

マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤の角膜血管新生抑制効果

羽出山 勉, 海老原伸行, 渡部 保男, 中安 清夫, 金井 淳

順天堂大学医学部眼科学教室

要 約

マトリックスメタロプロテアーゼインヒビター(以下, MMPI)の角膜における血管新生抑制効果を *in vivo* の実験系において検討した. 白色家兎の角膜にサイズの大きなポリメチルメタクリレート性ハードコンタクトレンズ(以下, PMMA-HCL)を装用させた後, または basic-fibroblast growth factor(以下, basic-FGF)含有 polymer disk を実質層間内に移植した後, 右眼に MMPI 点眼, 左眼に対照として MMPI 用基剤点眼を 1 日 6 回投与し, 2 週間後誘導された角膜新生血管の状態について,

細隙灯顕微鏡を用いた観察および組織学的観察を行った. 両者の観察結果は, いずれも MMPI が角膜新生血管に対して抑制的に作用することを示していた. (日眼会誌 102: 270—275, 1998)

キーワード: マトリックスメタロプロテアーゼインヒビター, ハードコンタクトレンズ, 塩基性線維芽細胞増殖因子, 角膜新生血管, 細胞外マトリックス

Inhibitory Effects of Matrix Metalloproteinase Inhibitor on Corneal Neovascularization

Tsutomu Hadeyama, Nobuyuki Ebihara, Yasuo Watanabe,

Kiyoo Nakayasu and Atsushi Kanai

Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine

Abstract

We evaluated the inhibitory effects of matrix metalloproteinase inhibitor (MMPI) on corneal neovascularization *in vivo*. MMPI drops in the right eye and MMPI basic drops in the left eye were administered six times per day after wearing a large polymethylmethacrylate-hard contact lens (PMMA-HCL) and intralaminar transplantation of a basic fibroblast growth factor (basic-FGF) containing polymer disk. We observed the status of corneal neovascularization with a slit lamp biomicroscopically after two weeks. Corneal buttons were also investi-

gated histologically with light and electron microscopes. The findings of both investigations showed MMPI eye drops tended to inhibit the corneal neovascularization. (J Jpn Ophthalmol Soc 102: 270—275, 1998)

Key words: Matrix metalloproteinase inhibitor, Hard contact lens, basic-FGF, Corneal neovascularization, Extracellular matrix

I 緒 言

マトリックスメタロプロテアーゼインヒビター(以下, MMPI)は, コラーゲン, プロテオグリカンなど細胞外マトリックスの分解酵素である種々のプロテアーゼに対する阻害剤で, 近年眼科領域においては角膜潰瘍の治療薬として注目を集めている¹⁾²⁾.

一方, この MMPI は血管新生に対する阻害作用も有している可能性が考えられる. 今回, 我々は三共株式会社から供与された MMPI である CS-610 を用い, ハードコン

タクトレンズ(以下, HCL)装用および basic-fibroblast growth factor(以下, basic-FGF)含有徐放性 polymer disk を実質内に移植して得られた血管新生モデル³⁾に対し, CS-610 を点眼薬として使用し, 本薬剤の角膜における血管新生抑制効果を観察し, 若干の知見を得たので報告する.

II 方 法

使用した CS-610 点眼薬は, 0.05 mol HEPES buffer 100 ml 中に dimethyl sulfoxide (DMSO) 2 ml を添加した

別刷請求先: 113-8431 東京都文京区本郷 3-1-3 順天堂大学医学部眼科学教室 羽出山 勉

(平成 9 年 5 月 6 日受付, 平成 9 年 12 月 5 日改訂受理)

Reprint requests to: Tsutomu Hadeyama, M.D. Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine, 3-1-3 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8431, Japan

(Received May 6, 1997 and accepted in revised form December 5, 1997)

基剤(これを基剤点眼とした)に, MMPIであるCS-610を40 mg含有したものとした。点眼薬のpHは7.4, 浸透圧は367 mosm/kgであった。CS-610の構造式を図1に示す。このCS-610は, コラゲナーゼ, プロテオグリカナーゼ, ゼラチナーゼ, エラスターゼに対して阻害効果を有していることが既に確認されている⁴⁾⁵⁾。

