵素で切

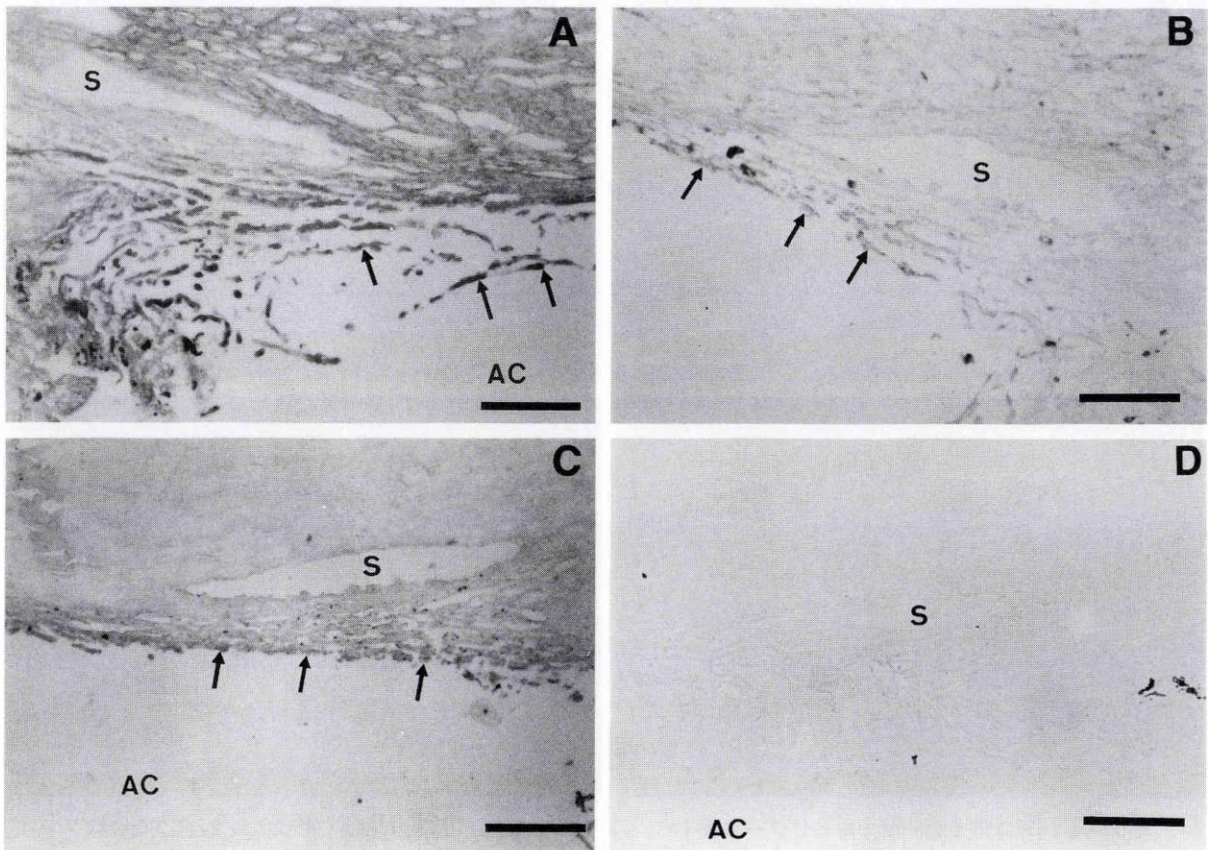


図1 α 1-プロテイナーゼインヒビター(PI)(A), α 1-アンチキモトリプシン(ACT)(B), α 2-マクログロブリン(MG)(C)に対する免疫組織化学染色. Dに陰性対照を示す. いずれもバーは100 μ m.

A: PIに対する免疫染色は線維柱帯では, ぶどう膜網で最も強く認められた(矢印). 角強膜網, 内皮網, シュレム管内, 外壁での染色はわずかであった. B: ACTはわずかだが染色が認められ, PIと同様にぶどう膜網で最も明らかであった(矢印). C: MGに対する染色は, 線維柱帯全体にびまん性に認められたが, やはりぶどう膜網で最も強かった(矢印). D: 正常ウサギIgGを作用させた陰性対照では有意な染色は認められなかった.

