

## 前囊下白内障における $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンと フィブロネクチンの存在

吉野 真未<sup>1)</sup>, 黒坂大次郎<sup>1)</sup>, 尾羽澤 実<sup>1)</sup>, 高山 房男<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>慶應義塾大学医学部眼科学教室, <sup>2)</sup>国立霞ヶ浦病院臨床検査部

### 要 約

**目 的**：前囊下白内障 (anterior subcapsular cataract : 以下, ASC) の混濁部を形成する筋線維芽細胞様の水晶体上皮細胞に  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンが, またその細胞周囲にフィブロネクチンが存在するかを検討した。

**方 法**：白内障手術の際に採取した前囊片 9 例 9 眼を材料とし, 新鮮凍結切片を作製し, 抗ヒト  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリン抗体, 抗ヒトフィブロネクチン抗体, 抗ヒト  $\alpha$  平滑筋線維アクチン ( $\alpha$ -smooth muscle actin : 以下,  $\alpha$ -SMA) 抗体を用いて免疫組織染色を行った。

**結 果**：ASC を伴う 6 例 6 眼の全例では, 混濁部の水晶体上皮細胞は  $\alpha$ -SMA 陽性の筋線維芽細胞様細胞が存

在しており, この細胞は  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンに陽性で, 細胞周囲にはフィブロネクチンが存在していた。対照とした ASC を伴わない 3 例 3 眼では, すべて陰性であった。

**結 論**：水晶体上皮細胞が筋線維芽細胞様細胞に変化する際には,  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンとフィブロネクチンが関与している可能性が推定された。(日眼会誌 105: 83-87, 2001)

**キーワード**：前囊下白内障, 水晶体上皮細胞,  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリン, フィブロネクチン, アルファ平滑筋線維アクチン ( $\alpha$ -SMA)

## Presence of $\alpha 5 \beta 1$ Integrin and Fibronectin in the Anterior Subcapsular Cataract

Mami Yoshino<sup>1)</sup>, Daijiro Kurosaka<sup>1)</sup>, Minoru Obazawa<sup>1)</sup> and Fusao Takayama<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine, <sup>2)</sup>Clinical Laboratory, Kasumigaura National Hospital

### Abstract

**Purpose** : We investigated whether  $\alpha 5 \beta 1$  integrin and fibronectin were present in myofibroblast-like lens epithelial cells in anterior subcapsular cataract (ASC).

**Methods** : Nine anterior capsule specimens were obtained from the patients during cataract surgery and frozen for cryostat sections. Six specimens were anterior capsule obtained from cataract with ASC. As a control, three specimens were obtained from cataract without ASC. Alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA),  $\alpha 5 \beta 1$  integrin, and fibronectin were detected by immunohistochemical observation.

**Results** : In all 6 specimens from patients with ASC, the lens epithelial cells around fibrosis tissue included myofibroblast-like lens epithelial cells which

were positive for  $\alpha$ -SMA.  $\alpha 5 \beta 1$  integrin was detected in these lens epithelial cells. Fibronectin was also detected around these myofibroblast-like lens epithelial cells. Three control specimens showed no immunoreactivity against  $\alpha$ -SMA,  $\alpha 5 \beta 1$  integrin, or fibronectin.

**Conclusions** : Alpha  $5 \beta 1$  integrin and fibronectin may play an important role in myodifferentiation of lens epithelial cells. (J Jpn Ophthalmol Soc 105 : 83-87, 2001)

**Key words** : Anterior subcapsular cataract, Lens epithelial cell,  $\alpha 5 \beta 1$  integrin, Fibronectin, Alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)

### I 緒 言

通常の水晶体上皮細胞 (lens epithelial cell : 以下, LEC) は立方形で, その基底膜である水晶体前囊に接着して

いる<sup>1)</sup>。しかしながら, 前囊下白内障 (anterior subcapsular cataract : 以下, ASC) の混濁部では, LEC が筋線維芽細胞様の形態をとり水晶体囊から離れ, 周囲を I, III, IV 型コラーゲンなどに囲まれ, 細胞外基質が変化してい

別刷請求先：160-8582 東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部眼科学教室 吉野 真未

(平成 12 年 2 月 7 日受付, 平成 12 年 8 月 10 日改訂受理)

Reprint requests to: Mami Yoshino M.D. Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

(Received February 7, 2000 and accepted in revised form August 10, 2000)

