

## ヒト眼の球後視神経における細胞接着性グリコプロテインの分布

福地 健郎, 沢口 昭一, 上田 潤, 阿部 春樹

新潟大学医学部眼科学教室

## 要 約

ヒト眼の球後視神経における6種の細胞接着性グリコプロテインの分布を免疫組織化学的方法によって調べた。軟膜中隔では、視神経線維との境界を形成するその表面にラミニン、エンタクチン、実質中にフィブロネクチン、ピトロネクチン、おそらくその両者にわずかにテナスチンが認められた。トロンボスポンディンはわずかに血管に伴って認められた。一方、髄膜組織では、ラミニン、エンタクチンがくも膜の表面と軟膜、硬膜のくも膜表面に分布し、フィブロネクチンは軟膜、くも膜、硬膜のいずれにもびまん性に認められ、ピトロネクチンはやはりいずれにも認められたが、その染色は細線維状であった。テナスチンについては髄膜組織では有意な染色は認められ

ず、トロンボスポンディンは軟膜の血管にわずかに認められた。以上のグリコプロテインの分布に関する情報は、これまでに知られていた他の細胞外マトリックス分子の分布と合わせ、視神経炎、緑内障の際の視神経障害などの疾患における細胞外マトリックスの変化、役割を論ずるうえでの新たな理解やきっかけを与えてくれると考えられる。(日眼会誌 101: 57-63, 1997)

キーワード；ヒト眼, 球後視神経, 免疫組織化学, 細胞外マトリックス, 細胞接着性グリコプロテイン

## Distribution of Cell Adhesion Glycoproteins in the Human Retrobulbar Optic Nerve

Takeo Fukuchi, Shoichi Sawaguchi, Jun Ueda and Haruki Abe

Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine

## Abstract

We examined the immunohistochemical distribution of six types of cell adhesion glycoproteins in the human retrobulbar optic nerve. The pial septa had laminin and entactin on the surface at the border with the optic nerve fibers, and fibronectin and vitronectin were distributed in the stroma of the septa. Some tenascin was also detectable both on the surface and in the stroma of the septa. Thrombospondin was associated with capillaries within the stroma. The surface of the arachnoid membrane, the pia mater, and the dura mater was covered by laminin and entactin. Diffuse staining with anti-fibronectin antibody was seen in all these meningeal tissues, but vitronectin showed a fine fibrillar

appearance in these tissues. No significant staining could be found for tenascin. Thrombospondin showed only faint staining on the capillaries of the pia mater and the dura mater. These findings can provide clues for the discussion of how the extracellular matrix works and what roles it plays in disorders involving the retrobulbar optic nerve, such as optic neuritis and glaucoma. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 57-63, 1997)

Key words: Human eyes, Retrobulbar optic nerve, Immunohistochemistry, Extracellular matrix, Cell adhesion glycoprotein

## I 緒 言

細胞外マトリックス(以下, ECM)<sup>1)2)</sup>は, 生体の細胞間隙を満たす巨大分子の総称で, 硬度や弾性を規定し, 組織

の骨組みとして構造を維持するだけでなく, 細胞の生存環境を提供し, 細胞の分化, 増殖など様々な生体現象に密接に関わっている。いわゆる球後視神経において, ECMは硬膜, くも膜, 軟膜の髄膜組織として視神経を包み込み

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7年12月28日受付, 平成8年7月5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 December 28, 1995 and accepted in revised form July 5, 1996)

保護しており、また、軟膜中隔として視神経線維束を保持している<sup>3,4)</sup>。したがって、ECMによって眼球と脳を結ぶ視神経線維は機能的に維持され、また、眼球運動などによる機械的なストレスにも耐え得ると考えられる<sup>5)</sup>。著者ら<sup>6)</sup>はすでに、正常人眼の球後視神経におけるコラゲンははじめとするECMの分布を免疫組織化学的方法で示した。この結果と、他の報告<sup>7-11)</sup>に認められた所見を総合すると、髄膜を含む球後視神経部のECMはI, III, IV, V, VI型などのコラゲン、グリコプロテインであるラミニン、フィブロネクチン、弾性線維の成分であるエラスチン、フィブリリン、また礎質の主要な構成要素であるプロテオグリカンなどで構成されていることが明らかとなっている。また最近の研究では、細胞とECMの相互作用も重要なポイントとなっている。したがって、細胞表面に発現するインテグリン<sup>12,13)</sup>を始めとする、ECMのレセプターについても注目され、著者ら<sup>14)</sup>もすでに球後視神経におけるインテグリンの分布を報告した。

