

マイトマイシン C 1 回投与後の家兎眼強膜と前房水の マトリックスメタロプロテアーゼ発現への影響

羽入 貴子

新潟大学医学部眼科学教室

要 約

背 景：緑内障濾過手術後の濾過胞の癒着化を抑制するために常用されるマイトマイシン C は、強膜細胞数の減少や細胞外マトリックスの異常を起こすことが知られている。強膜と前房水のマトリックスメタロプロテアーゼの発現について検討した。

方 法：家兎 14 眼の結膜下にマイトマイシン C を 5 分間投与し、生理食塩水で洗浄した。1 週、2 週、1 か月後の強膜を組織培養し、培養液中の gelatin 分解酵素活性を zymography で調べた。1 か月の強膜組織に *in situ* zymography を行った。前房水の活性を zymography で調べた。

結 果：強膜組織と培養液に gelatinase の活性が亢進していた。前房水の活性に変化はなかった。

結 論：マトリックスメタロプロテアーゼの活性亢進が、マイトマイシン C 投与後の強膜細胞外マトリックスの異常な改変に関与している可能性がある。(日眼会誌 103: 186—192, 1999)

キーワード：マイトマイシン C, マトリックスメタロプロテアーゼ, 家兎, ザイモグラフィー, 組織ザイモグラフィー

The Effects of Single Mitomycin C Application on the Expression of Matrix Metalloproteinase in the Sclera and Aqueous of Albino Rabbits

Takako Hanyu

Department of Ophthalmology, Niigata University, School of Medicine

Abstract

Background : Topically applied mitomycin C, which is used to prevent scar formation after filtering surgery for glaucoma, is known to cause reduction in scleral cells and abnormal remodelling of scleral extracellular matrices. I examined in this study the effects of mitomycin C on the expression of matrix metalloproteinase in the sclera and aqueous humor.

Method : Mitomycin C was applied for 5 minutes to the bared sclera of 14 albino rabbit eyes. The sclera was organ cultured after 1 week, 2 weeks, and 1 month. The culture medium was subjected to zymography to quantitate the gelatinase activity. *In situ* zymography was performed on the sclera ob-

tained 1 month after mitomycin C application. The aqueous was also subjected to zymography.

Findings : The scleral tissue and its cultured media showed enhanced gelatinase activity. The aqueous showed no changes in gelatinase activity.

Conclusion : Increased activity in matrix metalloproteinase may be involved in the abnormal remodelling of scleral extracellular matrices after application of mitomycin C. (J Jpn Ophthalmol Soc 103 : 186—192, 1999)

Key words : Mitomycin C, Matrix metalloproteinase, Albino rabbit, Zymography, *In situ* Zymography

I 緒 言

マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)は、細胞外マ

トリックスを分解する亜鉛要求性のメタロプロテアーゼの総称である。その中で、ゼラチンや IV 型コラーゲンを主な基質とするものは gelatinase と呼ばれ、gelatinase

別刷請求先：951-8510 新潟市旭町通 1-757 新潟大学医学部眼科学教室 羽入 貴子

(平成 10 年 4 月 24 日受付, 平成 10 年 9 月 11 日改訂受理)

Reprint requests to: Takako Hanyu, M.D. Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine, 1-Asahi-machi-dori, Niigata 951-8510, Japan.

(Received April 24, 1998 and accepted in revised form September 11, 1998)

A, B がある。Gelatinase A は MMP-2 または 72 kD gelatinase と呼ばれ, gelatinase B は MMP-9 または 92 kD gelatinase と呼ばれている^{11,12)}。

マイトマイシン C (MMC) は従来, 翼状片手術に術後再発防止目的に眼科領域で使用されてきた³⁾。しかし, 翼状片の術後 MMC 点眼による強膜潰瘍, 石灰化, 穿孔などの合併症も次々に報告⁴⁾⁵⁾されてきた。1986 年, Chen ら⁶⁾が緑内障濾過手術時に MMC の 1 回投与を報告して以来, 術中 1 回投与での瘢痕形成阻止による良好な手術成績が次々に追試され確認されてきている。さらに, 点眼投与の際に発症した強膜潰瘍などの重篤な合併症もないことから, 現在濾過手術時の 1 回投与が普及している。しかしながら, MMC 1 回投与によっても濾過胞の非薄化の報告⁷⁾、また, MMC の眼組織への *in vivo*, *in vitro* への影響についてはテノン嚢や強膜線維芽細胞の細胞数減少^{8)~10)}、コラーゲンの減少¹⁰⁾を含む細胞外マトリックスの減少などの報告もある。