いずれもS: シュレム管, AC: 前房

断し、予想された核酸配列が増幅されたことを確認した。増幅されるべき cDNA のサイズと、制限酵素によって切断されるサイズは以下のものである。 α 1-プロテアーゼインヒビターは 275 bp で Hinc II によって 109/148 bp, α 1-アンチキモトリプシンは 735 bp で Ban I によって 348/387 bp, α 2-マクログロブリンは 619 bp で Hinc II によって 90/185 bp, プラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1 は 256 bp で Hinc II によって 109/148 bp, アンチトロンビン III は 503 bp で Sac I によって 379/124 bp である。

III 結 果

1. 免疫組織化学染色(図 1)

ヒト眼の線維柱帯は、組織学的に前房側から大きく①ぶどう膜網、②角強膜網、③内皮網、④シュレム管(内壁、外壁)に分類される¹⁶⁾¹⁷⁾。また、ぶどう膜網、角強膜網は類似した構造を持っており、結合組織性のビームとその周囲を取り巻く線維柱帯細胞とに分類される。

免疫組織化学染色によって、PI, ACT, MG に対する染色がヒト線維柱帯のいずれの例にも認められた。ただし、いずれの分子も最も前房側であるぶどう膜網で強く認められ、内皮網、Schlemm(シュレム)管周囲では軽度であった。PI では(図 1 A)ぶどう膜網で最も染色が著しく、角強膜網も強く染色された。内皮網、シュレム管内壁、外壁では染色は弱かった。しかし、それより外側の強膜は再び強く染色された。ACT では(図 1 B)ぶどう膜網、角強膜網で明らかな染色が認められるが、その他の部位ではわずかであった。一方、MG では(図 1 C)やはりぶどう膜網が強く染色されたが、角強膜網、内皮網、シュレム管内、外壁はほぼ同じ程度で染色された。正常ウサギ IgG を反応させた陰性対照の切片では、いずれの部位にも有意の染色は認められなかった(図 1 D)。

2. *In situ* hybridization(図 2)

In situ hybridization 法によって、PI(図 2 A), ACT, MG(図 2 C)の特異的 mRNA を検出した。PI(図 2 A)の mRNA の検出には³H を用いたオートラジオグラ

