

ウシ角膜特異蛋白質のマウス・ヒト眼組織における局在

川端 昌子, 小西裕美子, 三村 康男

徳島大学医学部眼科学教室

要 約

ウシ角膜に多量に存在する角膜特異蛋白質(CSP)を精製し、このCSPに対するラットポリクローナル抗体を作製し、ペルオキシダーゼによる組織酵素抗体法を用いて、マウスおよびヒト眼球でのCSPの局在を光学顕微鏡的に検討した。その結果、マウスでは、角膜上皮細胞、角膜実質のケラトサイト、角膜内皮、結膜上皮、水晶体上皮細胞にCSPの存在が認められた。ヒトでは、角膜上皮細胞と角膜実質のケラトサイト、角膜周囲の結膜上皮にCSPの存在が認められたが、水晶体には認められなかった。CSPの局在部位は種により差があることが明らかとなり、CSPの存在部位と種間の系統発生とを関連づけて考えると、CSPは角膜の分化に関連していることが推察された。(日眼会誌 95:829-834, 1991)

キーワード: ウシ角膜特異蛋白質, ポリクローナル抗体, 組織酵素抗体法, 局在部位

Localization of Bovine Cornea-Specific Protein
in Mouse and Human Eyes

Masako Kawabata, Yumiko Konishi and Yasuo Mimura

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Tokushima University

Abstract

Rats were immunized by purified bovine cornea-specific protein (CSP) and anti-CSP polyclonal antibody was produced. Localization of CSP in mice and human eyes was examined by immunohistochemical methods with light microscopy using this antibody. In mice CSP was found in the corneal epithelium, keratocytes, corneal endothelium, conjunctival epithelium and lens epithelium. In human eyes CSP was found in the corneal epithelium, keratocytes and conjunctival epithelium, but it was not found in the lens. These results confirmed a difference in localization of CSP between mice and human eyes. It was suggested that the production of CSP might be associated with phylogenesis and that CSP might also be associated with the development of the cornea. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 95: 829-834, 1991)

Key words: Bovine Cornea-Specific Protein (CSP), Polyclonal antibody, Immunohistochemical methods, Localization

別刷請求先: 770 徳島市蔵本町2-50 徳島大学医学部眼科学教室 川端 昌子
(平成2年7月20日受付, 平成2年12月20日改訂受理)

Reprint requests to: Masako Kawabata, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine,
Tokushima University.

2-50 Kuramoto-cho, Tokushima 770, Japan

(Received July 20, 1990 and accepted in revised form December 20, 1990)

I 緒 言

1981年 Alexander ら¹⁾はウシ角膜に多量に存在する分子量54,000の可溶性蛋白質(角膜特異蛋白質 cornea-specific protein: 以下CSPと略す)を精製し, Silverman ら²⁾とともに, CSPに対する家兎ポリクローナル抗体を用いた免疫拡散法により, CSPがウシ角膜全層, 結膜上皮および水晶体上皮細胞に特異的に存在し, 他の眼組織および他臓器には存在しないことを報告している。また, モルモット, ブタ, ヒトなどの哺乳類の角膜にも存在するが, 鳥類, 両生類, 魚類の角膜には存在しなかったとしている。1987年 Eype ら³⁾は, CSPに対する家兎ポリクローナル抗体を作製し, 免疫アルカリフォスファターゼ染色法を用いてラット眼球凍結切片でのCSPの局在を調べた結果, CSPはラット角膜上皮細胞にびまん性に存在し, 特に基底細胞層の核上は濃染され, 角膜実質ケラトサイトと内皮細胞, 水晶体上皮細胞にも存在したと報告している。

今回, このCSPに対するラットポリクローナル抗体を作製し, ペルオキシダーゼによる組織酵素抗体法を用いて, マウスおよびヒトの眼球組織におけるCSPの局在を光学顕微鏡的に検討した。その結果, マウスとヒトで種によりCSP局在部位に差異が認められたので報告する。

II 実験方法

1. CSPの抽出と精製

0℃で保存, 移送してきた新鮮なウシ眼球より角膜を切除したのち, 1mM EDTA-2Na/2.5%SDS/5%2-メルカプトエタノール/50mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)を加え8時間室温で静置し, 可溶性蛋白質を抽出した。次に10,000×gで20分間遠心分離し, その遠心上清を7.5%SDS-ポリアクリルアミドディスクゲル(アドバンテック, CD-50)を用いて, 電気泳動しCSPを純化した。精製したCSPを50mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)/0.1M NaClで透析したのち, 限外濾過法により濃縮した。