近年, 細胞外マトリックスの改変と修復に MMP が重要な役割を果たしていることが明らかにされきている¹¹⁾。今回我々はこの点に注目し, MMC の 1 回投与が細胞外マトリックスへ与える影響について, 前房水, 強膜における MMP の活性の変化を示標に検討したので報告する。

II 実験方法

1. 対象と MMC の投与法, 組織の採取, 処理法

実験動物として, 体重 3~4 kg の白色家兎 14 匹 28 眼を用いた。両眼に塩酸オキシプロカイン(ペノキシル[®])の点眼麻酔後, 左眼耳上側結膜を輪部から剥離し, 強膜を露出した後, MMC (0.4 mg/ml) を染み込ませたスポンジ (2×5×7 mm) を 5 分間強膜に接触させた。その後, 100 ml の生理食塩水で洗浄した⁸⁾。生食での洗浄は, 20 G 針のついた注射器から水圧をかけないようにしながら 3~4 分かけて洗浄した。他眼には MMC の代わりに生理食塩水を用い, 同様の処理を行った。1, 2 週間, 1 か月後にベントバルビタールナトリウム(ネンブタール[®])の大量静注で安楽的に屠殺し, 両眼を丁寧に摘出した。

それぞれ前房水を 0.1 ml ずつ採取し, 分注後, 実験まで -70℃ で保存した。また, 9 匹の手術施行部位の強膜を採取し, 強膜片を前後方向に 2 分割し, 1 片は OCT compound (Tissue Tek 社) に包埋し, もう 1 片は約 3×3.5 mm の大きさにトリミングし, 500 µl の無血清ダルベッコ変法イーグル培地 (Nissui 社) 中で 37℃, 5% CO₂ の条件下で器官培養を 48 時間行った¹²⁾。培養終了後, 強膜片の湿重量を測定し, 培養液は分注して -20℃ で保存した。6 匹の眼球は 10% ホルマリン液を用いて一晩漬浸固定した後, 手術施行部位の強膜を採取しパラフィン包埋した。5 µm の厚さの組織切片を作製してヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色をして脱水, 封入後, 顕微鏡で観察し写真撮影した。

2. Zymography¹²⁾

前房水 15 µl を水中解凍し, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis を 0.15% ゼラチン入りゲルで 4℃, 80 V, 12 時間行った。その後, ゲルを 2.5% Triton-X 中で 1 時間浸透し, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM CaCl₂ の反応液の中に入れ 37℃, 12 時間おいた。ゲルをクーマシーブリリアントブルーで染色した。検出されたバンドが酵素反応によるものであることを確認するために, 一部のゲルは反応液中にキレート剤である 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10 mM 1,10-phenanthroline を添加して酵素反応が阻害されるかどうかを確かめた。強膜の器官培養液 20 µl も同様にを行い, バンドはゲル解析ソフト NIH image を使用してバンドの濃度を定量的に解析し, 強膜湿重量で補正した。

3. *In situ* zymography

Gelatinase 活性を組織切片の上で検出することを試みた¹³⁾。Fluorescein Labeling kit (Pharmacia) を用い, gelatin-fluorescein を作製した。一方, 50 mM Tris, 0.05% Brij, 0.01 M CaCl₂ 入り 1% アガロース (BRL 社, 低融点) 溶液を作製した。この 1 mg/ml gelatin-fluorescein と 1% ア

