

ヒトおよび糖尿病ラット白内障の水晶体上皮細胞における アポトーシスの免疫組織化学的研究

高村 佳弘, 杉本 佳彦, 久保 江理, 高橋 幸男, 赤木 好男

福井医科大学眼科学教室

要 約

目 的：水晶体上皮細胞におけるアポトーシスを免疫組織化学的に検索する。

対象と方法：白内障手術で採取したヒト前囊(53例 68眼)および3週齢ラット(72匹 144眼)にストレプトゾトシンを投与して作製した糖尿病モデルの水晶体上皮細胞に対し, TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)染色を行った。ラットモデルには増殖細胞核抗原(PCNA)免疫組織染色も行った。

結 果：ヒト前囊の68眼中59例においてTUNEL陽性細胞を確認したが, その分布については白内障の形

態による差はなかった。糖尿病ラットでは上皮の堆積部付近にTUNEL陽性細胞があった。上皮の堆積部ではDNA合成の指標となるPCNA陽性細胞も観察された。

結 論：ヒト水晶体上皮においてアポトーシスが存在する可能性が推定された。高血糖などの因子によりアポトーシスと増殖とがともに誘導されると考えた。(日眼会誌 104: 221—225, 2000)

キーワード：アポトーシス, TUNEL法, 水晶体上皮細胞, 免疫組織化学法

Immunohistochemical Study of Apoptosis of Lens Epithelial Cells in Human and Diabetic Rat Cataracts

Yoshihiro Takamura, Yoshihiko Sugimoto, Eri Kubo, Yukio Takahashi and Yoshio Akagi

Department of Ophthalmology, Fukui Medical University

Abstract

Purpose : To evaluate apoptosis of lens epithelial cells with immunohistochemical methods.

Methods : We performed terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assays on capsulotomy specimens (68 eyes in 53 patients) from patients who had undergone cataract surgery and an epithelium of diabetic cataracts in rats (144 eyes in 72 rats). The animal model of diabetic cataracts was prepared by injection of streptozotocin in three-week old rats. The rats were also examined using the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemical staining method.

Results : Although some TUNEL-positive cells were detected in capsulotomy specimens, we recog-

nized little correlation between its distribution and morphological classification of cataracts. In the animal model of diabetic cataracts, TUNEL-positive cells were seen around the region where epithelial cells had accumulated. In the accumulated region, PCNA labeled cells undergoing DNA synthesis were also detected.

Conclusion : These results suggest the possibility that apoptosis occurs in human lens epithelial cells and apoptosis and proliferation may be induced by factors such as hyperglycemia. (J Jpn. Ophthalmol Soc 104: 221—225, 2000)

Key words : Apoptosis, TUNEL assay, Lens epithelial cell, Immunohistochemical staining

I 緒 言

能動的な細胞の死であるアポトーシスは, 眼科領域に

においても最近活発な論議がなされている。緑内障では網膜神経節細胞が, 網膜色素変性症や網膜剥離では視細胞がアポトーシスを起こしていることが明らかとなってき

別刷請求先：910-1193 福井県吉田郡松岡町下合月 23-3 福井医科大学眼科学教室 高村 佳弘
(平成 11 年 5 月 17 日受付, 平成 11 年 10 月 22 日改訂受理)

Reprint requests to: Yoshihiro Takamura, M.D. Department of Ophthalmology, Fukui Medical University,
23-3 Shimoaizuki, Matsuoka-cho, Yoshida-gun, Fukui 910-1193, Japan

(Received May 17, 1999 and accepted in revised form October 22, 1999)

ている¹¹⁻¹³⁾。これまで決定的な治療法がなかった難治性疾患にアポトーシスが深く関与しているなら、その発現を阻止することで病状の進行を抑えたりあるいは改善できるかも知れない。こういった治療はこれまでにない新しい分野であり、この点でアポトーシスの研究は眼科領域において大きな意味を持つ。

これは白内障治療においても同様である。水晶体については発生・形態形成においてのアポトーシスの存在は定着しつつあるが、後発的な白内障におけるアポトーシスの誘導については未だ不明な点も多く、意見が分かれている¹¹⁻¹²⁾。そこで今回は、ヒトと糖尿病ラット白内障モデルを対象として、水晶体上皮細胞におけるアポトーシスを TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 法を用いて免疫組織化学的に検索した。

