

光凝固後の培養網膜色素上皮細胞創傷治癒の自然経過

—BrDu 取り込みによる DNA 合成の観察—

唐沢 容子, 水川 淳, 沖坂 重邦

防衛医科大学校眼科学教室

要 約

光凝固後の網膜色素上皮細胞の細胞増殖を調べるため、培養ニワトリ胚網膜色素上皮細胞にクリプトンレーザー照射を行った。コラーゲン上に置いたコラーゲン膜に細胞を培養し、色素化した色素上皮細胞をクリプトンレーザーで光凝固した。培養細胞に bromodeoxyuridine (BrDu) を 12 時間ずつ取り込ませてラベルし、抗 BrDu 抗体による免疫染色を行って DNA 合成の時間経過を調べた。レーザー照射直後は照射部分の細胞が剝離し、コラーゲン膜が露出していた。レーザー照射後、12 時間以降から照射部位に接した細胞に DNA 合成とそれに続く細胞分裂が起こり、24 時間以降から細胞は DNA を合成

しながら照射部位を覆い始めた。光凝固後、細胞が照射部位を完全に覆った後も DNA 合成は継続したが、3 ½ ~ 4 日後に DNA 合成はいったん停止した。その後、DNA 合成は再開し実験終了時の 7 ½ 日目も細胞の DNA 合成は継続していた。培養細胞を用いた光凝固は、凝固後の反応を細胞レベルで理解する上で有用な方法であると考えられた。(日眼会誌 100: 605—610, 1996)

キーワード：クリプトンレーザー光凝固、網膜色素上皮細胞、DNA 合成、細胞培養

Natural Process of Wound Healing of Photocoagulated Retinal

Pigment Epithelium in Culture

—Observation of DNA Synthesis by BrDu Incorporation—

Yoko Karasawa, Atsushi Mizukawa and Shigekuni Okisaka

Department of Ophthalmology, National Defense Medical College

Abstract

We examined the proliferation of retinal pigment epithelial (RPE) cells after krypton laser photocoagulation in culture. A pigmented monolayer of chick embryonic RPE cells was cultured on a collagen membrane placed on collagen gel. RPE cells were labeled with bromodeoxyuridine (BrDu) every 12 hours until 7 ½ days after the photocoagulation and stained immunocytochemically with anti BrDu antibody. Immediately after the photocoagulation, RPE cells became detached at the burned lesion and the collagen membrane beneath the RPE layer was exposed. Some cells adjacent to the burned lesion showed DNA synthesis and subsequent mitosis between 12 to 24 hours after the photocoagulation. Cells with labeled nuclei migrated into the denuded

burned area after 24 hours and covered the whole burned area within three days after the photocoagulation. DNA synthesis continued in these on the burned lesion after complete coverage of the lesion but stopped temporarily 3 ½ to 4 ½ days after the photocoagulation. Thereafter DNA synthesis increased again and continued until the end of the experiment. Such use of the cultured RPE cells might be useful in studying cellular reaction after photocoagulation. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 605—610, 1996)

Key words: Krypton laser photocoagulation, Retinal pigment epithelial cells, DNA synthesis, Cell culture

別刷請求先：359 埼玉県所沢市並木3-2 防衛医科大学校眼科学教室 唐沢 容子

(平成7年10月17日受付, 平成8年4月24日改訂受理)

Reprint requests to: Yoko Karasawa, Ph.D. Department of Ophthalmology, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa-shi, Saitama-ken 359, Japan

(Received October 17, 1995 and accepted in revised form April 24, 1996)

I 緒 言

眼底疾患に対するレーザー治療は、網膜・脈絡膜の異常血管、脆弱化した組織、腫瘍細胞などを凝固し、隣接組織の修復力を利用して病的組織を除去し、視機能を回復させることを目的としている。照射されたレーザーは網膜色素上皮細胞や脈絡膜メラノサイトのメラニン顆粒、赤血球のヘモグロビンなどに吸収されて熱エネルギーに変化し、照射部の組織を熱凝固する。波長 647 nm のクリプトンレーザーは、色素上皮細胞よりもメラノサイトに強く熱凝固を惹起する。レーザー光凝固後の網膜脈絡膜の変化は、主に動物眼で組織病理学的に調べられてきた^{1)~5)}。しかし、実験動物を用いた研究では色素上皮細胞、メラノサイトに隣接する組織からの修復反応を無視できないため、網膜色素上皮細胞自体に対するレーザー照射の直接的な影響を研究するには不都合である。一般的に上皮組織の傷害は上皮細胞の移動と増殖によって修復されるが、光凝固後の網膜色素上皮細胞の増殖の報告⁶⁾⁷⁾には光凝固直後からの変化については記載がなく、また、透過型電子顕微鏡を用いた研究のため、DNA 合成細胞の平面的な分布についての情報は少ない。

