

老化促進モデルマウスにおける Bruch 膜の 加齢性変化の免疫組織学的検討

高田百合子, 宇山 昌延, 大熊 紘, 緒方奈保子
松島 正史, 出口 順子, 菅澤 啓二

関西医科大学眼科学教室

要 約

基底膜にみられる細胞外基質構成成分である IV 型コラーゲン, ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) について免疫組織学的観察を行い, 加齢による変化を調べた. 老化促進モデルマウス SAM P 1 の生後 2, 10, 14 か月齢を用いた. 抗体は IV 型コラーゲンに対するポリクロナール抗体と HSPG に対するモノクロナール抗体を用いた. 光学顕微鏡的には ABC 法で, 電子顕微鏡的には金コロイドを用いた免疫電子顕微鏡法を行った. 光学顕微鏡的には, IV 型コラーゲン, HSPG とともに, Bruch (ブルッフ) 膜に特異的に染色をみたが, 加齢による差はなかった. 電子顕微鏡的には, IV 型コラーゲン, HSPG と

もに金粒子は 2 つの基底膜にみられ, 特に脈絡膜毛細血管板側に著明であった. 加齢に伴い脈絡膜毛細血管板側基底膜は肥厚し, それに伴って, IV 型コラーゲンに対する金粒子は増加した. HSPG に対する金粒子も増加していたが, 分布は不規則であった. このような変化がブルッフ膜の加齢に伴う変化を示している. (日眼会誌 98: 955—961, 1994)

キーワード: IV 型コラーゲン, ヘパラン硫酸プロテオグリカン, ブルッフ膜, 老化促進モデルマウス, 加齢

Immunohistological Study in Bruch's Membrane of Senescence Accelerated Mouse

Yuriko Takada, Masanobu Uyama, Hiroshi Ohkuma, Nahoko Ogata
Masashi Matsushima, Junko Deguchi and Keiji Sugasawa

Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

Abstract

Age-related macular degeneration is one of the major causes of severe visual loss in elderly individuals. However, relatively little is known about its etiology. The disease may be associated with senescence. Ultrastructural and immunohistochemical studies on SAM (senescence accelerated mouse) eyes were carried out to learn details of aging changes in the retinal pigment epithelium (RPE) and Bruch's membrane. SAM P 1 mice aged 2, 10, 14 months were examined in this study. The eyes were analysed for type IV collagen and heparan sulfate proteoglycan (HSPG) by the avidin-biotin-peroxidase complexes (ABC) method and post-embedding immunolocalization with colloidal gold. With the ABC method, the basement membranes of both the RPE and the choriocapillaris showed markedly positive staining when treated with anti-type IV collagen antibody and moderately positive staining when

treated with anti-HSPG antibody. In ultrastructural immunolocalization, both basement membranes showed fairly heavy labeling in response to the antibodies to type IV collagen, and moderate labeling in response to the antibodies to HSPG. With aging, the thickness of the basement membrane of the choriocapillaris and gold particle labeling by the antibodies to type IV collagen increased. The gold particle labeling by the antibodies to HSPG increased slightly, but was distributed sparsely. These results showed the advancing process of senescence changes in Bruch's membrane. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 955—961, 1994)

Key words: Type IV collagen, Heparan sulfate proteoglycan, Bruch's membrane, Senescence accelerated mouse, Aging

別刷請求先: 570 大阪府守口市文園町1 関西医科大学眼科学教室 高田百合子
(平成6年3月25日受付, 平成6年5月20日改訂受理)

Reprint requests to: Yuriko Takada, M.D. Department of Ophthalmology, Kansai Medical University, 1 Fumizonochō, Moriguchi-shi, Osaka-fu 570, Japan

(Received March 25, 1994 and accepted in revised form May 20, 1994)

I 緒 言

細胞外基質は、IV型コラーゲンを主体とするコラーゲン成分とラミニン、プロテオグリカン、フィブロネクチンなどの非コラーゲン成分から成っていることが、近年次第に明らかにされてきた。この細胞外基質は、単に細胞を支持しているのみならず、細胞の接着、分化、遊走、増殖などにも深く関わっていることが解明されてきており、注目を浴びている^{1)~4)}。

