

神経網膜内在性網膜色素上皮細胞増殖因子の部分精製

加藤 圭一, 石黒 誠一, 玉井 信

東北大学医学部眼科学教室

要 約

胎生ニワトリ網膜色素上皮細胞を用いて, ウシ神経網膜内在性網膜色素上皮細胞増殖因子の精製を試みた. 硫酸塩析, ゲルろ過およびイオン交換カラムクロマトグラフィー(DEAE-Sephadex A-25)を用いて精製を行った. 現在, 部分精製ではあるが, ウシ神経網膜抽出液は, 胎生ニワトリ網膜色素上皮細胞に対し, 増殖効果と形態変化作用の二つの効果を有していた. また, ゲルろ過におけ

る精製因子の分子量推定から, 現在精製中の因子は過去に報告されているウシ神経網膜内在性増殖因子以外の物質であるものと考えられた. (日眼会誌 100: 145-149, 1996)

キーワード: 網膜色素上皮細胞, 増殖因子, 精製, 神経網膜

Partial Purification of Endogenous Growth Factor(s) of Retinal Pigment Epithelial Cells from Neural Retina

Kei-ichi Katoh, Sei-ichi Ishiguro and Makoto Tamai

Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine

Abstract

We attempted to purify endogenous growth factors of chick embryonal retinal pigment epithelial cells from bovine neural retina. Ammonium sulfate precipitation, gel filtration, and anion exchange column chromatography were used. Though only partially purification, bovine retinal extract had two effects, growth and transformation, on chick embryonal pigment epithelial cells. We think that

these purified factors may be novel from the estimation of their molecular weight by gel filtration. (Jpn Ophthalmol Soc 100: 145-149, 1996)

Key words: Retinal pigment epithelial cells, Growth factor, Purification, Neural retina

I 緒 言

増殖硝子体網膜症(PVR)において, 網膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)細胞はその成因に, また臨床で, その重症度および予後を大きく左右する線維化という現象に非常に深く関与する¹⁾²⁾. しかし, その増殖のメカニズムは未だ不明の点も多い.

また, 生体内において RPE 細胞と神経網膜細胞は近接した位置にあり, RPE 細胞は blood-retinal barrier^{3)~6)} や視細胞外節食能^{7)~9)} など, 神経網膜細胞の代謝およびその保全に重要な役割を果たしていることが知られている. しかし, 反対に神経網膜細胞が RPE 細胞に与える影響については, あまり知られていない. その解剖学的位置からも, 神経網膜細胞が RPE 細胞に与える影

響についての検討は, 各種疾患の病態を知る上で非常に興味深いことと思われる. 今回我々は, 胎生ニワトリ RPE 細胞を指標としてウシ神経網膜内在性増殖因子の精製を試みた.

II 実験方法

1. ニワトリ網膜色素上皮細胞の培養

Kean ら¹⁰⁾の方法に基づき胎生ニワトリ網膜色素上皮細胞を採取し, 培養した. 概略を以下に記述する. 胎生6日目の受精卵(stage 26-9)から眼球を摘出し, カルシウムおよびマグネシウムを含まないダルベッコ変法緩衝塩類溶液(DPBS)中で, 角膜上で結合織を剝離し, RPE細胞を露出させた. 眼球赤道部で眼球を切開後, 前眼部および中間透光体を除去した. その後, 視神経乳頭部の組織を

別刷請求先: 980-77 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 加藤 圭一
(平成7年4月24日受付, 平成7年10月6日改訂受理)

Reprint requests to: Kei-ichi Kato, M.D. Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine,
1-1 Seiryu-machi, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi-ken 980-77, Japan

(Received April 24, 1995 and accepted in revised form October 6, 1995)

切除し、RPE細胞を神経網膜から剝離した。得られたRPE細胞はCTC溶液(6 units/ml コラゲナーゼ, 0.1% トリプシン, 2% ニワトリ血清および4 mM EDTAをDPBSに溶解した溶液)で37°Cで約5分間処理し、5% ウシ胎児血清(FBS)および抗生物質(100 units/ml ペニシリンおよび100 μ g/ml ストレプトマイシン)含有MEM溶液でその反応を止めた。その後、1,000 rpmで5分間遠心し、その沈渣を5% FBSおよび抗生物質含有MEM溶液で37°Cで、約3週間培養した。

