

水晶体上皮における増殖領域と 組織幹細胞の同定 —新しい固定液を用いた良好な 組織切片による解析—

Identification of the Proliferating Region and Tissue-type Stem Cells in the Lens Epithelium

山本直樹

Naoki Yamamoto

藤田保健衛生大学共同利用研究施設
分子生物学・組織化学研究室

要旨 これまで水晶体組織標本の作製は困難であったが、新しい固定原理に基づき開発した固定液を使用することでアーティファクトの少ない良好な水晶体標本が作製できるようになった。マウス水晶体上皮細胞 (LEC) の増殖領域と組織幹細胞は、既報の領域よりも赤道部に近い領域に存在していた。また、領域の異なる LEC の増殖能を培養条件下で検証したところ、いずれの領域の LEC においても速やかに増殖が開始されることがわかった。

キーワード：水晶体上皮細胞，組織幹細胞，細胞周期，p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR})，新しい固定液

1. はじめに

水晶体は眼球内部にある楕円球体の構造で (図 1a)，水晶体の角膜側を前極，網膜側を後極，そして前極と後極から等距離にあり水晶体中で最大径の円周を赤道という (図 1b)。水晶体は周囲を type-IV collagen を主成分とする水晶体嚢で包まれており (図 1c, d)，水晶体の前極から赤道にいたる水晶体嚢の内側に，水晶体上皮細胞 (lens epithelial cell: LEC) が単層で並んでいる (図 1c, d)。LEC は，水晶体赤道部よりやや後極寄りの領域で水晶体嚢から離れ，水晶体の前極と後極に向かって伸長し水晶体線維細胞に分化する (図 1b, d)。水晶体線維細胞は水晶体の中心に向かってさらに分化し，細胞核，ミトコンドリア，ゴルジ体などの細胞内小器官が減少・消失して水晶体線維となり，長期にわたって透明性を維持する。水晶体の透明性と水晶体を通過する際の

光の屈折は，水晶体を構成する細胞の配列と細胞内に高密度に存在するクリスタリンなどのタンパク質の秩序立った分子配列に起因する¹⁾。

2. 新しい固定液を用いたマウス眼球組織標本の作製

従来のホルマリン固定・パラフィン切片標本では，アーティファクトの少ない角膜，水晶体，網膜などの眼球組織標本作製することは非常に困難であった。一方，グルタルアルデヒド固定・樹脂切片標本では微細な組織形態を保持することはできるが，組織全体の観察，免疫酵素抗体染色，および in situ hybridization (ISH) などには適していない。

組織標本の作製において，アーティファクトの少ない“綺麗な”組織標本の作製は固定の良し悪しで決まると言っても過言ではない。著者は，2000年頃から標本作製が難しい組織の1つである眼球 (水晶体) においても，アーティファクトの少ない組織標本作製できる固定法の開発に着手した。その結果，新しい固定理論に基づく固定液の開発に成功し，2005年に特許 (特許第 3723204号) を取得，さらにこの特許に基づいた固定液が 2007年 10月 から販売 (組織用迅速固定液: SUPER FIX, KURABO) された²⁾。この SUPER FIX を用いてマウス眼球を固定したところ，アーティファクトのない“綺麗な”パラフィン切片標本が作製できるようになった (図 1a)。

3. 水晶体の増殖領域の検索

水晶体 (LEC) の増殖領域 (増殖帯) は，水晶体の赤道部と前極部の中間部を取り囲むように帯状に存在すると報告³⁾されているが，水晶体の組織標本作製が難しいことから，これまで詳細な検索が行われていなかった。

ブロモデオキシウリジン (5-Bromo-2'-deoxyuridine: BrdU) は，さまざまな生体組織の増殖している細胞の検出に用いられている。そこで水晶体における細胞の増殖領域を確認するため，マウス腹腔内に BrdU を投与後，眼球を摘出して SUPER FIX で固定し，パラフィン連続切片を作製して抗 BrdU 抗体による免疫組織化学染色を行った。結果として，大部分の BrdU 標識細胞は，水晶体赤道部近傍から前極部側の領域で観察された^{2,4)} (図 2)。