網膜と脈絡膜の物質輸送関門であるBruch(ブルッフ)膜は加齢に伴い、基底膜の肥厚、膠原線維の配列の乱れがみられ、これらの変化には細胞外基質構成成分の関与が考えられている^{5)~7)}。

老化促進モデルマウス(senescence accelerated mouse, SAM)は1981年竹田ら⁸⁾⁹⁾によって開発され、促進老化とアミロイド症を呈する系統で、老化の動物モデルとして眼科領域でも研究されている^{7)10)~12)}。SAM P系の平均寿命は11.9か月、R系では15.3か月である。その特徴としては、行動性の低下、脱毛、被毛光沢の減退消失、被毛粗雑、脊椎前後彎増強、寿命の短縮などがある。

我々は、SAM P1を用い、網膜色素上皮細胞、ブルッフ膜の加齢性変化について報告し¹⁰⁾¹²⁾、さらに、クプロリニック・ブルー染色法^{13)~16)}を用いて、ブルッフ膜におけるプロテオグリカンの分布および加齢に伴う変化を報告した⁷⁾。

本論文では、SAMを用い、基底膜にみられる細胞外基質構成成分であるIV型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)について抗体を用いて、免疫組織学的観察を行い、加齢による変化を調べた。

II 方 法

1. 実験動物

老化促進モデルマウスSAM P1の生後2か月齢：5匹6眼、10か月齢：6匹6眼と平均寿命を超えた14か月齢：3匹4眼を全身状態、行動などを観察した上で用いた。エチルエーテルで麻酔後、灌流固定(4%パラホルムアルデヒド、0.1%グルタルアルデヒド、ハンクス緩衝液、pH 7.4)した後、眼球摘出し、燐酸緩衝液に保存した。

2. 実験方法

1) 光学顕微鏡的検索

眼球はクリオスタットで10 μ mの薄片を作成した。IV型コラーゲンの染色にあたっては、組織切片を0.3% H_2O_2 燐酸緩衝液で室温30分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した後、燐酸緩衝液で洗浄した。非特異的反応阻止の目的で20%正常ヤギ血清(0.5%牛血清アルブミン含燐酸緩衝液、0.3% Triton X-100)を

室温15分間反応させた。一次抗体としてrabbit anti-mouse collagen IV polyclonal antisera (CHEMICON社製)を用い、2,000倍希釈で室温100分間反応させた。対照にはrabbit antiseraを用いた。燐酸緩衝液で洗浄後、二次抗体にはbiotinylated anti-rabbit IgG (VECTOR社製)を5 μ g/ml(0.5%牛血清アルブミン含燐酸緩衝液+0.3% Triton X-100)で室温30分間反応させた。燐酸緩衝液で洗浄後、VECTASTAIN社製 avidin-biotin-peroxidase complexes (ABC) reagentで室温30分間反応させた。燐酸緩衝液で洗浄後、3,3'-diaminobenzidine (DAB) 過酸化水素反応液(0.1% DAB, 0.018% H_2O_2 , 50 mM Tris-HCl pH 7.4)に5分間浸漬し発色させ、蒸留水で洗浄後、メチルグリーンで核染色し、エタノールで脱水し、透徹、封入した。

HSPGの染色にも同様にABC法を用いたが、一次抗体としてはrat anti-heparan sulfate proteoglycan monoclonal antibody (CHEMICON社製)を100倍希釈し、対照としてgoat anti-rat IgGを用いた。二次抗体としてはbiotinylated anti-rat IgG (E-Y社製)を5 μ g/mlで用いた。

2) 電子顕微鏡的検索

固定した組織を細切後エタノールで脱水、LRwhiteにより包埋し、紫外線重合を-20°Cで一昼夜、室温で一昼夜行った。その後、ミクロトームで超薄切片を作成し、金コロイド法による免疫電子顕微鏡染色を行った。