2. ウシ神経網膜抽出液中の増殖因子の精製

300眼のウシ眼球から神経網膜を採取し、約4倍量の0.25 M シュークロース中でホモジナイズした。その溶液を4°Cで16,000 rpm, 30分間遠心し、上清(ウシ神経網膜抽出液)を用いた。

ウシ神経網膜抽出液は硫酸アンモニウムで塩析(35%, 50%, 70%)し、DPBSで透析した。最も活性の強かった硫酸塩析35~50%分画を、Sephadex G-100カラムでゲルろ過した。この際、溶液はDPBSを用い、流量は1.5 ml/minとした。次に、得られた試料をDEAE-Sephadex A 25カラムで0.05~0.5 M NaCl(0.01 M 磷酸塩類溶液 pH 7.40で溶解)まで直線的勾配により分画した。

II-1項で得られたRPE細胞をconfluentに培養し、CTC溶液でsingle cellを得た。この細胞を 2×10^4 個ずつ35 mm培養用シャーレ(Becton-Dickinson Laboware)に播き、5% FBSおよび抗生物質含有MEM溶液で2日間培養後、引き続いてそれぞれの濃度のウシ神経網膜抽出液、1% FBSおよび抗生物質含有MEM溶液で6日間培養した。各実験で、各4個の培養用シャーレを用いた。その細胞数を算定し、各々の段階のウシ神経網膜抽出液のRPE細胞に対する増殖効果を検討した。ウシ神経網膜抽出液の濃度は、ゲルろ過後は約0.1%、DEAE Sephadex A 25カラム後は約1%になるように各分画を

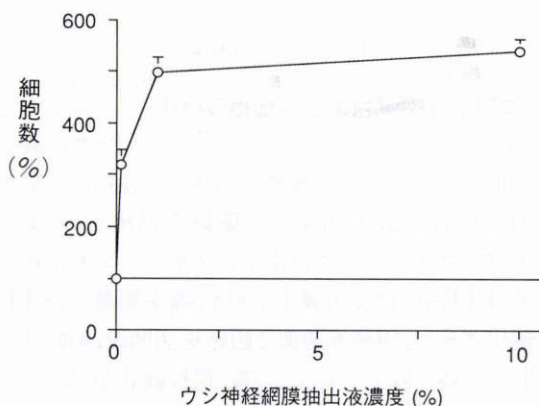


図1 ウシ神経網膜抽出液の胎生ニワトリ網膜色素上皮(RPE)細胞に対する増殖効果。

濃度依存性に増殖効果が認められた。1% ウシ神経網膜抽出液で増殖効果は飽和した。平均値 \pm 標準誤差

用いた。

各段階における精製過程を調べるために、Lowry法¹¹⁾で各々の段階の総蛋白質量を測定し、10% ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEにより精製度の評価を行った。各段階の試料をSDS-PAGEで、各レーンに約15 μ gずつ用いた。

