

## サル視神経乳頭の matrix metalloproteinase 活性

須田生英子, 沢口 昭一, 岩田 和雄, 阿部 春樹

新潟大学医学部眼科学教室

## 要 約

正常カニクイザル3匹3眼の視神経乳頭における matrix metalloproteinase 活性のうち, gelatinase 活性と caseinase 活性を測定する目的で, 視神経乳頭を20時間器官培養した後の培養液について, gelatin または casein を基質とした zymography を行い検討した。3眼全例に 94 kDa と 62 kDa の gelatinase 活性が検出され, また, 1眼には 58 kDa の gelatinase がわずかに検

出された。いずれの視神経乳頭からも明らかな caseinase 活性は検出されなかった。(日眼会誌 99: 582—585, 1995)

キーワード: サル視神経乳頭, Matrix metalloproteinase, Zymography, Gelatinase, Caseinase

## Matrix Metalloproteinase in the Cynomolgus Monkey Optic Nerve Heads

Kieko Suda, Shoichi Sawaguchi, Kazuo Iwata and Haruki Abe

Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine

## Abstract

Gelatinolytic and caseinolytic activity of matrix metalloproteinase in normal cynomolgus monkey optic nerve heads was investigated. Optic nerve heads of three eyes were incubated in the media for 20 hours. Each media was applied to the gelatin or casein containing gels, and zymography was performed. Major bands of 94 kDa and 62 kDa gelatinase activities were demonstrated in all three eyes. In

one eye gelatinolytic activity of the 58 kDa band was also demonstrated. Caseinase activity was not detected in any of the three optic nerve heads. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 582—585, 1995)

Key words: Monkey optic nerve head, Matrix metalloproteinase, Zymography, Gelatinase, Caseinase

## I 緒 言

緑内障における視神経障害の発症あるいは進展に視神経乳頭, 特に乳頭篩状板部の変化が重要な役割を果たしているということについては, 今まで多くの報告<sup>1)~3)</sup>がなされている。しかし, それらの報告は免疫組織化学的手法を用い, 主として細胞外マトリックスの変化を捕えたものがほとんどであった。緑内障における視神経乳頭部細胞外マトリックスの変化やそれに伴う篩状板構造の変化は, 視神経乳頭を構成する細胞の代謝の変化を反映しているものであり, 緑内障における視神経障害への視神経乳頭の関与について検討するためには, さらに細胞レベルでの動的な変化を考慮する必要があると思われる。

細胞外マトリックスの動態は, その合成と分解のバラ

ンスの上で成り立っており, 近年 Hernandez ら<sup>4)</sup>は, in situ hybridization 法を用いて視神経乳頭部における I 型, IV 型膠原線維の mRNA レベルについて検討し, 細胞外マトリックスの合成系についての報告を行っている。また, 我々も視神経乳頭の器官培養を用いて, その蛋白合成能の変化を生化学的に分析する試みを行い報告<sup>5)</sup>してきている。一方, 分解系についてはこれまでにいくつかの分解酵素の存在が組織化学的に証明され報告<sup>6)</sup>されてきたが, その活性などに関しては未だ明らかにはなっていない。そこで今回, 我々は細胞外マトリックス分解酵素である matrix metalloproteinase のうち, gelatinase ならびに caseinase 活性について, 正常カニクイザル視神経乳頭でのその存在の有無と生化学的特性について検討を行ったので報告する。

別刷請求先: 951 新潟県新潟市旭町通1番町757 新潟大学医学部眼科学教室 須田生英子

(平成6年11月11日受付, 平成6年12月10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 November 11, 1994 and accepted in revised form December 10, 1994)

## II 実験方法

### 1. 対象組織と gelatinase, caseinase の抽出

対象には、体重 3.5~5.0 kg の正常成熟カニクイザル 3 匹 3 眼 (M 1~M 3) を用いた。過剰の塩酸ケタミン (ケタラール®) の筋注とペントバルビタールナトリウム (ネンブタール®) の静注により安楽的に屠殺後、眼球を速やかに摘出し、実体顕微鏡下で周囲組織を切除し視神経乳頭部を切り出した。切り出した視神経乳頭は 30~50 mg であった。これらの視神経乳頭はそれぞれ半切し、その全量は無血清ダルベッコ変法イーグル培地 (Nissui) 500  $\mu$ l 中で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で器官培養を行った。培養液は必要量に分注し、zymography 施行時まで -20°C で保存した。