レーザー光凝固後の網膜色素上皮自体の修復を経時的に調べるために、生体内での色素上皮細胞の環境を模してコラーゲン膜上に置いたコラーゲン膜上にニワトリ胚色素上皮細胞層を培養し、クリプトンレーザーで光凝固し、細胞層の修復過程での DNA 合成の変化を 5-bromodeoxyuridine (BrDu) の核への取り込み⁸⁾によって測定したところ、興味ある知見が得られたので報告する。

II 実験方法

1. 網膜色素上皮細胞の培養

孵卵 10 日目のニワトリ胚から眼球を摘出し、虹彩、角

膜、水晶体を含む前眼部を切除した。眼球後極部から硝子体を除き、実体顕微鏡下で神経網膜を除去後、0.05% エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 中で 37°C、30 分保温した。網膜色素上皮細胞層を層状に剝離して回収し、0.25% トリプシン (DIFCO) で 37°C、10 分処理した⁹⁾。遠心して回収した細胞を 10% ウシ胎児血清 (FBS) 添加イーグル MEM 培地 (GIBCO) (MEM-10% FBS) に懸濁して培養皿にまき、MEM-10% FBS 中で 37°C、5% 二酸化炭素 95% 空気で培養した。細胞が増殖して一層の細胞層を形成後、コラーゲナーゼ (和光純薬) とトリプシンの連続処理で細胞を解離して継代培養した。継代 3~4 代目の細胞を実験に用いた。

2. レーザー照射

レーザー光凝固用に色素上皮細胞をコラーゲン膜上に培養した。直径 35 mm の培養皿に I 型コラーゲンゲル (1.2 mg/ml, 新田ゼラチン, Type I-A) 混合溶液を加え、透過性コラーゲン膜 (培養面積 530 mm², 高研, Cellgen, CM-6) を置き、37°C でコラーゲンをゲル化させてコラーゲン膜を固定した。無血清 MEM でコラーゲン膜を洗った後、解離した細胞をコラーゲン膜上にまいて培養した。倒立位相差顕微鏡 (Olympus, IMT-2) で観察し、細胞が色素化し一層の上皮層を形成したことを確認して光凝固を行った。コラーゲン膜上培養の培養液を除いて、クリプトンレーザー (ニデック, アルゴン/クリプトンレーザー光凝固装置 AKC-8000) を出力 400 mW, 照射時間 0.2 秒, 照射径 200 μ m で培養皿当たり 4 発あるいは 50 発ずつ照射した。照射後、培養液を戻して培養を継続した。

3. DNA 合成細胞核の染色

レーザー照射直後から培養液に 10 μ M BrDu (Sigma) を加え、12 時間ずつ DNA 合成細胞を時間を追ってラベルした。-20°C の 100% エタノールで 20 分固定し、2 規定塩酸で DNA を変性後、硼酸緩衝液 (0.1 M, pH 9.0) で中和し、抗 BrDu 抗体 (大日本製薬) を用いて avidin-

図 1 レーザー光凝固直後から 12 時間後までの 5-bromodeoxyuridine (BrDu) ラベル。

光凝固によって円形に剝離した細胞層の下にコラーゲン膜が露出している。DNA 合成は起きていない。照射部位の周囲の細胞は空胞を持っているため、蜂の巣状に白くみえる。バーは 100 μ m

図 2 光凝固後 12~24 時間の BrDu ラベル。

染色された核を持つ細胞が照射部位周囲に沿って並ぶ。矢じりは並んだ 2 細胞の BrDu 陽性の核を示す。光凝固によってはがれかけた細胞層が照射部位中央に付着している。細胞による照射部位の被覆は始まっていない。バーは 100 μ m