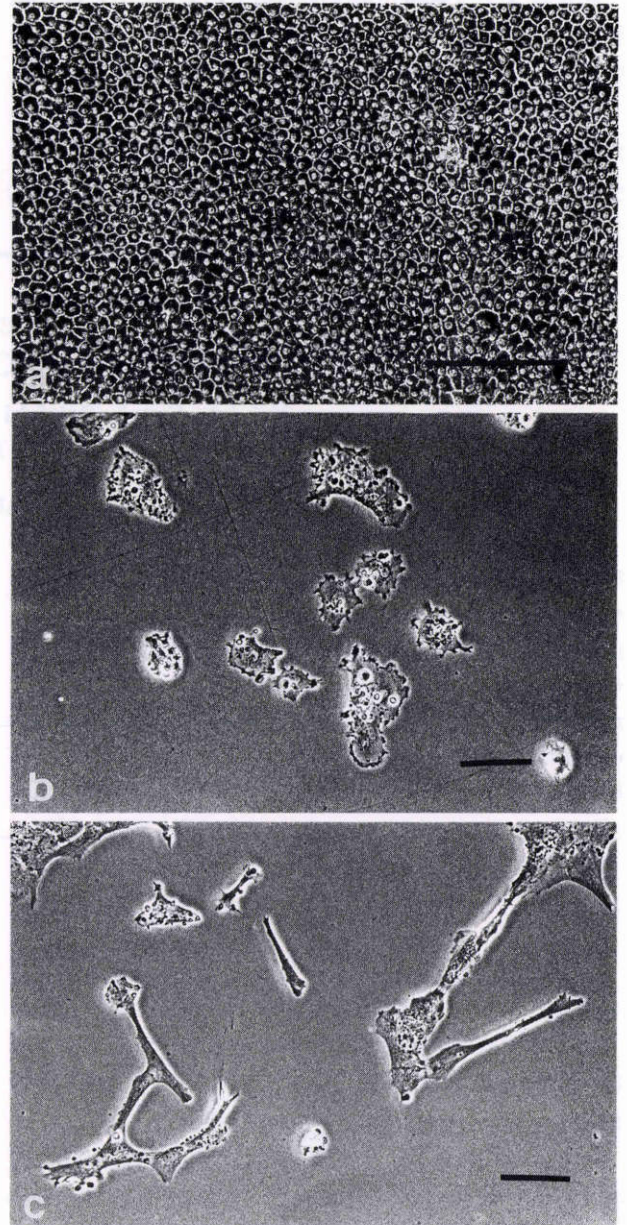


図2 ウシ神経網膜抽出液による胎生ニワトリRPE細胞の形態変化。

a: confluentの状態に培養した初代培養の胎生ニワトリRPE細胞。細胞同士は密着し、RPE細胞に特徴的な六角形の細胞形態を示した。b: 低濃度(1%)ウシ神経網膜抽出液を含む培養液にて培養した胎生ニワトリRPE細胞。細胞は類上皮様の形態をとり、形態変化は認められなかった。c: 高濃度(10%)ウシ神経網膜抽出液を含む培養液で培養した胎生ニワトリRPE細胞。RPE細胞はその形態が変化し、紡錘形となった。バーは50 μ m

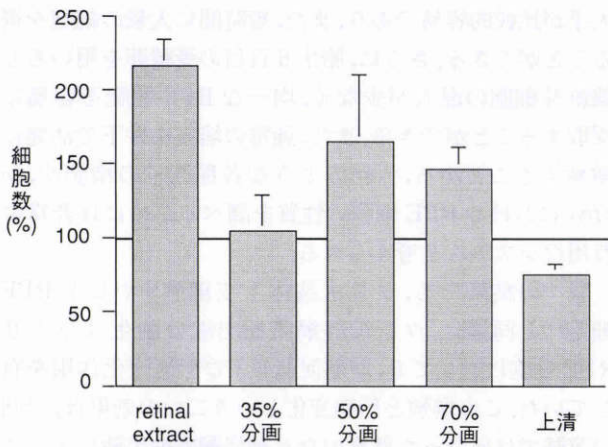


図3 硫酸塩析後分画の胎生ニワトリ RPE 細胞に対する増殖効果。

平均値±標準誤差

III 結 果

1. ウシ網膜抽出液のニワトリ RPE 細胞に対する影響

対照に比し,ウシ網膜抽出液は,0.1%の濃度で約320%,1%で約500%,10%で約540%と濃度依存性にニワトリ RPE 細胞に対し増殖効果を有していた(図1).初代培養(図2a)後の継代培養で,高濃度(10%)のウシ網膜抽出液を含んだ培養液によりニワトリ RPE 細胞は形態変化を起こし,細胞は紡錘形となった(図2c).この形態変化は増殖の面では十分な効果の得られる1%の濃度では殆ど認められなかった(図2b).

2. ウシ網膜抽出液中の増殖因子の精製

硫酸アンモニウムを用いた塩析で,35~50%および50~70%分画に増殖活性が認められた(図3).