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

Zymography は既報<sup>7)</sup>に準じた。Gelatin または casein 0.15% を含んだ 8.75% SDS-polyacrylamide gel を用い、20  $\mu$ 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 で 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM CaCl<sub>2</sub> を含む溶液中で gelatinase は 20 時間、caseinase は 48 時間酵素反応を行い、coomassie brilliant blue を用いて染色して酵素活性のバンドを検出した。また、一部のゲルは metalloproteinase inhibitor として 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10 mM 1, 10-phenanthroline を加えて酵素反応を行い、これらのキレート剤によって酵素のバンドが消失することを確認した。

## III 結果

眼圧は塩酸ケタミン (ケタラール®) 麻酔下で Alcon Applanation Pneumatograph® を用いて 2 回以上測定し、いずれも 20~28 mmHg で、平均眼圧は 24 mmHg であった。また、眼底は Topcon 社製立体眼底カメラで観察したが、3 眼とも視神経乳頭には異常を認めなかった。

図 1 に gelatin を基質にした zymography を示した。M 1~M 3 の全例に分子量 94 kDa と 62 kDa の gelatinase 活性が認められ、また、M 3 にはこの他に 58 kDa のバンドも認められた。酵素反応時にキレート剤を添加した場合にはすべてのバンドが消失しており、以上から、これらのバンドが金属イオンによって活性化される metalloproteinase の作用によるものであることが明らかにされた (図 2)。

一方、casein を基質とした場合には、今回の反応条件、反応時間ではゲル上に明らかなバンドを検出することは

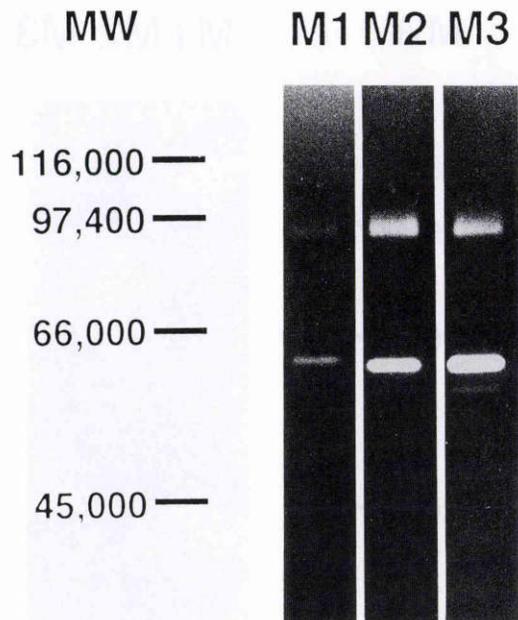


図 1 視神経乳頭器培養液中の gelatinase 活性

各視神経乳頭は、500  $\mu$ l の無血清培地中で 20 時間器定培養し、うち 20  $\mu$ 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 20 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), M 1, M 2, M 3: 各々のサル眼視神経乳頭

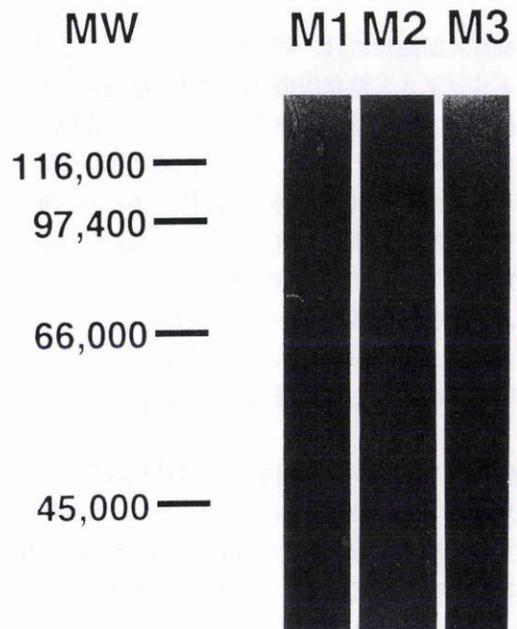


図 2 キレート剤添加時の gelatinase 活性

キレート剤を使って図 1 と同様の反応を行ったもの。図 1 で認められたバンドはすべて消失しており、図 1 で認められたバンドが酵素反応によるものであることが確認された。