IV型コラーゲンに対しては、非特異的反応阻止の目的で、0.5%牛血清アルブミン含燐酸緩衝液で室温10分間反応させた。抗体はrabbit anti-mouse collagen IV polyclonal antisera (CHEMICON社製)100倍希釈(0.5%牛血清アルブミン含燐酸緩衝液)で室温60分間反応させた。対照にはrabbit antiseraを用いた。0.5%牛血清アルブミン含燐酸緩衝液で洗浄し、goat anti-rabbit IgG gold (和光純薬, ULTRA Biotechnology MIC Medical社)直径10 nmで10倍希釈(0.5%牛血清アルブミン含燐酸緩衝液)で30分間反応を行った。カコジル酸緩衝液で洗浄後、5%グルタルアルデヒド(カコジル酸緩衝液、pH 7.4)で室温5分間反応後、蒸留水で洗浄した。ウラニール酸で10分間、水洗後鉛で20秒間染色を行い、電子顕微鏡で観察した。

HSPGに対しても同様で、抗体はrat anti-heparan sulfate proteoglycan monoclonal antibody (CHEMICON社製)50倍希釈で120分間反応させた。対照としてgoat anti-rat IgGを用いた。金粒子はgoat anti-rat IgG gold (E-Y社製)直径5 nmで10倍希釈した。

なお、光学顕微鏡および電子顕微鏡的観察は眼底後極部を中心に行った。

III 結 果

1. 光学顕微鏡所見

IV型コラーゲンは、ブルッフ膜に特異的に染色がみられた(図1, 2)。しかし、加齢による染色の程度に差をみなかった。

HSPGについても、染色の程度はIV型コラーゲンに比べると弱かったが、ブルッフ膜に特異的に染色がみられた(図3, 4)。加齢による差はなかった。

2. 電子顕微鏡的所見

1) IV型コラーゲン

2か月齢では、網膜色素上皮細胞側と脈絡膜毛細血管

板側の基底膜の厚さにはまだ著明な差はみられなかったが、金粒子は、脈絡膜毛細血管板側基底膜全体に散在性に多くみられ、網膜色素上皮細胞側では僅かであった(図5)。また、内外側膠原線維層、弾性線維層にはみられなかった。対照には基底膜への金粒子の付着をみなかった(図6)。

10か月齢では、網膜色素上皮細胞側の基底膜に比べ、脈絡膜毛細血管板側の基底膜は肥厚していた。それに伴い、脈絡膜毛細血管板側の基底膜にみられた金粒子の数は増加していた(図7)。網膜色素上皮細胞側では、基底膜の肥厚は僅かで金粒子の不着も僅かであった。また、基底膜以外の部位への付着をみなかった。

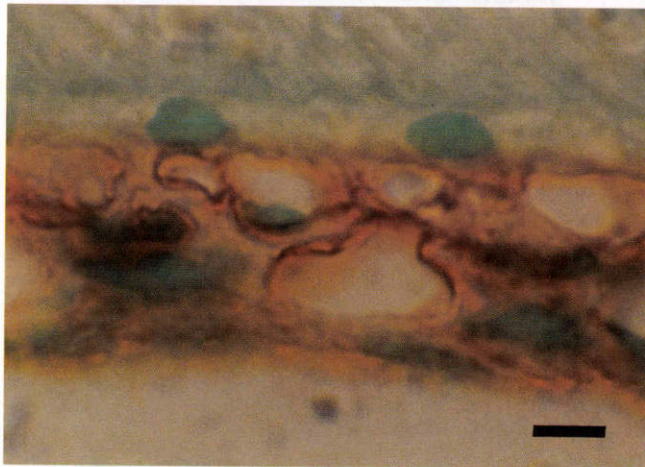


図1 Senescence accelerated mouse (SAM) 10か月齢網脈絡膜組織のIV型コラーゲンの局在。Bruch (ブルッフ) 膜に特異的に染色をみる。バーは5 μm