今回は,35~50%塩析分画を Sephadex G-100 カラムを用いてさらに分画を試みた.図4のごとく,いくつかの

分画に増殖活性が認められた.今回,我々はこの中で分子量約25~65 kD の分画を収集した.

次に,上記で収集した分画を DEAE-Sephadex A-25 カラムで分画した.約0.3~0.5 M NaCl で得られた分画に増殖活性が認められたので,これらの分画を収集した(図5).

表1に各段階における蛋白質量を,また,図6には SDS-PAGE による精製度を示した.蛋白質量は,DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィー後では,精製開始時の約570分の1となっている.また,SDS-PAGE で,DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィー後でも約20種類近いバンドが認められる.

IV 考 按

今回,我々はPVRの治療および予防のため,その原因および重症度を決定する大きな因子である RPE 細胞増殖のメカニズムを探る目的として,胎生ニワトリ RPE 細胞を用い,ウシ神経網膜内在性 RPE 細胞増殖因子の精製を試みた.

ウシ神経網膜中に存在する増殖因子の研究は,1978年にウシ水晶体細胞に対してウシ網膜抽出液が増殖促進および形態変化作用を持つことが報告¹²⁾されたことに始まった.その後,同グループ¹³⁾¹⁴⁾および Glazer ら¹⁵⁾, Barritault ら¹⁶⁾により,ウシ神経網膜抽出液中に含まれる増殖因子精製の報告がなされたが,それらは構造が決定されると塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)および酸性線維芽細胞増殖因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF)と同一物質であることが証明された¹⁷⁾.その後も Campochiaro ら¹⁸⁾により,これら以外の増殖因子がウシ神経網膜中に存在し,これはヒト RPE 細胞に対し増殖促進および形態変化作用を有することが報告された.しかし,この因子は未精製であり,その分子量などの推定から未知の増殖因子であ

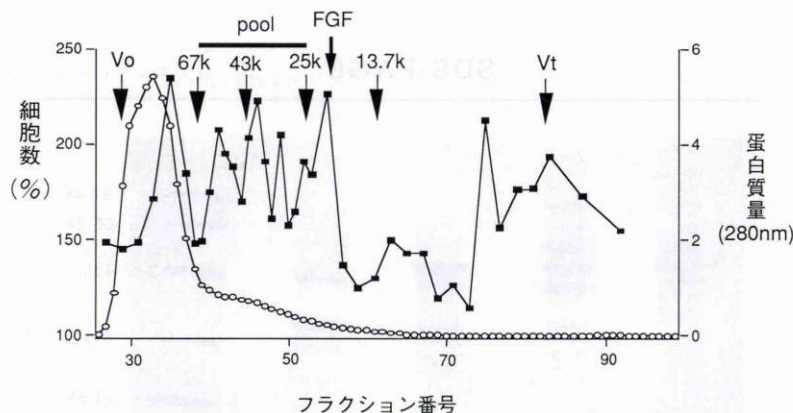


図4 Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィー各分画の増殖効果。

Pool の部分の分画を DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィーに用いた. FGF: 酸性および塩基性線維芽細胞増殖因子の分子量. Vo: 排除容量(void volume). Vt: 総容量(total volume). ■: 細胞数(%)
○: 蛋白質量

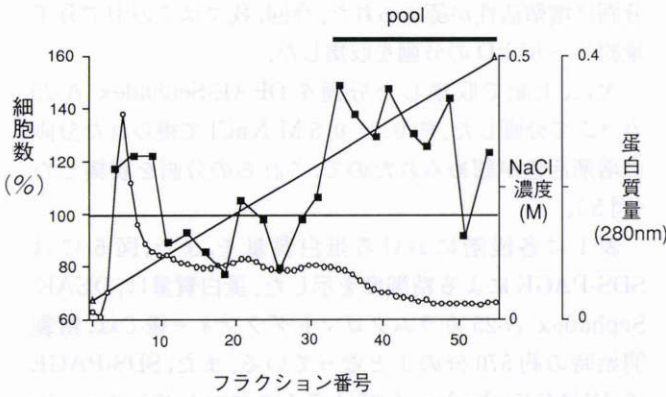


図5 DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィー各分画の増殖効果。
pool の部分(約 0.3~0.5 M NaCl に相当)の分画を収集した。■：細胞数(%) ▲：NaCl 濃度(M) ○：蛋白質量(280 nm)

