

眼軸伸展に伴う強膜の matrix metalloproteinase ならびに tissue inhibitor of metalloproteinase の発現の変化

須田生英子, 沢口 昭一, 市辺 幹雄, 岩田 和雄, 阿部 春樹

新潟大学医学部眼科学教室

要 約

眼軸伸展を認めた強膜における細胞外マトリックス分解酵素(MMP)である gelatinase(Ge), caseinase(Ca)と抗分解酵素である tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) の発現の変化について検討した。若年白色家兎の片眼に250 Uの α -chymotrypsinを注入し、眼軸長の延長を認めた実験眼と対照の他眼の赤道部強膜を器官培養した後、培養液中のGe, Ca活性をzymographyで、TIMP-1濃度をEIA法で測定した。すべての培養液中で87, 61, 57 kDa Geが認められ、87 kDa Geは実験眼で1.1~2.9倍上昇していた。また87, 82, 52, 50 kDa Caも実験眼で1.8~6.6倍強くなり、一

部のバンドは実験眼でのみ特異的に検出された。これに対し、TIMP-1は実験眼で0.98倍~1.41倍とその上昇の程度は軽度であり、MMPとTIMPのバランスはより組織分解の方向に傾いていることがわかった。以上から、強膜伸展を伴う種々の眼疾患の病因に、これら酵素系の発現の異常が関与している可能性が示唆された。(日眼会誌 99:23-28, 1995)

キーワード: 眼軸伸展, 強膜, Gelatinase, Caseinase, Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)

Changes of Expression in Matrix Metalloproteinase and Its Inhibitor Level in the Sclera from Axially Elongated Eyes

Keiko Suda, Shoichi Sawaguchi, Mikio Ichibe,
Kazuo Iwata and Haruki Abe

Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine

Abstract

We studied the gelatinolytic activity, caseinolytic activity and the level of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in the sclera from experimentally induced axially elongated eyes. The animal models were made by the injection of 250U α -chymotrypsin into the posterior chamber of young albino rabbits. Animals were killed with overdoses of intravenous pentobarbital and eyes were enucleated gently. Sclera from the equatorial area was then subjected to organ culture. The enzyme activity in the media was investigated by zymography using gelatin- or casein-containing gels together with an image analyzer system. TIMP-1 levels in each medium were measured by enzyme immunoassay (EIA). All samples showed three major bands of

gelatinolytic activity at molecular weights of 87, 61, and 57kDa. Gelatinolytic activity of 87 kDa increased 1.1 to 2.9 times compared with control sclera. All of the caseinolytic activity (87, 82, 52, and 50kDa) was also elevated 1.8 to 6.6 times in samples from experimental eyes. TIMP-1 levels were mildly increased (up to 1.41 times) in the experimental eyes. These data suggest that degradation processes might be accelerated in the sclera from experimentally induced elongated eyes. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:23-28, 1995)

Key words: Axial elongation, Sclera, Gelatinase, Caseinase, Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)

別刷請求先: 951 新潟県新潟市旭町通1-757 新潟大学医学部眼科学教室 須田生英子
(平成6年4月18日受付, 平成6年7月27日改訂受理)

Reprint requests to: Kieko Suda, M.D. Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine,
1-757 Asahimachi-dori, Niigata-shi Niigata-ken 951, Japan

(Received April 18, 1994 and accepted in revised form July 27, 1994)

I 緒言

近視眼, 実験近視眼, ならびに先天緑内障において眼球の拡大や眼軸長の延長が起こることはよく知られている¹⁾²⁾. この眼軸伸展に伴って強膜に種々の変化が生じていることは既に報告されているが³⁾, その伸展の機構については未だ不明の点が多い. 強膜はコラーゲンを中心とした豊富な細胞外マトリックスによって, その形態および強度が保たれている組織であり, この細胞外マトリックスの変化と眼軸伸展は深く関わっている可能性がある. そこで今回我々は, 若年家兎を用いて眼軸伸展を生じさせ, その強膜中の細胞外マトリックス分解系酵素である matrix metalloproteinase (MMP) のうち, gelatinase, caseinase と抗分解系酵素である tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) について正常眼との比較検討を行ったので報告する.