II 実験方法

以下の2群を対象とした。

対象1. ヒト前囊：術前に承諾を得た患者(53例68眼)から白内障手術において25G針ないし鑷子で前囊切開後、不要となった前囊片を採取し、直ちに4%パラホルムアルデヒド含有0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で2~3時間固定した。

対象2. 糖尿病ラットモデル：3週齢(体重50g)のSprague-Dawley(SD)系雄ラットにストレプトゾトシン(Sigma)を体重1g当たり0.1mg腹腔内に投与して糖尿病ラットモデルを作製した。4~12週齢まで隔週毎に前囊を採取した。各週12匹ずつ計72匹使用、それぞれ血糖の測定をストレプトゾトシン投与1週後と前囊採取前の2回行い、血糖値200mg/dl以下の個体は除外した。エーテルで麻酔致死後、直ちに眼球を摘出し、水晶体後囊側から切開し水晶体上皮細胞と前囊を一塊として取り出した。今回、糖尿病ラットモデルにおいては、TUNEL法とともに核DNA合成能の指標となる抗proliferating cell nuclear antigen(PCNA)免疫染色も行った。ラットの片眼をそれぞれ、TUNEL法には4%パラホルムアルデヒド含有0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で、抗PCNA免疫組織化学法にはメタノールで固定した。

両群から採取した前囊を伸展標本とし、10倍希釈したproteinase K(DAKO)で処理した後、TUNEL法に従い免疫組織化学染色を行った。Terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)の反応にはApopDETEK[®](DAKO)を用い、biotin標識化dUTPおよびperoxidase avidin複合体の反応にはsimply sensitive[®] Horseradish Peroxidase-DAB *In Situ* Detection System(ENZO)を用いた。また、PCNA免疫組織化学法ではavidin-biotin complex(ABC)法によりヒストファインSAB-PO(M)キット[®](ニチレイ)を用いて行い、一次抗体には抗PCNA monoclonal antibody(NC-012, Novocastra Lab., UK, mouse monoclonal antibody)を用いた。それぞれ陰性対照にはTdT,

抗PCNA monoclonal antibodyを用いない標本を使用し、切片は光学顕微鏡で微分干渉プリズム(Olympus)を介して観察した。

III 結果

対象1：ヒト前囊ではLOCS III分類による白内障の形態、糖尿病の有無などに注目した。LOCS III分類は核の色調、混濁を6段階に、皮質・後囊下混濁を徹照像でそれぞれ5段階に評価するものであり、白内障の進行を詳

