

# 筋線維芽細胞による matrix metalloproteinases および tissue inhibitor of metalloproteinase の発現

—角膜創傷治癒過程における形態学的検討—

下田真理子<sup>1)</sup>, 石崎 正通<sup>2)</sup>, 雑賀 壽和<sup>1)</sup>, 山中 宣昭<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>日本医科大学眼科学教室, <sup>2)</sup>日本医科大学第一病理学教室

## 要 約

角膜創傷治癒過程に出現するケラトサイト由来の筋線維芽細胞(myofibroblast, MF)は, 治癒に必要な種々の細胞外マトリックスを産生することが明らかとなっている。今回, さらに, MFが細胞外マトリックスの分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs) およびその阻害酵素である tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) を産生する可能性について, 家兎角膜にアルカリ損傷および全層切開創を作製し, 形態学的検討を行った。この結果, 光学顕微鏡および電子顕微鏡免疫組織化学により, 両損傷で MF が MMP-1, 2, 9 および TIMP-2 を産生することが明らかとなった。両受傷角膜に受傷後1週間後から, MMP-1 は明らかな出現を示し, MMP-2

は微弱な発現を示した。MMP-9 は3週間後から微弱陽性所見を示した。MMP-2, 9 に関しては, アルカリ損傷角膜で4週間後から発現が増強された。TIMP-2 はいずれの損傷においても1週後から MF に陽性であった。今回の検討で, MF は創傷後の細胞外マトリックスの産生ばかりでなく, MMPs および TIMP を同時に分泌し, 組織の再構築にさらに重要な役割を担うことが明らかとなった。(日眼会誌 101: 371—379, 1997)

キーワード: 角膜創傷治癒, 実質, 筋線維芽細胞, MMP, TIMP

## Expression of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase by Myofibroblasts —Morphological Study on Corneal Wound Healing—

Mariko Shimoda<sup>1)</sup>, Masamichi Ishizaki<sup>2)</sup>, Toshikazu Saiga<sup>1)</sup>  
and Nobuaki Yamanaka<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Nippon Medical School

<sup>2)</sup>1st Department of Pathology, Nippon Medical School

## Abstract

The matrix metalloproteinases (MMPs) and the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) regulate the extracellular matrix and are important in the process of connective tissue remodeling. In this study, we investigated the expression of MMPs and TIMP-2 by myofibroblasts (MF) originating from keratocytes during the healing of alkali-burned and lacerated rabbit corneas. In light and/or electron microscopic immunohistochemistry, the MMP-1, 2, 9 and TIMP-2 antibodies reacted with MF in both types of corneal wounds. The clear expression of MMP-1 and the relatively faint immunoreaction of MMP-2 were observed in both types of healing from one week after wounding, while MMP-9 appeared

from 3 weeks after injury. In addition, the levels of MMP-2 and 9 were increased from 4 weeks after alkali-burned injury. The clear expression of TIMP-2 was observed from 1 week after both types of wounds. These findings indicate that MF is deeply involved in degrading some of the key matrix proteins (such as type I collagen), and may play an important role in tissue remodeling in corneal wounds through production of MMPs and TIMP. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 371—379, 1997)

Key words: Corneal wound healing, Stroma, Myofibroblast, MMP, TIMP

別刷請求先: 113 東京都文京区千駄木1-1-5 日本医科大学眼科学教室 下田真理子  
(平成8年6月4日受付, 平成8年12月18日改訂受理)

Reprint requests to: Mariko Shimoda, M.D. Department of Ophthalmology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

(Received June 4, 1996 and accepted in revised form December 18, 1996)

## I 緒言

Matrix metalloproteinase (MMP) 群は細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) の構成タンパク質を分解する酵素で、組織の発生、炎症、創傷治癒、悪性腫瘍の浸潤や転移などに重要な働きをすることが報告<sup>1)~3)</sup>されている。角膜に関しては、基底膜、実質をその基質とし、正常時には組織のターンオーバー、損傷時には変性物質の除去、時には潰瘍形成に関わる可能性が示唆されている。MMP を特異的に阻害する酵素には、tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 群があり、MMP の活性をコントロールする上で重要である<sup>1)~3)</sup>。MMP 群が角膜実質細胞から分泌されることは、Fini ら<sup>4)~7)</sup>により、生化学的手法を用いて既に報告されており、Berman<sup>8)</sup>は、培養細胞を用いて MMP-1 の発現を蛍光抗体法により観察している。しかし、現在までに角膜における MMP および TIMP の *in vivo* での免疫組織化学的報告はない。

角膜実質の創傷治癒は、まず、損傷部周囲のケラトサイト (keratocyte) が胎生期実質細胞に類似した線維芽細胞 (fibroblast) へ形質転換し、増殖、遊走が起こり、次いで ECM の産生・分解といった組織の再構築が行われると考えられてきた<sup>9)</sup>。しかし、先に我々は、家兎角膜でのアルカリ外傷および全層切開による実験で、ケラトサイトは  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 陽性、vimentin 陽性、desmin 陰性の AV 型筋線維芽細胞 (myofibroblast, MF) に形質転換し、I 型コラーゲンなどの ECM を産生することを明らかにした<sup>10)11)</sup>。本論文では MF を形態学的に同定し、MF が創傷治癒に必要な ECM を産生するばかりでなく、同時に MMP および TIMP を産生し、組織の再構築により重要な役割を担う可能性について、免疫組織化学的に検討した。