II 実験方法

1. 眼軸伸展家兎眼の作成と gelatinase, caseinase, TIMP-1 の抽出

実験には生後2か月, 体重1.6~1.7 kg の若年白色家兎5匹を用いた. まず, 右眼に表面麻酔を行った後, 角膜輪部から前房に向けて27 G注射針を挿入し, 前房水を約0.3 ml 吸引した. その後, この注射針を虹彩根部から後房に向け, α -chymotrypsin 250 単位を含む生理食塩水0.5 ml を注入し, 吸引と注入を数回繰り返した後, 全量の後房内へ注入して終了した. 左眼は無処置で対照眼とした. 経過中の眼圧は Alcon Applanation Pneumatograph® を用いて測定を行った. α -chymotrypsin 注入1か月後に A モードエコーで眼軸長を測定し, 左右差が認められなかった2匹を除く3匹を過剰のペントバルビタールナトリウム (ネンブタール®) を用いて屠殺し, その両眼球を摘出後, 赤道部の強膜片 5×10 mm に対して無血清ダルベッコ変法イーグル培地 1 ml 中で20時間器官培養を行った. この培養液は分注し, 酵素測定時まで-20°C で保存した. また, 器官培養後の強膜は, 十分に水分を取り除いた後, その湿重量を測定した.

2. Zymography を用いた gelatinase, caseinase 活性の測定

Zymography は既報に準じた⁴⁾. Gelatin または casein 0.15% を含んだ 8.75% SDS-polyacrylamide gel を用い, 20 μ l の培養液を sample buffer (1% SDS, 10 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol) とともに 80 V, 4°C で12時間電気泳動を行った. 次に, 酵素の活性化を妨げるゲル中の SDS を置換するため 2.5% Triton-X 中でゲルを1時間振盪した後, 37°C にて 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM CaCl₂ を含む溶液中で gelatinase は18時間, caseinase は48時間酵素反応を行い, 酵素の存在する部位における基質分解の程度をもって酵素活性とし

た. 反応後のゲルは coomassie brilliant blue を用いて染色し, MILLIPORE 社製 Bio Image の [バンド濃度のピーク×バンドの幅] で算出された integrated optical density (IOD) 値を酵素活性とみなし, その値を組織 10 mg 当たりに換算した後, 同一家兎の左右眼で比較検討した. また, 一部のゲルは metalloproteinase inhibitor として 10 mM の EDTA, EGTA, 1, 10-phenanthroline を加えて反応を行い, 酵素のバンドが消失することを確認した.

3. 酵素免疫測定 (EIA) 法を用いた TIMP-1 濃度の測定

培養液中の TIMP-1 濃度は, human TIMP-1 (hTIMP-1) 測定用試薬 (第一化学薬品社製) を用いた one-step sandwich EIA 法により測定した. まず, 各々の培養希釈液を peroxidase 標識 hTIMP-1 モノクローナル抗体, 1% BSA, 0.1% Tween 20, 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) と混合し, 抗 hTIMP-1 モノクローナル抗体結合マイクロウェルに添加して反応を行った. その後, マイクロウェルを 0.1% Tween 20, 0.15 M NaCl, 0.4 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) で3回洗浄し, 0.5 mg/ml o-phenylenediamine, 0.02% H₂O₂ を含む発色液を加えて反応させた. 2 NH₂SO₄ を加