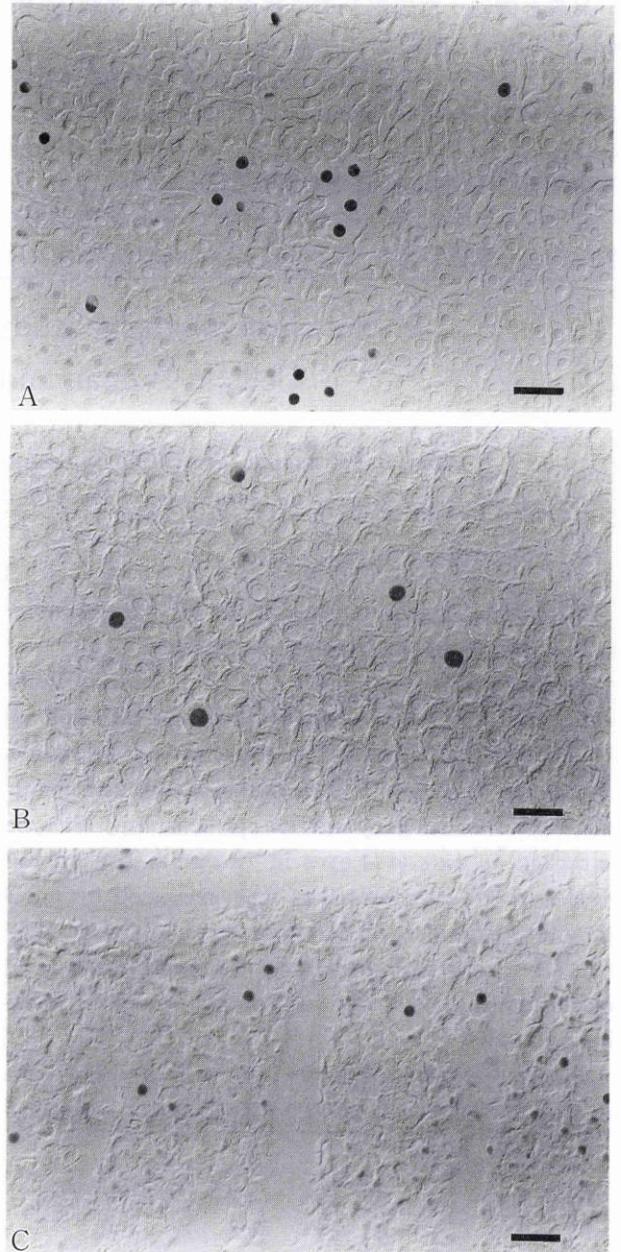


図1 ヒト水晶体前囊におけるTdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling(TUNEL)染色例。

TUNEL染色例。

症例A：糖尿病(-)LOCS III分類C₁N₂P₅

症例B：糖尿病(-)LOCS III分類C₄N₂P₄

症例C：糖尿病(+)LOCS III分類C₃N₄P₂

バーは27μm

細に把握できる¹³⁾¹⁴⁾. 68 眼中 59 眼において TUNEL 陽性細胞があった. TUNEL 陽性例として, 以下の 3 例を示す(図 1).

症例 A: 70 歳男性 糖尿病(-) LOCS III 分類 C₁N₂P₅

症例 B: 61 歳女性 糖尿病(-) LOCS III 分類 C₄N₂P₄

症例 C: 69 歳女性 糖尿病(+) LOCS III 分類 C₃N₄P₂

TUNEL 陽性細胞の多くは細胞質が圧平されたように観察された. A, B のように皮質の混濁が乏しい方にむしろ陽性細胞があったように, 白内障の病型と TUNEL 陽

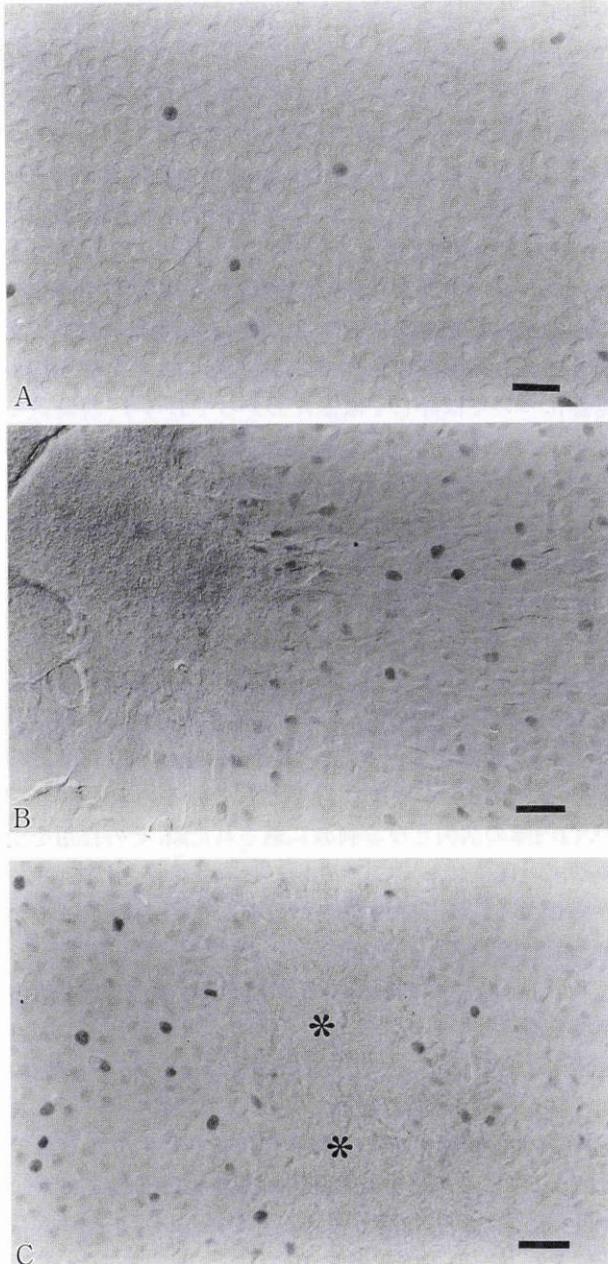


図 2 ストレプトゾトシン投与による糖尿病ラットの水晶体前囊の TUNEL 染色例.