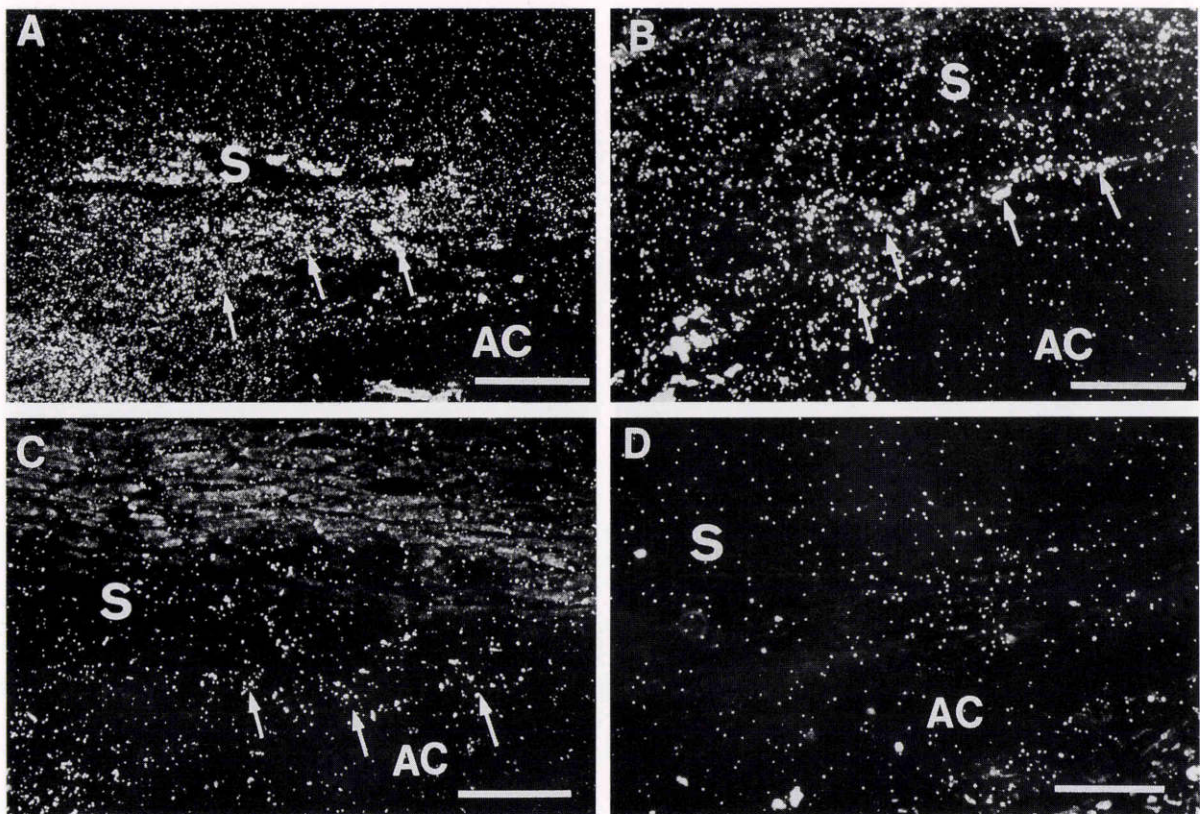


図 2 α 1-プロテアーゼインヒビター(PI) (A), α 1-アンチキモトリプシン(ACT) (B), α 2-マクログロブリン(MG) (C) に対する *in situ* hybridization の結果を示す。D は PI に対する実験の陰性対照の像を示している。いずれも暗視野光学顕微鏡下での写真を示している。バーはいずれも 100 μ m

A : PI のメッセンジャーRNA(mRNA) の存在部位を示す感光銀粒子は線維柱帯にびまん性に認められた。シュレム管の内壁、外壁にも同様に集積が認められた。毛様体、特に毛様体筋部では著しい集積が認められる。B : ACT についても線維柱帯全体に有意な感光銀粒子の集積が認められる(矢印)。C : MG は毛様体に比較するとごくわずかであるが、陽性と考えられる銀粒子の集積が認められる(矢印)。D : 陰性対照では軽度のバックグラウンドを認めるが、陽性所見としてとらえるべき細胞への集積像は、いずれの部位にも認められなかった。