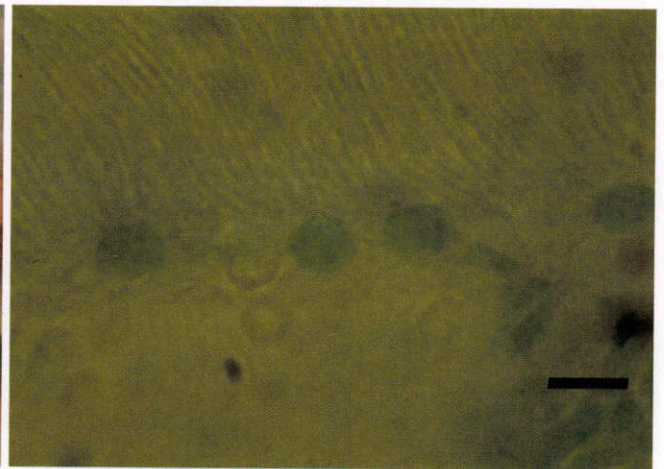


図2 SAM 10か月齢の網膜絡膜組織。一次抗体 (IV型コラーゲン) の代わりに正常ウサギ血清を用いると、ブルッフ膜は染色されない。バーは5 μm

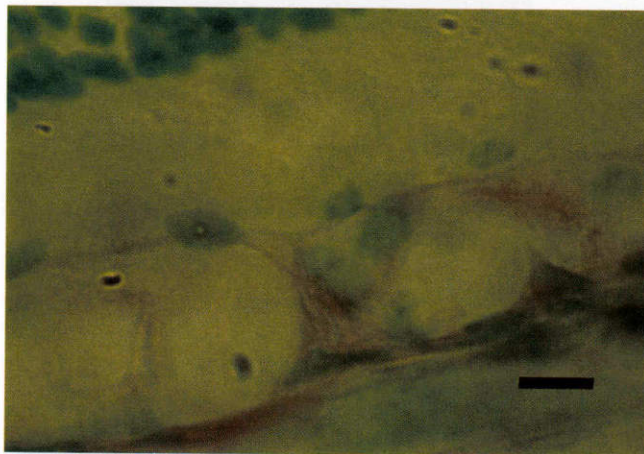


図3 SAM 10か月齢の網脈絡膜組織の heparan sulfate proteoglycan (HSPG) の局在。染色の程度はIV型コラーゲンに比べると弱いだが、ブルッフ膜と脈絡膜血内壁に特異的に染色をみる。バーは5 μm