## II 材料と方法

### 1. 動物および試料の作製

実験には、体重 2.5 kg の白色家兎 21 匹 21 眼を用いた。実験は、「動物の保護および管理に関する法律」および「日本医科大学動物実験指針」に従い行った。家兎はチオペンタールナトリウム (ラボナール<sup>®</sup> 25 mg/kg 静注、田辺製薬) による全身麻酔と 0.4% 塩酸オキシブプロカイン (ベノキシール<sup>®</sup>、参天製薬) による点眼麻酔を施した後、既報の方法<sup>10)</sup>で右眼にアルカリ損傷および全層切開創を作製した。アルカリ損傷は 1 M NaOH に浸した直径 8 mm の円形濾紙 (東洋濾紙 No. 2) を角膜中央に 1 分間載せた後、20 ml 以上の phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄し作製した。切開創は長さ 8 mm の全層切開を角膜中央部に外科用メスを用いて作製した。それぞれの創傷作製直後、0.3% オフロキサシン (タリビット<sup>®</sup> 眼軟膏、参天製薬) を点眼した。角膜損傷後、7, 14, 21, 28,

35 日後に各々 4 匹 (アルカリ損傷群 2 匹、切開群 2 匹) の家兎を過剰量のチオペンタールナトリウム (ラボナール<sup>®</sup>、田辺製薬) で致死させた後、輪部を含めた角膜全領域の摘出を行った。残りの家兎 1 匹の角膜は対照として用いた。採取した角膜は、4% パラホルムアルデヒド (PFA) / PBS で 4°C、12 時間固定し、免疫組織化学用として型のごとくパラフィン包埋を作製し、使用時まで 4°C に保管した。電子顕微鏡 (電顕) 用としてグルタルアルデヒド / PBS で 4°C、24 時間固定を行い、さらに、1% オスミウム酸で後固定した後脱水し、Epok 812 に重合包埋した。免疫電顕用として、4% PFA / PBS で 4°C、6 時間固定後、凍結標本作製した。これらの固定時間、温度はそれぞれ厳密に行った。

### 2. 免疫組織化学的検索

MMP, TIMP および  $\alpha$ -SMA の検索は通常の方法によって脱パラフィンを行った後、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / メタノールにより内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した。次に、抗原の顕在化を目的として MMP および TIMP 用の切片は 6 M urea (室温)、 $\alpha$ -SMA 用の切片は蒸留水 (60°C) に一晚浸漬した。蒸留水および 0.01 M PBS で洗浄後、10% albumin (BSA) で 10 分間非特異的の反応をブロックし、それぞれの切片を 10% BSA / 0.01 M PBS で 200 倍に希釈したモノクローナル抗ヒト MMP-1, 2, 9, TIMP-2 抗体 (富士薬品工業) および 500 倍希釈のモノクローナル抗  $\alpha$ -SMA 抗体 (DAKO) で各々 4°C で一晚反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体として 200 倍に希釈したビオチン化抗マウス IgG 山羊抗体を 60 分間、PBS で洗浄後 ABC (DAKO) を 45 分間それぞれ室温で反応させ、洗浄後 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で発色を行った。次いで、ヘマトキシリンで核染色を行い、脱水透徹後封入し、観察に供した。MMP および TIMP を産生している細胞の同定のため、2 枚のパラフィン連続切片でミラーイメージの標本作製し、1 枚を抗 MMP あるいは抗 TIMP 抗体により、他の 1 枚を抗  $\alpha$ -SMA でそれぞれ免疫組織化学的に検討を行った。

### 3. 電顕的検索

Epok 812 に包埋重合した組織は超薄切片を作製し、タンニン酸染色<sup>12)</sup>を行い、日立 H-7100 型電子顕微鏡で 75 kV の加速電圧により観察を行った。

### 4. 免疫電顕的検索

PFA 固定凍結切片を PBS で洗浄後、1% BSA / PBS で 200 倍に希釈した各抗体 (MMP-1, TIMP-2) を 4°C で一晚反応させた。次いで PBS で洗浄後、二次抗体としてペルオキシダーゼ・ラベル抗マウス山羊 IgG (Fab')<sub>2</sub> を 6 時間反応させた。PBS で洗浄後 1% グルタルアルデヒドで 10 分間固定し、洗浄した後 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により発色を行った。さらに、切片を 2% オスミウム酸で後固定し、洗浄後アルコール脱水を行い、Epok 812 に包埋重合した。作製した超薄切片はクエン酸鉛の単染色を行い、観