図 3 光凝固後 24~36 時間の BrDu ラベル。

照射部位は部分的に被覆され、照射部位を覆った細胞の多くが BrDu 陽性核 (矢じり) を持つ。バーは 100 μ m

図 4 光凝固後 36~48 時間の BrDu ラベル。

染色された核を持つ細胞が照射部位の大部分を覆っている。バーは 100 μ m

図 5 光凝固後 3 $\frac{1}{2}$ ~4 日の BrDu ラベル。

染色核を持つ細胞数が減少している。バーは 100 μ m

図 6 光凝固後 4 日~4 $\frac{1}{2}$ 日の BrDu ラベル。

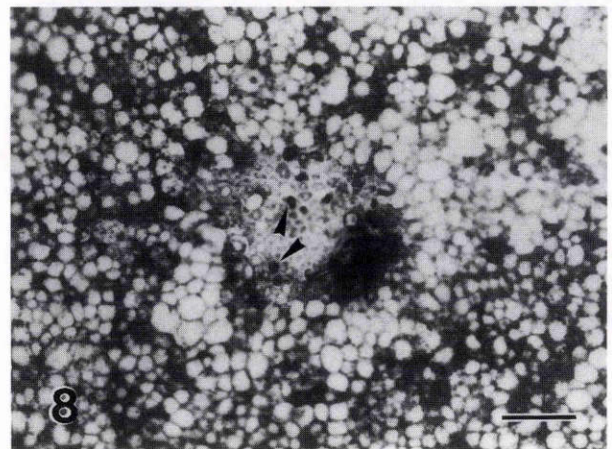
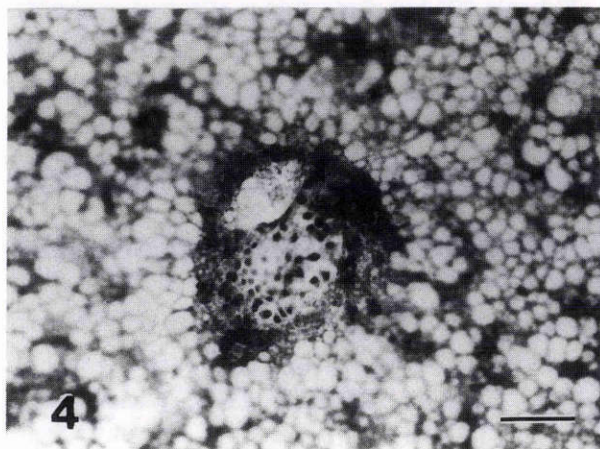
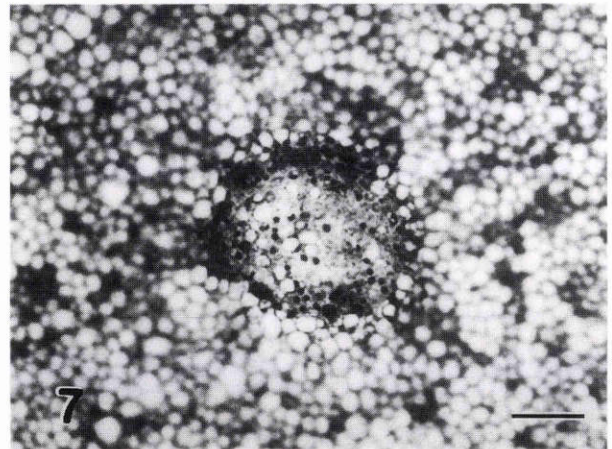
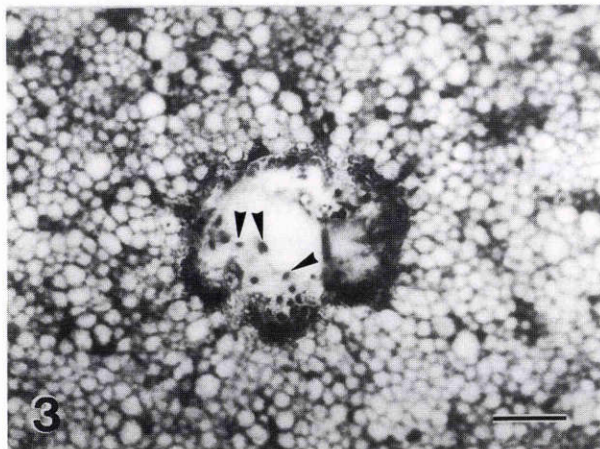
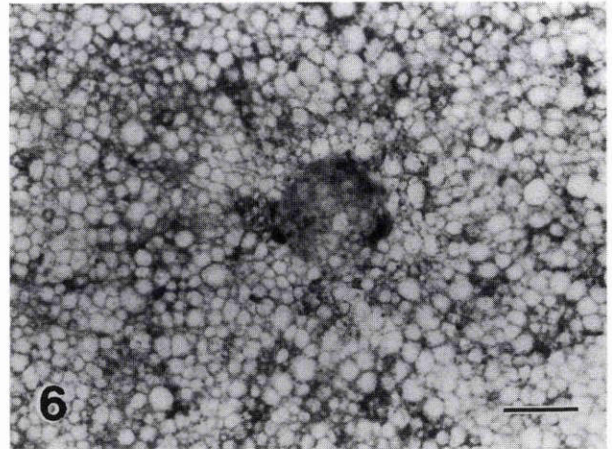
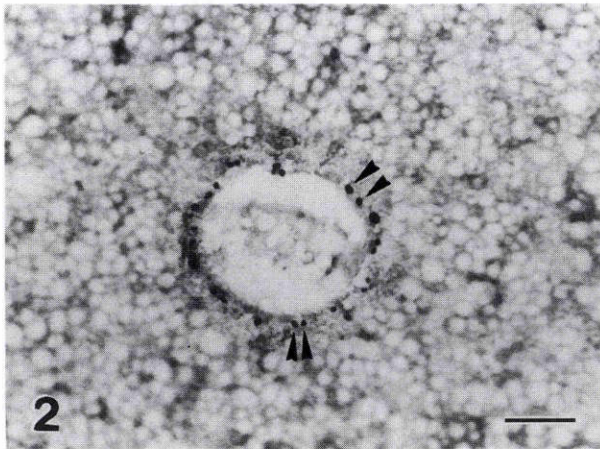
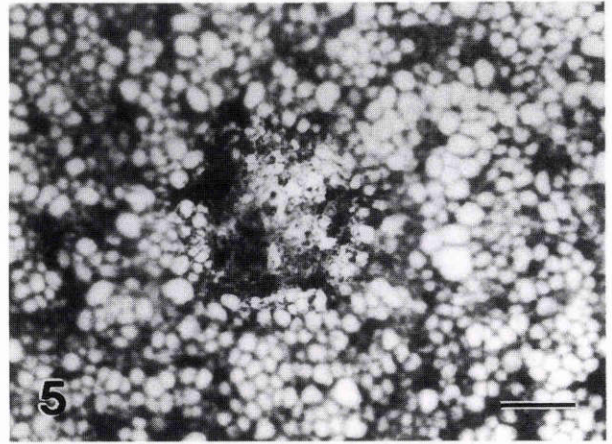
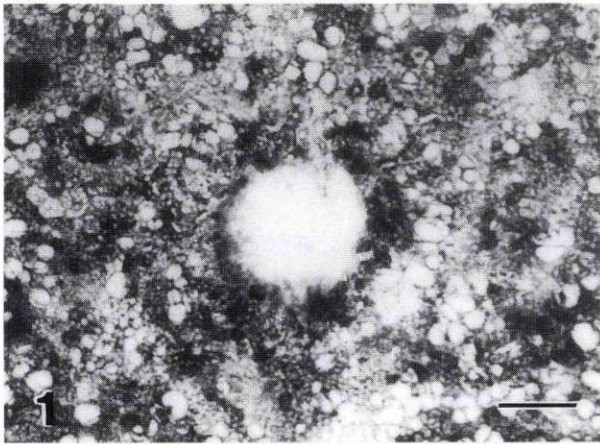
染色された核を持つ細胞がない。空胞を持つ細胞が増加している。バーは 100 μ m