実験には体重約3.0 kgの白色家兎の角膜を用いた。白色家兎9匹18眼に対し, ベースカーブ7.6 mm, 直径13.0 mmのポリメチルメタクリレート性ハードコンタクトレンズ(PMMA-HCL)を両眼に装着させた。また, basic-FGF 500 ng/ml含有のエチレン酢酸ビニル共重合樹脂製(デュボン社)徐放性 polymer disk を作製し, 白色家兎3匹6眼に対し, diskの外側端が角膜輪部から1 mmに位置するように実質層間に移植した。PMMA-HCL装着または polymer disk 移植翌日から右眼にCS-610点眼, 左眼に対照としてCS-610用基剤点眼を各々1日6回14日間投与した(CS-610の1回投与量20 µg, 全投与量1.68 mg)後, 細隙灯顕微鏡を用いて角膜新生血管の発症およびその程度を生体観察し, 写真撮影した。角膜新生血管の観察・評価は同一検者が印画紙上で行った。すなわち, 新生血管の全く誘導されなかったものを(-), 誘導されていたものではその程度に応じて, 軽度を(+),

中等度を(++), 重度を(+++)と三段階に評価した。細隙灯顕微鏡による観察・写真撮影後すべての眼球を摘出し, 角膜片を組織学的観察のために2%グルタルアルデヒド液で固定した。その後アルコールで脱水し, メタクリレート樹脂またはエポキシ樹脂に包埋し, 光学または電子顕微鏡的観察に供した。

III 結 果

1. 細隙灯顕微鏡による観察(表1)

PMMA-HCLの14日間装着眼で, 基剤点眼を投与された対照眼は9眼すべてにおいて角膜下方の角結膜輪部から帯状に出現する角膜新生血管が観察された(図2a)。この9眼中(+)が2眼(22.2%), (++)が3眼(33.3%), (+++)が4眼(44.4%)であった。一方, CS-610点眼角膜(図2b)では角膜新生血管の全く観察されなかったもの(-)が9眼中2眼(22.2%), (+)が3眼(33.3%)で, (+++)と評価されたものは全くなかった(0%)。

basic-FGF含有 polymer disk 移植14日後の細隙灯顕微鏡による観察では, 基剤点眼の3眼中2眼(66.7%)において角結膜輪部から disk に向かって誘導された角膜新生血管が観察された(図3a)。一方, CS-610点眼の3眼ではいずれの角膜においても新生血管は観察されな

表1 細隙灯顕微鏡による角膜新生血管の観察

basic-FGF 含有 polymer disk 移植後14日目				
家兎番号	MMPI点眼角膜(右眼)		基剤点眼角膜(左眼)	
1	-		++	
2	-		++	
3	-		-	
新生血管	(-)	(+)	(++)	
MMPI点眼角膜	3(100%)	0	0	/3眼
基剤点眼角膜	1(33.3)	0	2(66.9)	/3眼
basic-FGF: basic-fibroblast growth factor, MMPI: マトリックスメタロプロテアーゼインヒビター				
PMMA-HCL 装着後14日目				
家兎番号	MMPI点眼角膜(右眼)		基剤点眼角膜(左眼)	
1	+		++	
2	+		+	
3	+		++	
4	++		+++	
5	-		+	
6	-		+++	
7	++		+++	
8	++		++	
9	++		+++	
新生血管	(-)	(+)	(++)	(+++)
MMPI点眼角膜	2(22.2%)	3(33.3)	4(44.4)	0(0.0)
基剤点眼角膜	0(0.0)	2(22.2)	3(33.3)	4(44.4)