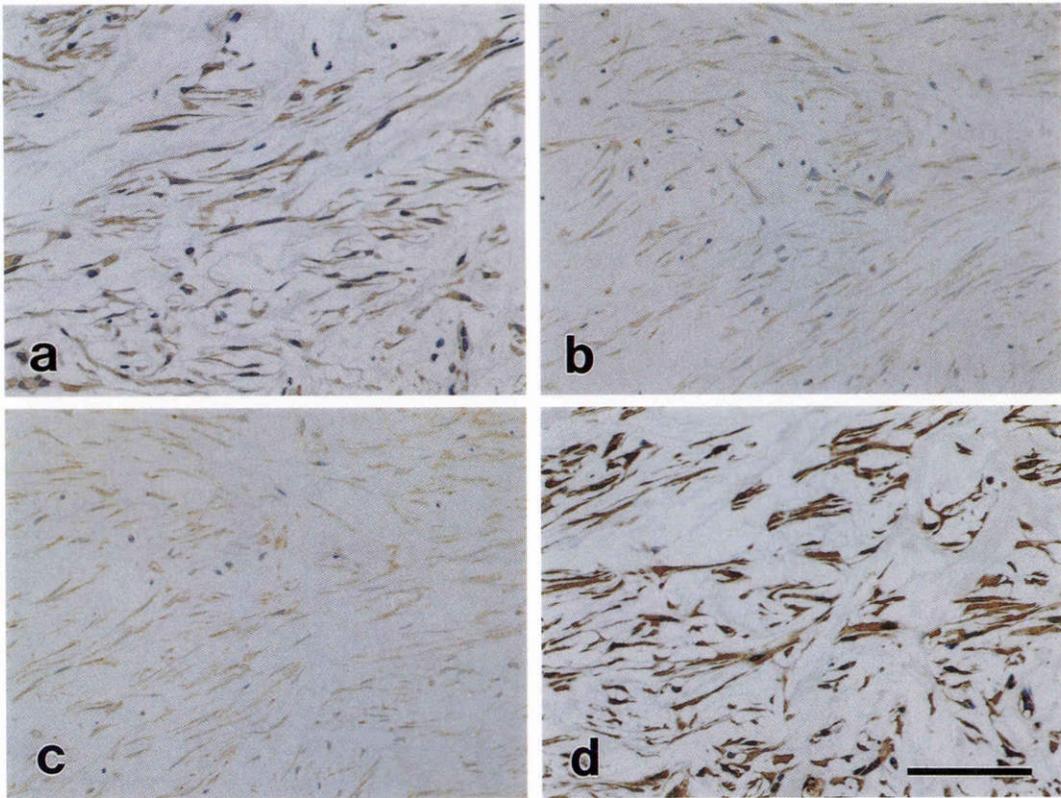


図1 アルカリ損傷後4週間目角膜のパラフィン組織切片による免疫組織染色所見。  
 a: 抗 matrix metalloproteinase(MMP)-1, b: 抗 MMP-2, c: 抗 MMP-9, d: 抗 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2. 損傷部に遊走, 増生した線維芽細胞様細胞に各抗体の陽性反応が認められる. バーは 50 μm

察に供した。

### III 結 果

#### 1. 免疫組織化学的観察

アルカリ処理により角膜損傷部実質は無細胞となり、ECMは著しく障害された。1週間後には受傷部全域に肉芽組織が形成され、好中球, 単球, 形質細胞などの浸潤が観察された。肉芽組織内には線維芽細胞様細胞が多数認められ、この細胞はα-SMA陽性であった。4週間後からは肉芽組織が角膜前面に局在し、肉芽組織の消退した領域ではα-SMA陽性の細胞は認められなかった。MMP, TIMPについては、肉芽組織内の実質細胞について免疫組織化学的に検討を行った結果、MMP-1, 2, 9およびTIMP-2が損傷領域の線維芽細胞様細胞に認められた(図1)。MMP-1の陽性反応は受傷1週間後から観察を行った5週間後まで認められた。MMP-2は受傷1週間後から微弱な発現を認め、4週間後から染色性は増強した。MMP-9は3週間後から発現が認められ、4週間後から染色性の増強を示した。TIMP-2は検討したすべてのステージで陽性所見を示し、損傷領域外にも陽性反応が観察された(表1)。全層切開例では、損傷1週間後、切開部に形成されたフィブリン塊中に実質の創面から多数の線維芽細胞様細胞が増殖、遊走する像が観察さ

表1 アルカリ処理角膜の筋線維芽細胞における matrix metalloproteinase (MMP) および tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) の免疫染色

	1週	2週	3週	4週	5週	対照*
MMP-1	+	+	+	+	+	-
2	±	±	±	+	+	±/-
9	-	-	±	+	+	-
TIMP-2	+	+	+	+	+	+

- : 陰性, ± : 微弱陽性, + : 陽性, \* : 正常家兎角膜実質細胞

れ、この細胞はα-SMA陽性であった。2週間後に切開部は肉芽組織で完全に覆われた。4週間後から肉芽組織は角膜前面と後面に局在し、5週間後には後面のみに局限した。MMP, TIMPについては、免疫組織化学的にMMP-1, 2, 9およびTIMP-2が切開で生じた解離部に形成された肉芽組織内の線維芽細胞様細胞に認められた(図2)。MMP-1の陽性反応は受傷1週間後から認められ、5週間後には反応の減弱を認めた。MMP-2は受傷1週間後から観察を行った5週間後まで微弱な発現を示した。MMP-9は受傷3週間後から5週間後まで微弱な陽性反応を示した。TIMP-2はアルカリ処理群と同様にすべてのステージで陽性所見を示し、非損傷部にも反応が認められた(表2)。対照として正常角膜で免疫染色を行ったところ、検体によってはMMP-2の微弱な陽性所