いずれも S : シュレム管, AC : 前房

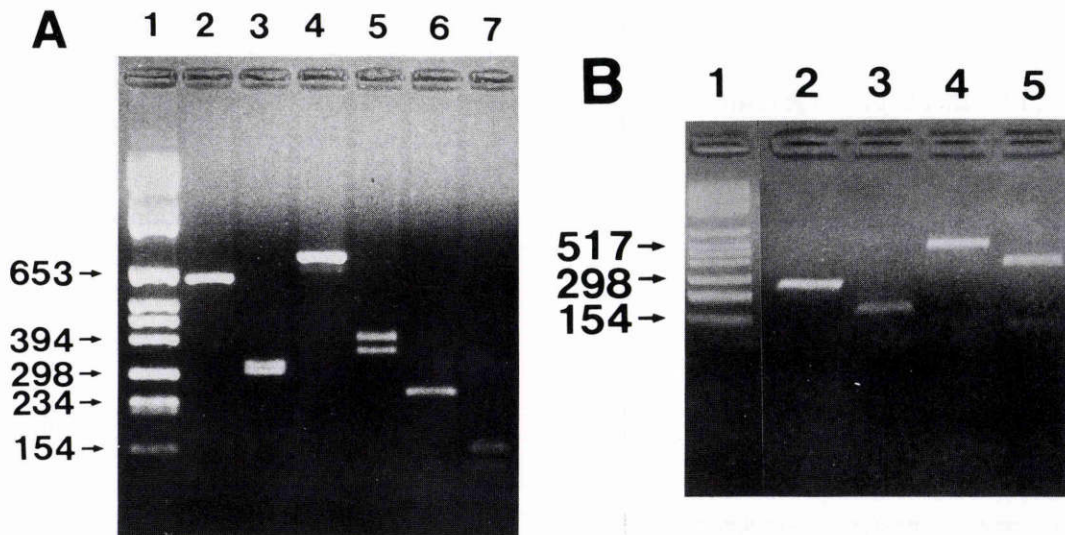


図3 Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法による、5種の蛋白分解酵素抑制因子の mRNA の検出。PCR 産物を 2% アガロースゲル上で、TBE 緩衝液で電気泳動を行った。
 A: 1: DNA 分子量マーカー, 2: α 2-マクログロブリン (MG, 619 bp), 3: MG の Hinc II による切断 (90/185 bp), 4: α 1-アンチキモトリプシン (ACT, 735 bp), 5: ACT の Ban I による切断 (348/387), 6: プラスミノノーゲンアクチベーターインヒビター 1 (PAI, 256 bp), 7: PAI の Hinc II による切断 (109/148 bp).
 B: 1: DNA 分子量マーカー, 2: α 1-プロテアーゼインヒビター (PI, 275 bp), 3: PI の Hinc II による切断 (109/148 bp), 4: アンチトロンビン III (AT, 503 bp), 5: AT の Sac I による切断 (379/124 bp).

フィーを行った。線維柱帯には mRNA の存在部位を示す感光銀粒子がシュレム管の内壁、外壁を含め、びまん性に認められた。後方に連続する毛様体にも著しい集積が認められた。線維柱帯における部位による発現の差は明らかではなかった。一方、ACT, MG の mRNA の検出には ^{33}P を用いた。ACT (図 2 B) の mRNA は、線維柱帯におそらく陽性と考えられる集積として認められたが、ごく軽度であった。PI と同様に、線維柱帯における部位による発現の差は明らかではなかった。一方、MG (図 2 C) の mRNA の発現も、同様に線維柱帯におそらく陽性と考えられる集積として認められたが、やはりごく軽度であった。いずれの実験の陰性対照 (図 2 D) においても軽度のバックグラウンドを認めたが、感光銀粒子の集積としては認められなかった。

3. RT-PCR (図 3)

培養線維柱帯細胞から抽出した total RNART を用いて PCR を行い、PI, ACT, MG, AT, PAI の cDNA を増幅するためにデザインしたそれぞれのプライマーペアによって、予想されたサイズの DNA が得られた。また、これらの増幅産物は制限酵素によって予想されたサイズに切断され、それぞれ特異的な DNA が増幅されたことが明らかとなった。なお、逆転写を行わずに PCR 反応のみを行った場合には、全く反応産物が得られないか、もしくはより大きなサイズのおそらく genomic DNA から増幅された) 反応産物が得られた。

IV 考 按

今回の研究で得られた結果によって、免疫組織化学的

に PI, ACT, MG が分布すること、*in situ* hybridization によって、おそらく線維柱帯細胞などがこれら分子の mRNA を発現していることを示した。さらに、RT-PCR によって、培養線維柱帯細胞が PI, ACT, MG, さらに AT, PAI-1 の mRNA を発現していることが明らかとなった。