ラミニン<sup>15-17)</sup>、フィブロネクチン<sup>18,19)</sup>は細胞接着性グリコプロテインの代表であるが、近年、さらに細胞接着に働いていると考えられるいくつかのグリコプロテインの存在が明らかになってきた。これらはECMに限局するもの、ECMと血清中の両者に発現するものなどがあり、また機能的にも複雑で、未だ明らかにされていない点も多い。ECMの代表であるコラゲンやプロテオグリカンの第一の機能は組織構築をすることにあり、つまり、これらは一種の構造的蛋白といえる。それに対して、今回取り上げた細胞接着性グリコプロテインはいずれも細胞接着という機能に加え、様々な物質と結合して働くという機能性蛋白としての性格が強い。したがって、いずれもが様々な組織現象の重要なモジュレーターとして働いている可能性が高く、球後視神経においてもそれらの果たしている役割が注目される。

そこで本研究では、この組織に関する新たな理解を加えることを目的に、すでに示されているラミニン<sup>15-17)</sup>、フィブロネクチン<sup>18,19)</sup>に加えて、テナスチン<sup>20-22)</sup>、ピトロネチン<sup>23)</sup>、トロンボスポンディン<sup>24-26)</sup>、エンタクチン<sup>27)</sup>の4種の細胞接着性グリコプロテインの人の球後視神経における分布を免疫組織化学的に明らかにした。

## II 実験方法

実験にはイリノイ眼球銀行(Chicago, 米国)から提供された正常眼5例5眼(64~87歳)を用いた。いずれの例も眼科的疾患、手術の既往がなく、摘出眼球も実体顕微鏡下で、視神経萎縮、視神経乳頭陥凹、さらには網膜出血などの異常所見を認めなかった。また、いずれの眼球も死後36時間以内に処理した。得られた眼球は速やかに視神経乳頭部のみを切り出し、OCT compound(TissueTek, ICN, Lisle, 米国)とともに、ドライアイス-イソペンタンにより凍結包埋した。続いて厚さ6 $\mu$ mの凍結切片を

作製し、FrostPlus(Fisher, Itasca, 米国)に張り付けた。このスライドガラスは-20°Cのフリーザーで保存した。なお、本研究はアメリカ合衆国、シカゴ、イリノイ大学眼科において行われた。

免疫組織化学染色は既報<sup>6,14)</sup>に準じ、以下のように行った。組織は-20°Cの冷アセトンで10分間固定、風乾した。いずれの洗浄も0.01 M PBS(リン酸緩衝食塩水)により行った。ブロッキングのためにまず3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で15分間、続いて10%正常ヤギ、もしくは正常ウサギ血清で30分間処理した。一次抗体を冷室で一晩作用させた。用いた抗体は以下である。ウサギ抗マウス・ラミニン抗体(希釈倍率1:500, 以下同じ)。ウサギ抗ヒト・フィブロネクチン抗体(1:500)(以上 Collaborative Research, Bedford, 米国)、マウス抗ヒト・テナスチン抗体(1:100)(GIBCO BRL, Gaithersburg, 米国)、マウス抗ヒト・1型ピトロネチン抗体(1:100)(Calbiochem, San Diego, 米国)、マウス抗ヒト・トロンボスポンディン抗体(1:50)、ラット抗マウス・エンタクチン抗体(1:50)(以上 Chemicon, Temacula, 米国)を用いた。抗体の特異性はwestern blotting法で確認した。陰性対照として、一次抗体がポリクロナル抗体(ラミニン、フィブロネクチン)の場合は、非標識正常ウサギ血清(Collaborative Research)をモノクローナル抗体(テナスチン、ピトロネチン、トロンボスポンディン、エンタクチン)の場合には、マウス抗ジゴキシゲニン抗体(Boehringer Mannheim, Indianapolis, 米国)を一次抗体と同濃度に希釈して用いた。二次抗体としてビオチン化ヤギ抗ウサギIgGもしくはビオチン化ヤギ抗マウスIgG(いずれも Vector, Burlingame, 米国)を1:250で室温、40分間作用させた。さらにストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ(BioGenex, San Ramon, 米国)を1:100で室温、40分間作用させた。発色はDAB(3,3-diaminobenzidine, Sigma, 米国)で行い、一部の切片では対比染色をヘマトキシリン(Sigma)で行った。切片はアルコール系列で洗浄、キシレンに透徹した後にPremount(Fisher)で封入し、光学顕微鏡で観察した。