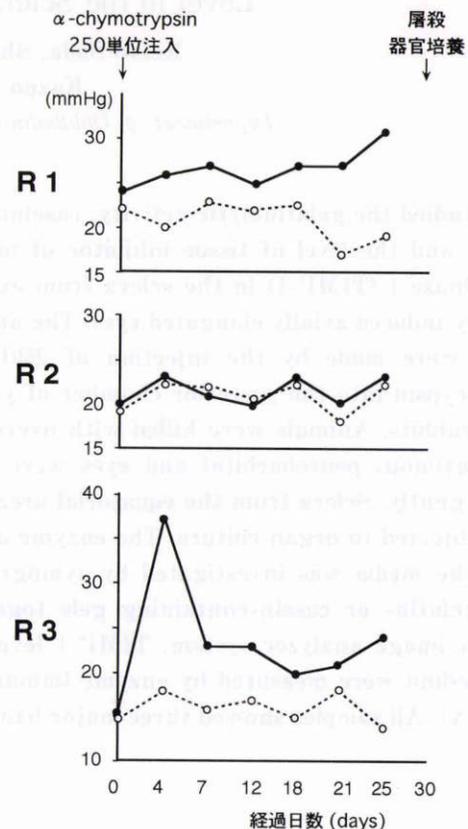


図1 眼圧経過.

眼軸伸展が認められた家兎 R1, R2, R3 の眼圧経過を示した.

黒丸: 実験眼 (α -chymotrypsin 処置眼), 白丸: 対照眼 (α -chymotrypsin 未処置眼)

えて反応を停止させた後、BIO-RAD 社製 microplate-reader の波長 492 nm で各々の吸光度を測定し、得られた TIMP-1 の濃度を gelatinase, caseinase 同様に組織 10 mg 当たりに換算した後、その値を同一家兎の左右眼で比較検討した。

III 結 果

図1には眼軸伸長の認められた3匹(R1~R3)の眼圧経過を示した。 α -chymotrypsin 注入1か月後、眼軸伸長が認められたR1, R2, R3の眼軸長は、それぞれ実験眼で20.7, 18.2, 21.0 mm (平均20.0 mm), 対照眼で16.1, 16.0, 16.6 mm (平均16.2 mm), 角膜径はR1, R2, R3の実験眼で17.0, 14.0, 15.5 mm (平均15.5 mm), 対照眼で12.0, 12.0, 12.5 mm (平均12.2 mm)であった。

図2, 表1には gelatin を用いた zymography の結果とその解析値を示した。すべての治療液中で 87 kDa, 61 kDa, 57 kDa の gelatinase 活性が認められた。このうち、61 kDa, 57 kDa の gelatinase は実験眼と対照眼で有意な差が認められなかったが、87 kDa のバンドは R1~R3 の実験眼で 2.9 倍, 1.5 倍, 1.1 倍と上昇していた。また、これらの他に IOD の測定できなかった弱いバンドとして、78 kDa の gelatinase 活性が R1~R3 の実験眼, 対照眼でほぼ左右差なく検出され、R2, R3 の実験眼と R1, R2 の対照眼では、さらに 73 kDa の gelatinase もわずかながら認められた。この他 R1, R2 の実験眼でのみ 50 kDa の gelatinase 活性を認めることができた。

図3, 表2には casein を用いた zymography の結果とその解析値を示した。R3の対照眼を除くすべての培

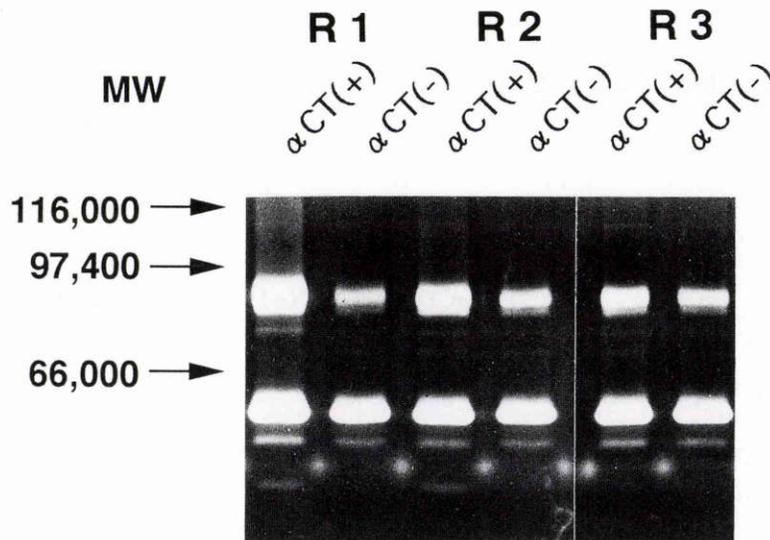


図2 強膜器官培養液中の gelatinase 活性。

各強膜片は 1 ml の無血清培地中で 20 時間器官培養し、うち 20 μ l の培養液に対して gelatin を含むゲルを用いて zymography を施行した。電気泳動後の酵素反応は 18 時間行った。白く抜けているバンドが酵素活性を認めた部位を示す。