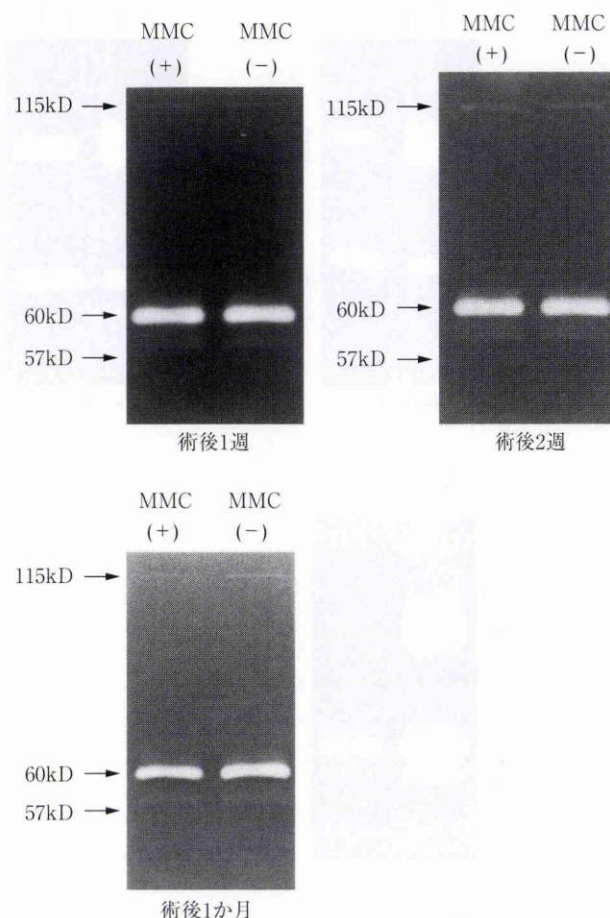


図1 前房水の gelatin zymography.

MMC (+) は投与群, MMC (-) は対照群を示す。115, 60, 57 kD にバンドがみられた。投与群, 対照群に差はない。MMC: マイトマイシン C

ガロース液を 1:1 で混合し、スライドガラスに均一に塗布し、暗所で 2~3 時間乾燥した。手術施行部の強膜を 6 μm の厚さで凍結切片を作製し、前述した gelatin-fluorescein でコーティングしたスライドガラス上に載せ、50 mM Tris, 0.05% Brij, 0.01 M CaCl_2 を含んだバッファを滴下し、カバーガラスをかけた後、遮光した湿箱に並べて 37°C で 6 時間反応させた。反応後、Zeiss 社落射式蛍光顕微鏡で観察し、撮影の露光時間は 15 秒に統一した。

III 結 果

1. 前房水の zymography

前房水の gelatin zymography を図 1 に示した。115, 60, 57 kD にそれぞれバンドが観察されるが、MMC 群と対照群の間に差はみなかった。また、MMC 投与後 1, 2 週、1 か月のすべてにおいて出現するバンドに変化はみなかった。また、キレート剤を添加したゲルにはいかなるバンドも検出できなかった。

2. 強膜の zymography

強膜器官培養の培養液中の gelatinase 活性を図 2 に示

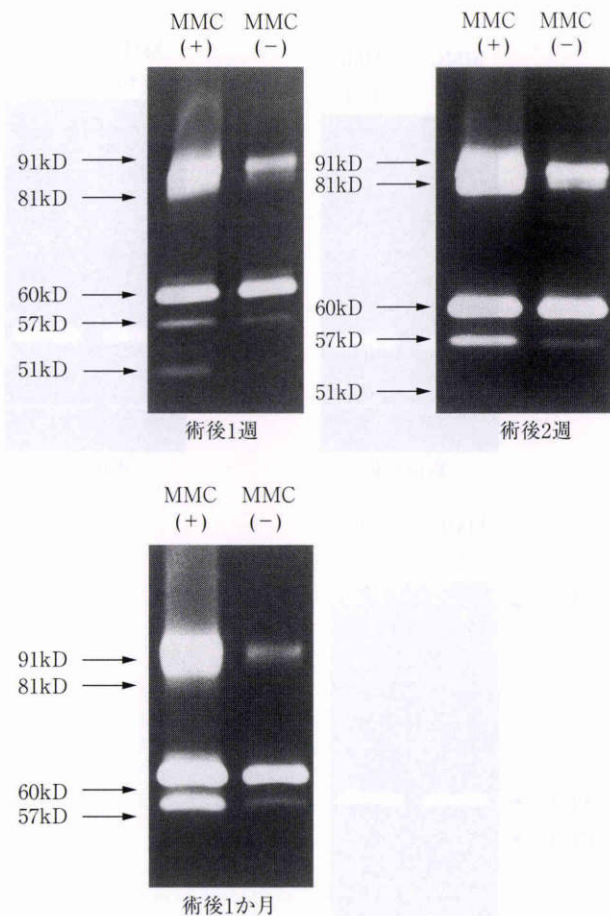


図 2 強膜器官組織培養液の gelatin zymography. MMC(+)は投与群, MMC(-)は対照群を示す。91, 87, 81, 60, 57 kD にバンドがみられ投与群の方が gelatinase の活性が亢進していた。また、投与群では術後 1, 2 週において 51 kD にもバンドがみられた。