2. ラット感作

8週齢雌のルイスラット2匹を用い, 上記方法で得られたCSP 50μgを同量の完全フロイントアジュバンドと混合乳化後, 腹腔内に注射した。さらに1カ月後に同量のCSPを不完全フロイントアジュバンドと混合し, 腹腔内注射した。2回目感作より4日後に心腔

穿刺により採血した。対照として, トリス塩酸緩衝液を同様にフロイントアジュバンドと混合乳化したものを腹腔内注射した。

3. 抗CSP抗体の精製とF(ab')₂フラグメント作製

得られたラット全血を室温で30分間静置したのち, 1,000×gで10分間遠心し, 血清を分離した。次に血清に飽和硫酸アンモニウムpH 7.4を同量加えて抗体を沈降させ, 25,000×gで10分間遠心分離した。再度遠心沈澱を50%硫酸アンモニウムに懸濁し, 10,000×gで10分間遠心分離した。この沈澱を10mM リン酸緩衝液pH 8.0で溶解し, セファデックス G-75 (Pharmacia, 1.5×48cm)を用いてゲル濾過による脱塩を行なった。次にDEAE-セルローズ(Whatman, DE-52)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより, ラットIgGを精製した。

精製したラットIgGを限外濾過法により濃縮したのち, 50mM 酢酸緩衝液(pH 4.5)に透析し, 1/10量のペプシンを加え, 35℃で18時間消化した。0.5M リン酸-2Naを加えて反応を停止させた後, 0.1N NaOHを加えてpHを7.0に調整した。次にセファクリル S-200 (Pharmacia, 2.5×35cm)を用いてゲル濾過をおこない, F(ab')₂フラグメントを分離した。

4. ウェスタンブロッティングによる抗体の検定

部分精製したCSPを8~25%SDS-ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用いて電気泳動した後, ニトロセルロース膜に転写し, 今回作製したラット抗CSPポリクローナル抗体F(ab')₂を一次抗体, ビオチン化家兎抗ラットIgG抗体を二次抗体として結合させた後, アビジン-ペルオキシダーゼ(西洋ワサビペルオキシダーゼ: 以下HRPと略する)を反応させ, 0.5mg/ml ジアミノペンチジン(DAB)/0.1M トリス塩酸緩衝液(pH 7.3)/0.15% H₂O₂で発色させた。

5. 組織酵素抗体法

正常な8週齢雌のBALB/cマウスより摘出した眼球6眼を10%中性ホルマリンで固定後, パラフィン包埋した。5μ薄切切片を作製し脱パラフィン後, 蒸留水で洗浄した。0.3% H₂O₂/20%メタノールで内因性ペルオキシダーゼをブロッキングし, 10%ウシ血清アルブミンを反応させ非特異的抗体沈着を阻止した。これに, 今回作製したラット抗CSPポリクローナル抗体F(ab')₂を一次抗体, ビオチン化家兎抗ラットIgG抗体を二次抗体として結合させたのち, DABを基質としてHRP反応を行なった。水洗し, メチルグリーンで核染色を行った後, 透徹・封入し光学顕微鏡で観察した。

なお、対照として、正常ラット IgG およびトリス塩酸緩衝液で感作したラット血清を一次抗体として、同様の染色を行なった。

また、脈絡膜腫瘍のために摘出した42歳男性のヒト眼球も同様にして、ラット抗 CSP 抗体を結合させて、DAB を基質とした HRP 反応を行ない、メチルグリーンで核染色をした後、透徹・封入し光学顕微鏡で観察した。

III 結 果

今回作製したラット抗 CSP ポリクローナル抗体の、ペプシン消化前と消化後の20%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を図1に示した。精製 IgG は H 鎖と L 鎖の 2 本のバンドとして認められており、ペプシン消化後は F(ab')₂ がメジャーバンドとして認められた。また、図2に作製した抗 CSP ポリクローナル抗体 F(ab')₂ によるウエスタンブロッティングの結果を示した。B の ◀ で示す 1 本のバンドのみが認められ、抗体の特異性が示された。