A: 投与後 6 週目. 軽度な白内障を呈していた例. TUNEL 陽性細胞はまばらにあった. B: 投与後 9 週目. C: 投与後 12 週目. B, C ともに高度に白内障を呈しており, 上皮細胞の堆積部(*)の周囲に TUNEL 陽性細胞があった. バーは 27 μ m

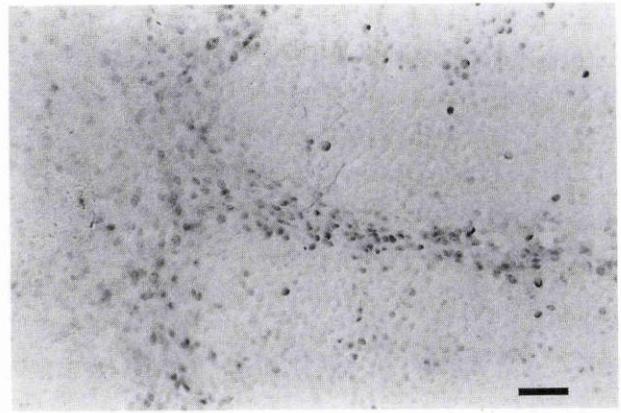


図 3 ストレプトゾトシン投与による糖尿病ラットの水晶体前囊の増殖細胞抗原(PCNA)染色例.
上皮細胞の堆積部に一致して PCNA 陽性細胞が集積していた. バーは 55 μ m

性細胞の数との間に相関関係を見出せなかった. また, 切片の形状から術前のスケッチを基に皮質の混濁部と陽性細胞の分布とを照らし合わせた, 一致しなかった. 糖尿病に特異的ではないが, C のように細胞が線上に消退している場合があり, 今回その周辺にも TUNEL 陽性細胞があった. この線状に消退した部分は幅が細胞 1~2 個分であり, 術中の 25 G 針の操作によるものではないと思われた.

対象 2: ストレプトゾトシン投与による糖尿病ラットモデルにおいて, 白内障の程度と血糖値や投与後の期間とは必ずしも相関せず, 個体差も大きい. 糖白内障の起きていないラットでは TUNEL 陽性細胞はなかった. 立体顕微鏡下で白内障がごく軽度であったラットでは, TUNEL 陽性細胞が図 2 A のようにみられた. 肉眼的にも高度な白内障を呈していたラットモデルにおいては, 上皮細胞が重積した部分があり, その周辺部に TUNEL 陽性細胞があった(図 2 B, C). また, 同様な上皮の堆積部に PCNA 陽性細胞が高密度に観察された(図 3). 個々の TUNEL 陽性細胞において白内障の程度による形態的な差はなかったものの, 白内障が高度に進行したラットでは上皮の堆積部周辺に TUNEL 陽性細胞が高密度に分布している点で異なっていた.

IV 考 案

これまでの報告から, 発生や形態形成の段階における水晶体のアポトーシスの存在は定説となりつつある^{4)~6)}. しかし加齢性の, ないしは糖尿病などの外からのストレスによる水晶体の変性, つまり白内障の出現の際に後発的にアポトーシスが誘導されていないか, という疑問がここで生じてくる. この問題に対しては, 現在なお議論が分かれている^{8)~12)}. そこで, 今回は水晶体上皮に対し免疫組織化学的に検索を行い, アポトーシスと白内障との関連を探り, 先の疑問に対する解決への糸口とす

ることを目的とした。

今回、水晶体上皮のアポトーシスを免疫組織化学的に検索する上で TUNEL 法を用いた。アポトーシスの定義からすると、その判別には電子顕微鏡的アプローチが必須であるが、これは組織の広範な検索には向いていない。また、光学顕微鏡レベルでもアポトーシス小体を正常な核と分別することは可能であるが、初期段階のアポトーシス細胞を見落とす可能性がある。TUNEL 法は DNA 切断量を組織化学的に鋭敏に検出でき、固定標本にも用いることが可能であり、先の問題に対しても本法は有利と考えられる¹⁵⁾。