蛋白分解酵素抑制因子の多くは血中成分として存在し、これまでは血栓形成、溶血など、主に血液中の調節機構に関連する物質としてしばしば研究されてきた⁸⁾。特に、serin proteinase といわれる一連の蛋白分解酵素に対する抑制因子は serin proteinase inhibitor = serpin と総称され⁹⁾、それぞれの分子は互いに類似した構造をもち、一つのスーパーファミリーを構成していることが明らかとなった¹⁹⁾²⁰⁾²³⁾。serin proteinase の例として、カテプシン D, G, トリプシン、トロンビン、プラスミン、カリクレイン、組織、また、ウロキナーゼプラスミノノーゲンアクチベーターなどがあげられ、また、serpin としては PI, ACT をはじめ、 α 2-アンチプラスミン、アンチトロンビン、プラスミノノーゲンアクチベーターインヒビターなどがその代表例としてあげられる。本研究で取り上げた PI は⁸⁾⁹⁾¹⁹⁾、主に肝臓の parenchyma cell で産生され、血清総蛋白の 3% を占める代表的な血清蛋白分解酵素抑制因子である。分子量は約 50 kDa で、シングルペプチド鎖で構成されている。血清中濃度は 2.5 ± 0.4 mg/ml で、エラスターゼとコラゲナーゼに対する特異的抑制因子として働き、他にトリプシン、キモトリプシン、トロンビンなどの活性も抑制する。ACT は⁸⁾²⁰⁾、同様に肝臓で産生される血清蛋白分解酵素抑制因子で、分子量は約 68 kDa

で、シングルペプチド鎖で構成されている。血清中濃度は0.2 mg/mlで、その主なターゲットはカテプシンGと考えられている。PIに比較して、より急性期に発現する抑制因子と考えられている。一方、MGは¹⁰⁾²¹⁾同様に主要な血清成分だが、構造から、また、その抑制の非特異性からserpinとは異なる特殊な抑制因子と考えられている。MGは分子量725 kDaの巨大分子で、4つのサブユニットによって構成されている。MGはserin proteinase, cystein proteinase, aspartic proteinase, metalloproteinaseのいずれのクラスの蛋白分解酵素をも非特異的に抑制すると考えられている。さらに、この分子、他の蛋白分解抑制因子の機能を補助する働きもすると考えられる点でも特殊な分子と考えられている。これらの抑制因子は一般に酵素に直接結合し、その活性を抑制する。そして分解酵素とその抑制因子のバランスは、少なくとも正常状態における組織のターンオーバー、リモデリングという現象に重要で、組織の恒常性の維持という機能を果たしていると考えられている³⁾。

これまでも眼組織における蛋白分解酵素抑制因子に関する研究がいくつか認められる^{7)11)~15)}。Twiningら^{11)~15)}は角膜における抑制因子の分布、発現についてのPI, ACT, MGを始め、 α 2-アンチプラスミンなどが分布していること、角膜の各細胞がこれら分子を局所で産生していることを示した。また、涙液中、前房水中にPIおよびMGなどが検出されることが報告⁷⁾されている。我々は²⁴⁾本論文と同様に免疫組織化学と*in situ* hybridization法を用いて、ヒト眼の毛様体にPI, ACT, MGが分布・発現していることを示した。病的な状態では、Sawaguchiら²⁵⁾²⁶⁾は円錐角膜患者の角膜においてPI, MGが低下していること、Fukuchiら²⁷⁾はそのPIの低下は主に上皮におけるmRNAの発現の低下による可能性が高いことを示した。

本研究において、ヒト眼の線維柱帯においてもいくつかの蛋白分解抑制因子が分布、発現していることを示した。線維柱帯はぶどう膜網、角強膜網、内皮網、シュレム管の、大きく4つの性格の異なった要素によって構成される。免疫組織化学的にはいずれの分子についても最前房側、つまり、ぶどう膜網が強く染色された。*In situ* hybridizationでは、いずれの分子に関しても陽性と考えられる細胞が認められたものの、感光銀粒子の集積は著明ではなく、また、4つの異なった部位のいずれで優先的に産生されているかについては明らかにできなかった。その理由として、おそらくこれらの分子に関する遺伝子発現が相対的に低いことが推定され、今後さらに検討が必要と考えられる。

Andoら⁷⁾は血清中において、PIは総蛋白の約3%に対して、前房水中で $14.9 \pm 4.9\%$ と著しく高濃度であることを示した。また、MGについても前房水中では、その濃度は血清中の約1/1,000ではあるが、MGのような高