した。術後 1, 2 週, 1 か月のすべてにおいて、MMC 群と対照群ともに 91, 87, 81, 60, 57 kD の分子量にバンドを検出できた。91, 87 kD が pro-gelatinase B であり, 81 kD の分子量が mature-gelatinase B に相当する。MMC 処理群では明らかにこの pro-gelatinase B および mature-gelatinase B の両方とも術後 1, 2 週, 1 か月すべてにおいて対照群に比べて強い発現を示した。60 kD のバンドは pro-gelatinase A に相当し, 57 kD のバンドは mature-gelatinase A に相当する。MMC 投与群は 2 週~1 か月で対照群に比べ発現が特に 57 kD の mature-gelatinase A が亢進していた(図 3)。また、MMC 投与群では術後 1, 2 週において 51 kD のバンドも出現していた。

3. 強膜の *in situ* zymography と強膜の HE 染色所見

図 4 に強膜組織の gelatinase 活性を *in situ* zymography で示した。Gelatinase の活性は組織切片上で蛍光色素の脱落で示されるが、術後 1 か月の強膜組織ではこの蛍光色素の脱落が明らかに MMC 処理群で対照群に比べて多くみられ、gelatinase の活性が亢進していることが示された。図 5 に強膜の HE 染色所見を示した。