MW: 分子量 (Da), M 1, M 2, M 3: 各々のサル眼視神経乳頭

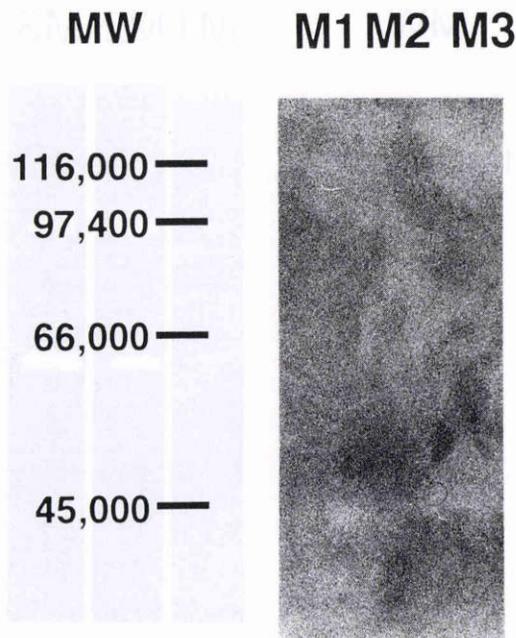


図3 視神経乳頭器培養液中の caseinase 活性。

図1同様 20  $\mu$ 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 時間行ったが、明らかなバンドは認められなかった。

MW：分子量 (Da), M1, M2, M3：各々のサル眼視神経乳頭

できなかった (図3)。

#### IV 考 按

視神経乳頭篩状板は、膠原線維を中心とする種々の細胞マトリックスと篩状板細胞、グリア細胞、ならびに血管を構成する内皮細胞、壁細胞など多くの細胞要素から構成されている<sup>8)~14)</sup>。また、この乳頭篩状板部位は視神経軸索が眼内から眼外へ通過する部位にあたり、視神経軸索の形態、機能の維持に重要な役割を果たしていることが推定される。近年、緑内障、実験サル緑内障において、この乳頭篩状板の形態変化のみならず、その細胞外マトリックスの分子レベルでの変化が相次いで報告され、緑内障における視神経障害との関係において注目を集めている<sup>1)2)15)</sup>。

細胞外マトリックスの組織における代謝は、その合成と分解のバランスによって保たれており、細胞外マトリックス分解酵素は総称して matrix metalloproteinase (MMP) と呼ばれている。MMP はまず活性を持たない pro-enzyme form として分泌され、種々の物質の作用を受けて active form に変化した後、その基質に働くことが知られている。これらの酵素は各々一種類から複数の細胞外マトリックスに作用し、その remodelling を調節している。これまで眼科領域においては、角膜<sup>7)</sup>、隅角線維柱帯<sup>16)</sup>、前房水<sup>17)</sup>、強膜<sup>18)</sup>、網膜<sup>19)</sup>、網膜色素上皮<sup>20)</sup> など多くの組織においてその活性が認められることが報告

されてきたが、乳頭篩状板部におけるその存在の有無については明らかにされていなかった。

今回、我々が酵素反応の基質として用いた gelatin は、MMP のうち主として MMP-2 (72 kDa gelatinase) と MMP-9 (92 kDa gelatinase) により分解される。この zymography で認められた 94 kDa と 62 kDa の gelatinase は、分子量とその基質から考えて MMP-9 と MMP-2 であると思われる。今回の3眼では、全例において 62 kDa の gelatinase 活性の方が 94 kDa の gelatinase 活性よりも強いという結果が得られたが、この傾向は Fini ら<sup>7)</sup>が報告した正常角膜における gelatinase 活性のパターンと類似しており、また、正常隅角線維柱帯<sup>16)</sup>や培養網膜色素上皮細胞<sup>20)</sup>においても、定常状態においては MMP-2 が主として分泌されることから、正常乳頭篩状板部においても他の組織と同様の機序で remodelling のバランスがとられていることが推測された。また、今回実験を行った3眼中1眼では、わずかではあるが 58 kDa の gelatinase 活性が認められ、分子量からはこの gelatinase が MMP-2 の active form である可能性も考えられることから、さらに対象数を増やしてその活性について検討を加えていきたいと考えている。

MMP は、その抗分解酵素である tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) とバランスをとりながら細胞外マトリックスの分解に携わっていることが知られており、組織の創傷治癒過程<sup>21)</sup>やある種の疾患モデル<sup>18)22)</sup>でこれらのバランスが大きく変化することも報告されるようになってきた。今後、視神経乳頭部位の細胞外マトリックスの代謝を考慮する際、以上の点、すなわち視神経乳頭を構成する細胞群の細胞外マトリックス合成能、MMP 活性ならびに TIMP 活性についての検討を行い、その動態を明らかにしていくことが必要になってくると考えられる。我々も実験緑内障について、これらを総合的に検討し、緑内障における視神経障害との関連性について究明していく予定である。