## III 結果

今回の研究では球後視神経部を視神経線維、軟膜中隔、髄膜組織である軟膜、くも膜、硬膜に分けて、その免疫組織化学による染色部位を検討した。

まず、ラミニン(図1A, B, 図3A)は既に示されているように、軟膜中隔、軟膜と神経線維の境界、または実質内では血管に伴って線状に認められた。くも膜ではその周囲を取り巻くように染色が認められ、また軟膜、硬膜のくも膜側表面も染色された。硬膜実質中には血管に伴った染色のみ認められた。フィブロネクチン(図1C, D, 図3B)は軟膜中隔、軟膜、くも膜、硬膜のいずれもがびまん性に染色された。軟膜中隔では、血管への染色が強調されて

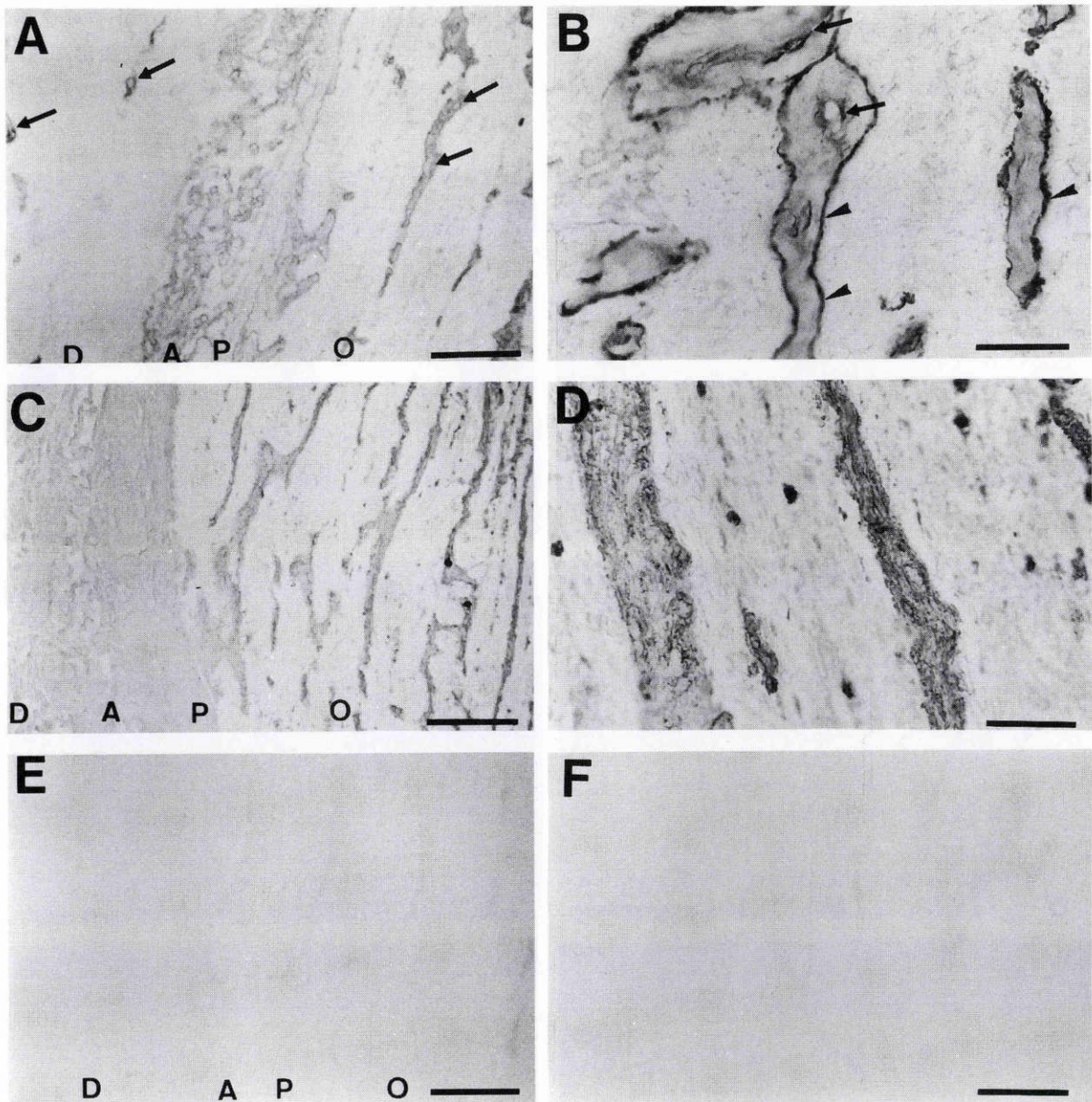


図1 正常ヒト球後視神経におけるラミニン(A, B), フィブロネクチン(C, D)に対する免疫組織化学染色。

A, C, E は視神経鞘部を(いずれもバーは200  $\mu\text{m}$ ), B, D, F は視神経部の強拡大を(いずれもバーは50  $\mu\text{m}$ ) 示している。D: 硬膜, A: くも膜, P: 軟膜, O: 視神経。A: ラミニンは、軟膜中隔, 軟膜と視神経線維束との境界部, 軟膜, 硬膜のくも膜側表面, くも膜表面, 各所の血管(矢印)に伴って認められた。B: ラミニンは、視神経線維束との境界部(矢じり)と血管(矢印)に伴って認められた。