PMMA-HCL: ポリメチルメタクリレート性ハードコンタクトレンズ

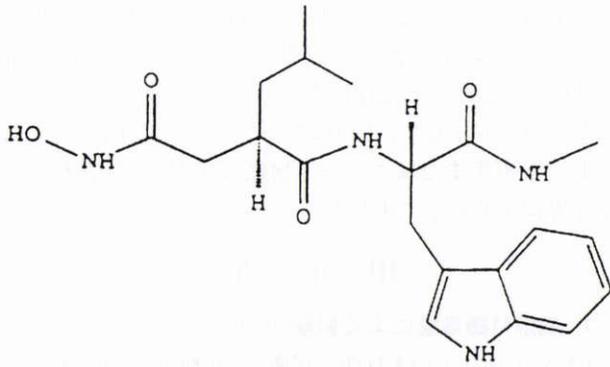


図1 CS-610の構造式.
分子式: C₂₀H₂₈N₄O₄ 分子量: 388.47

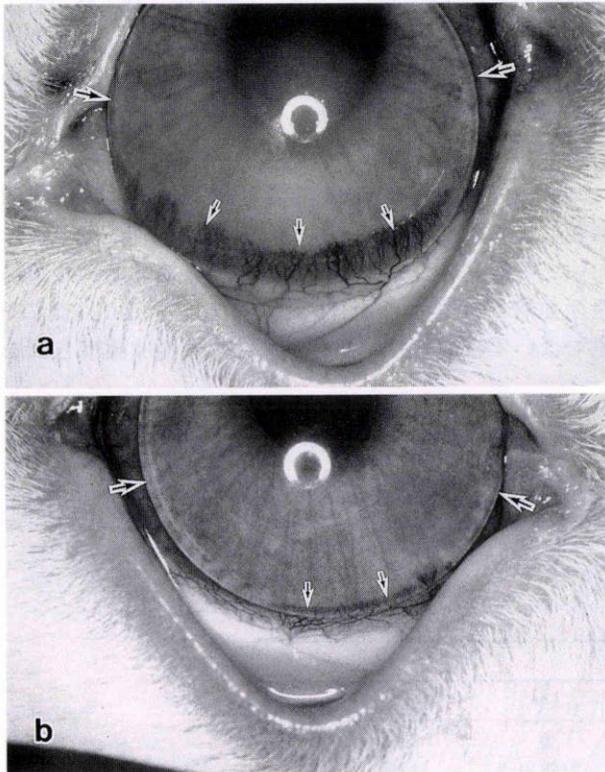


図2 ポリメチルメタクリレート性ハードコンタクトレンズ(PMMA-HCL) (大矢印)を14日間装用した家兎角膜.

小矢印: 角膜新生血管. 外眼写真.
a: CS-610 基剤点眼角膜
b: CS-610 点眼角膜

かった(図3 b).

2. 組織学的観察

PMMA-HCLを14日間装用させ, 基剤点眼した家兎角膜を光学顕微鏡で観察した. 角膜新生血管は実質前層にのみ誘導されており, 新生血管の先端付近には比較的多数の遊走細胞と思われる細胞が観察された(図4). 電子顕微鏡による観察では, 走行の乱れた実質層間に多数の新生血管があった. 血管内皮細胞は極めて幼若で, 内皮細胞外周の基底膜もほとんど形成されていなかったが, 管腔内には多数の赤血球やマクロファージと思われる細胞

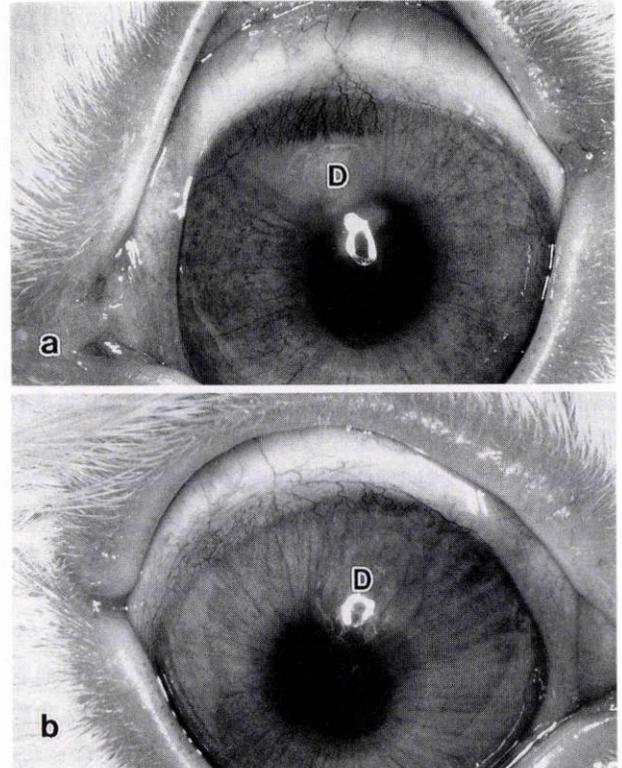


図3 basic-fibroblast growth factor(basic-FGF)含有徐放性 polymer disk (D)移植後14日目の家兎角膜. 外眼写真