4. LEC の細胞周期と水晶体の組織幹細胞

細胞の増殖に関連する代表的なタンパク質として，PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) や Ki-67 などがある。PCNA は細胞周期が遷移している細胞 (増殖細胞) で主に検出されるが，一部の増殖していない細胞 (静止期の細胞) でも検出される。また，細胞周期制御因子のサイクリン D やサイクリン E などは，増殖マーカーとして考えられている。一方，著者が注目している組織幹細胞マーカーの1つに low-affinity neurotrophin receptor p75 (p75^{NTR}; CD271) がある。この p75^{NTR} は，低親和性の neurotrophin の受容体で上皮系幹細胞マーカーの1つであり^{2,5)}，著者は間葉系幹細胞マ-

〒 470-1192 愛知県豊明市掛掛町田楽ヶ窪 1-98
TEL: 0562-93-2317; FAX: 0562-92-5382
E-mail: naokiy@fujita-hu.ac.jp
2009年 8月 30日 受付

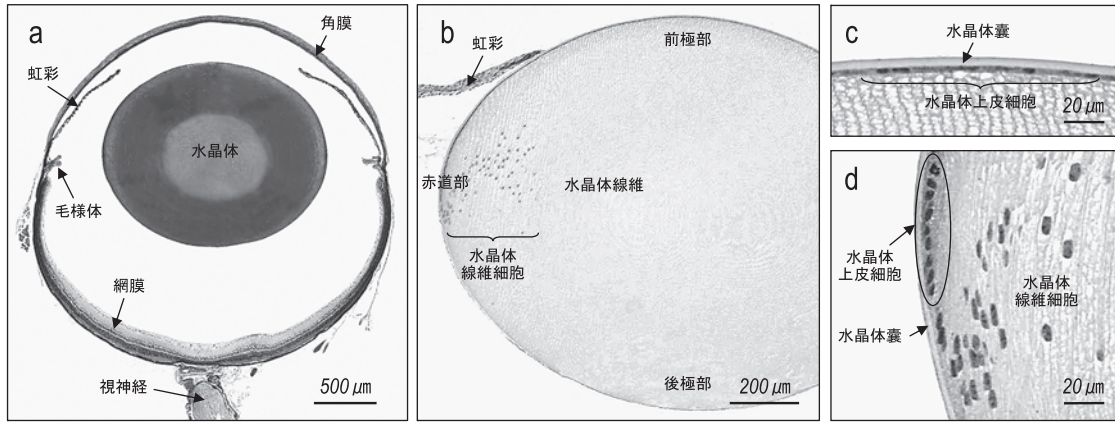


図1 水晶体の全体像. マウス眼球のパラフィン切片をヘマトキシリン・エオジン染色 (a), またはヘマトキシリン単染色を行った (b-d). 眼球のまま固定しても, アーティファクトの少ない標本作製ができるようになった.

カーとしての有用性を特許 (特開 2006-230235, 特開 2007-267672) と論文で報告⁶⁾した. さらに, 角膜輪部に存在する角膜上皮幹/前駆細胞, 一部の虹彩組織細胞, および網膜神経幹/前駆細胞にも存在することを報告した^{7,8)}.

週令の異なるマウス水晶体の切片標本を各抗体で免疫酵素抗体染色を行ったところ, PCNA やサイクリン D1 陽性の LEC は水晶体赤道部近傍から前極部側の領域で観察され, ほぼ同じ領域に p75^{NTR} 陽性の LEC が観察された²⁾ (図 3). BrdU 陽性の LEC もほぼ同じ領域で観察された (図 2) ことから, マウス水晶体では, 比較的赤道部に近い領域に LEC の増殖帯が存在していることが明らかとなった.

5. LEC の増殖能

現在の白内障手術では, 主に術後に残存した LEC が水晶体嚢内や人工水晶体レンズ上で増殖・重層化⁹⁾し, 再び混濁が生じる後発白内障が高率に発生している. 白内障手術時に LEC の残存を防ぐさまざまな処置を施しても, わずかに残存した LEC が増殖して後発白内障を引き起こしている¹⁰⁾.

LEC の細胞周期解析において, 水晶体前極部の多くの LEC は PCNA が陰性であり, Ki-67 も陰性 (data not shown)

であったことから, 細胞周期は静止期であると考えられる. そこで水晶体前極部周辺の LEC と増殖帯を含む水晶体赤道部周辺の LEC を別々に培養し, LEC の細胞増殖が開始される過程における各細胞周期マーカーの mRNA 発現の推移を検証した (図 4).