る<sup>2)~6)</sup>。この筋線維芽細胞様の LEC は、通常の上皮細胞が持たない  $\alpha$  平滑筋線維アクチン ( $\alpha$ -smooth muscle actin: 以下,  $\alpha$ -SMA) を持ち、水晶体嚢の収縮や混濁に関与している<sup>7)8)</sup>。

一般に通常の線維芽細胞は、通常  $\alpha$ -SMA を持たないが、創傷治癒時に  $\alpha$ -SMA を発現した筋線維芽細胞に変化し癒痕収縮を起こす<sup>9)</sup>ことから、ASC の形成は創傷治癒過程と考えられる。細胞外基質は細胞接着の足場となるだけでなく、細胞の遊走・増殖・分化に影響を及ぼすことが知られているが<sup>10)</sup>、最近、線維芽細胞が  $\alpha$ -SMA を持つ筋線維芽細胞へ変化するのに際し、まずはじめにフィブロネクチンとそのリセプターである  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンが発現し、この変化を誘導することが報告<sup>11)</sup>された。

水晶体ではニワトリの胎児の LEC に、 $\beta 1, \alpha 3, \alpha 6$  インテグリンが発現し<sup>12)</sup>、ヒトの LEC では  $\beta 1$  インテグリンが検出されると報告<sup>13)14)</sup>されている。しかしながら、 $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンの局在についての報告はなく、ASC の混濁部において、LEC が  $\alpha$ -SMA を持つ線維芽細胞様細胞へ変化するのに際し、 $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンとフィブロネクチンが関与しているのかどうかを検討する目的で、両者の存在について人眼の ASC の前囊片に対し免疫組織学的に検討を加えたので報告する。

## II 対象および方法

### 1. 対象 (表 1)

対象は、1997 年 5 月から 11 月の 6 か月間に慶應義塾大学病院眼科において、白内障手術を施行された症例から採取した前囊片である。ASC を伴う 6 眼と、ASC を伴わない 3 眼の合計 9 例 9 眼を対象とし、ASC を伴わない 3 例を対照とした。ASC を伴う 6 眼はすべて男性で、平均年齢は  $44.3 \pm 10.6$  (平均値  $\pm$  標準偏差) 歳、対照 3 眼は男性 1 眼、女性 2 眼で、平均年齢は  $73.0 \pm 5.1$  歳であった。ASC を伴う 6 眼は、加齢白内障 3 眼、アトピー性皮膚炎に伴う白内障 2 眼、ぶどう膜炎後の併発白内障 1 眼であった。対照 3 眼はすべて加齢性白内障であった。

すべての材料採取に際しては、本研究の主旨を説明のうえ、患者の同意を得て行った。

### 2. 方法

全例とも白内障手術において、前囊切開した際に得られたほぼ円形の直径約 5 mm の前囊片を採取し、直ちに OPD (Tissue-Tek, Sakura 社) に包埋し、液体窒素で新鮮凍結切片を作製した。この切片を DAKO 社 LSAB キットを用いて免疫組織染色を行った。一次抗体として、モノクロナールマウス抗ヒト  $\alpha$ -SMA 抗体 (DAKO 社、濃度 1:100)、モノクロナールマウス抗ヒト  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリン抗体 (DAKO 社、濃度 1:25)、ウサギ抗ヒトフィブロネクチン抗体 (SHIGMA 社、濃度 1:1000) を用いた。3-amino-9-ethyl carbazole で発色させ、ヘマトキシリンで

表 1 症例の要約

症例	年齢 / 性別	ASC (+ / -)	白内障の原因
1	49 / 男性	+	加齢性
2	47 / 男性	+	加齢性
3	57 / 男性	+	加齢性
4	25 / 男性	+	アトピー性皮膚炎に伴う
5	44 / 男性	+	アトピー性皮膚炎に伴う
6	44 / 男性	+	併発 (ぶどう膜炎後)
7	68 / 男性	-	加齢性
8	80 / 女性	-	加齢性
9	71 / 女性	-	加齢性