本実験を行うにあたっては、新潟大学遺伝子実験施設の設備、機器を使用させていただきました。桑野良三助教授ならびにスタッフの皆様へ深謝いたします。

#### 文 献

- 1) Hernandez MR, Andrzejewska WM, Neufeld AH: Changes in the extracellular matrix of the human optic nerve head in primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 109: 180-188, 1990.
- 2) 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. *Grafe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 230: 421-427, 1992.
- 3) 福地健郎, 沢口昭一, 原 浩昭, 白柏基宏, 岩田和雄, 海谷忠良: サル実験緑内障の視神経篩状板におけ

- る sulfated proteoglycan について, あたらしい眼科 9: 653—656, 1992.
- 4) **Hernandez MR, Wang N, Hanley NM, Neufeld AH:** Localization of collagen type I and IV mRNAs in human optic nerve head by in situ hybridization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 2169—2177, 1991.
  - 5) **Sawaguchi S, Emi K, Yue BYJT, Hara H, Fukuchi T, Iwata K:** Altered protein biosynthesis in the optic nerve head of monkey eyes with laser-induced glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 1280, 1993.
  - 6) 原 浩昭, 沢口昭一, 福地健郎, 岩田和雄: 猿正常眼における視神経乳頭部内 Lysosome 酵素活性について. 日眼会誌 96(臨時増刊): 293, 1992.
  - 7) **Fini ME, Girard MT:** Expression of collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinases by normal cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1779—1788, 1990.
  - 8) **Hernandez MR, Igoe F, Neufeld AH:** Extracellular matrix of the human optic nerve head. *Am J Ophthalmol* 102: 139—148, 1986.
  - 9) **Hernandez MR, Luo XX, Igoe F, Neufeld AH:** Extracellular matrix of the human lamina cribrosa. *Am J Ophthalmol* 104: 567—576, 1987.
  - 10) **Morrison JC, Jerdan JA, L'Hernault NL, Quigley HA:** The extracellular matrix composition of the monkey optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 1141—1150, 1988.
  - 11) **Morrison JC, L'Hernault NL, Jerdan JA, Quigley HA:** Ultrastructural location of extracellular matrix components in the optic nerve head. *Arch Ophthalmol* 107: 123—129, 1989.
  - 12) **Morrison JC, Jerdan JA, Doman ME, Quigley HA:** Structural proteins of the neonatal and adult lamina cribrosa. *Arch Ophthalmol* 107: 1220—1224, 1989.
  - 13) 福地健郎: 正常猿眼における視神経篩状板・細胞外マトリックスの免疫組織化学的分析, 日眼会誌 94: 1024—1030, 1990.
  - 14) **Morrison JC, Rask P, Johnson EC, Deppmeier L:** Chondroitin sulfate proteoglycan distribution in the primate optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 838—845, 1994.
  - 15) **Hernandez MR:** Ultrastructural immunocytochemical analysis of elastin in the human lamina cribrosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2891—2903, 1992.
  - 16) **Alexander JP, Samples JR, Buskirk EMV, Acott TS:** Expression of matrix metalloproteinase and inhibitor by human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 172—180, 1991.
  - 17) **Ando H, Twining SS, Yue BYJT, Zhou X, Fini ME, Kaiya T, et al:** MMPs and proteinase inhibitors in the human aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 3541—3548, 1993.
  - 18) 須田生英子, 沢口昭一, 市辺幹雄, 岩田和雄, 阿部春樹: 眼軸進展に伴う強膜の matrix metalloproteinase ならびに tissue inhibitor of metalloproteinase の発現の変化. 日眼会誌 99: 23—28, 1995.
  - 19) **Plantner JJ:** The presence of neural metalloproteolytic activity and metalloproteinase inhibitors in the interphotoreceptor matrix. *Curr Eye Res* 11: 91—101, 1992.
  - 20) **Alexander JP, Bradley JM, Gabourel JD, Acott TS:** Expression of matrix metalloproteinases and inhibitor by human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 2520—2528, 1990.
  - 21) **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.
  - 22) **Samples JR, Alexander JP, Acott TS:** Regulation of the levels of human trabecular matrix metalloproteinases and inhibitor by interleukin-1 and Dexamethasone. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 3386—3395, 1993.