結果として, 水晶体前極部周辺の LEC と水晶体赤道部周辺の LEC は, ほぼ同様に細胞周期が遷移していくことが判明した²⁾. この結果は, 水晶体のいかなる領域の LEC でも細胞増殖が可能であり, 例えわずかでも LEC が残存すれば後発白内障が発生するおそれがあるということを示唆している.

6. おわりに

新しい固定液を使用することによって, これまで標本作製することが困難であった水晶体でもアーティファクトの少ない組織標本が作製できるようになった. 今回のマウス水晶体の解析結果から, 水晶体 (LEC) の増殖帯が存在する領域は, 比較的赤道部に近い領域であることが明らかとなった. その一方で, 前極部の LEC は生体内では静止期であるが, 環境が変わると増殖帯を含む赤道部の LEC と同様に増殖できることがわかった. 前極部の LEC は“細胞増殖が再開可

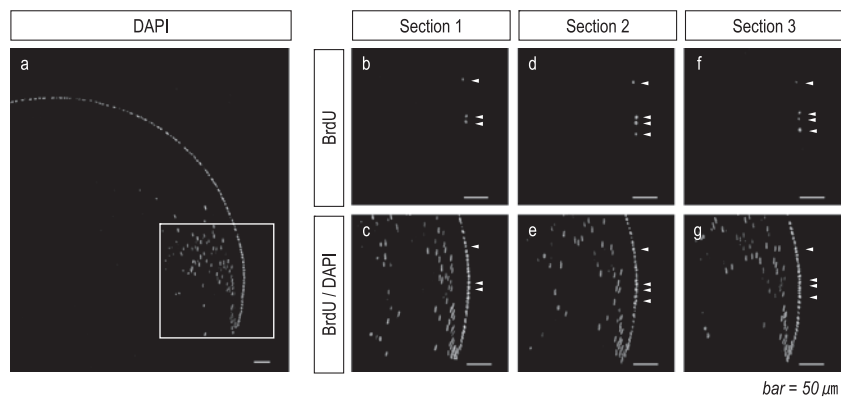


図2 マウス水晶体の *in vivo* における増殖細胞の検出. 連続切片標本で観察したところ, BrdU 陽性の LEC は水晶体赤道部近傍から前極部側の領域で観察された (a-g). b-g は a の四角で囲んだ領域の強拡大. (文献²⁾ より一部改変引用)