a: CS-610 基剤点眼角膜
b: CS-610 点眼角膜

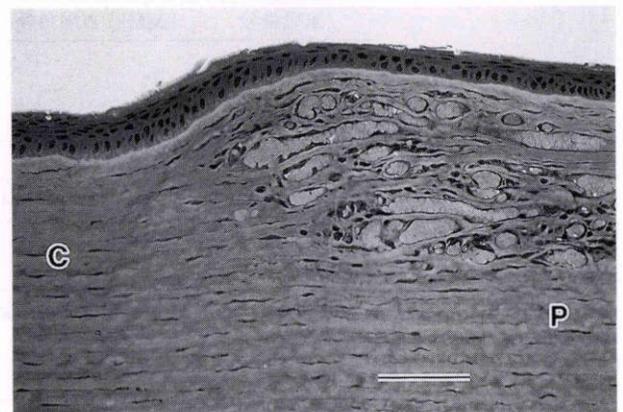


図4 PMMA-HCL装用, 基剤点眼角膜の光学顕微鏡写真.
C: 中央側, P: 周辺側
トルイジンブルー染色, バーは100 μm

があった(図5 a). また, 管腔周囲の実質内にも, しばしばマクロファージと思われる遊走細胞が観察された. 一方, PMMA-HCLを装用させ, CS-610点眼した角膜を電子顕微鏡で観察すると, 角膜実質の層状構造の乱れとその層間に生じた新生血管を認めたものの, 基剤点眼角膜に比べ, 実質内の遊走細胞は極めて少数であった(図5 b).

basic-FGF 含有 polymer disk 移植角膜においても, 基剤点眼角膜では disk と角結膜輪部の間に多数の遊走細胞

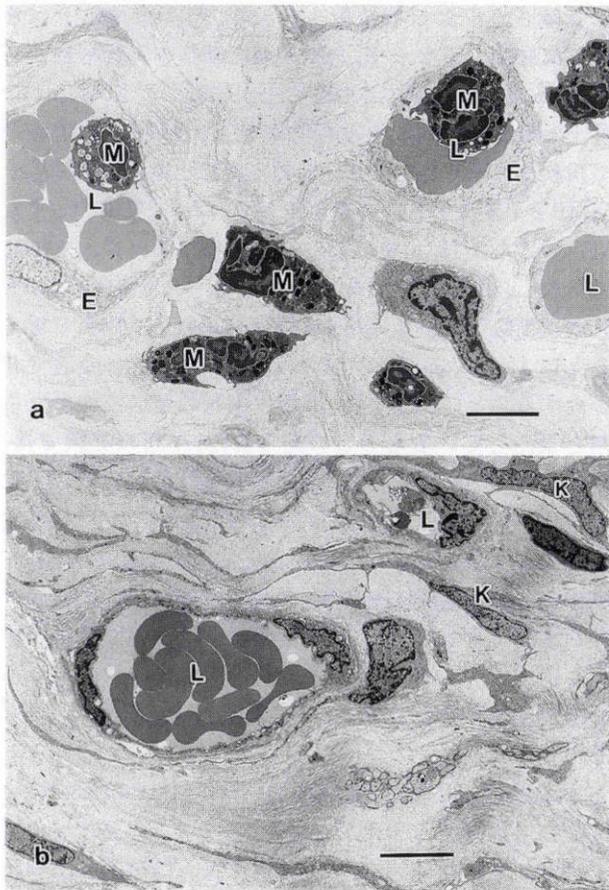


図 5 PMMA-HCL 装用角膜の電子顕微鏡写真.

E: 血管内皮細胞, L: 血管腔, M: マクロファージ, K: 角膜実質細胞

a: CS-610 基剤点眼角膜, バーは 5 μm

b: CS-610 点眼角膜, バーは 5 μm

胞と新生血管があった(図 6 a,b). また, 幼若な新生血管の腔内にもマクロファージと思われる細胞が観察された(図 7 a). しかし, CS-610 点眼角膜では遊走細胞・新生血管ともにほとんどなかった(図 6 c). わずかに disk 周囲の実質細胞の細胞突起が vertical な方向に延びており, 粗面小胞体がやや目立ち, 軽度の線維芽細胞様変化が観察された(図 7 b).