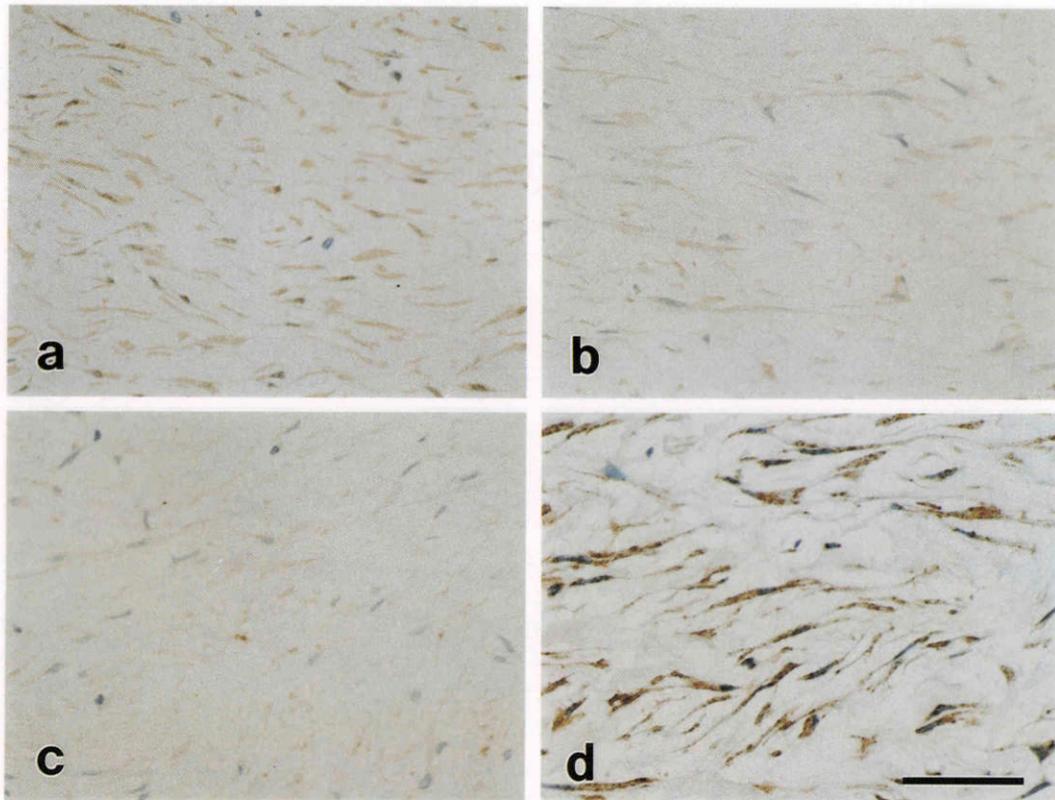


図2 全層切開損傷後4週間眼角膜のパラフィン組織切片による免疫組織染色所見。

a: 抗 MMP-1, b: 抗 MMP-2, c: 抗 MMP-9, d: 抗 TIMP-2. 損傷部に遊走, 増生した線維芽細胞様細胞は抗 MMP-1(a)および抗 TIMP-2(d)により陽性反応を示している. 一方, 抗 MMP-2(b), 9(c)では微弱陽性所見を呈している. バーは 50  $\mu$ m

表2 全層切開角膜の筋線維芽細胞における MMP および TIMP の免疫染色

	1週	2週	3週	4週	5週	対照*
MMP-1	±	+	+	+	+	-
2	±	±	±	±	±	±/-
9	-	-	±	±	±	-
TIMP-2	+	+	+	+	+	+

見が観察され, MMP-1 および MMP-9 は陰性であった. TIMP-2 は明らかな陽性所見を示した(表1). アルカリ処理4週間後の角膜を用い, ミラーイメージのそれぞれの切片上で免疫組織化学的検討を行った. この結果, 図3 a, bの矢印で示したように, ほぼ同一の細胞が  $\alpha$ -SMA および MMP-1 陽性であることが明らかとなった. MMP-2(図3 c, d), MMP-9(図3 e, f), TIMP-2(図3 g, h)についても同様な結果が認められた.

## 2. 電顕的観察

アルカリ損傷3週間後には細胞質内に dense body を持ち, 細胞膜に接する microtendon, あるいは basal lamina 様構造を持つ MF の巣状の増殖を認めた. MF 周囲ではコラーゲン線維の著しい消失が観察された(図4). 全層切開群では切開で生じた解離部の肉芽組織中に, 細胞質内に dense body, attachment site, pinocytotic

vesicle および豊富な粗面小胞体を持つ MF の増殖を認めた. MF 周囲には不統一な方向性を示すコラーゲン線維の新生が観察された(図5).

## 3. 免疫電顕的観察

アルカリ損傷3週間後の角膜で, 抗 MMP-1 および抗 TIMP-2 を用いた免疫電顕による観察を行った. MMP-1 は矢じりで示した microfilament の束を持つ MF の粗面小胞体内に陽性反応を認めた(図6 a). TIMP-2 も同様に, pinocytotic vesicle を持つ MF の粗面小胞体内に陽性反応を示した(図6 b).

## IV 考 按

受傷した角膜実質では, ケラトサイトが形質転換されて胎生期の線維芽細胞となり, 損傷治癒を担うとされてきた<sup>9)</sup>が, 我々<sup>10)11)</sup>や Jester ら<sup>13)</sup>は治癒過程で, ケラトサイトは MF へ形質転換することを明らかにした. さらに, 我々はこの MF が I, IV型コラーゲン, フィブロネクチンなどの ECM 成分を盛んに産生することを明らかにした<sup>10)14)</sup>. 実質損傷の治癒には ECM の再構築が最も重要であり, それは損傷により生じた変性 ECM の分解, ECM の新生, およびこれらの再整理などの一連の過程から成る. 本論文では, ケラトサイト由来の MF が ECM の分解酵素である MMP と, その阻害酵素である TIMP