MW: 分子量 (Da) R1, R2, R3: 眼圧上昇が認められた家兎 α CT (+): 実験眼 α CT (-): 対照眼

表1 Gelatinase の integrated optical density (IOD) 値

MW	R1		R2		R3	
	α CT(+)	α CT(-)	α CT(+)	α CT(-)	α CT(+)	α CT(-)
87 kDa	0.911	0.309	0.591	0.386	0.425	0.375
78 kDa	×	×	×	×	×	×
73 kDa	-	×	×	×	×	-
61 kDa	0.805	0.792	0.701	0.692	0.747	0.811
57 kDa	0.141	0.153	0.096	0.066	0.066	0.096
50 kDa	×	-	×	-	-	-

すべての値は強膜組織 10 mg 当りの IOD で表した MW: 分子量

α CT(+): 実験眼 α CT(-): 対照眼

×: ゲル中にバンドは認められたが弱くて IOD 値が求められなかったもの

-: ゲル中にその分子量の酵素活性が認められなかったもの

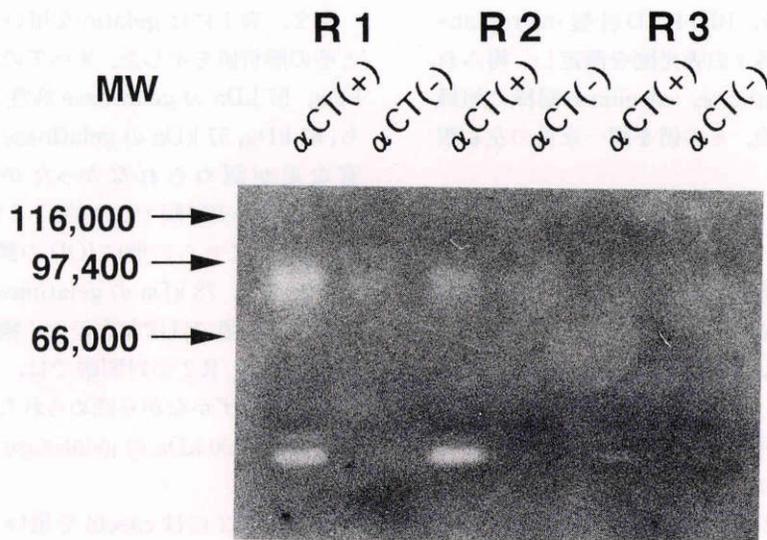


図3 強膜器官培養液中の caseinase 活性.

各強膜片は1 mlの無血清培地中で20時間器官培養し、うち20 μ lの培養液に対して casein を含むゲルを用いて zymography を施行した。電気泳動後の酵素反応は48時間行った。白く抜けているバンドが酵素活性を認めた部位を示す。

MW: 分子量 (Da) R1, R2, R3: 眼圧上昇が認められた家兎 α CT (+): 実験眼 α CT (-): 対照眼

表2 Caseinase の IOD 値

MW	R1		R2		R3	
	α CT(+)	α CT(-)	α CT(+)	α CT(-)	α CT(+)	α CT(-)
87 kDa	0.059	0.009	0.051	0.008	×	-
82 kDa	0.032	0.014	0.011	0.006	×	-
52 kDa	0.011	-	0.013	-	×	-
50 kDa	0.041	0.014	0.053	-	0.014	-