C: フィブロネクチンは、軟膜中隔, 軟膜, くも膜, 硬膜のいずれにおいてもびまん性に認められた。D: フィブロネクチンは、視神経内部では軟膜中隔にびまん性に認められた。E, F: 正常ウサギ IgG を作用させた陰性対照では有意の染色は認められなかった。

いた。テナスチン(図2 A, B)に対する染色は、軟膜中隔, 軟膜と神経線維の境界部に時に認められた。陽性の部位と陰性の部位とが認められた。実質中には染色は認められなかった。くも膜, 硬膜には認められなかった。ビトロネクチン(図2 C, D, 3 C)は軟膜中隔, 軟膜, くも膜, 硬膜のいずれにも認められ, それらは細線維状を示していた。また, くも膜ではその表面に強く認められたのに加えて, 内部の実質中にもわずかがだが認められた。トロンボスポンディン(図2 E, F)は軟膜中隔, 軟膜の毛細血管と考え

られる部位に認められた。実質中には認められなかった。また, くも膜, 硬膜には明らかな染色は認められなかった。エンタクチンの分布はほぼラミニンと同様で, 軟膜中隔, 軟膜の神経線維との境界, くも膜, 硬膜の表層に認められた。

今回用いた5眼の組織では染色強度に差は認められたが, 分布という点では個体差は認められなかった。また, 陰性対照(図1 E, F, 2 G, H)では有意の陽性所見は認められなかった。