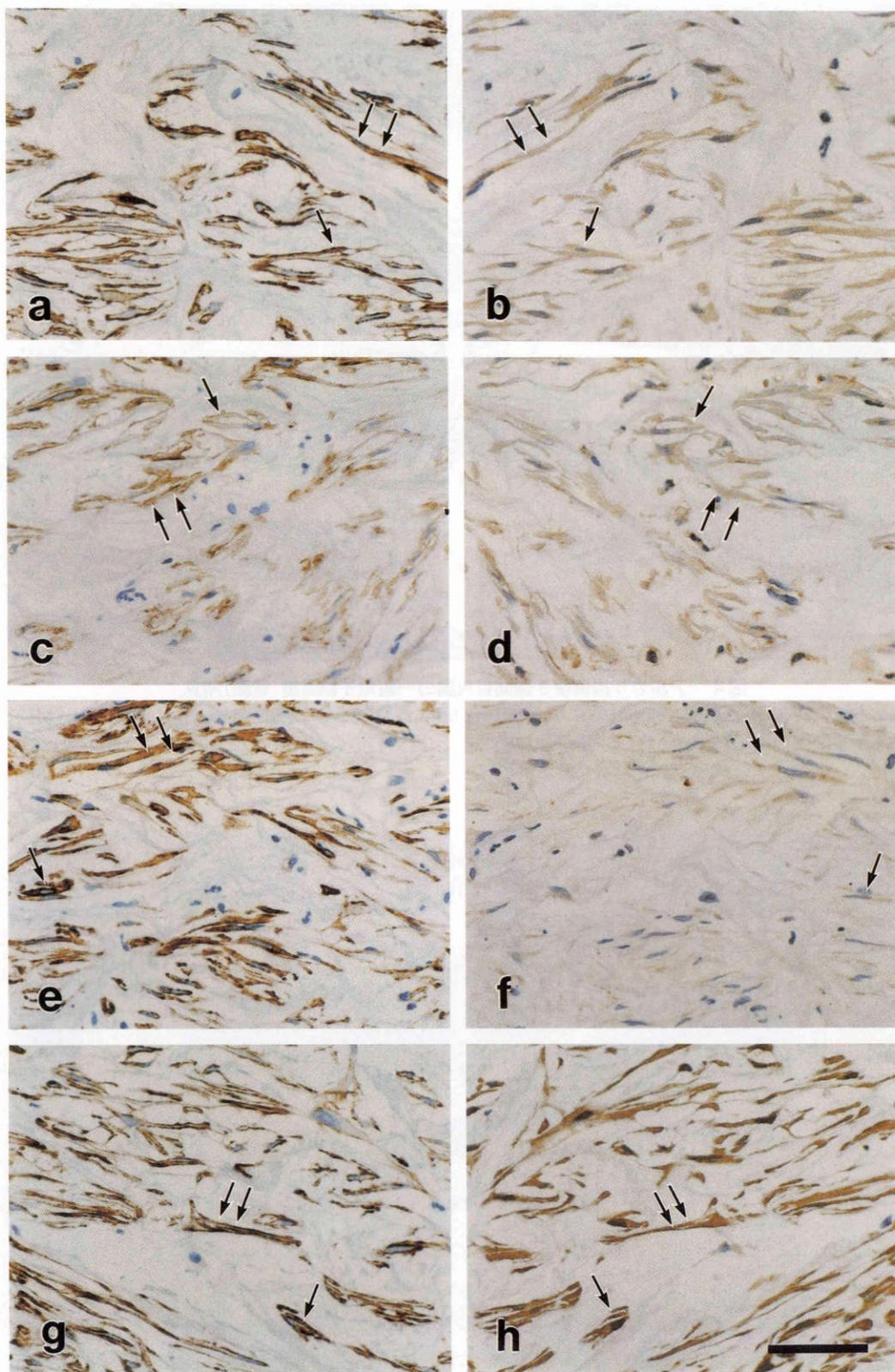


図3 アルカリ損傷後4週間目角膜のミラーイメージ切片上での免疫組織学的所見。

a: 抗  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), b: 抗 MMP-1, 矢印で示したように, 抗  $\alpha$ -SMA 抗体陽性細胞と同一の細胞に抗 MMP-1 抗体陽性反応が認められる. c: 抗  $\alpha$ -SMA, d: 抗 MMP-2, e: 抗  $\alpha$ -SMA, f: 抗 MMP-9 および g: 抗  $\alpha$ -SMA, h: 抗 TIMP-2 の各カップルも同様な所見を呈している. バーは 50  $\mu$ m

を産生している可能性について損傷角膜組織を用いた形態的観察を行い, MF の ECM 分解への関与について検

討した. この結果, ケラトサイトが壊死に陥る重篤なアルカリ外傷においても, 全層切開のような機械的損傷にお



図4 アルカリ損傷後3週間目角膜の一般電子顕微鏡(電顕)所見.

Dense body(大矢印), microtendon(矢じり)や basal lamina 様構造(小矢印)などの myofibroblast(MF)の特徴を示す細胞の増生が認められ, その周囲のコラーゲン線維の消失が観察される. タンニン酸染色. バーは  $1\mu\text{m}$



図5 全層切開損傷後3週間目角膜の一般電顕所見.