分子量蛋白の濾過率から考えるとやはり高濃度であると述べている。したがって、これらの分子は、単純濾過による滲出だけでなく、おそらく毛様体、線維柱帯を含む局所においても、これらの分子は産生されているのだらうと推定しており、今回の結果はそれを支持している。

ところで、*in situ* hybridizationを行った目的は、線維柱帯細胞による各抑制因子のmRNAの発現を示すことであつた。ところが今回の結果では、おそらく陽性と考えられる集積は認められたものの、それらは概して弱く明瞭ではなかつた。そのため、近年mRNAの検出の目的で盛んに用いられているRT-PCRを同時に行った。その結果、培養線維柱帯細胞はPI, ACT, MGに加えて、AT, PAI-1のmRNAをも産生していることが明らかとなつた。*In vitro*で培養された細胞は、しばしばその性状を変化させる。したがって、培養細胞における発現がただちに*in vivo*の状態での蛋白産生を意味してはいないが、少なくとも線維柱帯細胞がこれらの分子を産生する能力をもつことを示している。また、RT-PCRの実験にAT, PAI-1を追加したのは、線維柱帯細胞によるserpinの発現には選択性があるのか、もしくは非選択的なものなのかを検討することにあつた。少なくとも、今回の結果をみる限り、5種のいずれの分子のmRNAをも発現していることから、選択性は認められなかつた。Twiningら^{11)~15)}は角膜におけるPI, ACT, MGの発現を検討している。これらによると、PIは主に上皮細胞で、MGは主に実質細胞で産生されるという優位に産生する細胞があるものの、上皮、実質、内皮の各細胞は、いずれの分子をも産生している可能性を示している。おそらく線維柱帯細胞も同様で、RT-PCRで検出され得る微量な発現レベルで検討した場合、いずれの分子のmRNAも検出され、したがって、様々な細胞がserpinのいずれの分子の産生能をも非特異的にもっている可能性が推定される。今回はRT-PCRによる単純な検出を目的としたが、いわゆるcompetitive PCRによって、相対的にmRNAを量的に検討することも可能であり、今後、検討の予定である。

線維柱帯における蛋白分解酵素とその抑制因子のバランスは、少なくともおそらく房水流出路という、眼内でも重要かつ特殊な機能を果たしているこの部位の、恒常性の維持に重要であると考えられる。また、前房内の炎症や出血の際には、血液中と類似した機能を果たすと考えられ、したがって、これらの病態に密接に関係していることが強く示唆される。また、局所の恒常性の維持という観点から考え、これら分子のバランスが直接的もしくは間接的にさまざまな病態、特に各種緑内障と関連している可能性がある。この点は非常に興味ある問題であり、今後さらに検討の必要がある。