すべての値は強膜組織 10 mg 当りの IOD で表した MW: 分子量

α CT(+): 実験眼 α CT(-): 対照眼

×: ゲル中にバンドは認められたが弱くて IOD 値が求められなかったもの

-: ゲル中にその分子量の酵素活性が認められなかったもの

養液中で幅の広い 87 kDa, 82 kDa のバンドが認められたが、その活性は実験眼で強く、87 kDa の caseinase は R1 の実験眼が対照眼に比べて 6.6 倍に、また、R2 の実験眼では 6.3 倍にと強い上昇を示していた。82 kDa caseinase は R1 の実験眼で 2.3 倍、R2 の実験眼で 1.8 倍に活性が上昇していた。また、52 kDa, 50 kDa の caseinase は R1 の対照眼で 50 kDa のバンドがわずかに認められた他は、実験眼でのみ有意に検出された。全体として caseinase は実験眼で有意に認められていた。

表3には各培養液中の TIMP-1 濃度を示した。R1, R2 では実験眼により強く認められたが、その程度は 1.41 倍、1.16 倍と gelatinase, caseinase の変化に比べ軽度であった。R3 ではほとんど左右差が認められなかった。

表3 Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 濃度 (ng/ml)

		(ng/ml)
R1	α CT(+)	7.39
	α CT(-)	5.26
R2	α CT(+)	8.68
	α CT(-)	7.51
R3	α CT(+)	4.38
	α CT(-)	4.45

すべての値は強膜組織 10 mg 当りの培養液中の濃度 (ng/ml) で表した

α CT(+): 実験眼 α CT(-): 対照眼

IV 考 按

眼軸長を延長させる要因にはいくつかのものがあるが、眼内外の圧較差もその一つに挙げられる⁵⁾。現在のところ、実験的緑内障の作成には隅角部へのアルゴン

レーザー凝固⁶⁾、水晶体破囊⁷⁾、 α -chymotrypsin の眼内への注入⁸⁾などの方法が試みられているが、幼若家兎を用いた山名らは⁷⁾、眼圧上昇に伴って眼軸長が平均 17.7% 伸び、その強膜は赤道部で顕著に菲薄化したと報告している。また、牛眼における早川¹¹⁾の報告においても眼軸長と緑内障発症時期との相関関係が示されており、個体が幼若であるほど圧較差は眼軸長に強く影響を及ぼしているようである。一方、近年実験近視眼のモデルとして脛裂縫合眼²⁾、透光性プラスチック眼帯による形態覚遮断眼³⁾⁹⁾などが用いられているが、やはり幼若個体では明らかな眼軸長の延長が認められている。以上のことを踏まえ、今回の実験では種々の刺激によって眼軸長に変化を来しやすい若年の家兎を対象とし、また、山名らの報告から、眼圧上昇を基礎とした眼軸伸長の際には最も変化が著明であると思われる赤道部強膜を用いて検討を行った。

強膜は、I 型膠原線維を中心に¹⁰⁾VIII 型膠原線維、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸などの細胞外マトリックスにより構成されているが、nanophthalmos、壊死性強膜炎などではプロテオグリカンの量的、質的な異常が報告されており¹¹⁾¹²⁾、その疾患の発症や病態と細胞外マトリックスの変化との間には深い関係があると考えられている。また、Rada ら⁹⁾はヒヨコを用いた近視眼の実験で、強膜中の総 DNA 量は不変でも軟骨プロテオグリカンである aggrecan の core protein が有意に増加していたと報告し、この細胞外マトリックスの増加と眼球の拡大との関連性について述べている。これら細胞外マトリックスの再構築には、細胞外マトリックス分解系酵素である MMP と抗分解系酵素である TIMP が常に関わっており、強膜が関与している種々の疾患における細胞外マトリックスの動態を考える上で、MMP および TIMP の変化を調べることは非常に重要であると思われる。

