

角膜アルカリ外傷治癒過程における 70 kD ストレス蛋白の局在

山田 桂, 山口 克宏, 武田 宜之, 山口 慶子, 玉井 信

東北大学医学部眼科学教室

要 約

白色家兎角膜に水酸化ナトリウムによる実験的アルカリ外傷を作成し、その治癒過程における 70 kD ストレス蛋白 (SP 70) の局在を抗 SP 70 抗体を用い免疫組織化学的に検討した。対照の角膜上皮では、基底細胞、翼状細胞の核に SP 70 が認められた。アルカリ外傷 1 日後には創面に角膜上皮細胞は存在せず、SP 70 は認められなかった。3 日後には角膜上皮細胞の遊走像がみられ、基底細胞層の核および細胞質に SP 70 が認められた。5 日後には、基底細胞層および 2～3 層の翼状細胞層が認められ、細胞質を中心にびまん性に SP 70 が認められた。

角膜実質細胞も増殖し、SP 70 が細胞質に認められた。7 日後には表層細胞層も出現し、SP 70 は再び上皮細胞の核に認められた。以上から、角膜の病的状態下における SP 70 の局在の変化が明らかにされ、SP 70 が角膜上皮細胞の再生機構に関与していることが示唆された。(日眼会誌 98:1056-1060, 1994)

キーワード：ストレス蛋白, アルカリ外傷, 角膜, 角膜上皮細胞

Distribution of the 70kD Stress Protein in Corneas with Alkali Burns

Katsura Yamada, Katsuhiko Yamaguchi, Yoshiyuki Takeda
Keiko Yamaguchi and Makoto Tamai

Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine

Abstract

The immunolocalization of 70kD stress-protein (SP 70) was investigated in white rabbit corneas with alkali burns. Corneal alkali burn injuries were induced with 6 mm circular filter paper discs soaked in 1N NaOH. Corneas of 1, 3, 5, and 7 days after alkali injury were immunostained with mouse monoclonal anti-SP 70 antibody. In the control rabbit cornea, immunostaining for SP 70 was observed in the nuclei of the basal cells and of the wing cells. On day 1 after alkali injury, total epithelial defect was observed. Immunostaining for SP 70 was not seen in corneas with total epithelial defect. Three days after injury, epithelial resurfacing with corneal edema was observed. Basal cells showed immunos-

taining for SP 70 in their nuclei and cytoplasm. Five days after injury, irregular basal cells and a few wing cells with cytoplasmic processes were re-recognized. Both cells showed diffuse cytoplasmic and nuclear immunostaining for SP 70. Seven days after injury, the corneal wound was healed, and SP 70 was observed in the nuclei of the epithelial cells again. It appears that SP 70 has a role in corneal epithelial healing after alkali burn injury. (J Jpn Ophthalmol Soc 98:1056-1060, 1994)

Key words: Stress protein, Alkali burn, Cornea, Corneal epithelium

I 緒 言

角膜アルカリ外傷は、角膜組織が全層にわたり化学腐食による融解を受ける化学外傷である。アルカリは脂質と反応し、これを可溶化する。このため細胞質が破壊され、角膜上皮細胞の融解、消失を引き起こす。またアル

カリは、その吸湿性により持続的に眼内に浸透する。このため、角膜上皮細胞のみならず角膜実質や角膜内皮細胞へもアルカリが到達し、高度の障害を生じるため臨床的にも重篤な後遺障害をもたらす。これまで実験的アルカリ外傷における創傷治癒に関する研究が行われ、その細胞応答に関する知見が得られている^{1)~3)}。

別刷請求先：980 宮城県仙台市青葉区星陵町1-1 東北大学医学部眼科学教室 山田 桂
(平成5年1月28日受付, 平成6年6月23日改訂受理)

Reprint requests to: Katsura Yamada, M.D. Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi-ken 980, Japan

(Received January 28, 1993 and accepted in revised form June 23, 1994)