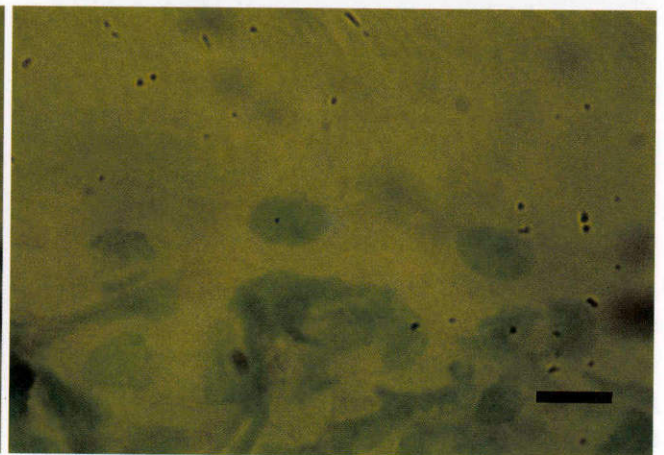


図4 SAM 10か月齢の網膜絡膜組織。一次抗体 (HSPG) の代わりにラット IgG 抗体を用いると、ブルッフ膜は染色されない。バーは5 μm

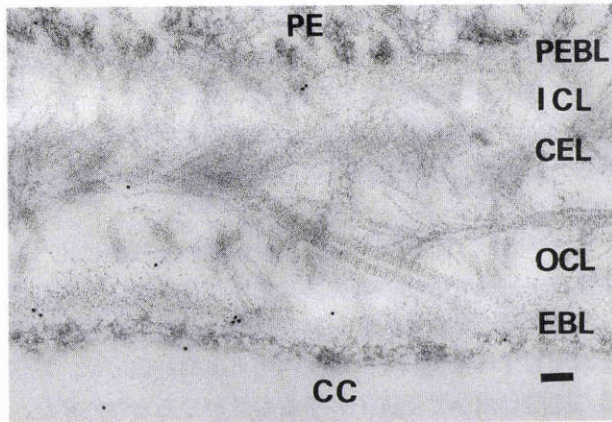


図5 SAM 2か月齢のブルッフ膜とIV型コラーゲンの局在。

網膜色素上皮細胞側と脈絡膜毛細血管板側の基底膜の厚さはまだ著明な差をみないが、金粒子は、脈絡膜毛細血管板側基底膜全体に散在性に多くみられ、網膜色素上皮細胞側では僅かである。内外側膠原線維層、弾性線維層にはみられない。PE：網膜色素上皮細胞、PEBL：網膜色素上皮細胞側基底膜、ICL：内側膠原線維層、CEL：弾性線維層、OCL：外側膠原線維層、EBL：脈絡膜毛細血管板側基底膜、CC：脈絡膜毛細血管。バーは100 nm



図6 SAM 2か月齢のブルッフ膜。

対照ではIV型コラーゲンに対する抗体の代わりに正常ウサギ血清を用いた。基底膜への金粒子の付着をみない。バーは100 nm

平均寿命を超えた14か月齢では、脈絡膜毛細血管板側の基底膜はさらに肥厚していた。基底膜に付着する金粒子も基底膜の肥厚に伴い、さらに増加していた(図8)。網膜色素上皮細胞側の基底膜の肥厚は著明ではなく、金粒子の付着も僅かであった。

2) ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG)

2か月齢では、脈絡膜毛細血管板側の基底膜に金粒子がみられ、網膜色素上皮細胞側では少数であった(図9)。内外側膠原線維層、弾性線維層には僅かにみられたのみであった。対照には、基底膜への金粒子の付着をみなかっ

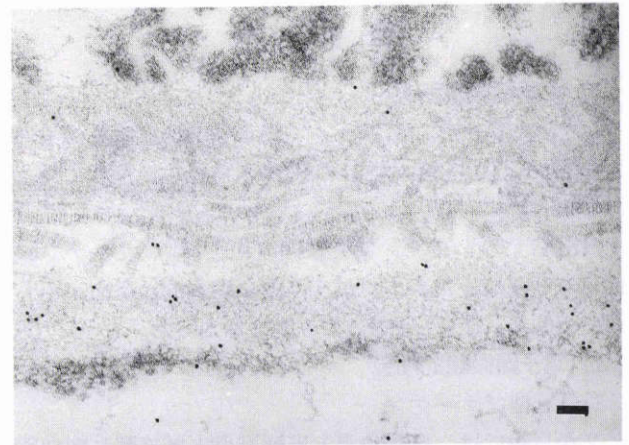


図7 SAM 10か月齢のブルッフ膜とIV型コラーゲン。

網膜色素上皮細胞側の基底膜に比べ、脈絡膜毛細血管板側の基底膜は肥厚している。それに伴い、脈絡膜毛細血管板側の基底膜にみられる金粒子の数が多し。網膜色素上皮細胞側では基底膜の肥厚は僅かであり、金粒子の付着も僅かである。基底膜以外の部位には付着をみない。バーは100 nm

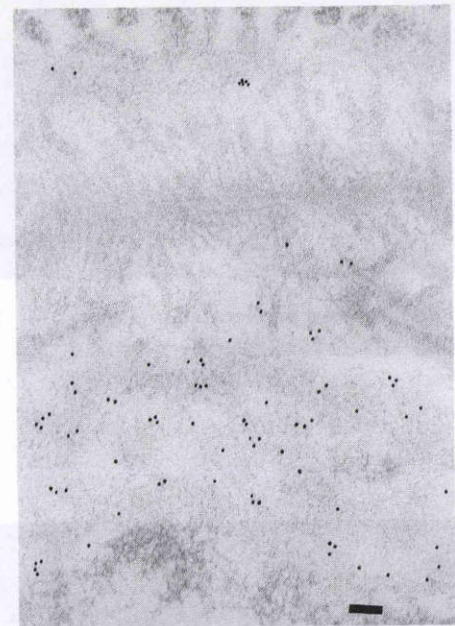


図8 SAM 14か月齢のブルッフ膜とIV型コラーゲン。

脈絡膜毛細血管板側の基底膜はさらに肥厚している。基底膜に付着する金粒子も膜の肥厚に伴い、さらに多し。網膜色素上皮細胞側の基底膜の肥厚は著明でなく、金粒子の付着も僅かである。バーは100 nm