IV 考 按

角膜に新生血管を誘導する方法として, 本実験では直径 13 mm の大きな PMMA-HCL を装用させる方法と, basic-FGF 含有徐放性 polymer disk の実質層間内移植による 2 種類の方法を用いた. 本実験のように, 新生血管に対する薬剤の有効性を *in vivo* で観察する実験では, 誘導される新生血管に安定した再現性がなければならない. この点で, 我々の用いた 2 つの方法は, ほぼ満足すべき結果であった. しかし, basic-FGF 含有 polymer disk 移植による方法では, 3 匹中 1 匹で基剤点眼の対照眼(左眼)にも角膜新生血管が誘導されていなかった. このため, 本方法を用いた実験は 3 匹のみにとどめ, PMMA-

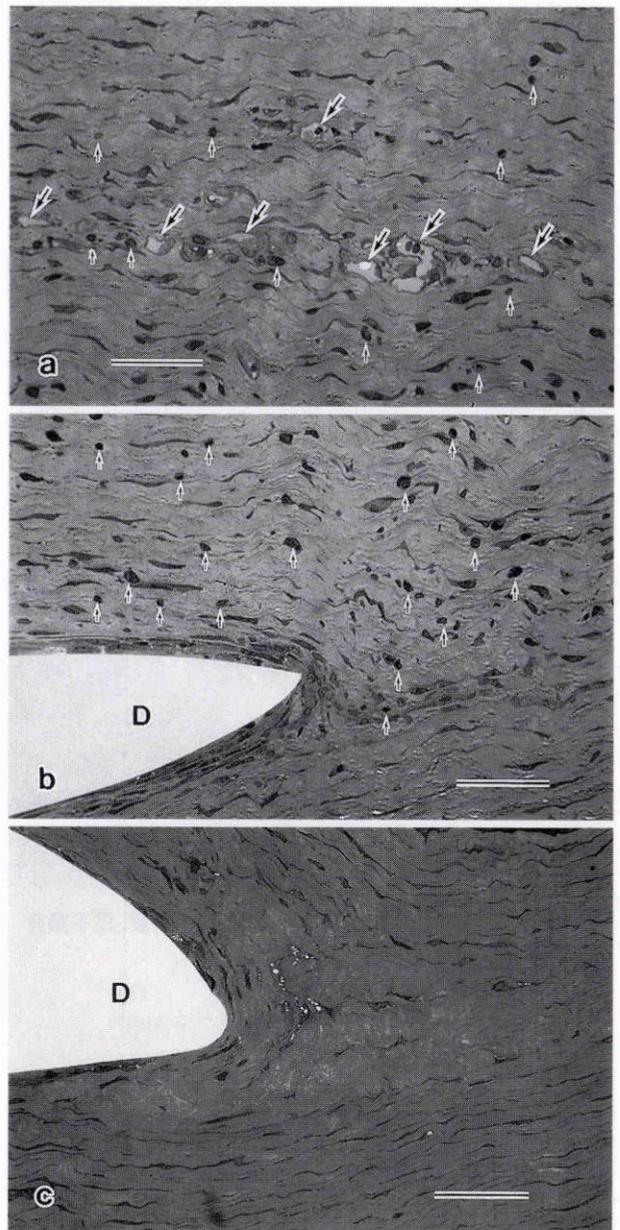


図 6 basic-FGF 含有 polymer disk (D) 移植角膜の光学顕微鏡写真.