一方、細胞が障害を受けることで誘導され、損傷した蛋白質の修復に關与するストレス蛋白 (heat shock/stress protein, SP) が、眼組織においても重要な役割を有することが知られている⁴⁾。近年ストレス蛋白が角膜上皮細胞にも存在し、ストレス蛋白が角膜組織障害の場でも重要な役割を担っていることが報告された⁵⁾⁶⁾。しかし、現在までアルカリ外傷時の角膜におけるストレス蛋白の動態に関する研究の報告はない。今回我々は、白色家兎角膜に水酸化ナトリウムを用いた実験的アルカリ外傷を作成し、その治癒過程における 70 kD ストレス蛋白 (SP 70) の局在を抗 SP 70 抗体を用いて免疫組織化学的に検討し、興味ある知見を得たので報告する。

II 実験方法

1. 角膜アルカリ外傷の作成

実験動物として生後6か月の白色家兎を用いた。角膜アルカリ外傷の作成は以下のように行った。直径6mmの円盤状に成形した濾紙(東洋製紙#2濾紙)に1N水酸化ナトリウム(NaOH)を十分に浸漬させた。固定器に白色家兎を固定し、0.04%塩酸オキシプロカイン(ペノキシル®)による点眼麻酔を施した後、右眼角膜の中央部に濾紙を静かに乗せ2分間放置した。次に濾紙を角膜から除去し、20mlの生理的食塩水を用いて1分間洗浄した(図1)。対照として、左眼には生理的食塩水による洗浄のみを施行した。

アルカリ外傷を作成してから1日後、3日後、5日後、7日後に致死量のペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®)の静脈内注射により各3匹を屠殺した。直ちに眼球を摘出し、Carnoy液に固定した。固定された眼球をパラフィンに包埋し、10 μ m厚の組織切片を作製した。一部の切片はヘマトキシリン-エオジン染色で観察した。

2. SP 70 に対する免疫組織化学

免疫組織化学的検索は以下の手順で行った。切片を脱

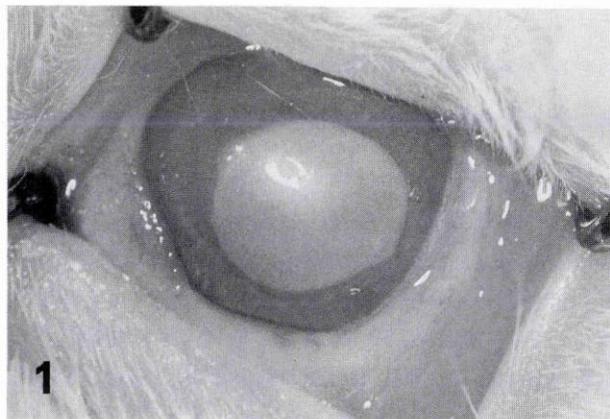


図1 アルカリ外傷作成直後の角膜。濾紙の形に一致して白濁がみられる。

パラフィン後、0.3%過酸化水素溶液で10分間内在性ペルオキシダーゼの阻止処理を行い、さらに20%正常ウサギ血清と1時間反応させて非特異的反応を除去した。その後、リン酸緩衝溶液で十分に洗浄し、4°Cの湿箱中でマウス抗SP70モノクローナル抗体と16時間反応させた。この際、一次抗体を除いたものを対照とした。リン酸緩衝溶液で洗浄後、ビオチン標識ヤギ抗体マウスIgG抗体と2時間反応させた。リン酸緩衝溶液で洗浄後、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体と2時間反応させた。次いで、組織切片をトリス塩酸緩衝溶液で洗浄し、0.01%過酸化水素加diamino-benzidine (DAB)溶液で10分間発色させた。リン酸緩衝溶液で洗浄し反応を停止させ、組織切片をエタノールおよびキシレンで脱水透徹後、封入し観察した。抗体はSP70に対するマウスモノクローナル抗体(N27F3-4, StressGen Biotechnologies社, カナダ)をwestern blotting法により検定し使用した。本抗体はHela細胞から分離されたSPに対して作成された抗体であり、ヒト、サル、ラットなど多くの哺乳動物細胞において、72kDおよび73kDのSPと反応する⁷⁾。