### IV 考 按

今回の報告では,既に示されている<sup>6)-9)</sup>ラミニン,フィ

ブロネクチンに加えて,テナスチン,ビトロネクチン,トロンボスポンディン,エンタクチンが球後視神経部に分布していることを免疫組織化学的に示した.いずれも特

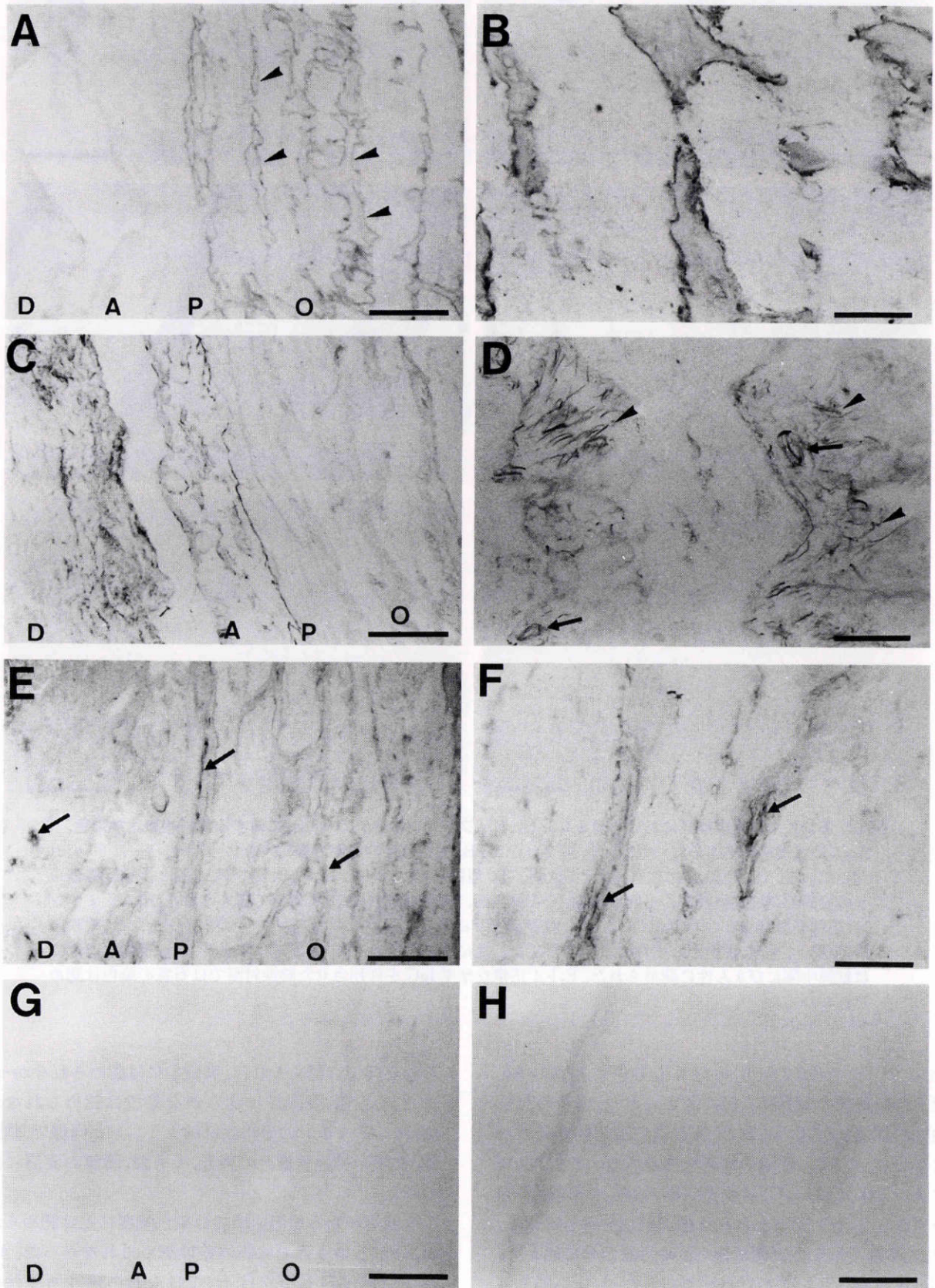


図 2

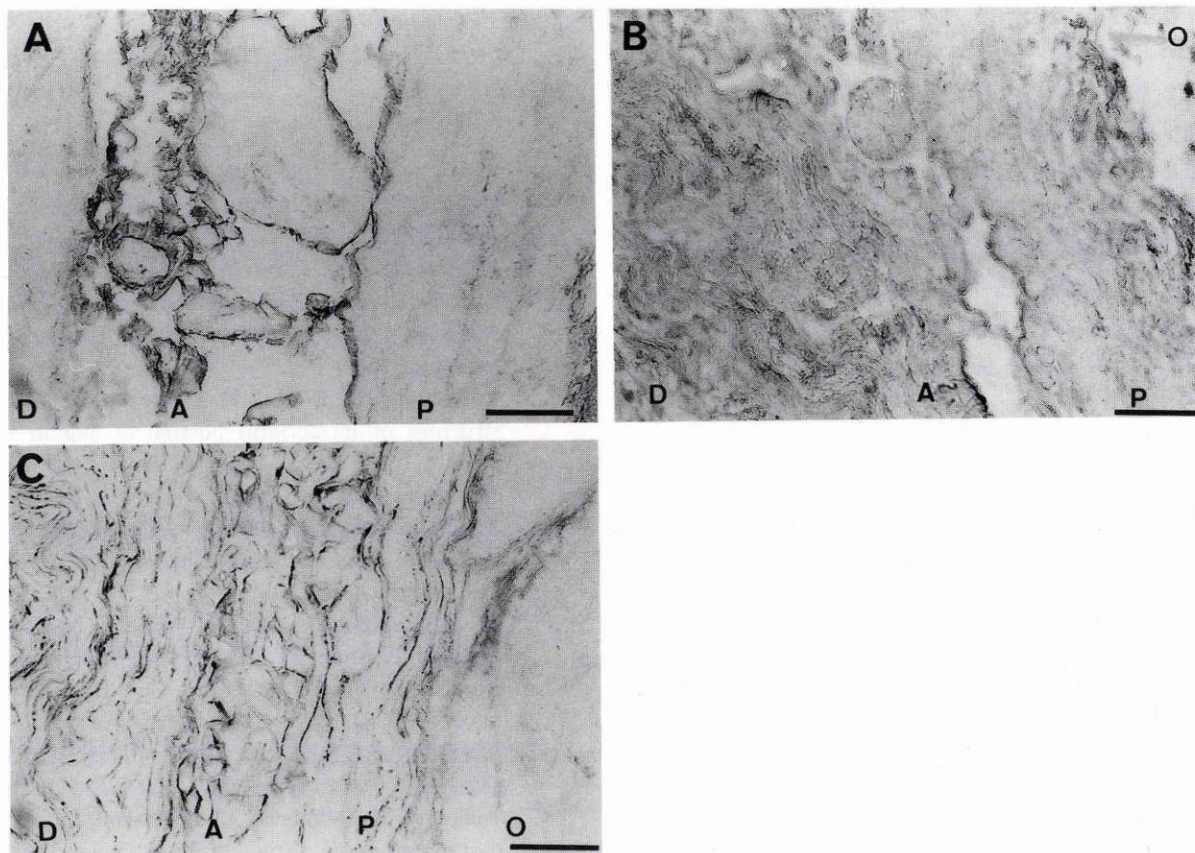


図3 正常ヒト球後視神経の髄膜組織におけるラミニン(A), フィブロネクチン(B), ビトロネクチン(C)の分布, 強拡大像(いずれもバーは50 μm)を示している。  
 D: 硬膜, A: くも膜, P: 軟膜, O: 視神経, A: ラミニンは、軟膜と視神経線維束との境界部, 軟膜, 硬膜のくも膜側表面, くも膜表面に伴って認められた。B: フィブロネクチンは、軟膜, くも膜, 硬膜のいずれにおいてもびまん性に認められた。C: ビトロネクチンは、くも膜をはさんで、軟膜表面, 硬膜表面で強く染色された。

異的な染色の分布, およびパターンを示していた。今回の実験で注目した分子は, 以下のような特徴をもっている。ラミニン<sup>15)~17)</sup>はIV型コラーゲンとともに基底膜の主要成分として知られている。少なくともA鎖, B1鎖, B2鎖と呼ばれる3本の長いポリペプチド鎖をもち, 非対称の十字形の構造をしている。組織の発生, 分化, 移動などに関して重要な役割を果たしていることが示唆されている。一方, フィブロネクチン<sup>18)19)</sup>は古くから知られる細胞接着分子で, 血液中, 体液中, ECMのいずれにも存在している。細胞の移動を含む様々な細胞とECMとの相互関係を仲介すると考えられており, 発生, 創傷治癒などの