本法による結果を論議する上で最も重要な点は、果たして陽性細胞が本当にアポトーシスかどうかということであろう。DNA 断端であれば染色される可能性があるわけで、ネクロシスで核が染まることも考えられる^{16)~19)}。形態的にはネクロシスは核、細胞質とも膨化することが原則であり、アポトーシスでは細胞質の変化は比較的少ないとされているが、TUNEL 陽性細胞の多くは細胞質が圧平されたように観察された。また、採取された前囊の切片の辺縁の部分は過度に染色される傾向があり、反応の過程で人為的に DNA の切断が起きている可能性もあると思われた。アポトーシス以外の原因で核のみが染色された場合、いわゆる偽陽性細胞として組織切片に混在してしまうことが考えられる。ヒトの前囊では糖尿病の有無や白内障の病型による特徴的な差を見出せなかったが、切片の辺縁に偽陽性が多いと、例えばアポトーシスと周辺部の皮質白内障との関連性を評価する際には支障となる。この点が今回の白内障の病型や糖尿病との関係が見出せなかった原因の一つと考えられる。ただし今回は、糖尿病に関しては標本数が 9 例と少なく、TUNEL 陽性細胞の分布の特徴を見出すには今後の追加検討が必要と思われた。また、TUNEL 陽性細胞数は計測していないが、固定期間が長くなった場合、特に 1 週間以上固定すると切片全体に占める陽性細胞の割合が若干増えるようであった。これは固定標本が経時的に DNA が切断されていくことが影響していると思われる²⁰⁾。本報告では固定後 2 日以内に染色し、切片の辺縁部以外の観察のみを結果として提示した。TUNEL 法を評価する上で、標本の固定期間や蛋白分解酵素の濃度などといった条件の差が結果にどのように影響するかをさらに検討していく必要があると思われた。

今回の TUNEL 陽性細胞がアポトーシス細胞であるとする、それらはいずれ消退していくと考えられるが、減少した分は新たな増殖により補充されるのであろうか、といった疑問が残る。アポトーシスが発現した際、核の凝集という細胞死の形態的特徴がみられてからは、アポトーシス細胞は通常速やかに除去されると考えられる²¹⁾²²⁾。常に水晶体上皮においてアポトーシスが起っていると仮定すると、新たな増殖による補充がなければ

上皮細胞は短時間ですべて消退することになる。このような理由から、水晶体におけるアポトーシスを疑問視する報告⁹⁾もみられる。以上から、水晶体上皮のアポトーシスを検討するには、同時にその増殖能も併せて考えていく必要があると思われる。水晶体上皮の増殖能に関しては、著者らも主にラットに対して顕微蛍光測光法や³H-サイミジンオートラジオグラフィ法、抗 PCNA 抗体免疫組織化学法などを用いて検討を行ってきた。その結果、ラットの週齢数や糖負荷などの飼育条件の違いによって増殖細胞の程度や分布も異なることを確認している²³⁾。アポトーシスがまず誘導され、減少した細胞を補充するように増殖が惹起されるのか、あるいは逆に過剰に増殖することでアポトーシスが誘導されるのかはわからない。糖尿病ラットにおける増殖能の検索とアポトーシスの検索は互いに独立しており、直接両者の関係を明らかにしたわけではない。しかし、上皮細胞の堆積部周辺に TUNEL 陽性細胞、および堆積部に PCNA 陽性細胞があったことはアポトーシスと増殖能との関連性を推定するものと考えている。ヒトにおいては、増殖帯において生涯を通じて増殖がなされているとされるが、上皮細胞の動態については詳しくはまだわかっておらず、現時点でアポトーシスを否定する根拠にはならないと考えられる。アポトーシスと増殖能との関係についての検討を進めることで、今後、水晶体上皮におけるアポトーシスの機序が明らかとなっていかも知れない。

白内障の病因は酸化的ストレスや放射線などがいわれているが、原因が多様性であっても白内障の組織的变化は線維膨化とそれに伴う蛋白変性が中心である点で共通している。よって、病因による差が組織的特徴に反映されにくく、この点がアポトーシス細胞の分布と白内障との病型との相関を不明瞭なものとしているのかも知れない。白内障の病因となる刺激に晒された際、その作用を受けやすい部位においてアポトーシスが誘導されている、つまりは TUNEL 陽性細胞が分布しているのではないかと考えている。

アポトーシスは細胞間で互いにシグナルを出し、その発現を調節していることがわかってきている²³⁾。しかし、水晶体は血管やリンパ管の影響を受けない単一の細胞のタイプから成る器官、組織という点で特殊である。したがって、他の細胞からのシグナルに依存せずに生存可能という点から、水晶体上皮細胞は細胞死を抑制する因子を自らに生産していると考えられている⁴⁾²³⁾。水晶体が自らにアポトーシスの発現を調節しているとする、加齢的变化や高血糖・外傷といった要因により、後発的にその抑制がはずれるなどしてアポトーシスが誘導されることは十分考えられる。今後、これらの白内障の病因とアポトーシスとの関連を探る上で、免疫組織化学的な手法での検索は必要であり、本研究は大きな意味を持つと考えられる。