トリジンブルー染色. 大矢印: 角膜新生血管, 小矢印: 遊走細胞

a: CS-610 基剤点眼角膜, バーは 50 μm

b: CS-610 基剤点眼角膜, バーは 50 μm

c: CS-610 点眼角膜, バーは 50 μm

HCL 装用による方法に, より多くの実験動物を使用した. 体重 3.0 kg の白色家兎の角膜前面曲率半径は約 7.4 mm である⁶⁾. 本実験に用いた HCL のベースカーブは 7.6 mm であり, フィッティングとしてはタイトではない. しかし, 直径が 13.0 mm と HCL としては非常に大きく角膜全体を完全に覆ってしまう. このため角膜は低酸素状態に陥り, 輪部から角膜新生血管が誘導されるものと考えられる. 通常の場合, 角膜新生血管は HCL 装用後約 5 日目頃から発症する. ほとんど 100% に観察され,

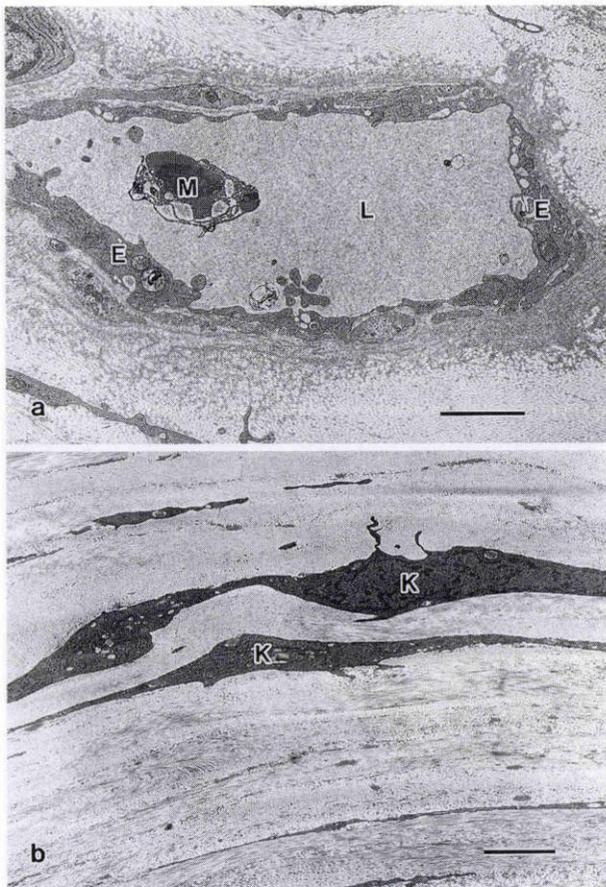


図7 basic-FGF 含有 polymer disk 移植角膜. 電子顕微鏡写真.

L: 血管腔, K: 角膜実質細胞
a: CS-610 基剤点眼角膜, バーは 2 μ m
b: CS-610 点眼角膜, バーは 2 μ m

しかも角膜下方の輪部から帯状に出現する。これは、HCL のセンタリングが僅かに下方にずれるため、低酸素状態が角膜下方に最も強く現われるためと考えられる。本方法は、角膜新生血管を誘導する方法として、これまであまり用いられてなかったものの、簡便である点、低酸素状態以外の要素がほとんどないシンプルな実験系である点、非常に高い再現性があることなど多くの利点を持った良い方法と思われた。

角膜を始めとする生体内における新生血管の発症機序として、FGF をはじめとする様々な血管新生促進因子の関与³¹⁷⁾⁸⁾が論じられている。しかし、その最初の段階は既存血管内皮細胞が MMP を分泌し、周囲の基底膜を含む細胞外マトリックスを融解し、血管内皮細胞自身が遊走することのできる環境を作ることと思われる⁹⁾。また、単球やマクロファージから分泌される炎症性サイトカインの一つである tumor necrosis factor- α (TNF- α) は、FGF や vascular endothelial growth factor (VEGF) などと同様に、強力な血管新生促進作用を有していると考えられている¹⁰⁾。近年、MMP が膜型 TNF- α に作用して、可溶性の活性型 TNF- α に変換させることによって、その作用