際の細胞移動, 細胞の成長や分化の調節などに重要な機能を果たしていると考えられている。さらに, テナスチン<sup>20)~22)</sup>はECMに限局して存在し, 一般に胎生期や創傷治癒の際など, 極めて限られた条件下のみで発現する分子で, 正常成熟状態での分布はごくわずかに限られている。その限られた発現から考えて, 細胞の移動, 増殖, 成熟などに重要な分子と考えられている。ビトロネクチン<sup>23)</sup>は, まさに細胞接着, 細胞伸展に働く分子として発見された分子で, 血清中, ECMの両者に認められる。この分子は多くのインテグリンを介して細胞と接着し, またエラスチンやプラスミノゲンアクチベーターインヒビター

図2 正常ヒト球後視神経におけるテナスチン(A, B), ビトロネクチン(C, D), トロンボスポンディン(E, F)に対する免疫組織化学染色。

A, C, E, Gは視神経鞘部を(いずれもバーは200 μm), B, D, F, Hは視神経部の強拡大を(いずれもバーは50 μm)示している。D: 硬膜, A: くも膜, P: 軟膜, O: 視神経。A: テナスチンは、球後視神経部では軟膜中隔と視神経線維束の境界部にのみ認められた(矢じり)。軟膜, くも膜, 硬膜には有意の染色は認められなかった。B: テナスチンの軟膜中隔と視神経線維束の境界部での染色は, 部位によってその強度に比較的大きな差が認められた。C: ビトロネクチンは、球後視神経の細胞外マトリックスの各所に認められ, 特にくも膜をはさんで、軟膜表面, 硬膜表面で強く染色された。D: ビトロネクチンは、軟膜中隔中に, 多数の微細な線維状に認められた(矢じり)。おそらく血管にも伴っている(矢印)。E, F: トロンボスポンディンは、球後視神経部では各所の血管に伴ってのみ認められた(矢印)。G, H: マウス抗ジゴキシゲニン抗体を作用させた陰性対照では有意の染色は認められなかった。