た(図10)。

10か月齢では、肥厚した脈絡膜毛細血管板側基底膜に金粒子が多数みられた(図11)。網膜色素上皮細胞側には増加をみなかった。また、内外側膠原線維層にも少数だが金粒子がみられた。

14か月齢になると、脈絡膜毛細血管板側の基底膜はさ

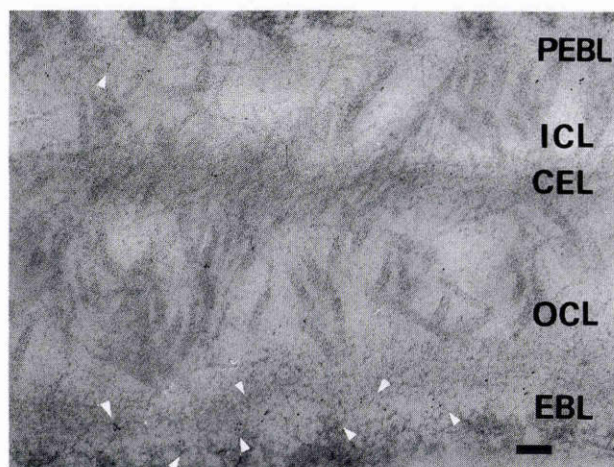


図9 SAM 2か月齢ブルッフ膜とHSPG.
脈絡膜毛細血管板側の基底膜に金粒子(一部白矢じりで示す)がみられ、網膜色素上皮細胞側では少ない。内外側膠原線維層、弾性線維層には僅かにみられるのみである。バーは100 nm

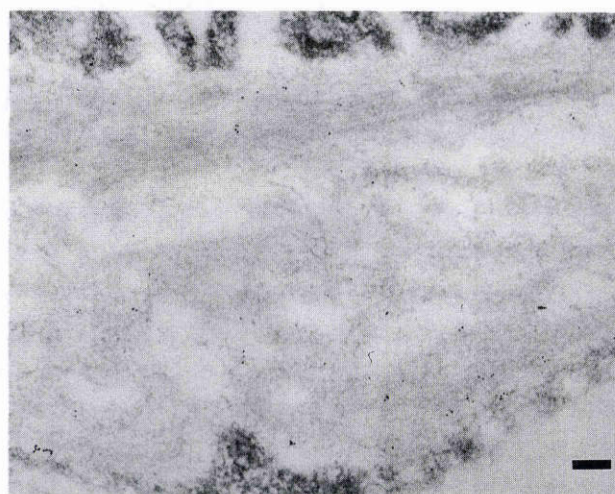


図11 SAM 10か月齢のブルッフ膜とHSPG.
肥厚した脈絡膜毛細血管板側基底膜に金粒子を多数みる。網膜色素上皮細胞側では少ない。内外側膠原線維層にも少数だが金粒子がみられる。バーは100 nm