文 献

- 1) **Kerrigan LA, Zack DJ, Quigley HA, Smith SD, Pease ME** : TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 115: 1031—1035, 1997.
- 2) **Portera-Cailliau C, Sung CH, Nathans J** : Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 974—978, 1994.
- 3) **Cook B, Lewis GP, Fisher SK, Adler R** : Apoptotic photoreceptor degeneration in experimental retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 990—996, 1995.
- 4) **Ishizaki Y, Voyvodic JT, Burne JF, Raff MC** : Control of lens epithelial cell survival. *J Cell Biol* 121: 899—908, 1993.
- 5) **Bassnett S, Mataic D** : Chromatin degradation in differentiating fiber cells of the eye lens. *J Cell Biol* 137: 37—49, 1997.
- 6) **Garcia-Porrero JA, Collado JA, Ojeda JL** : Cell death during detachment of the lens rudiment from ectoderm in the chick embryo. *Anat Rec* 193: 791—804, 1979.
- 7) **Schook P** : Morphogenetic movements during the early development of the chick eye: An ultrastructural and spatial study: Obliteration of the lens stalk lumen and separation of the lens vesicle from the surface ectoderm. *Acta Morphol Neerl Scand* 18: 195—201, 1980.
- 8) **Li WC, Kuszak JR, Dunn K, Wang RR, Ma W, Wang GM, et al** : Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in humans and animals. *J Cell Biol* 130: 169—181, 1995.
- 9) **Harocopos GJ, Alvares KM, Kolker AE, Beebe DC** : Human age-related cataract and lens epithelial cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 2696—2706, 1998.
- 10) **Li WC, Spector A** : Lens epithelial cell apoptosis is an early event in the development of UVB-induced cataract. *Free Radic Biol Med* 20: 301—311, 1996.
- 11) **Li WC, Kuszak JR, Wang GM, Wu ZQ, Spector A** : Calcimycin-induced lens epithelial cell apoptosis contributes to cataract formation. *Exp Eye Res* 61: 91—98, 1995.
- 12) **Spector A, Wang GM, Wang RR, Li WC, Kuszak JR** : A brief photochemically induced oxidative insult causes irreversible lens damage and cataract. I: transparency and epithelial cell layer. *Exp Eye Res* 60: 471—481, 1995.
- 13) **Chylack LT Jr, Wolfe JK, Singer DM, Leske MC, Bullimore MA, Bailey IL, et al** : The lens opacities classification system III. The longitudinal study of cataract study group. *Arch Ophthalmol* 111(6) : 831—836, 1993.
- 14) **Hall AB, Thompson JR, Deane JS, Rosenthal AR** : LOCS III versus the Oxford Clinical Cataract Classification and Grading System for the assessment of nuclear, cortical and posterior subcapsular cataract. *Ophthalmic Epidemiol* 4(4) : 179—194, 1997.
- 15) **Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA** : Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493—501, 1992.
- 16) **Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R** : *In situ* detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A cautionary note. *Hepatology* 21: 1465—1468, 1995.
- 17) **Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y** : A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 7: 61—64, 1995.
- 18) **Fukuda K, Kojiro M, Chiu JF** : Demonstration of extensive chromatin cleavage in transplanted Morris hepatoma 7777 tissue: Apoptosis or necrosis? *Am J Pathol* 142: 935—946, 1993.
- 19) **Kato K, Kurosaka D, Nagamoto T** : Apoptotic cell death in rabbit lens after lens extraction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 2322—2330, 1997.
- 20) **Umemura S, Yasuda M, Osamura RY, Kawarada Y, Sugiyama T, Tsutsumi Y** : Enhancement of TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) method using mung bean nuclease, a single-stranded DNA digestion enzyme. *J Histochem Cytochem* 44: 125—132, 1996.
- 21) **Vaux DL, Strasser A** : The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2239—2244, 1996.
- 22) **Kubo E, Takayanagi K, Suzuki S, Takahashi Y, Akagi Y** : Cell growth of rat lens epithelium in galactose-induced cataracts. *Acta Histochem Cytochem* 30: 243—249, 1997.
- 23) **Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD** : Programmed cell death and the control of cell survival: Lessons from the nervous system. *Science* 262: 695—700, 1993.