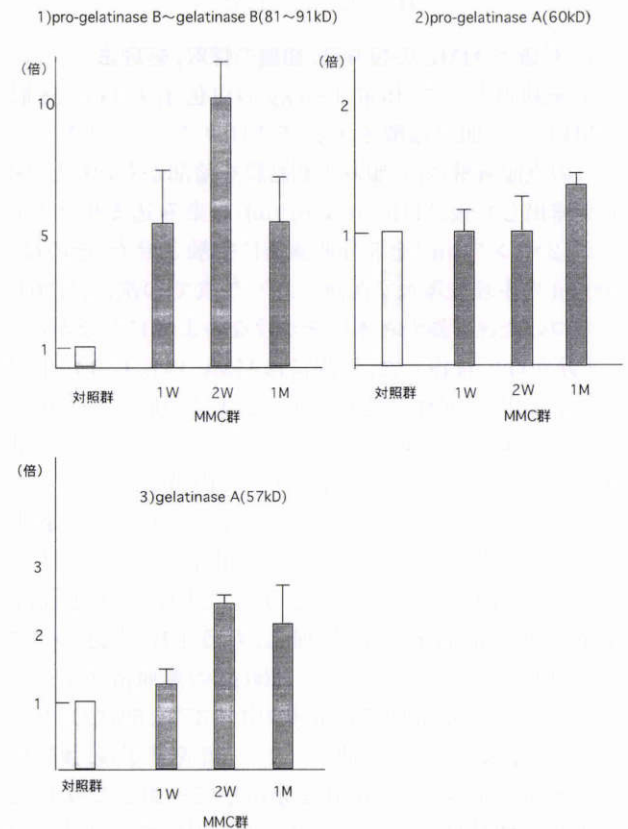


図 3 強膜器官組織培養液の gelatin zymography のバンドの定量的解析。

MMC 投与眼のバンドの濃度値を対照眼の値で割ったものの平均と標準偏差 (1 W n=3, 2 W n=3, 1 M n=3)。

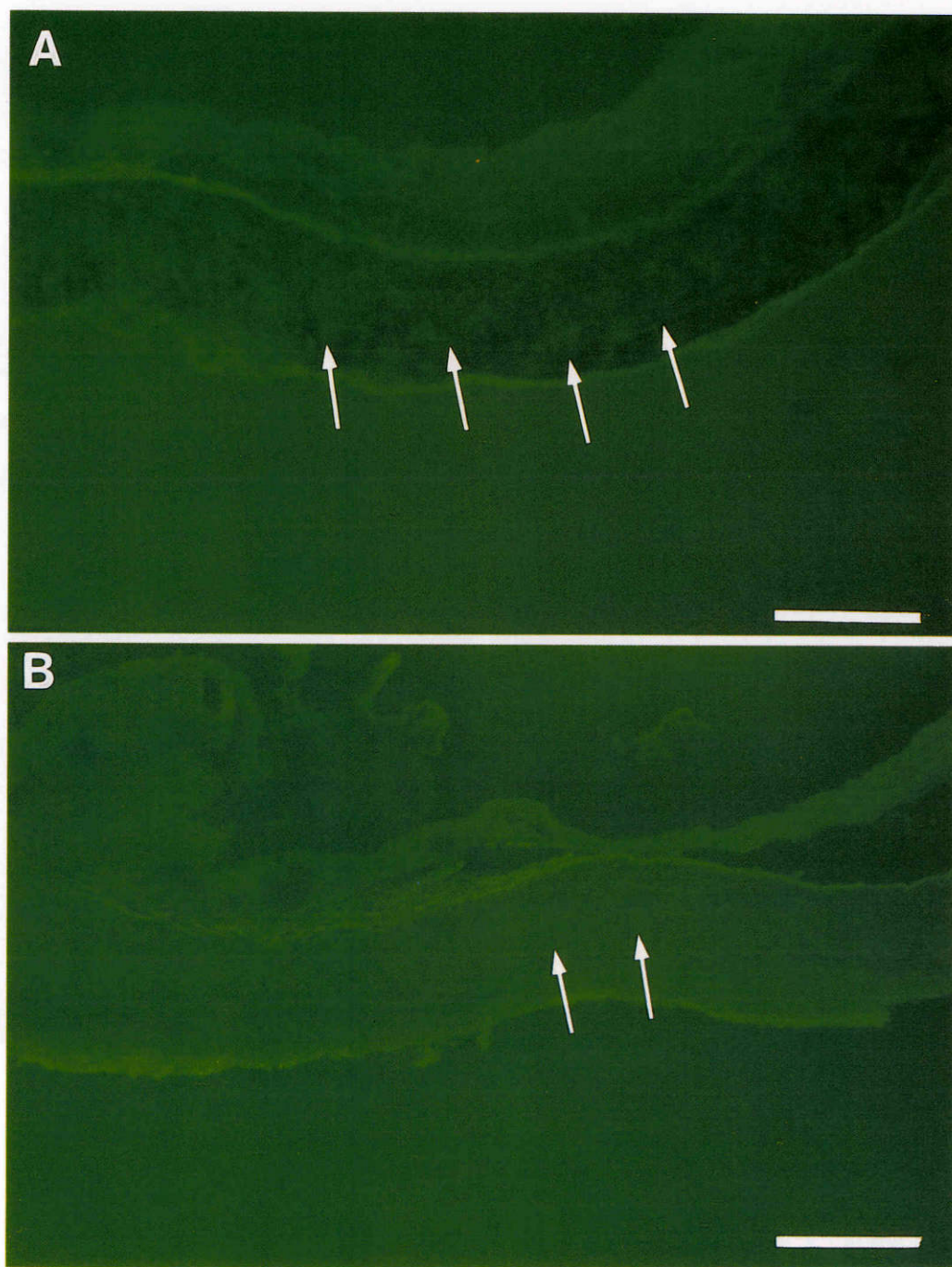


図4 術後1か月の強膜 *in situ* zymography.

A: MMC 投与群術後1か月の強膜. B: 対照群の術後1か月の強膜. 蛍光色素の脱落は gelatin が分解されている部位を示す(矢印). B に比べ A では gelatin 分解酵素の活性亢進がみられる. バーは 0.4 mm

IV 考 按

MMC はアルキル化作用により DNA 合成を阻害する物質である¹⁴⁾. この MMC は, 眼科領域ではかつて翼状片手術後の再発防止の目的で点眼で用いられたが, 翼状片手術後の MMC 点眼に伴う合併症として強膜穿孔などが報告された. 一方, 他の眼科領域への応用として, この MMC の線維芽細胞増殖抑制効果を利用して, 緑内障の濾過手術時に術中1回の投与が広く行われるようになって

てきており, それにより濾過胞の癒着化が防止され, 術後の眼圧コントロールは飛躍的に向上してきた¹⁵⁾. 幸い, これまでこの術中1回投与による強膜, 結膜の重篤な合併症は報告されていないが, 点眼による翼状片術後の MMC による合併症は, 数年後の長期経過後に起こっていることもあり, MMC の強膜組織に与える影響, あるいはその病態の解明は重要と考えられる.