組織酵素抗体法では、BALB/c マウス角膜では、図3、4に示すように上皮細胞全体にわたって抗 CSP 抗体結合による茶褐色のペルオキシダーゼ染色像が認められた。とくに基底細胞の核と核膜、細胞質が強染された。角膜実質のケラトサイトもその細胞質が強染

された。角膜内皮細胞では淡く細胞質が染色されたが、実質線維成分とポーマン膜は染色されなかった。水晶体では、図5のように前囊の上皮細胞の細胞質が淡く

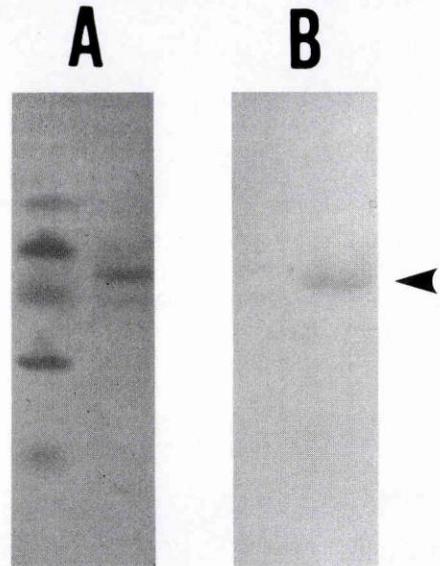


図2 ウエスタンブロッティング法による抗体の検定。レーン左：分子量マーカー、レーン右：部分精製した CSP を 8~25% SDS-ポリアクリルアミドグラジェントゲルにて電気泳動したのちニトロセルロース膜に転写し、A はクマジーブリリアントブルーで染色した、B は精製したラット抗 CSP 抗体を一次抗体、ビオチン化家兎抗ラット IgG を二次抗体とする ABC 法を行い DAB で発色させた。B では CSP のバンドのみが染色された。

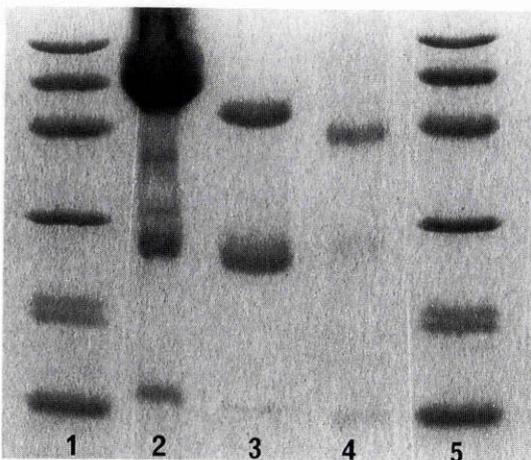


図1 精製ラット IgG のペプシン消化前後20%SDS-ポリアクリルアミドゲルの電気泳動パターン。レーン1・5：分子量マーカー、レーン2：感作ラットの血清、レーン3：陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製 IgG 分画、レーン4：ペプシン消化後の F(ab')₂ 分画。

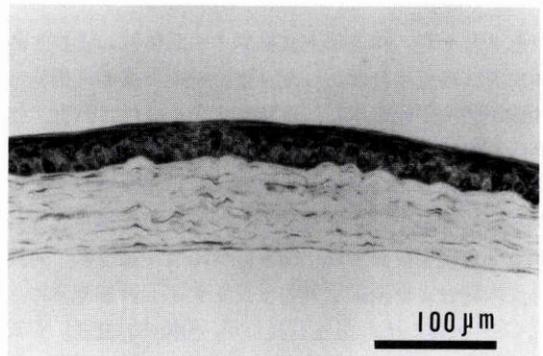


図3 BALB/c マウス角膜（免疫ペルオキシダーゼ法、×160）。角膜上皮細胞は全体に濃く染色された。角膜実質のケラトサイトと角膜内皮細胞の細胞質は染色されたが角膜実質の線維成分とポーマン膜は染色されなかった。

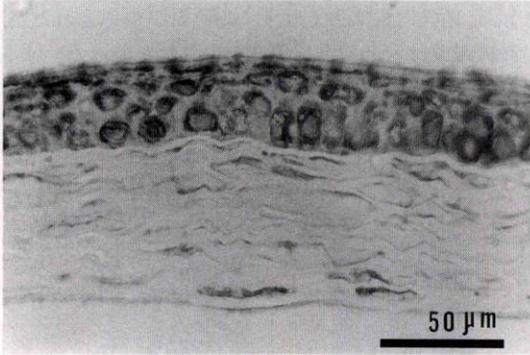


図4 BALB/c マウス角膜(免疫ペルオキシダーゼ法, $\times 320$). 図5の強拡大像. 上皮基底細胞の細胞質と一部の核および核膜が強染されており細胞膜は染色されていない.