MMP は酵素群の総称であり、各々の酵素が特異的な複数の細胞外マトリックスを基質としている。その命名法については未だ多くの混乱があり、interstitial collagenase, type IV collagenase, gelatinase, proteoglycanase など、主たる基質に基づく名称を用いる報告¹³⁾、MMP-1, 2, 3... という名称を用いる報告¹⁴⁾など、一種類の酵素に複数の名称が与えられているのが現状である。今回我々が基質として用いた gelatin は、主として MMP-2 (72-kD gelatinase, gelatinase A), MMP-9 (92-kD gelatinase, gelatinase B) により分解を受ける。分子量から考えて 87 kDa, 78 kDa の gelatinase 活性は MMP-9 に由来し、61 kDa, 57 kDa の活性は MMP-2 に由来すると思われる。MMP-2 は正常な角膜、隅角線維柱帯、強膜、網膜色素上皮などの組織ならびに培養細胞でその発現が認められており^{15)~18)}、Fini¹⁷⁾、Matsubara ら¹⁹⁾は角膜に存在する MMP-2 は静止状態の組織に

おいて監視の役割を果たしているのではないかと考察している。角膜中の MMP-2 は、また創傷部の組織修復開始時期に呼応して active form で強く認められており、創傷部における変性コラーゲンの分解と、その部への新しいマトリックスの沈着という過程に関わっていると推測されている。今回の実験では実験眼と対照眼の間で MMP-2 分画に明らかな差は認められておらず、これは強膜の伸長がコラーゲンの断裂、変性や強膜組織の化学的変性に対する二次的な変化として生じてきたものではないことを示しているといえる。一方、MMP-9 は正常組織や通常の培養細胞では強い発現が認められない場合が多く¹⁵⁾¹⁶⁾、眼組織では限られた部位や 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) で刺激された培養細胞などでのみその発現が認められている⁴⁾¹⁶⁾。我々の結果でも対照眼における 87 kDa gelatinase の発現は実験眼に比べて明らかに弱く、強膜の remodeling に伴ってこの活性が上昇していることがうかがえた。この MMP-9 は角膜創傷部においては、上皮基底膜の再合成を調節していると考えられている¹⁷⁾¹⁹⁾、免疫組織学的に lamina cribrosa を除く強膜中には IV 型膠原線維は認められておらず¹⁰⁾、強膜におけるこの酵素活性の上昇は、IV 型膠原線維の remodeling 以外に関わっているものと思われる。

Casein を用いて行った zymography では主に MMP-3 (stromelysin) の活性を検出することができるが、casein の一部は他の MMP によっても分解され得る。今回検出された caseinase のうち、52 kDa, 50 kDa のバンドは MMP-3 由来と思われるが、87 kDa, 82 kDa に認められた広いバンドは、48 時間という長時間の酵素反応によって gelatinase により分解を受けた部分である可能性がある。MMP-3 は、ラミニン、フィブロネクチン、IV 型膠原線維などの他プロテオグリカンを基質としており²⁰⁾、proteoglycanase の別名もある。また、MMP-3 の active form は 50 kDa であることから、実験眼で強く認められた 52 kDa, 50 kDa の caseinase 活性は、強膜におけるプロテオグリカンの代謝に影響を及ぼしていると推測される。前述のように、強膜の種々の疾患や実験近視眼の強膜においてプロテオグリカンの変化が報告されており、この caseinase 活性の変化と眼軸伸長の機序との関連性については、さらに検討を加えていく必要があると思われる。なお、今回の実験では、眼圧上昇の程度、眼軸伸長の程度と、gelatinase ならびに caseinase 活性の変化の大きさと間に強い相関関係を認めることはできなかったが、MMP はその作用機序から眼軸伸長の初期に最も活性が高くなっている可能性があり、この伸長時期との関連性については実験対象数を増やして検討を加えていく予定である。

今まで述べてきた MMP は、その合成量と阻害の程度によって活性がコントロールされており、この MMP 阻

害酵素は総称して TIMP と呼ばれている。MMP-3, MMP-9 は TIMP-1 によって, MMP-2 は TIMP-2 によってその活性が阻害されるが, TIMP による阻害機構については未だ解明されていない点も残っている。今回測定を行った TIMP-1 濃度は実験眼で上昇している傾向を認めたが, その変化の程度は MMP に比べて弱く, MMP と TIMP のバランスは全体として細胞外マトリックス分解系に傾いていることがわかった。