を發揮させることがわかってきた¹¹⁾¹²⁾。一方、MMP は血管内皮細胞のみならず、角膜の上皮細胞や実質細胞からも、ある条件下で産生されることが報告²⁾¹³⁾¹⁴⁾されている。我々も培養ヒト角膜上皮細胞が MMP-9 を、また培養ヒト角膜実質細胞と培養ヒト胎児皮膚微小血管内皮細胞が MMP-2 を産生することを確認している(未発表データ)。以上のことから、角膜において角結膜輪部血管内皮細胞や角膜上皮細胞・実質細胞から分泌される MMP は、血管内皮細胞周囲の基底膜や角膜実質の細胞間物質に働くことによって、またマクロファージの TNF- α の活性化を介することによって、角膜新生血管の発症に大きな役割を果たしているものと考えられた。今回の実験では、PMMA-HCL を装用させ角膜を低酸素状態にすることにより角膜新生血管を誘導した。この機序としては、低酸素状態により障害を受けた角膜上皮や実質細胞が MMP を放出し、角膜輪部の血管内皮細胞基底膜の IV 型コラーゲンを分解すること、また低酸素状態において分泌される VEGF などの血管新生促進因子が直接血管内皮細胞の増殖を亢進することによって新生血管が誘導されたと考えられた。

今回我々が用いた CS-610 は、この MMP の産生または活性を抑制する薬剤であり、角膜上皮の MMP-9 の産生に対し、抑制作用を有することを我々は確認している(未発表データ)。CS-610 を点眼薬として使用し、角膜の新生血管を抑制したとする報告は今回が初めてと思われる。しかし、本薬剤は、本邦においてもすでに角膜潰瘍に対する点眼薬として、我々の施設を含めた 5 つの施設で臨床治験が開始されており、点眼薬としての安全性は確認されている。本実験における細隙灯顕微鏡による生体観察および光学・電子顕微鏡を用いた組織学的観察から、CS-610 は抗角膜潰瘍剤としてのみならず、角膜新生血管を抑制する点眼薬として臨床応用される可能性があると考えられた。

本研究は、平成 6~8 年度厚生省科学研究費補助金(オーファンドラック開発事業)「角膜潰瘍治療薬の開発研究」(金井淳班長)によって行われた。

文 献

- 1) Wentworth JS, Paterson CA, Gray RD: Effect of a metalloproteinase inhibitor on established corneal ulcers after an alkali burn. Invest Ophthalmol Vis Sci 33:2174-2179, 1992.
- 2) Fini ME, Cui T, Mouldovan A, Grobelny D, Galardy RE, Fisher SJ: An inhibitor of the matrix metalloproteinase synthesized by rabbit corneal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 32:2997-3001, 1991.
- 3) Herbert JM, Laplace MC, Maffrand JP: Effect of heparin on the angiogenic potency of basic and acidic fibroblast growth factors in the rabbit corneal assay. Internat J Tiss React 10:133-139,

- 1988.
- 4) **Grobelny D, Poncz L, Galardy RE**: Inhibitor of human skin fibroblast collagenase, thermolysin and pseudomonas aeruginosa elastase by peptide hydroxamic acids. *Biochemistry* 31: 7152—7154, 1992.
 - 5) **Schultz GS, Stern GA, Chegini N, Grant MB, Galardy RE, Grobelny D, et al**: Treatment of alkali-injured rabbit corneas with a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 3325—3331, 1992.
 - 6) 謝 培英: Dk 値の異なるガス透過性ハードコンタクトレンズ連続装用による各種動物への影響. *日コレ誌* 31: 8—19, 1989.
 - 7) **Folkman J, Klagsbrun M**: Angiogenic factors. *Science* 235: 442—447, 1987.
 - 8) **Klintworth GK**: Corneal angiogenesis. A comprehensive critical review. Springer-Verlag, New York, 45—50, 1991.
 - 9) **Ausprunck DH, Folkman J**: Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvascular Res* 14: 53—65, 1977.
 - 10) **Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N**: Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis growth factor- α . *Nature* 329: 630—632, 1987.
 - 11) **Gearing AJH, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, et al**: Processing of tumor necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. *Nature* 370: 555—557, 1994.
 - 12) **McGeehan GM, Beckerer JD, Bast RC Jr, Boyer CM, Champion B, Connolly KM, et al**: Regulation of tumor necrosis factor- α processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature* 370: 558—561, 1994.
 - 13) **Fini ME, Girard MT**: The pattern of metalloproteinase expression by corneal fibroblasts is altered by passage in cell culture. *J Cell Sci* 97: 373—383, 1990.
 - 14) **Fini ME, Girard MT**: Expression of collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinases by normal cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1779—1988, 1990.