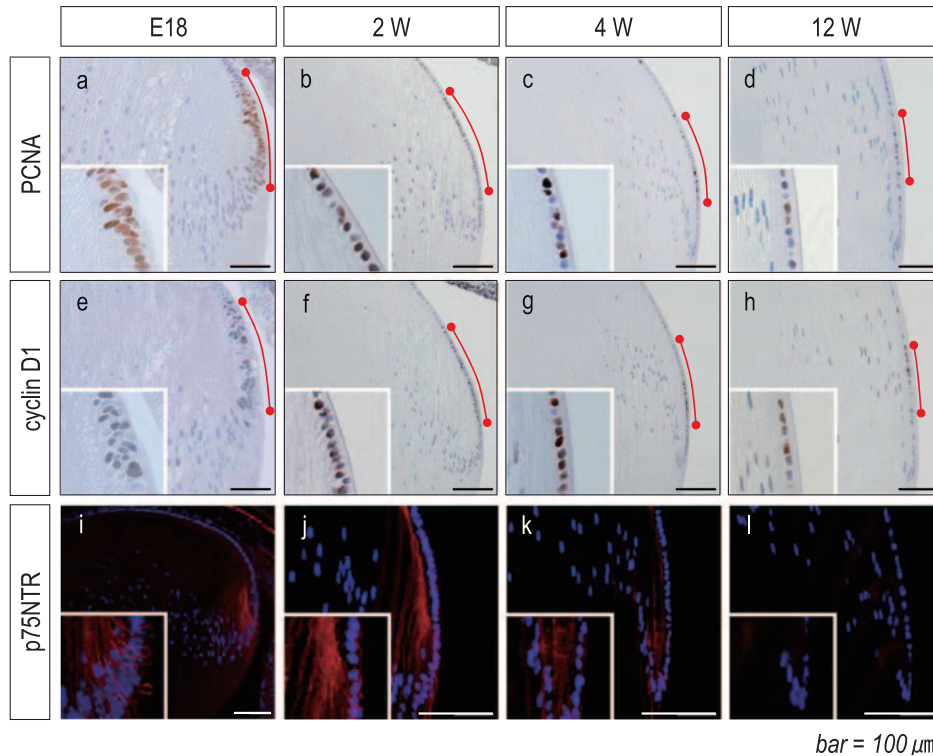


図3 LECの増殖帯と組織幹細胞の存在. PCNA陽性のLEC (a-d) やサイクリンD1陽性のLEC (e-h) は水晶体赤道部近傍から前極部側の領域で観察され、ほぼ同じ領域でp75^{NTR}陽性のLEC (i-l) も観察された. マウスの成長に伴いPCNA, サイクリンD1, およびp75^{NTR}陽性のLEC数は減少した. (文献²⁾より一部改変引用)

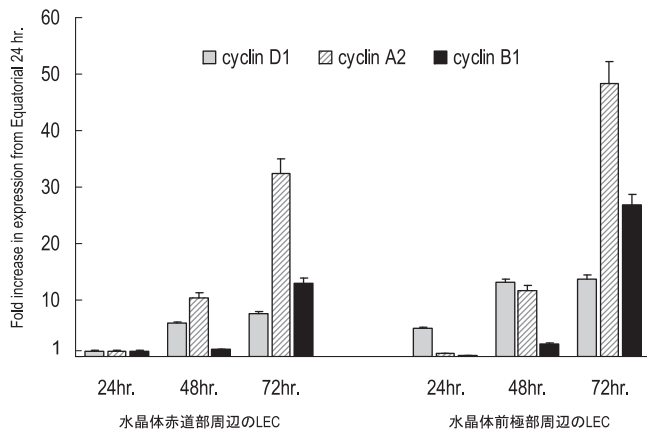


図4 培養LECにおけるサイクリン遺伝子の経時的推移. 各細胞周期で最も強く発現しているサイクリン遺伝子 (G₁期: cyclin D1, S期: cyclin A2, G₂/M期: cyclin B1) の発現量を測定した. 培養24時間後の水晶体赤道部周辺のLECにおける各遺伝子の発現量を基準とし、水晶体赤道部周辺のLECと水晶体前極部周辺のLECの培養24時間後、48時間後、72時間後の遺伝子発現をリアルタイムPCRにて比較したところ、ほぼ同様に細胞周期が遷移していた. (文献²⁾より一部改変引用)

能な細胞”であり、“水晶体特異的な組織幹細胞”であるのかもしれない. また今回の結果は、後発白内障の発生機序の一部を説明できることから、後発白内障の予防や新しい治療法の開発に結びつく可能性がある.

文 献

- 1) 山本直樹: 日本白内障学会誌, 18, 22-31 (2006)
- 2) Yamamoto, N., Majima, K. and Marunouchi, T.: *Med. Mol. Morphol.*, 41, 83-91 (2008)
- 3) McAvoy, J.W., Chamberlain, C.G., de Jongh, R.U., Richardson, N.A. and Lovicu, F.J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 638, 256-274 (1991)
- 4) Zhou, M., Leiberman, J., Xu, J. and Lavker, R.M.: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 47, 2997-3003 (2006)
- 5) Kunimura, C., Kikuchi, K., Ahmed, N., Shimizu, A. and Yasumoto, S.: *Oncogene*, 17, 189-197 (1998)
- 6) Yamamoto, N., Akamatsu, H., Hasegawa, S., Yamada, T., Nakata, S., Ohkuma, M., Miyachi, E., Marunouchi, T. and Matsunaga, K.: *J. Dermatol. Sci.*, 48, 43-52 (2007)
- 7) 山本直樹, 丸野内棣: *Tiss. Cult. Res. Commun.*, 24, 101-106 (2005)
- 8) 山本直樹: 藤田学園医学会誌 (印刷中, 2009)
- 9) 山本直樹: 日本白内障学会誌, 20, 12-19 (2008)
- 10) Nishi, O., Yamamoto, N., Nishi, K. and Nishi, Y.: *J. Cataract. Refract. Surg.*, 33, 1065-1070 (2007)