ASC: anterior subcapsular cataract

対比染色を行った。陰性対照は、一次抗体を除いて染色を行った。

## III 結果

### 1. ASC を伴う症例

6 眼全例において、ASC の混濁部の LEC は紡錘形をした細胞があり、これらの細胞は  $\alpha$ -SMA 陽性であった。混濁部周囲の立方型をした LEC は  $\alpha$ -SMA 陰性であった (図 1)。この紡錘形をした細胞は  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンに陽性で、その周囲にはフィブロネクチンが存在していた (図 2, 3)。ASC の混濁部でない周囲の立方型をした LEC には、 $\alpha$ -SMA、 $\alpha 5 \beta 1$  インテグリン、フィブロネクチンともに陽性所見はなかった (図 2, 3)。陰性対照では、いずれの抗体においても陽性所見はなかった (図 4)。

### 2. 対照症例

対照 3 眼全例において、 $\alpha$ -SMA、 $\alpha 5 \beta 1$  インテグリン、フィブロネクチンは陰性であった。

## IV 考 按

ASC の混濁部の LEC は、 $\alpha$ -SMA 陽性の筋線維芽細胞様細胞に変化することが知られており<sup>3)4)7)8)</sup>、今回も同様の結果であり、創傷治癒過程にみられる細胞の変化があった。今回の研究では、さらにこの細胞周囲にフィブロネクチンとそのレセプターである  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンが細胞に存在することがわかった。ASC の混濁部の筋線維芽細胞様細胞の LEC に両者が存在することにより、筋線維芽細胞様細胞の形成にもフィブロネクチンや  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンの因子が関与している可能性が推定された。

角膜上皮細胞の創傷治癒では、細胞外マトリックスであるフィブロネクチンが、細胞の接着、伸展、移動を促進し、再生上皮の先端部 (局所接着部) にはフィブロネクチン受容体である  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンが存在し、強固な接着斑ができる。臨床的にも、フィブロネクチン点眼が難治性の角膜上皮障害に効果がある<sup>15)16)</sup>。一方、角膜実質に創傷が加わると、創傷部周囲の角膜実質細胞は活性化されて、 $\alpha$ -SMA 陽性の筋線維芽細胞様細胞に変化し、実質組織の再生ならびに再構築に主要な役割を果たす<sup>15)17)</sup>が、

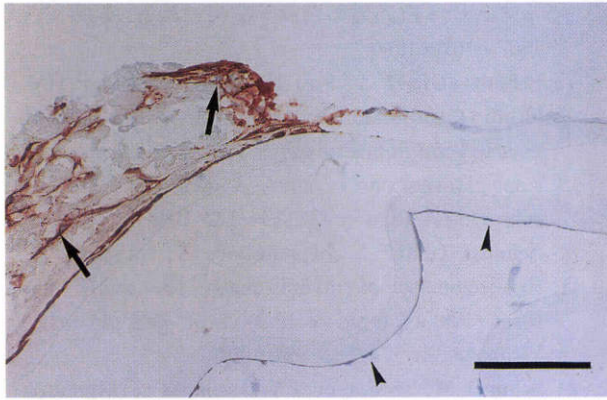


図1 前嚢下白内障 (anterior subcapsular cataract: 以下, ASC) の前嚢片の抗  $\alpha$ -SMA 抗体による免疫組織学的所見 (症例 4).

ASC の混濁部の水晶体上皮細胞は,  $\alpha$  平滑筋線維アクチン ( $\alpha$ -smooth muscle actin: 以下,  $\alpha$ -SMA) 陽性の紡錘形をした線維芽細胞様細胞があった (矢印). 混濁部周囲の正常な水晶体上皮細胞は, 陰性であった (矢じり部). バーは 100  $\mu$ m

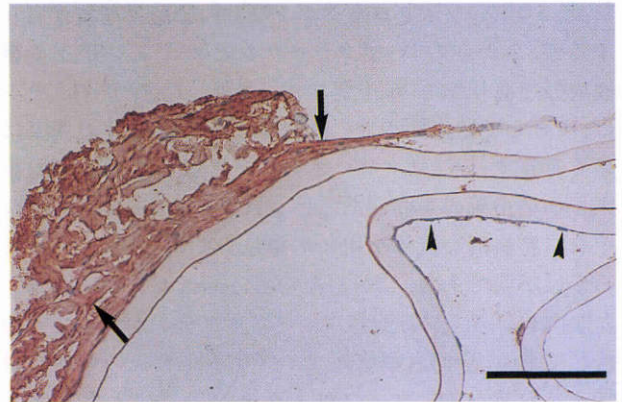


図3 ASC の前嚢片の抗フィブロネクチン抗体による免疫組織学的所見 (症例 4).