MMC は家兎眼で結膜下に 0.2 mg/ml, 1 回投与後の半減期が強膜で 0.2~0.45 時間であり, また, 0.4 mg/ml

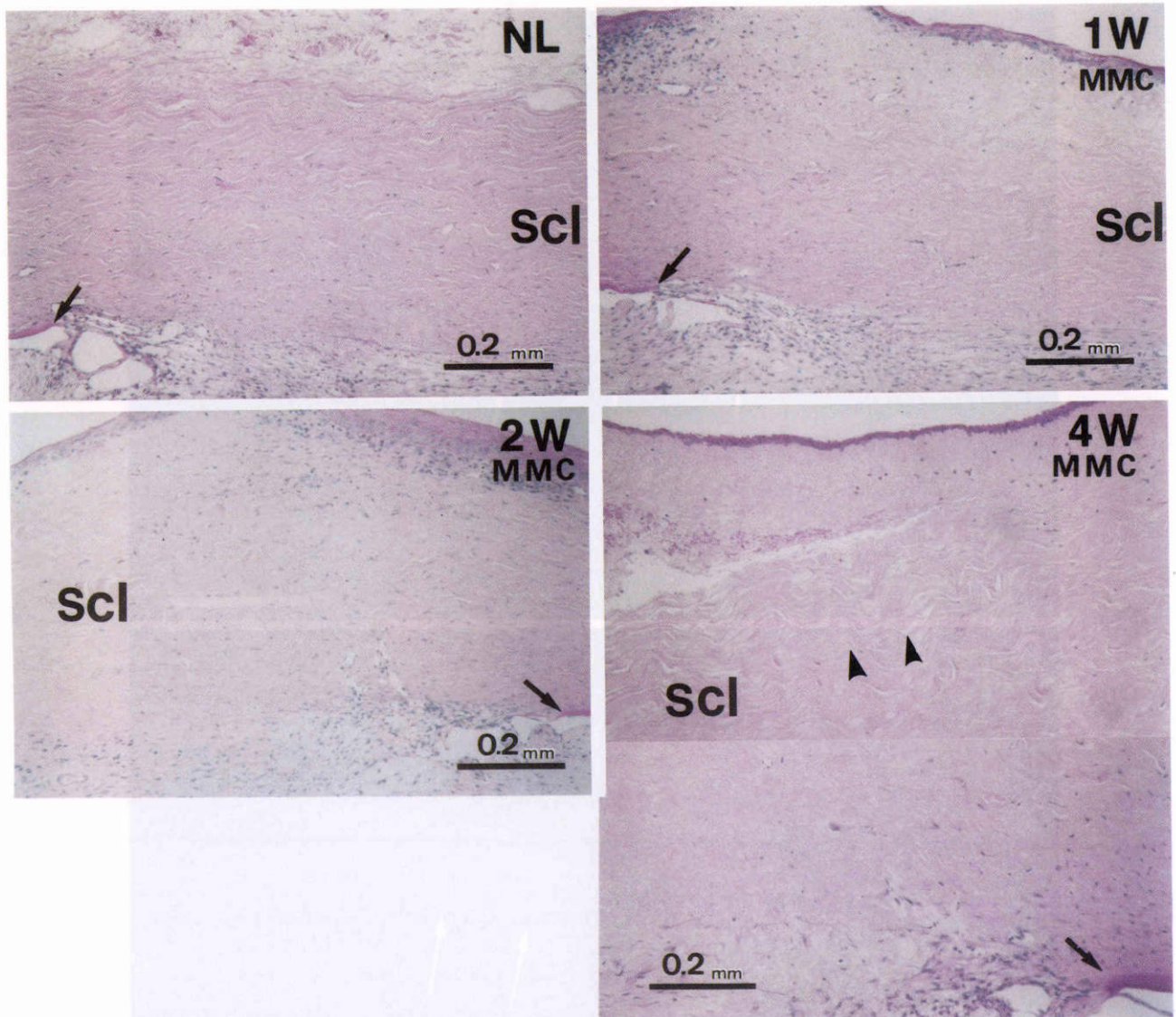


図5 強膜のヘマトキシリン・エオジン染色光学顕微鏡所見。

NL：対照群の術後1か月，1W：MMC投与群術後1週，2W：MMC投与群術後2週，4W：MMC投与群術後1か月，MMC投与群では対照群に比べ，特に1か月後(図D)で強膜線維芽細胞の脱落，膠原線維の配列の乱れ(矢じり)がみられた．バーは0.2 mm．矢印はデスメ膜を示す．