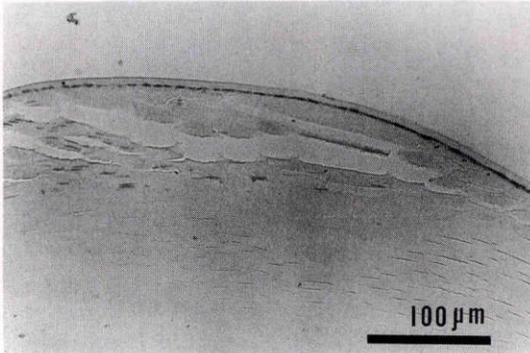


図5 BALB/c マウス角膜(免疫ペルオキシダーゼ法, $\times 160$). 角膜上皮基底細胞の細胞質が淡く染色されたが, 角膜上皮核および核膜は染色されなかった.

染色されたが, 赤道部上皮細胞と角膜上皮核および角膜上皮皮質は染色されなかった. また結膜上皮非杯細胞では核が強く陽性を示し, 細胞質も淡く染色された. 強膜内の実質細胞の細胞質にも陽性所見を認めたが, 虹彩, 毛様体および網膜, 脈絡膜, 視神経は染色されなかった. なお, ddY マウスでも同じ結果が得られた.

ヒト角膜中央部では, 図6, 7に示すように, 角膜上皮細胞および角膜実質のケラトサイトの細胞質に, 抗 CSP 抗体の結合がみられたが, 角膜内皮細胞, 実質線維成分, 基底膜およびポーマン膜には陽性所見を認めなかった. 特に角膜上皮細胞では基底層の細胞の細胞質と一部の核及び核膜が顆粒状に強染されていた. 基底層から表層にかけて, 扁平化と共に細胞質のみが淡くび漫性に染色されていた. また角膜実質のケラト

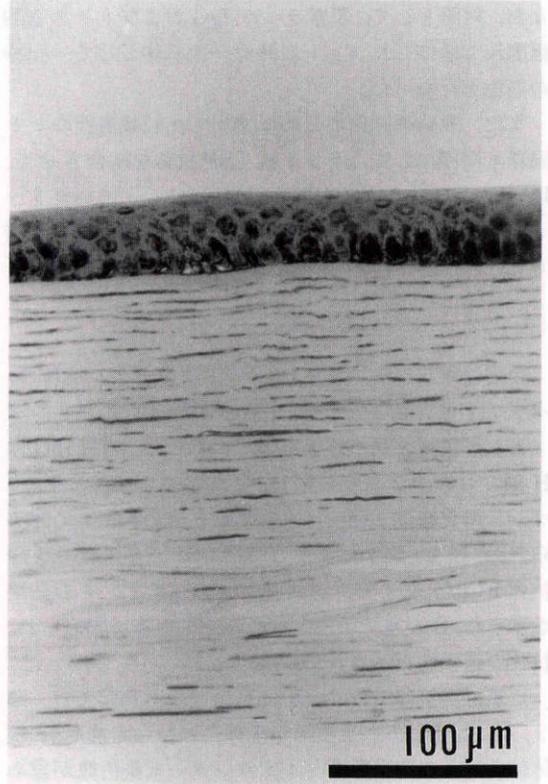


図6 ヒト角膜(免疫ペルオキシダーゼ法, $\times 250$). 角膜上皮細胞および実質のケラトサイトは抗 CSP 抗体結合による染色像がみられた.

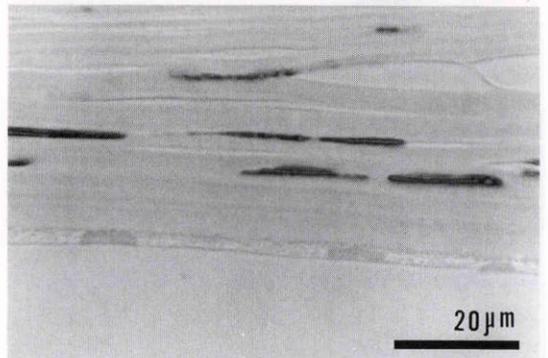


図7 ヒト角膜実質-内皮(免疫ペルオキシダーゼ法, $\times 820$). 角膜内皮細胞および実質の線維成分は抗 CSP 抗体結合による染色像はみられなかった.