などとも結合し、その結果、様々な生体现象とかかわっていると考えられている。トロンボスポンディン<sup>24)~26)</sup>は血小板の $\alpha$ 顆粒に認められる分子で、血液中だけでなく、線維芽細胞、平滑筋細胞によっても分泌されECM中にも発現している。接着分子である一方、線維芽細胞、血管内皮細胞に対しては反接着性をもち両機能と考えられている。また、ECMにおける機能に関しては不明だが、最近の知見から血管新生を抑制する作用があるらしいことが明らかとなってきている。最後に、エンタクチン<sup>27)</sup>はナイドジェンとも呼ばれ、基底膜の一成分として知られており、ラミニン、IV型コラーゲンとともに存在し、両者をつなぐ働きをしていると考えられている。

今回の研究では、すでに報告したラミニン、フィブロネクチンの分布についても検討した。その理由として、これらが広く生体内に分布する細胞接着性グリコプロテインの代表であること、またラミニンは基底膜に分布し、組織切片上で線上を示すのに対して、フィブロネクチンは、いわゆる細胞外組織にびまん性に存在することから、両者は免疫組織化学的にそれぞれ全く異なったパターンで染色され、他の分子の分布を検討する上で対比しやすいと考えたからである。ラミニン、フィブロネクチンに対する染色は、既報とほぼ同様であった。また、エンタクチンはほとんどすべての基底膜に存在するとされ、ラミニンと結果が一致した点もこれを支持していると考えられた。一方、テナスチンが球後視神経の軟膜中隔に部分的ではあるが、陽性と考えられる所見が得られた点は、一般的なこの分子に関する概念<sup>20)21)</sup>に反している。テナスチン分子は成人においては、創傷治癒などのいわゆる組織のremodelingの際など、限られた条件下でのみ発現する分子と考えられ、その分布はきわめて限られている。神経線維は、生理的にも経年変化によって脱落していく。つまり、視神経の形態は継続的に変化していると推定され、その変化の強い部位にテナスチンが発現している可能性がある。また、グリア細胞はテナスチンを発現する代表的な細胞であると考えられている。ピトロネクチンは球後視神経の、細胞外組織の多くに認められた。この細線維状の染色パターンはエラスチンに見られるそれに類似している。ピトロネクチンはしばしばエラスチンと共存していると考えられており、球後視神経における両者の相互作用についても興味もたれる。最後に、トロンボスポンディンは血管に沿ってのみわずかに認められた。眼組織における分布を検討した研究はなく、その意義は不明である。我々の同様の研究では、篩状板のビームに強い発現が認められた(未発表データ)。

これらのグリコプロテインは、いずれも遺伝子および分子構造<sup>16)20)23)26)28)29)</sup>などがほぼ明らかになっているのに対して、生理的機能に関する情報、特に*in vivo*での働きに関してはほとんど未知のままである。おそらく、これらの分子は他のECM分子と同様に、互いに共同し、作用