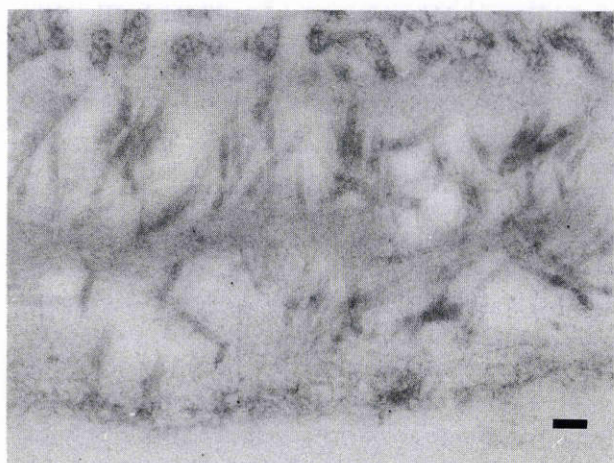


図10 SAM 2か月齢のブルッフ膜。
対照では、HSPGに対する抗体の代わりにラットIgGを用いた。基底膜への金粒子の付着をみない。バーは100 nm



図12 SAM 14か月齢のブルッフ膜とHSPG。
脈絡膜毛細血管板側の基底膜はさらに肥厚したが、金粒子の付着は不規則で疎らである。バーは100 nm

らに肥厚したが、金粒子の付着は不規則で疎らであった(図12)。

IV 考 按

我々は既に、老化促進モデルマウス(SAM)を用いて網膜色素上皮細胞、ブルッフ膜の加齢性変化について報告している¹¹⁾¹²⁾。ブルッフ膜については、加齢により網膜色素上皮細胞側および脈絡膜毛細血管板側基底膜に肥厚がみられ、特に、脈絡膜毛細血管板側で著明であった。また、膠原線維間の離間が大きくなり、間隙には微細線維様物質を多数みた。さらに、クプロロニック・ブルー染色法^{13)~16)}を用いて観察すると、膠原線維には2種類のプロテオグリカンが存在し、酵素処理を行うことによりコンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸であることが確認

された⁷⁾。さらに、加齢に伴い、膠原線維にみられるフィラメントの配列、染色性は低下していた。また、酵素処理を行うと、加齢による膠原線維の脆弱性および易消化性が示唆された。基底膜には1種類のプロテオグリカンが存在し、亜硝酸消化を行うことにより、ヘパラン硫酸であることが確認された。すなわち、加齢による基底膜、特に脈絡膜毛細血管板側基底膜の高度の肥厚とそれに伴うHSPGの増加がみられた。

このように、特殊染色および酵素処理、消化を行うことによりプロテオグリカンの存在と加齢による変化を間接的に観察してきた。しかしながら、抗原の明確な局在と加齢による抗原量の変化を検討すれば、加齢性の網膜

疾患の病態解明の上で重要な情報を提供すると思われる。

そこで本報では、酵素抗体法による検討を加えた。抗体としては、基底膜の重要な細胞外基質であるIV型コラーゲンとHSPGを用いた。

IV型コラーゲン、HSPGともに金粒子は基底膜にみられ、特に、脈絡膜毛細血管板側に著明であった。加齢に伴い脈絡膜毛細血管板側基底膜は肥厚し、それに伴ってIV型コラーゲンに対する金粒子は増加した。しかし、HSPGに対する金粒子では加齢に伴って増加したが、加齢の末期になると、HSPGの抗原量が低下するためかその分布は不規則で疎らになった。

このような変化はRohrbachら¹⁷⁾が、正常および遺伝的糖尿病マウスにおけるHSPGの減少とラミニンの増加を、また、糖尿病誘発物質であるストレプトゾトシン処置ラットの腎糸球体基底膜においてもHSPGの減少とIV型コラーゲンの増加を見出したことに共通点がある。Rohrbachら¹⁷⁾はこのことから、以下のような考察を行っている。糖尿病においてはHSPGの産生低下または代謝亢進のために、基底膜の主機能である透過性と深い関わりを持つ、すなわち、charge barrierとして制御するHSPGが基底膜局所で減少し、基底膜が機能不全になり、透過性は亢進する。それを補償するために、新たな基底膜形成の反復の結果として、生化学的にはラミニン、IV型コラーゲンの増加が生じ、形態学的には基底膜の多層化が起こるとした。また、石田¹⁸⁾はこの説を基に、実験的肉芽でのIV型コラーゲンによる血管基底膜の層状構造の出現を考察している。

これらの実験にみられる血管基底膜のIV型コラーゲンの増加、HSPGの変動は血行障害や、血管結合組織の増殖過程初期に観察されている。

この結果を今回の実験にみられるブルッフ膜の加齢性変化と同一には比較できないが、脈絡膜から網膜外層と組織は異なるが、同様の血管結合組織の増殖で発症する加齢性網膜疾患の発生要因を考える上で重要な所見の一つと考えられる。