我々は, 今回生化学的手法を用いて眼軸長延長時の強膜における細胞外マトリックスの動態について検討を行ったが, 現在, 同様の実験眼に免疫組織学的な方法を用いた検討も試みており, これによって病態との関連性がさらに解明できると考えている。

文 献

- 1) 早川むつ子: 牛眼の長期予後. 日眼会誌 84: 1708—1714, 1980.
- 2) Funata M, Tokoro T: Scleral change in experimentally myopic monkeys. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 228: 174—179, 1990.
- 3) Christensen AM, Wallman J: Evidence that increased scleral growth underlies visual deprivation myopia in chicks. Invest Ophthalmol Vis Sci 32: 2143—2150, 1991.
- 4) Fini ME, Girard MT: Expression of collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinase by normal cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 1779—1788, 1990.
- 5) Arciniegas A, Amaya LE: Mechanical behavior of the sclera. Ophthalmologica Basel 193: 45—55, 1986.
- 6) Fukuchi T, Sawaguchi S, Hara H, Shirakashi M, Iwata K: Extracellular matrix changes of the optic nerve lamina cribrosa in monkey eyes with experimentally chronic glaucoma. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 230: 421—427, 1992.
- 7) 山名敏子, 西村みえ子, 石橋達朗, 猪俣 猛: 眼軸伸長に伴う網膜変性の実験的研究. 日眼会誌 88: 764—772, 1984.
- 8) Fernandez-Durango R, Ramirez JM, Trivino A, Sanchez D, Paraiso P, Lacoba MG, et al: Experimental glaucoma significantly decreases atrial natriuretic factor (ANF) receptors in the ciliary processes of the rabbit eye. Exp Eye Res 53: 591—596, 1991.
- 9) Rada JA, Thoft RA, Hassell JR: Increased aggrecan (cartilage proteoglycan) production in the sclera of myopic chicks. Dev Biol 147: 303—312, 1991.
- 10) Konomi H, Hayashi T, Sano J, Terato K, Nagai Y, Arima M, et al: Immunohistochemical localization of type I, III, and IV collagens in the sclera and choroid of bovine, rat, and normal and pathological human eyes. Biomedical Res 4: 451—458, 1983.
- 11) Young RD, Powell J, Watson PG: Ultrastructural changes in scleral proteoglycans precede destruction of the collagen fibril matrix in necrotizing scleritis. Histopathology 12: 75—84, 1988.
- 12) 福地健郎, 沢口昭一, 本田徳弼, 斎藤達也, 飯塚裕子, 岩田和雄, 他: Nanophthalmos の 1 例の強膜に見られたプロテオグリカンの異常について. 日眼会誌 97: 260—267, 1993.
- 13) Fridman R, Fuerst TR, Bird RE, Hoyhtya M, Oelkuct M, Kraus S, et al: Domain structure of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. J Biol Chem 267: 15398—15405, 1992.
- 14) Okada Y, Nagase H, Harris ED: A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. J Biol Chem 261: 14245—14255, 1986.
- 15) Alexander JP, Bradley JMB, Gabourel JD, Acott TS: Expression of matrix metalloproteinases and inhibitor by human retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 2520—2528, 1990.
- 16) Alexander JP, Samples JR, Buskirk EMV, Acott TS: Expression of matrix metalloproteinases and inhibitor by human trabecular meshwork. Invest Ophthalmol Vis Sci 32: 172—180, 1991.
- 17) Fini ME, Girard MT, Matsubara M: Collagenolytic/gelatinolytic enzymes in corneal wound healing. Acta Ophthalmologica Suppl 70: 26—32, 1992.
- 18) Fini ME, Yue BYJT, Sugar J: Collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinases in normal and keratoconus corneas. Cur Eye Res 11: 849—862, 1992.
- 19) Matsubara M, Girard MT, Kublin CL, Cintron C, Fini ME: Differential roles for two gelatinolytic enzymes of the matrix metalloproteinase family in the remodelling cornea. Dev Biol 147: 425—439, 1991.
- 20) Woessner JF: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB 5: 2145—2154, 1991.