表1 各精製段階における蛋白質量

精製段階	蛋白質量
ウシ神経網膜抽出液(300眼)	5,713 mg
硫酸塩析 50%分画	851 mg
Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィー	159 mg
DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィー	9.9 mg

る可能性が大きい。このようにウシ神経網膜中には未知の増殖因子がなお存在することが期待されている。

上記のように、過去に aFGF および bFGF がウシ神経網膜から精製されている。そこで、我々はそれらの報告とは異なった種類の培養細胞を対象とすることにより、新規の増殖因子の発見を試みた。我々は、各種の RPE 細胞の中で安定した入手が可能であり、かつ増殖力の旺盛な細胞である胎生ニワトリ RPE 細胞を用いて実験を行った。ニワトリ RPE 細胞は古くから、各種実験系に広く用いられている。胎生期のニワトリ RPE 細胞は有精卵の

入手が比較的容易であり、また、短時間に大量の細胞を得ることができる。さらに、胎生 6 日目の受精卵を用いると線維芽細胞の混入が少なく、均一な RPE 細胞を容易に採取することができる。また、通常の培養条件下で活発に増殖することから、今回のような各種因子の精製や、*in vivo* における RPE 細胞の性質を調べるためには非常に有用なシステムと考えられる。

我々の結果でも、ウシ水晶体上皮細胞¹²⁾やヒト RPE 細胞¹⁸⁾と同様に、ウシ神経網膜抽出液は胎生ニワトリ RPE 細胞に対しても、増殖促進および形態変化作用を有していた。この増殖と形態変化という二つの効果は、今回の実験では異なった濃度のウシ神経網膜抽出液によって惹起された。すなわち、増殖面ではほぼ飽和濃度と考えられる 1% ウシ神経網膜抽出液では形態変化は認められず、形態変化を起こすためには 10% の濃度のウシ神経網膜抽出液が必要であった。

今回の実験において、Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィー後の分画で、分子量約 25~65 kD の分画を用いた。これは図 4 に示したように、酸性および塩基性線維芽細胞増殖因子(aFGF, bFGF)は分子量約 19 kD であり、既に報告されているこれらの因子を今回の精製から除くために、この分子量約 25~65 kD の分画を用いた。このことから、現在精製中の物質は、過去に精製された aFGF および bFGF 以外の因子である可能性が高いと考えられる。この物質の性質を確認し、また、これが aFGF および bFGF 以外の因子であるかを検討するためには、まず、ヘパリンカラムを用いてヘパリンに対する親和性を調べることが、今後必要であると考えられる。また、現在精製中の因子は、ウシ神経網膜抽出液から得られたものであり、この因子のウシ RPE 細胞に対する影響の評価も必要と思われる。