し合いながら、組織の調節、維持に働いていると考えられる。したがって、種々の視神経疾患における変化や機能が注目される。

## 文 献

- 1) Hay E: Extracellular matrix. *J Cell Biol* 91: 205—223, 1981.
- 2) Klintworth GK: Proteins in ocular disease. In: Garner A, et al (Eds): *Pathobiology of Ocular Disease*. 2nd edn. New York, Mercel Dekker, Inc, 1994, 973—1033.
- 3) Anderson DR, Hoyt WF, Francisco S: Ultrastructure of intraorbital portion of human and monkey optic nerve. *Arch Ophthalmol* 82: 506—530, 1969.
- 4) Anderson DR, Francisco S: Ultrastructure of meningeal sheaths. Normal human and monkey optic nerve. *Arch Ophthalmol* 82: 659—674, 1969.
- 5) Sawaguchi S, Yue BYJT, Abe H, Iwata K, Fukuchi T, Kaiya T: The collagen fibrillar network in the human pial septa. *Curr Eye Res* 13: 819—824, 1994.
- 6) 福地健郎, 岩田和雄: ヒト眼における球後視神経の細胞外マトリックス. *日眼会誌* 93: 962—968, 1989.
- 7) Tengroth B, Rehnberg M, Amitzball T: Comparative analysis of the collagen type and distribution in the trabecular meshwork, sclera, lamina cribrosa and the optic nerve in the human eye. *Acta Ophthalmologica* 63(Suppl): 91—93, 1985.
- 8) Hernandez MR, Igoe F, Neufeld AH: Extracellular matrix of the human optic nerve head. *Am J Ophthalmol* 102: 139—148, 1986.
- 9) Goldbaum MH, Jeng S, Logemann R, Weinreb RN: The extracellular matrix of the human optic nerve. *Arch Ophthalmol* 107 J: 1225—1231, 1989.
- 10) Caparas VL, Cintron C, Hernandez-Neufeld MR: Immunohistochemistry of proteoglycans in human lamina cribrosa. *Am J Ophthalmol* 112: 489—495, 1991.
- 11) Morrison JC, Rask P, Johnson EC, Deppmeier L: Chondroitin sulfate proteoglycan distribution in the primate optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 838—845, 1994.
- 12) Hynes RO: Integrins: A family of cell surface receptor. *Cell* 48: 549—554, 1987.
- 13) Ruoslahti E: Integrins. *J Clin Invest* 87: 1—5, 1991.
- 14) 福地健郎, 沢口昭一, 阿部春樹: ヒト眼の術後視神経におけるインテグリンの分布. *新しい眼科* 12: 1323—1326, 1995.
- 15) Timple R, Rohde H: Laminin-aglycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 254: 9933—9937, 1979.
- 16) Timple R, Dziadek M: Structure, development and molecular pathology of basement membranes. *International Review of Experimental Pathology* 29: 1—112, 1986.

- 17) **Wang TH, Lindsey JD, Weinreb RN**: The distribution of the different laminin chains in the human optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 1850 (ARVO suppl), 1994.
- 18) **Ruoslahti E, Engvall E**: Fibronectin: Current concepts of its structure and functions. *Coll Relat Res* 1: 95-128, 1981.
- 19) **Hynes RO**: Fibronectin and its relation to cellular structure and behavior. In: Hay, ED (Ed): *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Plenum Press, New York, 295-334, 1981.
- 20) **Erickson HP, Bourdon MA**: Tenascin: An extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumor. *Annu Rev Cell Biol* 5: 71-92, 1989.
- 21) **Mackie E, Halfter W, Liverrani D**: Induction of tenascin in healing wounds. *J Cell Biol* 107: 2758-2767, 1988.
- 22) **Tervo T, van Setten GB, Lehto I, Tervo K, Tarkanen A, Virtanen I**: Immunohistochemical demonstration of tenascin in the normal human limbus with special reference to trabeculectomy. *Ophthalmic Res* 22: 128-133, 1990.
- 23) **Preissner KT**: Structure and biological role of vitronectin. *Annu Rev Cell Biol* 7: 275-310, 1991.
- 24) **Frazier WA**: Thrombospondin: A modulator adhesive glycoprotein of platelet and nucleated cells. *J Cell Biol* 105: 625-632, 1987.
- 25) **Mosher DF**: Physiology of thrombospondin. *Annu Rev Med* 41: 85-97, 1990.
- 26) **Bornstein P**: Thrombospondin: Structure and regulation of expression. *Faseb J* 6: 3290-3299, 1992.
- 27) **Paulsson M**: Laminin-nidogen complex. Extraction with chelating agents and structural characterisation. *Eur J Biochem* 166 J: 467-478, 1987.
- 28) **Nagayoshi T, Sanborn D, Hickok NJ, Olsen DR, Fazio MJ, Chu ML, Knowlton R, et al**: Human nidogen: Complete amino acid sequence and structural domains deduced from cDNAs, and evidence for polymorphism of the gene. *DNA* 8: 581-594, 1989.
- 29) **Owens RJ, Kornblihtt AR, Baralle FE**: Fibronectin, the generation of multiple polypeptides from a single gene. *Oxford Surveys on Eukaryotic Genes* 3: 141-160, 1986.