サイトは, 細胞質のみが中等度染色された. 図8に示すように, 輪部角膜では, 上皮細胞は核と細胞質が同程度に染色された. また結膜上皮および結膜下組織で

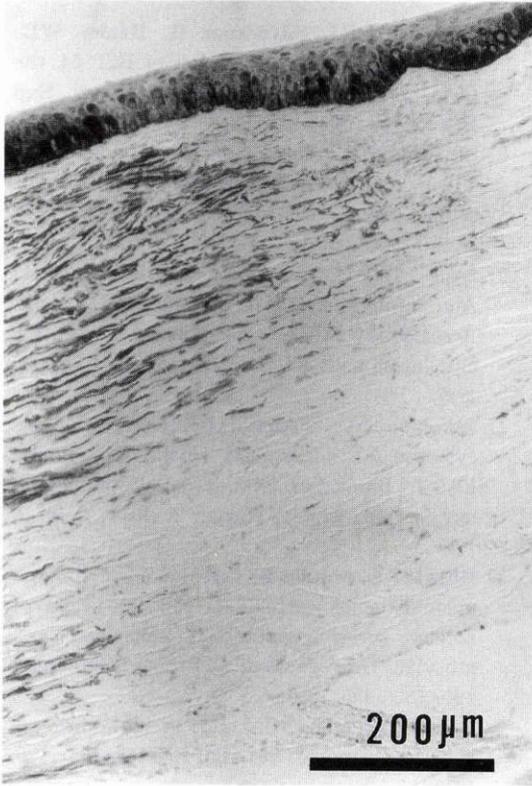


図 8 ヒト角膜輪部 (免疫ペルオキシダーゼ法, × 120), 輪部角膜の上皮細胞は核と細胞質が同程度に染色された。輪部結膜では上皮基底層の一層の細胞の核が濃く染まり, 上皮表層の細胞はび漫性に淡く染まった。強膜は細胞成分および線維成分ともに染色されなかった。

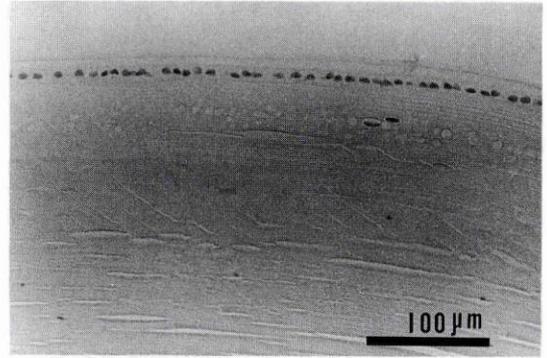


図 9 ヒト水晶体 (免疫ペルオキシダーゼ法, ×160), 水晶体は抗 CSP 抗体結合による染色像はみられなかった。

染色されなかった。また図 9 に示すように, 水晶体は染色されず, 虹彩, 毛様体, 網膜, 脈絡膜および視神経も染色されなかった。

IV 考 按

今回の実験で, 齧歯類であるマウスでは角膜全層の細胞成分, 結膜上皮細胞, 強膜実質細胞および水晶体前囊の上皮細胞とに, CSP が存在するのに対して, 霊長類であるヒトでは角膜上皮細胞と角膜実質のケラトサイトおよび角膜周囲の結膜上皮細胞に存在することが判明した。マウスと同じ齧歯類であるラットでは, CSP は角膜上皮細胞, 角膜実質のケラトサイト, 角膜内皮細胞, 水晶体上皮細胞および結膜上皮細胞に存在したと, Eype ら³⁾は報告している。Silverman ら²⁾の報告では, 偶蹄類であるウシでは, 角膜全層, 結膜上皮, 水晶体上皮細胞に CSP は存在している。以上をまとめると表 1 のようになる。これらのことより, CSP は哺乳類に共通して存在するが, 種により局在部位に差があることが明らかとなった。これは CSP の産生部位