Dense body(大矢印), attachment site(矢じり)や pinocytotic vesicle(小矢印)などの MF の特徴を示す細胞の増生が認められる. 細胞周囲には不統一な方向性を示すコラーゲン線維が観察される. タンニン酸染色. バーは  $1\mu\text{m}$

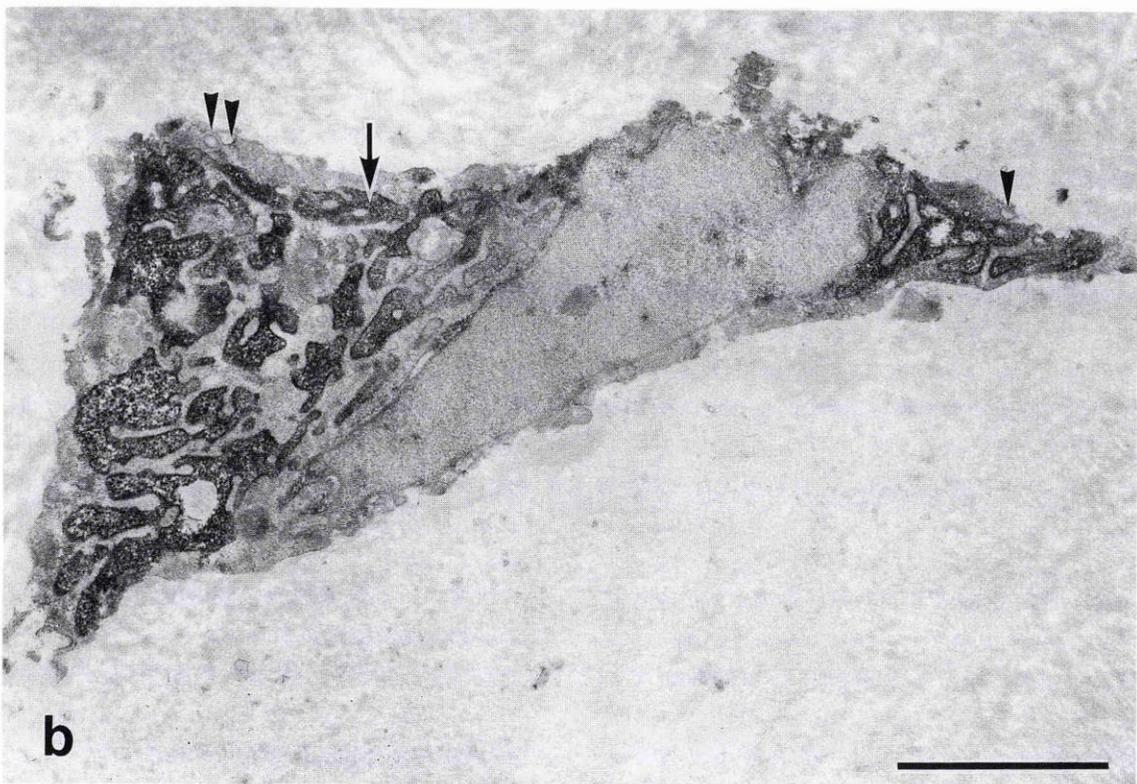
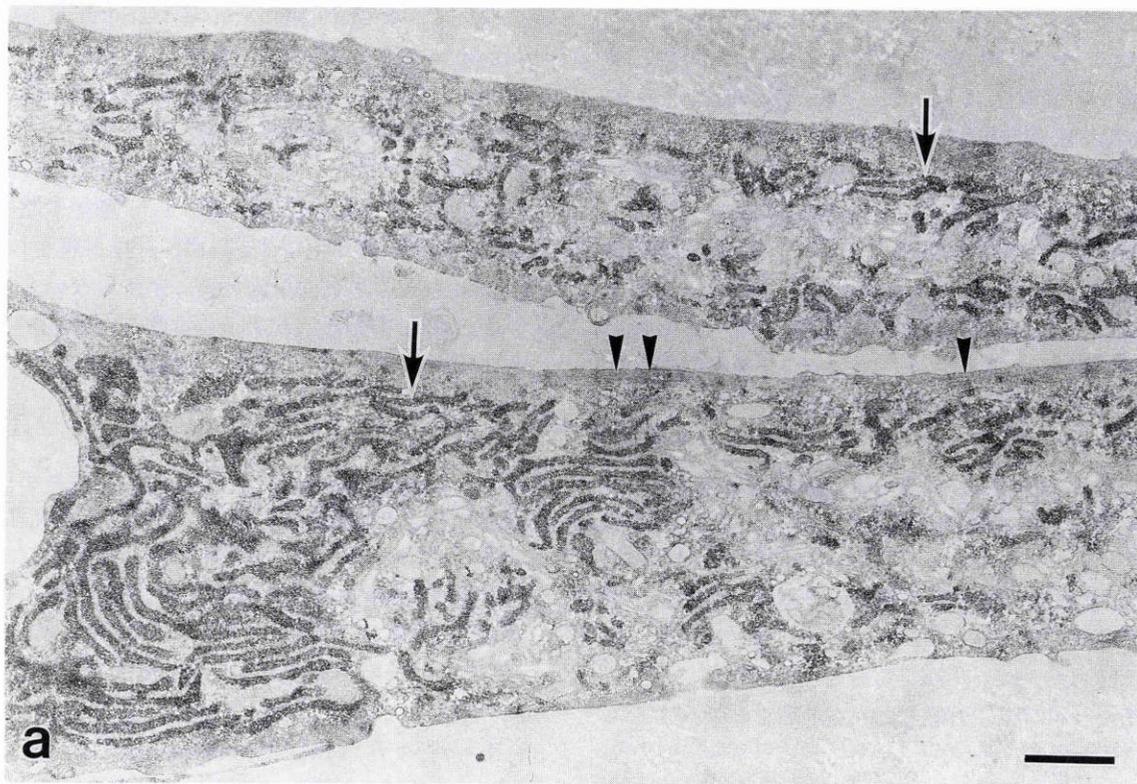


図6 アルカリ損傷後3週間目角膜の免疫電顕所見.