III 結果

観察はすべて、作成した角膜アルカリ外傷の中央部について行った。

正常の白色家兎角膜は、基底細胞、翼状細胞の規則正しい配列で形成される(図2A)。しかし、アルカリ外傷を作成して1日後には、外傷作成部位の角膜上皮細胞は死滅し存在していなかった(図2B)。アルカリ外傷を作成して3日後には、角膜上皮の再生が始まっていた(図2C)。アルカリ外傷を作成してから5日後には、障害部位に角膜上皮の再生が認められた。この角膜上皮には基底細胞層および2~3層の翼状細胞層が認められたが、基底細胞の形態および配列は乱れており、翼状細胞も突起を出して進展しているのが認められた。また、角膜実質にも角膜実質細胞の増殖が認められた(図2D)。アルカリ外傷を作成してから7日後には、角膜上皮には基底細胞層、翼状細胞層に加えて表層細胞層が認められた(図2E)。

SP70による免疫組織化学染色は、アルカリ外傷を作成しない角膜上皮では基底細胞および翼状細胞の核に認められた(図3A)。アルカリ外傷を作成して1日後の角膜では角膜上皮細胞および実質細胞は死滅しており、SP70の免疫組織化学染色は認められなかった(図3B)。アルカリ外傷を作成して3日後には、再生中の角膜上皮細胞のうち、基底細胞の細胞質およびその核にSP70の免疫組織化学染色が認められた(図3C)。アルカリ外傷を作成して5日後には、再生してきた角膜上皮細胞の細胞質を中心にびまん性にSP70による免疫組織化学染色が認められ、また再生してきた角膜実質細胞

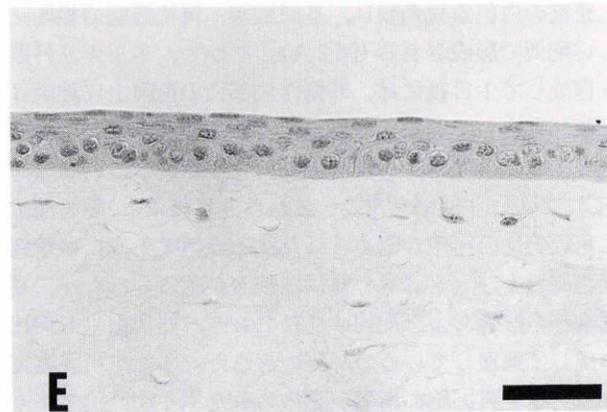
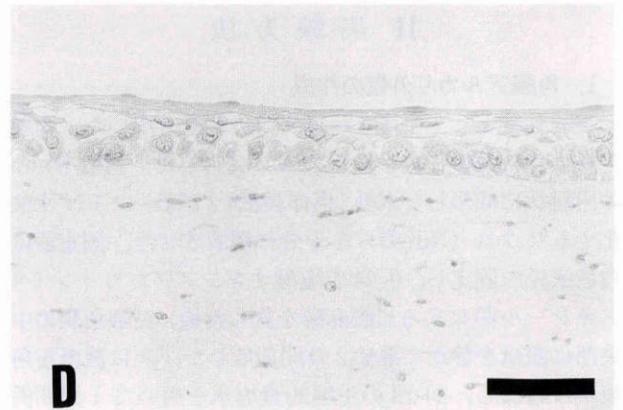
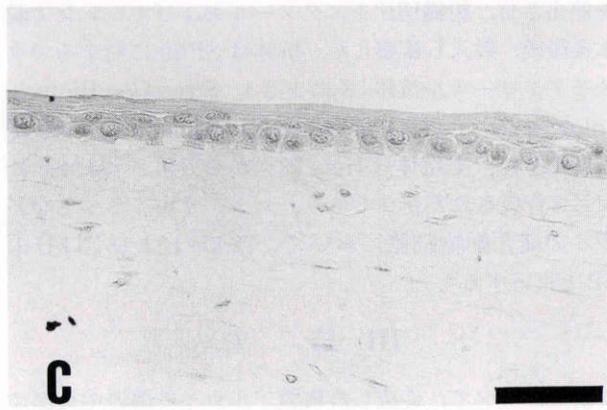
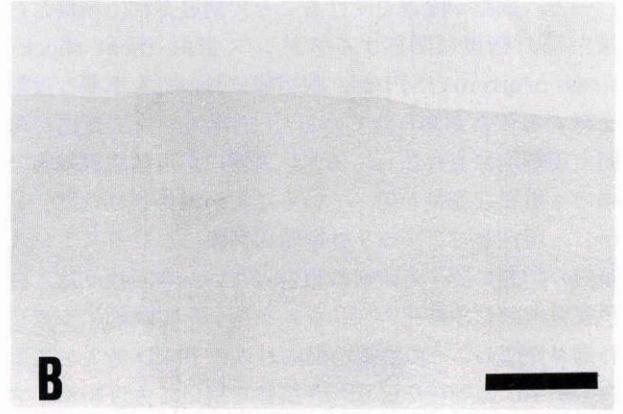
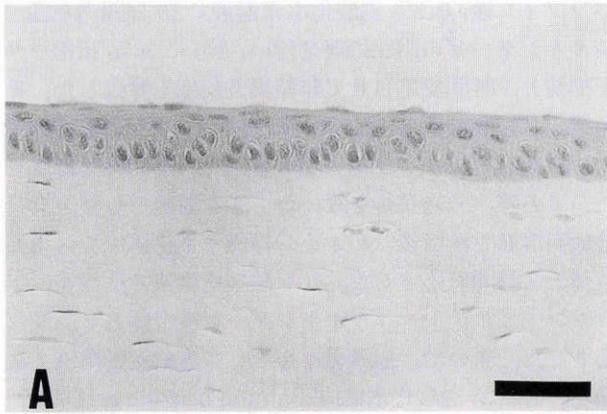