をスポンジで投与後灌流した場合は，半減期は約0.30時間であると報告¹⁶⁾されている．しかし，MMCの1回投与が強膜の線維芽細胞に与える影響は長期にわたっており，投与3か月後に著明な細胞数の減少を来したとする報告⁸⁾もある．MMCの影響は強膜線維芽細胞の増殖抑制ばかりでなく，コラーゲン産生の減少¹⁷⁾や配列の乱れなど細胞外マトリックスへの影響も次々に報告⁸⁾されている．

今回細胞外マトリックスの分解に重要な役割を担っているgelatinaseの発現について，MMC処理後の強膜，前房水について検討した．前房水では，それらの活性には変化はなかった．一方，強膜の器官培養液において培養液中の，特に1か月後の91～81 kDのgelatinase B，60，57 kDのgelatinase Aの活性に亢進がみられた．また，51 kDにもバンドがみられた．このバンドはproMMP-1(procol-

lagenase)とproMMP-3(prostromelysin)のいずれか，もしくは両方の和であると思われる．Gelatin分解酵素活性の亢進は，さらに*in situ* zymographyで強膜組織切片上でも確認することができた．今回示した細胞外マトリックス分解酵素群の発現の亢進は，これまで報告されてきた強膜の非薄化の原因の一つである可能性があるものと考えられた．

MMPは生体の様々な組織で生成され，分泌されている．正常あるいは病的な状態における細胞外マトリックスの改変，修復の過程においてMMPは重要な役割を担っている．MMPはpro-enzymeとして生成し細胞外に分泌され，その後，様々なペプチダーゼにより切断されて活性型に変換される．その活性中心には亜鉛が存在し，活性化機構はシステインスイッチメカニズムと呼ばれている¹¹²⁾．Gelatinaseのpro-enzymeの分泌を促進するも

のとしては、インターロイキン-1 α (IL-1 α)、腫瘍壊死因子 α (TNF α)、トロンビンなどがあり¹⁸⁾¹⁹⁾、また、抑制する因子としてインターフェロン (INF) β などが知られている²⁰⁾。これに対し、MMP の活性を特異的に阻害する因子は tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) と呼ばれており、現在 TIMP 1~4 が知られている²¹⁾。

今回の実験系において、MMC 処理後の強膜組織の gelatinase A, B の活性が亢進し、また、それらの pro-enzyme の分泌の増加が明らかとなった。強膜器官培養液中の gelatinase は細胞外に分泌されたものの、一部が培養液中に溶出したものであり、*in situ* zymography では切片の断面上で gelatinase 活性をみていることになる。これらの gelatin 分解酵素活性の亢進が強膜組織の細胞外マトリックスの異常に関与している可能性を示すものと考えられた。しかしながら、今回の実験では何故これらの gelatinase の発現が亢進したかの機序については明らかではなく、今後の検討が必要である。これを説明するのに、最近末梢血の単球と B リンパ芽球株において MMC を投与したところ、IL-1 の分泌が著明に上昇したとの報告²²⁾²³⁾があり、既に述べたように IL-1 がマトリックスメタロプロテアーゼの分泌を誘導する物質の一つであることから、今回の実験結果を説明するのに都合がよいと考えられる。今後、この点については IL-1 の動態の検討が必要である。

また、マトリックスメタロプロテアーゼと TIMP は、それぞれにバランスをとって細胞外マトリックスのリモデリングに関与していることが報告されている。今回、この TIMP については検討しなかったが、*in situ* zymography の結果は明らかに分解系の亢進を示しており、この点からも強膜組織においては組織の分解、それに引き続く細胞外マトリックスの異常が引き起こされているものと考えられる。

稿を終えるに当たり、御指導と御校閲をいただきました新潟大学眼科学教室阿部春樹教授、琉球大学眼科学教室沢口昭一教授に深謝いたします。御指導いただきました新潟大学遺伝子実験施設桑野良三助教授に深謝いたします。