ASC の混濁部の紡錘形に変化した水晶体上皮細胞は, フィブロネクチン陽性であった (矢印). 混濁部以外の正常な水晶体上皮細胞は, 細胞質が染色されておらず, 陰性であった (矢じり部). バーは 100  $\mu$ m

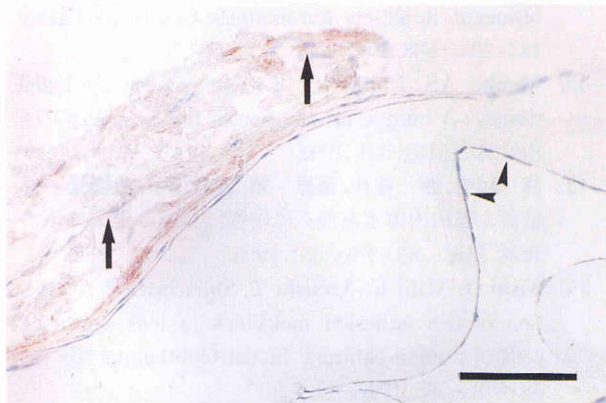


図2 ASC の前嚢片の抗  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリン抗体による免疫組織学的所見 (症例 4).

ASC の混濁部の紡錘形に変化した水晶体上皮細胞は,  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリン陽性であった (矢印). この陽性所見は, 抗  $\alpha$ -SMA 抗体染色像の陽性所見とほぼ一致していた. 混濁部周囲の正常な水晶体上皮細胞は, 陰性であった (矢じり部). バーは 100  $\mu$ m

この際に, 通常の間葉系細胞には存在しない  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンとフィブロネクチンが出現し<sup>18)</sup>, 変化を誘導する<sup>19)20)</sup>. したがって,  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンの発現には, 上皮の遊走を促進させる働きや実質細胞を筋線維芽細胞へ変化を誘導させる 2 つの役割が知られている. LEC では, *in vitro* において LEC をコラーゲンゲル上で培養すると上皮の性質を維持し, コラーゲンゲル内で培養すると間葉系の細胞に変化する. この際, コラーゲン上の LEC は,  $\beta 1, \alpha 3, \alpha 6$  インテグリンが存在するが, コラーゲンゲル中に培養すると, まず LEC は  $\beta 1$  インテグリンの発現が増加し, より多くの  $\beta 1, \alpha 5$  インテグリンが存

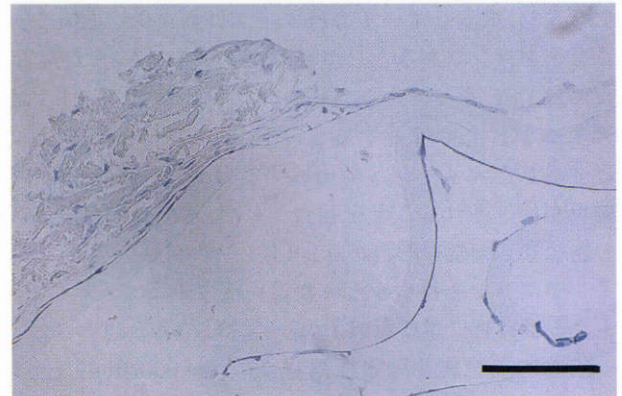


図4 陰性対照 (症例 4).

ASC の混濁部にも混濁部周囲の水晶体上皮細胞にも, 陽性所見はなかった. バーは 100  $\mu$ m

在するようになり, 一方  $\alpha 6$  インテグリンは失われ間葉系細胞様細胞に変化する<sup>21)</sup>. このような周囲の環境の変化により間葉系の細胞に近い性質を持つようになる. 今回の ASC の混濁と嚢収縮を起こす筋線維芽細胞様の LEC 周囲にのみフィブロネクチンとレセプターである  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンが存在していたことは, これらの役割が角膜上皮細胞の創傷治癒の際の細胞の接着, 伸展, 移動を促進する働きよりも, むしろ角膜実質細胞やコラーゲンゲル内で培養した LEC が間葉系細胞様細胞に変化する際の過程で果たしたような間葉系細胞への変化を誘導すると考えられる. ただし, 加齢白内障, アトピー性白内障, ぶどう膜炎後の併発白内障の ASC について検討した. いずれも同様の結果を得たが, ASC の形成に他の因子が関与している可能性もあり, 基礎疾患により機序に違いがあるか否かは今後の検討が必要と思われる.