図2 アルカリ外傷作成後の角膜上皮組織。

A: 正常の白兔家兎角膜。基底細胞、翼状細胞および表層細胞の規則正しい配列がみられる。B: アルカリ外傷1日後の角膜。外傷を作成した部位の角膜上皮細胞および角膜実質細胞は死滅している。C: アルカリ外傷3日後の角膜。基底細胞層と、菲薄化した翼状細胞層がみられる。アルカリ外傷創は閉じられていない。D: アルカリ外傷5日後の角膜。基底細胞層の形態および配列は乱れ、翼状細胞層は突起を出して進展している。角膜実質細胞も進展してきている。E: アルカリ外傷7日後の角膜。角膜上層には基底細胞層、翼状細胞層に加えて表層細胞層が認められ、形態および配列は整っている。

ヘマトキシリン-エオジン染色。バーは50 μm

にも SP 70 による免疫組織化学染色が認められた (図 3 D)。アルカリ外傷を作成して7日後には、SP 70 による免疫組織化学染色は形態および配列の整った角膜上皮細胞の核に認められた。アルカリ外傷5日後にみられた細胞質の免疫染色は、この時点では認められなかった (図 3 E)。

IV 考 按

細胞はその生存環境の急激な変化、すなわち種々の環境の変化や病的状態などに対し、ストレス応答と呼ばれる普遍的な防御反応を行っており、眼組織も例外ではない⁴⁾。ストレス応答の際、急速に発現される蛋白質群は、

ストレス蛋白 (SP) として知られている。その機能と構造は進化的に種を越えてよく保存され、各生物間で高い相同性を示す。代表的な SP の一つである 70 kD ストレス蛋白 (SP 70) は、熱ショックや有害物質の投与、または炎症、発熱、虚血、感染、グルコース飢餓などの病的状態で誘導され、蛋白質の会合、膜の通過、膜通過後の再会合を助ける分子シャペロンとして機能すると理解されている。すなわち、SP 70 はストレスにより変性した蛋白質に結合して、不必要な折り畳みが起こらないようにしたうえで、これを小胞体やミトコンドリアに送り込み、修復させる機能を有していると考えられている^{10)~13)}。