本論文の要旨は第 101 回日本眼科学会総会で報告した。

文 献

- 1) 宮崎 香：マトリックスプロテアーゼと癌の浸潤、転移。癌転移の分子機構。メジカルビュー社、東京、92—107, 1993。
- 2) 佐藤 博：細胞外マトリックス分解酵素と膜型メタロプロテアーゼ。癌転移の分子医学。羊土社、東京、88—95, 1996。
- 3) 国友 昇、森 茂：翼状片の研究。日眼会誌 67：601—606, 1963。
- 4) 杉本光子、佐々木淳子、八代成子、木全奈都子、吉野圭子：翼状片手術の治療成績と術後合併症。臨眼 48：892—894, 1994。
- 5) 山之内卯一、高久 功、津田尚幸、梶原喜徳、峰 当典、上野泰志、他：マイトマイシン C 点眼によると思われる強膜軟化症症例について。臨眼 33：139—144, 1979。
- 6) Chen CW, Huang HT, Sheu MM: Enhancement of IOP control effect of trabeculectomy by local application of anticancer drug. Acta XXV Concilium Ophthalmologicum (Rome), 1487—1491, 1986。
- 7) Cordeiro MF, Constabel PH, Alexander RA, Bhattacharya SS, Khaw PT: Effects of varying the mitomycin-C treatment area in glaucoma filtration surgery in rabbit. Invest Ophthalmol Vis Sci 38: 1639—1646, 1997。
- 8) 笹川智幸、沢口昭一、阿部春樹、海谷忠良：マイトマイシン C の強膜線維芽細胞に対する影響 第 1 報。眼紀 46: 1275—1280, 1995。
- 9) Watanabe J, Sawaguchi S, Fukuchi T, Abe H, Zhou L: Effects of MMC on the expression of proliferating nuclear antigen after filtering surgery in rabbits. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 235: 234—240, 1997。
- 10) Mietz H, Arnold G, Kirchhof B, Diestelhorst M, Krieglstein GK: Histopathology of episcleral fibrosis after trabeculectomy with and without mitomycin C. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 234: 364—368, 1996。
- 11) Woessner JF: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB J 5: 2145—2154, 1991。
- 12) 須田生英子、沢口昭一、市辺幹雄、岩田和雄：眼軸伸展に伴う強膜の matrix metalloproteinase ならびに tissue inhibitor of metalloproteinase の発現の変化。日眼会誌 99: 23—28, 1995。
- 13) Galis ZS, Sukhova GK, Libby P: Microscopic localization of active proteases by *in situ* zymography: Detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue. FASEB J 9: 974—80, 1995。
- 14) Tomasz M, Lipman R, Chowdary D, Pawlak J, Verdine GL, Nakanishi K: Isolation and structure of covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. Science 235: 1204—1208, 1987。
- 15) Kitazawa Y, Hiromi SM, Yamamoto T, Kawase K: Low-dose and high-dose mitomycin trabeculectomy as an initial surgery in primary open-angle glaucoma. Ophthalmology 100: 1624—1628, 1993。
- 16) Kawase K, Matsushita H, Yamamoto T, Kitazawa Y: Mitomycin concentration in rabbit and human ocular tissues after topical administration. Ophthalmology 99: 203—207, 1992。
- 17) Saika S, Ooshima A, Yamanaka O, Kimura M, Okada Y, Tonoe O, et al: *In vitro* effects of doxorubicin and mitomycin C on human Tenon's capsule fibroblast. Ophthalmic Res 29: 91—102, 1997。
- 18) Sang QX, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE: Proteolytic and non-proteolytic activation of hu-

- man neutrophil progelatinase B. *Biochem Biophys Acta* 1251: 99—108, 1995.
- 19) **Fabunmi RP, Newby AC**: Divergent regulation by growth factors and cytokines of 95 kDa and 72 kDa gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinase-1, -2, and -3 in rabbit aortic smooth muscle cells. *Biochem J* 315: 335—342, 1996.
- 20) **Kato N, Nakajima M**: Suppression of gelatinase production with decreased invasiveness of choriocarcinoma cells by human recombinant interferon beta. *Am J Obstetrics Gynecol* 172: 601—606, 1995.
- 21) **Greene J, Wang M, Liv VE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE**: Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* 271: 30375—30380, 1996.
- 22) **Futamura Y, Matsumoto K**: Characteristics of peripheral blood monocytes and bone marrow macrophages from rat treated with mitomycin C, 5-fluorouracil or phenylhydrazine. *J Toxicol Sci* 20: 1—7, 1995.
- 23) **Akiyoshi T, Arinaga S**: Augmentation of the generation of cell-mediated cytotoxicity in culture by mitomycin C. *Cancer Immunol Immunother* 24: 259—262, 1987.