LEC の基底膜である水晶体嚢には, I, IV 型コラーゲ

ン、ラミニン、フィブロネクチンなどの細胞外基質が存在するが、このうち IV 型コラーゲンとラミニンが主要構成成分であり<sup>22)</sup>、一方、I 型コラーゲン、フィブロネクチンは、主として胎生期や<sup>12)21)</sup> 白内障術後の線維性混濁部に多く存在する<sup>23)</sup>。フィブロネクチンには血管内皮細胞由来と血清由来のものがあるとされているが、今回はそれぞれに特異的な抗体を用いて染色していないので、どちらかは不明である。しかしながら、Saika ら<sup>23)24)</sup>は摘出した眼内レンズ上に細胞性フィブロネクチンがあったと報告しており、今回も細胞性フィブロネクチンの可能性が考えられる。一方、フィブロネクチン以外にも存在する I, IV 型コラーゲン、ラミニンなどの細胞外基質の変化も筋線維芽細胞様細胞への変化に関わっている可能性が考えられる。しかしながら、手掌線維腫症の結節では筋線維芽細胞が存在し、この周囲に I, IV 型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなどの細胞外基質が存在するが、コラーゲンやラミニンのレセプターである  $\alpha 2 \beta 1$  インテグリンは存在せず、細胞外基質とそのレセプターがともに存在し、機能しているのはフィブロネクチンと  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンであることが報告<sup>11)</sup>されている。また最近、我々は LEC をラミニン、IV 型コラーゲンでコートしたディッシュ上で培養するよりも、フィブロネクチンでコートしたディッシュで培養する方が、より  $\alpha$ -SMA の発現が促進されることを報告<sup>25)</sup>した。水晶体前囊混濁部の筋線維芽細胞様細胞が  $\alpha 2 \beta 1$  インテグリンなど、他のインテグリンを持つかどうかは不明であるが、フィブロネクチンは特に重要な因子の一つではあると思われる。

LEC の筋線維芽細胞様細胞には、transforming growth factor- $\beta$  などの増殖因子が関与していることが報告<sup>25)~30)</sup>されている。これらの増殖因子と細胞外基質やレセプターであるインテグリン発現との関係を明らかにすることが課題であると思われる。

稿を終えるに当たり、ご校閲を賜りました慶應義塾大学医学部眼科学教室小口芳久教授に深謝いたします。

## 文 献

- 1) **Brown NP, Bron AJ** : Lens disorders—A clinical manual of cataract diagnosis. Butterworth Heinemann Ltd. Oxford, 32—38, 1996.
- 2) **Lamb HD** : Anterior capsular cataract. Arch Ophthalmol 17 : 877—881, 1937.
- 3) **Novotny GEK, Pau H, Arnold G** : Organization of collagen and other extracellular material in anterior cataract. Anat Anz 168 : 127—133, 1989.
- 4) **Novotny GEK, Pau H** : Myofibroblast-like cells in human anterior capsular cataract. Virchows Arch 404 : 393—401, 1984.
- 5) **矢島保道** : 白内障. 沖坂重邦(編) : 眼病理アトラス. 文光堂, 東京, 1992.
- 6) **川合憲司, 塩谷滝雄, 恩田 恵** : 走査電子顕微鏡によるアトピー白内障の前囊下混濁の観察. 臨眼 50 : 1567—1570, 1996.
- 7) **Schmitt-Graff A, Pau H, Spahr R, Piper HM, Skalli O, Gabbiani G** : Appearance of alpha-smooth muscle actin in human eye lens cells of anterior capsular cataract and in cultured bovine lens-forming cells. Differentiation 43 : 115—122, 1990.
- 8) **Schmitt-Graff A, Desmouliere A, Gabbiani G** : Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features : An example of fibroblastic cell plasticity. Virchows Arch 425 : 3—24, 1994.
- 9) **Schurch W, Seemayer TA, Gabbiani G** : Myofibroblast. Histology for pathologists, second edition. In : Sternberg SS (Ed) : Lippincott-Raven Publishers, New York, 129—159, 1997.
- 10) **小栗佳代子, 草野由理, 岡山 實** : 細胞接着・マトリックスと形態形成. 坂倉照好(編) : 細胞接着のしくみと疾患. 羊土社, 東京, 80—97, 1998.
- 11) **Magro G, Frassetto F, Travali S, Lanzafame S** : Immunohistochemical expression and distribution of  $\alpha 2 \beta 1$ ,  $\alpha 6 \beta 1$ ,  $\alpha 5 \beta 1$ , integrins and their extracellular ligands, Type IV collagen, laminin and fibronectin in palmar fibromatosis. Gen Diagn Pathol 143 : 203—208, 1997.
- 12) **Menko AS, Philip NJ** :  $\beta 1$  integrins in epithelial tissues : A unique distribution in the lens. Exp Cell Res 218 : 516—521, 1995.
- 13) **西 起史, 西 佳代, 藤原 勉, 若島洋子, 白澤榮一** : 培養人眼白内障水晶体上皮細胞における接着分子の発現. 眼紀 46 : 376—381, 1995.
- 14) **Nishi O, Nishi K, Akaishi T, Shirasawa E** : Detection of cell adhesion molecules in lens epithelial cells of human cataract. Invest Ophthalmol Vis Sci 38 : 579—585, 1997.
- 15) **片上千加子** : 角膜創傷治癒. 本田孔士(編) : 眼科診療プラクティス 22. やさしい眼の細胞・分子生物学. 文光堂, 東京, 154—158, 1996.
- 16) **Murakami J, Nishida T, Otori T** : Coordinated appearance of  $\beta 1$  integrins and fibronectin during corneal wound healing. J Lab Clin Med 120 : 86—93, 1992.
- 17) **Jester JV, Barry-Lane PA, Cavanagh HD, Petroll WM** : Induction of  $\alpha$ -smooth muscle actin expression and myofibroblast transformation in cultured corneal keratocytes. Cornea 15 : 505—516, 1996.
- 18) **Ishizaki M, Wakamatsu K, Matsunami T, Yamanaoka 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.
- 19) **Petroll WM, Cavanagh HD, Jester JV** : Assessment of stress fiber orientation during healing of radial keratotomies using confocal micros-