Yamaguchi ら⁵⁾はラット角膜上皮細胞における SP 70

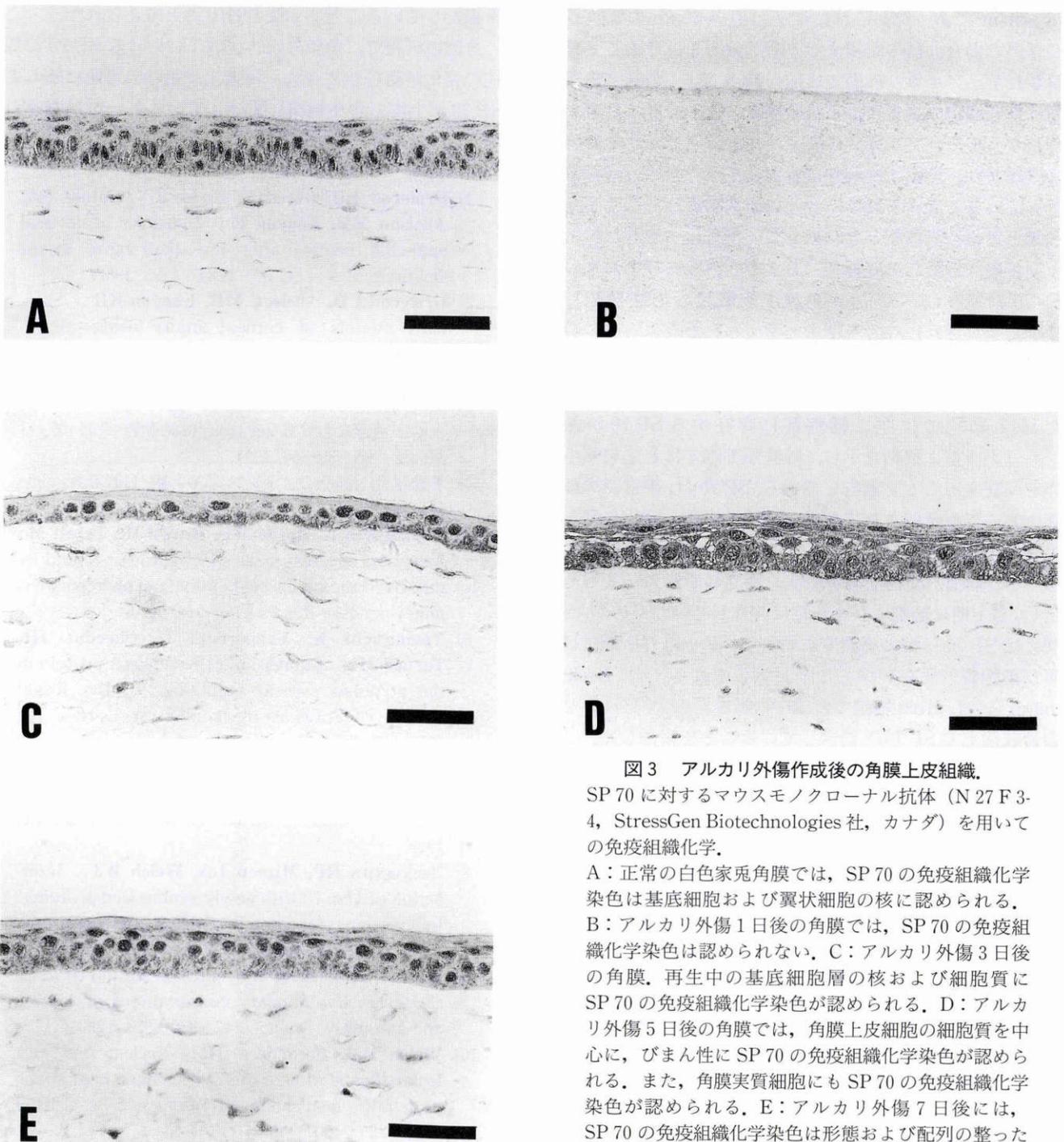


図3 アルカリ外傷作成後の角膜上皮組織。

SP 70 に対するマウスモノクローナル抗体 (N 27 F 3-4, StressGen Biotechnologies 社, カナダ) を用いての免疫組織化学。

A: 正常の白色家兎角膜では, SP 70 の免疫組織化学染色は基底細胞および翼状細胞の核に認められる。B: アルカリ外傷 1 日後の角膜では, SP 70 の免疫組織化学染色は認められない。C: アルカリ外傷 3 日後の角膜。再生中の基底細胞層の核および細胞質に SP 70 の免疫組織化学染色が認められる。D: アルカリ外傷 5 日後の角膜では, 角膜上皮細胞の細胞質を中心に, びまん性に SP 70 の免疫組織化学染色が認められる。また, 角膜実質細胞にも SP 70 の免疫組織化学染色が認められる。E: アルカリ外傷 7 日後には, SP 70 の免疫組織化学染色は形態および配列の整った角膜上皮細胞の核に認められる。バーは 50 μ m

の存在を明らかにし, 角膜上皮細胞の熱ショック応答を検討した。その結果, SP 70 は正常状態では基底細胞に存在するが, 熱ショックを受けた後は翼状細胞や表層細胞にも存在することが示された。また, *in situ hybridization* 法による検討で, 熱ショックから 18 時間後に SP 70 の mRNA が著しく増加することが示された。また, SP 70 は病的状態の角膜においても発現することが報告されている。