ご指導いただきました米国シカゴ、イリノイ大学眼科のBeatrice Yue教授に深謝いたします。

文 献

- 1) **Woessner JF**: Matrix metalloproteinases and their inhibitor in connective tissue remodeling. *FASEB J* 5: 2145—2154, 1991.
- 2) **Chen WT**: Membrane proteinases: Roles in tissue remodeling and tumour invasion. *Curr Opin Cell Biol* 4: 802—809, 1992.
- 3) **早川太郎**: 細胞外マトリックスの分解と調節. 藤本大三郎(編): 細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー. アイピーシー, 東京, 192—219, 1991.
- 4) **Alexander JP, Samples JR, van Bruskirk M, Acott TS**: Expression of metalloproteinase and inhibitor by human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 172—180, 1991.
- 5) **Fini ME, Girard MT**: Expression of collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinase by normal cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1779—1788, 1990.
- 6) **Emi K, Sawaguchi S, Yue BYJT, Hara H, Fukuchi T, Iwata K**: Increased levels of matrix metalloproteinase in the optic nerve head of monkey eyes with laser-induced glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34(ARVO Suppl): 1283, 1993.
- 7) **Ando H, Twining SS, Yue BYJT, Zhou X, Fini ME, Kaiya T, et al**: MMPs and proteinase inhibitors in the human aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 3541—3548, 1993.
- 8) **Travis J, Salveson GS**: Human plasma proteinase inhibitor. *Annu Rev Biochem* 52: 655—709, 1982.
- 9) **Carrell R, Travis J**: α 1-antitrypsin and the serpins: Variation and countervariation. *TIBS* 10: 20—24, 1985.
- 10) **Borth W**: α 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *FASEB J* 6: 3345—3353, 1992.
- 11) **Twining SS, Everse SJ, Wilson PM, Yue BYJT, Chan SK**: Localization and quantification of α 1-proteinase inhibitor in the human cornea. *Curr Eye Res* 8: 389—395, 1989.
- 12) **Twining SS, Zhou X, Wilson PM**: Identification of proteinase inhibitors in the cornea: α 1-antichymotrypsin, α 2-antiplasmin, and α 2-macroglobulin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32(ARVO Suppl): 1071, 1991.
- 13) **Twining SS, Fukuchi T, Yue BYJT, Wilson PM, Boskovic G**: Corneal synthesis of α 1-proteinase inhibitor (α 1-antitrypsin). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 458—462, 1994.
- 14) **Twining SS, Fukuchi T, Yue BYJT, Wilson PM, Zhou X**: α 1-antichymotrypsin is present in and synthesized by the cornea. *Curr Eye Res* 13: 433—439, 1994.
- 15) **Twining SS, Fukuchi T, Yue BYJT, Wilson PM, Zhou X, Loushin G**: α 2-macroglobulin is present in and synthesized by the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3226—3233, 1994.
- 16) **Bill A**: The drainage of aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 14: 1—3, 1975.
- 17) **Fine BS, Yanoff M**: The uveal tract. In: *Ocular histology*: Harper & Row, New York, 195—247, 1979.
- 18) **Sawaguchi S, Yue BYJT, Kawa JE, Chang IL, Twining SS, Meberg B**: Lysosomal enzyme and inhibitor levels in the human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 251—261, 1994.
- 19) **Long GL, Candra T, Woo SLC, Davie EW, Kurachi K**: Complete sequence of cDNA for human α 1-antitrypsin and the Gene for the S variant. *Biochemistry* 23: 4828—4837, 1984.
- 20) **Candra T, Stackhouse R, Kidd VJ, Robson KJH, Woo SLC**: Sequence homology between α 1-antichymotrypsin, α 1-antitrypsin, antithrombin III. *Biochemistry* 22: 5055—5061, 1983.
- 21) **Kan CC, Solomon E, Belt KT, Chain AC, Hiorns L**: Nucleotide sequence of cDNA encoding human α 2-macroglobulin and assignment of the chromosomal locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 2282—2286, 1985.
- 22) **Kurosawa A, Elnor VM, Yue BYJT, Elvert JL, Tso MOM**: Cultured trabecular-meshwork cells: Immunohistochemical and lectin-binding characteristics. *Exp Eye Res* 45: 239—251, 1987.
- 23) **Ju Bao J, Sifer RN, Ledley KVJ, Woo SLC**: Molecular evolution of serpins: Homologous structure of the human α 1-antichymotrypsin and α 1-antitrypsin genes. *Biochemistry* 26: 7755—7759, 1987.
- 24) **Fukuchi T, Yue BYJT, Zhou L, Sawaguchi S, Abe H**: Expression of proteinase inhibitors in the human ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(ARVO Suppl): S825, 1996.
- 25) **Sawaguchi S, Twining SS, Yue BYJT, Wilson PM, Sugar J, Chan SK**: Alpha-1 proteinase inhibitor levels in keratoconus. *Exp Eye Res* 50: 549—554, 1990.
- 26) **Sawaguchi S, Twining SS, Yue BYJT, Chang SHL, Zhou X, Loushin G, et al**: α 2-macroglobulin levels in normal human and keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 4008—4014, 1994.
- 27) **Fukuchi T, Zhou L, Twining SS, Yue BYJT, Sugar J**: Expression of cathepsin G and α 1-proteinase inhibitor in keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(ARVO Suppl): 1458, 1994.