は, 角膜周囲の細膜上皮基底層の一層の細胞の核が濃染され, 上皮表層の細胞がび漫性に淡染され, 周辺結膜上皮および杯細胞は全く染色されなかった。しかし, 強膜岬部を境に, 強膜は細胞成分および線維成分共に

表 1 各動物での CSP の局在

| | 表層外胚葉由来 | | | 神経堤由来 | |
|---------------------------|---------|-------|------|-------|------|
| | 結膜上皮 | 水晶体上皮 | 角膜上皮 | 角膜実質 | 角膜内皮 |
| マウス (川端ら, 1991) | + | + | + | + | + |
| ヒト (川端ら, 1991) | + | - | + | + | - |
| ラット (Eype ら, 1987) | + | + | + | + | + |
| ウシ (Silverman ら, 1981) | + | + | + | + | + |

と、種間の系統発生とに関連性があることが示唆される。

Silverman ら²⁾は、発生学的に、角膜上皮は水晶体上皮と起源が同一であることから、水晶体上皮細胞中の CSP の存在は発生学的に説明されるかもしれないとしている。また眼組織以外の表層外胚葉を起源とする他臓器には存在せず、水晶体皮質にも存在しないことから、CSP は水晶体上皮の分化を研究するうえで有用なマーカーになりうると考えている。しかし今回の実験で、1眼ではあるが、ヒトの眼組織において、水晶体上皮には CSP は存在せず、CSP が水晶体分化のマーカーである可能性は少ないと考えられる。ヒト、マウス、ラット、ウシにおいて、種により若干の差はあるものの、表層外胚葉由来の角膜上皮および結膜上皮と、近年神経堤 (neural crest) 由来であることが明らかとなってきた⁴⁾⁵⁾角膜実質に、すなわち発生学的に起源の異なる組織に共通に CSP が存在することが明らかとなった。発生学上、角膜の発生過程は、マウス⁶⁾およびヒト⁷⁾ともに、水晶体原基が確立された後に、水晶体より出される誘発因子により、表層外胚葉から角膜上皮が分化し⁸⁾⁹⁾、さらに、神経堤から細胞が遊走してきて角膜内皮、ついで角膜実質が分化する⁴⁾と考えられている。これらのことより、CSP は水晶体上皮の分化より、むしろ角膜とくに角膜輪部基幹細胞の分化に深く関わっているのではないかと考えられる。これを確認するために、今後胎生期の眼組織の発生過程における CSP の局在を検討したいと考えている。

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導をいただいた徳島大学生化学教室山本尚三教授に深謝いたします。

なお、本研究は平成元年度文部省科学研究費補助金(課題番号01480417)の補助を受けた。付記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) Alexander RJ, Silverman B, Henley WL: Isolation and characterization of BCP 54, the major soluble protein of bovine cornea. *Exp Eye Res* 32: 205-216, 1981.
- 2) Silverman B, Alexander RJ, Henley WL: Tissue and specificity of BCP 54, the major soluble protein of bovine cornea. *Exp Eye Res* 33: 19-29, 1981.
- 3) Eype AA, Kruit PJ, Gaag Rvd, et al: Autoimmunity against corneal antigens. II. Accessibility of the 54 kD corneal antigen for circulating antibodies. *Cur Eye Res* 6: 467-475, 1987.
- 4) Jakobiec FA: Prenatal development of the eye and its adnexa, In Duane TD, Jaeger EA(ed): *Biomedical Foundation of Ophthalmology* 1, Philadelphia, Harper & Row, Chap 2, 1983.
- 5) Hayashi K, Sueishi K, Tanaka K, et al: Immunohistochemical evidence of the origin of human corneal endothelial cells and keratocytes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 224: 452-456, 1986.
- 6) Pei YF, Rhodin JAG: The prenatal development of the mouse eye. *Anat Rec* 168: 105-126, 1970.
- 7) Kronfeld PC: The gross anatomy and embryology of the eye, In Davson H(ed): *The eye* 1: 43-62, New York, Academic Press, 1962.
- 8) Coulombre AJ: Problems in corneal morphogenesis, In Abercrombie M, Brachet J(ed): *Advances in Morphogenesis* 4: 81-109, New York, Academic Press, 1965.
- 9) Zinn KM, Mockel-Pohl S: Fine structure of the developing cornea. *Int Ophthalmol Clin* 15: 19-37, 1975.