最近の研究によれば, Royal College of Surgeons ラットの角膜上皮も生後 1 か月~3 か月にかけて有意に萎縮し, 萎縮期の角膜上皮細胞には SP 70 の発現が認められている⁹⁾。このように, SP 70 は角膜上皮

においてもストレス応答の基本構成要素として重要な役割を担っていると考えられる。

今回の研究では, アルカリ外傷 3 日後には再生中の基底細胞の核と細胞質に, またアルカリ外傷 5 日後には翼状細胞を含む角膜上皮細胞の細胞質に SP 70 の染色が認められた。角膜上皮は細胞の遊走により創が閉じられた後, 細胞の垂直方向への増殖により再生すると考えられている。Ormerod ら¹⁾は白色家兎角膜にアルカリ外傷を作成し, 角膜上皮は円形の創縁から均等な速度で再生してくることを明らかにした。その際, 1 N 水酸化ナトリウムによるアルカリ外傷では, 角膜上皮の再生の速度は

76 $\mu\text{m/hr}$ であった。これに従えば直径 6 mm のアルカリ外傷の場合、創の閉鎖までの時間は約 3 日であると計算された。アルカリ外傷 3 日後の時点では、角膜上皮細胞は基底細胞の遊走による治癒機転の途上にあると考えられる。また、アルカリ外傷 5 日後の時点ではすでに創は閉鎖され、角膜上皮細胞は盛んに垂直方向への増殖を行っていると考えられる。今回の研究結果は、こうした角膜上皮の治癒機転ときわめてよく符号しており、アルカリ外傷 3 日後の基底細胞、および 5 日後のびまん性の SP 70 の局在は、SP 70 が角膜上皮細胞の治癒機転に伴って誘導されたことを示すと考えられた。