a: 抗 MMP-1 により損傷部に増生した MF の粗面小胞体内に陽性反応が認められる (矢印). 矢じりは MF の特徴の一つである細胞内の microfilaments を示す. b: 抗 TIMP-2 により損傷部に増生した MF の粗面小胞体内に陽性反応が認められる (矢印). 矢じりは MF の特徴の一つである pinocytotic vesicle を示す. バーは 1  $\mu$ m

いても、MF は少なくとも MMP-1, 2, 9 および TIMP-2 を産生することが明らかとなった。また図 4, 5 の電顕写

真に示されるように、アルカリ損傷例で MF 周囲にコラーゲン線維の消失が観察され、この所見は MMP の強

い発現を示唆した。

MMP-1はI, II, III, VII, X型コラーゲン, ゼラチンなどを分解する間質型コラーゲナーゼで, 腫瘍細胞, 上皮細胞, 線維芽細胞, 炎症細胞などから産生されることが知られている<sup>13)</sup>。Berman<sup>8)</sup>, Girardら<sup>15)</sup>は, 角膜実質細胞によってMMP-1が産生されることを報告しているが, *in vivo*で免疫組織化学的には検討されておらず, 本論文が最初の報告である。ミラーイメージ切片で免疫組織化学的に観察したところ,  $\alpha$ -SMA陽性細胞と同一の細胞にMMP-1抗原が認められたことや, さらに, 免疫電顕法によりMFの特徴を持つ細胞の粗面小胞体内にMMP-1抗原の存在が認められたことによって, MFがMMP-1を産生することが明らかとなった。角膜実質の70~80%はコラーゲンから構成されており, MMP-1の分解基質の一つであるI型コラーゲンはその主要な成分である。表1, 2に示すように, MFは比較的早期からMMP-1を産生して障害を受けたI型コラーゲンの処理に関与したことを示唆した。また, 角膜実質の受傷後に過剰に産生されるIII型コラーゲン<sup>16)</sup>の処理にもMMP-1が関与するものと考えられる。

MMP-2, 9抗原についても, ミラーイメージ切片上で $\alpha$ -SMA陽性細胞と同一の細胞に認められ, MFがこれらのMMPを発現していることが明らかとなった。

MMP-2はゼラチン, IV, V, VII, X, XI型などのコラーゲン, フィブロネクチン, ラミニン, エラスチンなどを基質とするMMPで, 腫瘍細胞, 線維芽細胞, 血管内皮細胞などから産生される<sup>17-3)</sup>。正常角膜でのMMP-2の発現について, Finiら<sup>45)</sup>, Matsubaraら<sup>97)</sup>は, ウサギ初代培養を用いた研究で, ケラトサイトがlatent型MMP-2を産生することを生化学的に明らかにした。さらに, 熱傷後治癒過程でのactive型MMP-2の発現を報告した。今回の形態的観察でも, 正常角膜に, 検体によっては微弱なMMP-2の陽性所見を認めたが, 陰性所見を示すものも観察された。この不安定な結果は, 正常角膜ではMMP-2の発現量が非常に少ないために生じたと考えられる。

MMP-9はゼラチン, IV, V型コラーゲン, エラスチンの他, nativeなI, III型コラーゲンも分解することが報告されており, 産生細胞はマクロファージ, 好中球などの炎症細胞, 線維芽細胞, 上皮細胞などが知られている<sup>11-3)</sup><sup>17)</sup><sup>18)</sup>。角膜実質におけるMMP-9発現については, 培養細胞を継代することによって, ケラトサイトがMMP-9を産生するようになることが報告<sup>41-7)</sup>されている。*In vivo*でも, MMP-9は正常角膜には認められず, 損傷角膜での発現が生化学的に報告<sup>6)</sup>されている。

両損傷で, MMP-2とMMP-9発現の程度差を免疫反応切片上で比較検討すると, アルカリ損傷例に比較的強い発現が認められ, これは, 強アルカリによって変性コラーゲン(ゼラチン)が多量に生じ, その処理のためにゼラチナーゼ群が多く発現したものと考えた。一方, 図4に

示したようなMF周囲のbasal laminaおよびmicrotendonはMFと間質の接着に重要な構造物で, MFの収縮による損傷部の縮小に関与することが知られている。これらの構造物の主成分はIV型コラーゲンやフィブロネクチンで, これらはゼラチナーゼ群の基質である。今回の観察でゼラチナーゼ群の発現が4, 5週後で比較的増加していたが, その理由として, MF自身が産生したbasal laminaなどの本来は正常角膜に存在しないものを分解するために, 損傷治癒がある程度進んだ時期からゼラチナーゼ群が増加したとも考えられる。しかし, 詳細については不明である。

TIMPはMMPの特異的な阻害因子として重要である。MMPの活性はそれらの共通のインヒビターであるTIMPと1:1で結合されることによって調節され, 組織発生, 創傷治癒, 炎症, 癌の転移などの生体反応は両者の微妙なバランスの上に維持されている<sup>118)</sup>。今回の実験では, 両受傷にTIMP-2の発現が観察され, ミラーイメージ切片上での免疫組織化学的検索および免疫電顕法からMFによってTIMP-2が産生されることも明らかとなった。また, TIMP-2はMMP群のほとんど認められない状態でも発現して細胞増殖に関与したり<sup>119)</sup>, 低濃度ではMMP-2を活性化すると報告<sup>19)</sup><sup>20)</sup>され, これらの機能に加え, MMPの異常な発現を監視しているとも考えられる。TIMP-2は正常角膜のケラトサイトにも陽性であったが, MF胞体中の豊富な粗面小胞体全域にTIMP-2が免疫電顕的に観察されたこと, 加えて, 損傷部のMFの細胞密度が正常時のケラトサイトに比較して著しく高いことから, 損傷部のTIMP-2発現量は正常角膜より多いことが示唆された。MFはMMP群を産生するとともに, MMPの活性を調節するTIMPを同時に発現することによって受傷角膜の創傷治癒過程に深く関与することが明らかになった。ところで, アルカリ損傷後の経過中で, しばしば生じる角膜潰瘍は, 主に好中球が放出するコラーゲナーゼが原因と考えられてきたが<sup>21)</sup>, MFによるMMPの過剰発現も要因の一つとして考慮する必要があると考えられた。