現在精製中の因子は、ニワトリ RPE 細胞に対し、各精製段階で最も強い増殖効果を持つ分画を精製したものである。今後、さらなる精製のためには、中性条件下で分離

SDS-PAGE

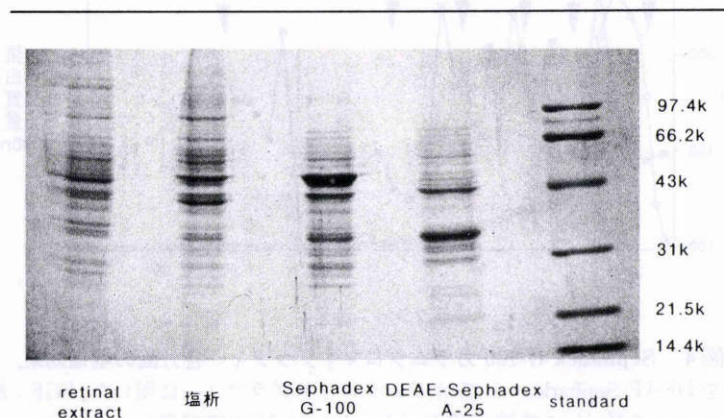


図6 SDS-PAGE による各段階における精製度。

可能な逆相高速液体クロマトグラフィーなどを用いる必要があると考えられる。

このようなRPE細胞における細胞増殖の研究は、PVRの予防および治療において非常に重要であり、また、神経網膜細胞とRPE細胞の相互作用の検討は各種増殖性疾患にとどまらず、延いては網膜硝子体疾患全般においてその病態解明に大きく寄与すると考えられる。

文 献

- 1) **Anderson DH, Stern WH, Fisher SK, Erickson PA, Borgula GA**: Retinal detachment in the cat: The pigment epithelial-photoreceptor interface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 906—926, 1983.
- 2) **Machemer R, Laqua H**: Pigment epithelium proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). *Am J Ophthalmol* 80: 1—23, 1975.
- 3) **Cunha-Vaz JG, Shakib M, Ashton N**: Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. I. On the existence, development, and site of a blood-retinal barrier. *Br J Ophthalmol* 50: 441—453, 1966.
- 4) **Shiose Y**: Electron microscopic studies on blood-retinal and blood-aqueous barriers. *Jpn J Ophthalmol* 14: 73—87, 1970.
- 5) **Pino RM, Essner E, Pino LC**: Permeability of the neonatal rat choriocapillaris to hemeproteins and ferritin. *Am J Anat* 164: 333—341, 1982.
- 6) **Fine BS**: Limiting membranes of the sensory retina and pigment epithelium: An electron microscopic study. *Arch Ophthalmol* 66: 847—860, 1961.
- 7) **Young RW**: The renewal of photoreceptor cell outer segments. *J Cell Biol* 33: 61—72, 1967.
- 8) **Toung RW, Bok D**: Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol* 42: 392—403, 1969.
- 9) **La Veil MM**: Rod outer segment disk shedding in rat retina: Relationship to cyclic lighting. *Science* 194: 1071—1074, 1976.
- 10) **Kean EL, Hara S, Lentricchia BB**: Binding of neoglycoproteins by the chick pigment epithelial cell in culture. *Vision Res* 21: 133—135, 1981.
- 11) **Markwell MAK, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE**: A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87: 206—210, 1978.
- 12) **Arruti C, Courtois Y**: Morphological changes and growth stimulation of bovine epithelial lens cells by a retinal extract *in vitro*. *Exp Cell Res* 117: 283—292, 1978.
- 13) **Barritault D, Arruti C, Courtois Y**: Is there a ubiquitous growth factor in the eye? Proliferation induced in different cell types by Eye-Derived Growth Factors. *Differentiation* 18: 29—42, 1981.
- 14) **Courty J, Loret C, Moenner M, Chevallier B, Lagente O, Courtois Y, et al**: Bovine retina contains three growth factor activities with different affinity to heparin: Eye derived growth factor I, II, III. *Biochemie* 67: 265—269, 1985.
- 15) **Glaser BM, D'Amore PA, Michels RG, Patz A, Fenselau A**: Demonstration of vasoproliferative activity from mammalian retina. *J Cell Biol* 84: 298—304, 1980.
- 16) **Barritault D, Plouët J, Courty J, Courtois Y**: Purification, characterization, and biological properties of the eye-derived growth factor from retina: Analogies with brain-derived growth factor. *J Neuroscience Res* 8: 477—490, 1982.
- 17) **Baird A, Esch F, Gospodarowicz D, Guillemain R**: Retina- and eye-derived endothelial cell growth factors: Partial molecular characterization and identity with acidic and basic fibroblast growth factors. *Biochemistry* 24: 7855—7860, 1985.
- 18) **Campochiaro PA, Glaser BM**: A retina-derived stimulator (s) of retinal pigment epithelial cell and astrocyte proliferation. *Exp Eye Res* 43: 449—457, 1986.