アルカリ外傷を作成して 7 日後の角膜では、SP 70 は細胞の核に局在していた。Welch ら¹⁰⁾は、37°C で発育した Hela 細胞では主に細胞質に存在する SP 70 が熱ショック後核に移動を示し、哺乳類細胞ではとくに核小体を局在することを報告している。SP 70 は、平常時の細胞においても合成されており、細胞の増殖、分化に際し重要な役割を持っていることが知られてきている。SP 70 の細胞内局在は増殖細胞の細胞周期によっても変化し、G 1 期に細胞にびまん性に存在していたものが、S 期には SP 70 は核に高濃度に局在し、さらに G 2 期には再び細胞質へ局在が移ることが報告された¹¹⁾¹²⁾。Beckmann ら⁸⁾は、Hela 細胞で合成中の蛋白質の大部分は、その合成途上で SP 70 と結合していることを報告した。これらのことから、SP 70 は細胞の増殖過程における蛋白質の合成過程で、折り畳みや会合を制御する機能をもつことが考えられる。アルカリ外傷 7 日後の時点では、角膜上皮には表層細胞が出現しており、修復はほぼ終了しつつある状態と考えられる。その核に SP 70 染色の局在がみられたことは、ストレスからの回復が進み安定期に移行しつつあることを反映するものと考えられた。

アルカリ外傷は、角膜上皮のみならず角膜実質に対しても高度の障害を与える。アルカリ外傷直後の角膜実質においては角膜実質細胞がいったん死滅した後、経過とともに障害部位へ増殖進入するが、アルカリ外傷 7 日後にはその密度は正常角膜実質とほぼ同じとなり、増殖が低下してくることが藤沢ら⁹⁾により報告されている。今回の研究においてもアルカリ外傷を作成した直後には角膜実質細胞は存在しなかったが、5 日後には障害部位への角膜実質細胞の進入がみられた。これらの角膜実質細胞の細胞質に SP 70 による免疫染色が認められたことは、角膜実質細胞の増殖を反映するとともに SP 70 が角膜上皮のみならず角膜実質においても、その再生に役割

を果たしていることを示唆するものと考えられた。

今回の研究で、角膜の病的状態下における SP 70 の局在の変化が明らかにされ、角膜上皮細胞の増殖に際して SP 70 が上皮の再生機構に関与していることが示唆された。

文 献

- 1) Ormerod LD, Garsd A, Reddy CV, Gomes SA, Abelson MB, Kenyon K: Dynamics of corneal epithelial healing after an alkali burn. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 1784—1793, 1989.
- 2) Ormerod LD, Abelson MB, Kenyon KR: Standard models of corneal injury using alkali-immersed filter discs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 2148—2153, 1989.
- 3) 藤沢久美子, 片上千加子, 山本 節: 角膜アルカリ外傷治癒過程における keratocyte の動態について. *日眼会誌* 95: 59—66, 1991.
- 4) 若倉雅登: 細胞のストレス応答と眼. *日眼会誌* 93: 511—523, 1989.
- 5) Yamaguchi K, Barbe MF, Brown IR, Tytell M: Induction of stress (heat shock) protein 70 and its mRNA in the rat corneal epithelium by hyperthermia. *Curr Eye Res* 9: 913—918, 1990.
- 6) Yamaguchi K, Yamaguchi K, Sheedlo JH, Turner JE: Expression of heat shock protein in the atrophic corneal epithelium of the Royal College of Surgeons dystrophic rat. *Cornea* 10: 161—165, 1991.
- 7) Riabowol KT, Mizzen LA, Welch WJ: Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp 70. *Science* 242: 433—436, 1988.
- 8) Beckmann RP, Mizzen LA, Welch WJ: Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: Implications for protein folding and assembly. *Science* 248: 850—854, 1990.
- 9) Hartl FU, Neupert W: Protein sorting to mitochondria: Evolutionary conservations of folding and assembly. *Science* 247: 930—938, 1990.
- 10) Welch WJ, Feramisco JR: Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shock mammalian cells. *J Biol Chem* 259: 4501—4513, 1984.
- 11) Wu BJ, Morimoto RI: Transcription of the human hsp 70 gene is induced by serum stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6070—6074, 1985.
- 12) Milarski KL, Morimoto RI: Expression of human HSP 70 during the synthetic phase of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 9517—9521, 1986.