- copy. Scanning 20: 74—82, 1998.
- 20) **Jester JV, Barry PA, Lind GJ, Petroll WM, Garana R, Cavanagh HD**: Corneal keratocytes: *in situ* and *in vitro* organization of cytoskeletal contractile proteins. Invest Ophthalmol Vis Sci 35: 730—743, 1994.
- 21) **Zuk A, Hay ED**: Expression of  $\beta 1$  integrins changes during transformation of avian lens epithelium to mesenchyme in collagen gels. Dev Dyn 201: 378—393, 1994.
- 22) **Kohno T, Sorgent N, Ishibashi T, Goodnight R, Ryan SJ**: Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 28: 506—614, 1987.
- 23) **Saika S, Kawashima Y, Miyamoto T, Okada Y, Tanaka S, Ohmi S, et al**: Immunolocalization of prolyl 4-hydroxylase subunits,  $\alpha$ -smooth muscle actin, and extracellular matrix components in human lens capsules with lens implants. Exp Eye Res 66: 283—294, 1998.
- 24) **Saika S, Kobata S, Yamanaka O, Yamanaka A, Okubo K, Oka T, et al**: Cellular fibronectin on intraocular lenses explanted from patients. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 231: 718—721, 1993.
- 25) **Saika S, Yamanaka A, Tanaka S, Ohmi S, Ohnishi Y, Ooshima A**: Extracellular matrix on intraocular lenses. Exp Eye Res 61: 713—721, 1995.
- 26) **Kurosaka D, Kato K, Oshima T, Kurosaka, Yoshino M, Ogata M**: Extracellular matrixes influence  $\alpha$ -smooth muscle actin expression in cultured porcine lens epithelial cells. Curr Eye Res 19: 260—263, 1999.
- 27) **Lee EH, Joo CK**: Role of transforming growth factor- $\beta$  in transdifferentiation and fibrosis of lens epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 40: 2025—2032, 1999.
- 28) **西 起史**: 後発白内障の成立. 本田孔士(編): 眼科診療プラクティス 22. やさしい眼の細胞・分子生物学. 文光堂, 東京, 198—201, 1996.
- 29) **Kurosaka D, Kato K, Nagamoto T, Negishi K**: Growth factors influence contractility and  $\alpha$ -smooth muscle actin expression in bovine lens epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 36: 1701—1708, 1995.
- 30) **Kurosaka D, Kato K, Nagamoto T**: Presence of  $\alpha$  smooth muscle actin in lens epithelial cells of aphakic rabbit eyes. Br J Ophthalmol 80: 906—910, 1996.
-