基底膜にみられる細胞外基質構成成分であるIV型コラーゲン、HSPGについて、抗体を用いて免疫組織学的観察を行い加齢による変化を調べた。

IV型コラーゲン、HSPGともに基底膜にみられ、特に脈絡膜毛細血管板側に著明であった。加齢に伴い脈絡膜毛細血管板側基底膜は肥厚し、それに伴ってIV型コラーゲンは増加した。HSPGも加齢に伴って増加していたが、14か月齢では不規則であった。このような変化がブルッフ膜の加齢に伴って生じると思われた。

本論文の要旨は、第97回日本眼科学会総会(1993年6月18日、札幌)において高田が発表した。

稿を終えるにあたり、老化促進モデルマウスを配布して頂

きました京都大学胸部疾患研究所竹田俊夫教授に感謝いたします。

文 献

- 1) **Alberts B, Bray JL, Raff M, Roberts K, Watson JD**: Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, New York, 673-716, 1983.
- 2) **Grant DS, Leblond CP**: Immunogold quantitation of laminin, type IV collagen, and heparan sulfate proteoglycan in a variety of basement membranes. *J Histochem Cytochem* 36: 271-283, 1988.
- 3) **Laurie GW, Leblond CP, Martin GR**: Localization of type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan, and fibronectin to the basal lamina of basement membranes. *J Cell Biol* 95: 340-344, 1982.
- 4) **榎野博史**: 糸球体腎炎と細胞外基質. *BIO Medica* 6: 563-569, 1991.
- 5) **Tso MO, Friedman E**: The retinal pigment epithelium. III. Growth and development. *Arch Ophthalmol* 80: 214-216, 1968.
- 6) **Hogan MJ, Alvarado JA, Weddel JE**: Histology of the Human Eye: An Atlas and Textbook. WB Sanders Co, Philadelphia, 328-363, 1971.
- 7) **高田百合子, 大熊 紘, 緒方奈保子, 松島正史, 菅澤啓二, 宇山昌延**: 老化促進モデルマウスにおけるブルッフ膜の加齢性変化. 一プロテオグリカンの局在と変化一. *日眼会誌* 98: 469-476, 1994.
- 8) **Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, et al**: A new murine model of accelerated senescence. *Mech Aging Dev* 17: 183-194, 1981.
- 9) **Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K**: Senescence-accelerated mouse (SAM): A novel murine model of accelerated senescence. *J Am Geriatr Soc* 39: 911-919, 1991.
- 10) **Hosokawa M, Ashida Y, Tsuboyama T, Chen WH, Takeda T**: Cataract in senescence accelerated mouse (SAM). 2. Development of a new strain of mouse with late-appearing cataract. *Exp Eye Res* 47: 629-640, 1988.
- 11) **緒方奈保子, 大熊 紘, 金井清和, 南後健一, 高田百合子, 宇山昌延**: 老化促進モデルマウスの網膜色素上皮, ブルッフ膜の加齢性変化. *日眼会誌* 96: 180-189, 1992.
- 12) **高田百合子, 緒方奈保子, 大熊 紘, 宇山昌延**: 老化促進モデルマウスにおけるブルッフ膜の加齢性変化. *日眼会誌* 97: 595-601, 1993.
- 13) **Scott JE**: Proteoglycan histochemistry—A valuable tool for connective tissue biochemists. *Collagen Rel Res* 5: 541-575, 1985.
- 14) **Tawara A, Verner H, Hollyfield JG**: Proteoglycans in the mouse interphotoreceptor matrix. I. Histochemical studies using cuproinic blue. *Exp Eye Res* 46: 689-704, 1988.
- 15) **Call TW, Joe GH**: Sulfated proteoglycans in Bruch's membrane of the human eye: Localiza-

tion and characterization using cuproline blue. *Exp Eye Res* 51: 451-462, 1990.

16) **Sawaguchi S, Yue BYJT, Iwata K, Fukuchi T, Kaiya T**: Sulfated proteoglycan in the human lamina cribrosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2388-2398, 1992.

17) **Rohrbach DH, Hassel JR, Kleinman HK, Martin GR**: Alteration in the basement membrane (heparan sulfate) proteoglycan in diabetic mice. *Diabetes* 31: 185-188, 1982.

18) **石田明彦**: 異物肉芽組織における基底膜コラーゲン (IV型コラーゲン) の局在について. *日医大誌* 55: 12-20, 1988.