本研究により, 角膜の治癒過程に出現するMFが多角的に組織の再構築に関与するために, 各種コラーゲンを含むECMの産生のみならず, ECMを分解するMMP, そして, それを制御するTIMPを同時に産生することが*in vivo*で免疫組織化学的に確認された。

稿を終えるに当たり, ご助言をいただいた日本医科大学眼科学教室大原國俊教授ならびに日本医科大学第一病理学教室福田 悠助教授, 技術的にご指導をいただきました日本医科大学第一病理学教室若松恭子氏に深謝いたします。

本研究の一部は文部省科学研究費, 一般研究(C)No. 07671938の援助を受けた。本論文要旨は第18回角膜カンファランス, 第15回日本眼薬理学会シンポジウムIIで発表した。

## 文 献

- 1) 永瀬秀明：マトリックスメタロプロテアーゼ。現代化学，増刊22，東京化学同人，東京：56—69，1993。
- 2) Salo T, Makela M, Kylmaniemi M, Autio-Harmanen H, Larjava H: Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest* 70: 176—182, 1994.
- 3) Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al: Matrix metalloproteinases: A review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 197—250, 1993.
- 4) Fini ME, Girard MT: Expression of collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinases by normal cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1779—1788, 1990.
- 5) Fini ME, Girard MT: The pattern of metalloproteinase expression by corneal fibroblast is altered by passage in cell culture. *J Cell Sci* 97: 373—383, 1990.
- 6) Matsubara M, Zieske JD, Fini ME: Mechanism of basement membrane dissolution preceding corneal ulceration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 3221—3237, 1991.
- 7) Matsubara M, Girard MT, Kublin CL, Cintron C, Fini ME: Differential roles for two gelatinolytic enzymes of the matrix metalloproteinase family in the remodelling cornea. *Dev Biol* 147: 425—439, 1991.
- 8) Berman MB: Regulation of (corneal fibroblast MMP-1) collagenase secretion by plasmin. *Cornea* 12(5): 420—432, 1993.
- 9) 北野周作：角膜の創傷治癒について。眼紀 29: 1341—1358, 1978.
- 10) Ishizaki M, Zhu G, Haseba T, Shafer SS, Kao WW-Y: Expression of collagen I, smooth muscle  $\alpha$ -actin, and vimentin during the healing of alkali-burned and lacerated corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 3320—3328, 1993.
- 11) Ishizaki M, Wakamatsu K, Matsunami T, Yamanaka N, Saiga T, Shimizu Y, et al: Dynamics of the expression of cytoskeleton components and adherens molecules by fibroblastic cells in alkali-burned and lacerated corneas. *Exp Eye Res* 59: 537—549, 1994.
- 12) Kajikawa K, Yamaguchi T, Katsuda S, Miwa A: An improved electron stain for elastic fibers using tannic acid. *J Electron Microsc* 24: 287—289, 1975.
- 13) Jester JV, Petroll WM, Barry PA, Cavanagh HD: Expression of  $\alpha$ -smooth muscle ( $\alpha$ -SM) actin during corneal stromal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 809—819, 1995.
- 14) Ishizaki M, Shimoda M, Wakamatsu K, Ogro T, Yamanaka N, Kao CW-C, Kao WW-Y: Stromal fibroblast are associated with collagen IV in scar tissues of alkali-burned and lacerated corneas. *Curr Eye Res* 16: April, 1997.
- 15) Girard MT, Matsubara M, Fini ME: Transforming growth factor- $\beta$  and interleukin-1 modulate metalloproteinase expression by corneal stromal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 2441—2454, 1991.
- 16) Cintron C, Hong B-S, Covington HI, Macarak EJ: Heterogeneity of collagens in rabbit cornea, type III collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 767—775, 1988.
- 17) Okada Y, Gonoji Y, Naka K, Tomita K, Nakaniishi I, Iwata k, et al: Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. *J Biol Chem* 267: 21712—21719, 1992.
- 18) Murphy G, Cockett MI, Ward RV, Docherty AJP: Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan: A quantitative comparison of the activities of 95kDa and 72kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem J* 277: 277—279, 1991.
- 19) 早川太郎：TIMP ファミリー—その構造と機能—。生化学 63: 523—528, 1991.
- 20) Ninoh H, Sato H, Tsunozuka Y, Takino T, Kawashima A, Okada Y, et al: MT-MMP, the cell surface activator of proMMP-2 (progelatinase A), is expressed with its substrate in mouse tissue during embryogenesis. *J Cell Sci* 109: 953—959, 1996.
- 21) Kao WW-Y, Ebert J, Kao CW-C, Covington H, Cintron C: Development of monoclonal antibodies recognizing collagenase from rabbit PMN; the presence of this enzyme in ulcerating corneas. *Curr Eye Res* 5: 801—815, 1986.