図 7 5 日~5 $\frac{1}{2}$ 日の BrDu ラベル。

染色された細胞核が認められる。バーは 100 μ m

図 8 7 日~7 $\frac{1}{2}$ 日の BrDu ラベル。

染色された核 (矢じり) を持つ細胞が存在する。バーは 100 μ m



biotin peroxidase 法(Vector, Vectorstain ABC-PO kit)で免疫細胞化学染色した。

III 結 果

光凝固時の細胞は、多角形の色素化した細胞から成る一層の細胞層を形成していた。顕微鏡観察では、多くの細胞が白く抜けてみえる空胞を持っていた。光凝固直後では、レーザーを当てた部分の細胞が脱落するかあるいは層状に剝離して、周辺の細胞層や照射部分に付着し、細胞下のコラーゲン膜が露出していた。凝固直後から12時間のBrDuラベルでは、DNAの合成を開始したものはほとんどなかった。剝離した部分の形と大きさは、照射直後と比較して特に変化はなかった(図1)。凝固後12~24時間ラベルでは、照射部位周囲に沿った細胞の核が染色されていた。照射部位の周囲に沿ってBrDu陽性の細胞が出現した。並んだ2個の細胞の核が染色されている所があり、DNAを合成した細胞の一部は照射部周囲で分裂したことを示していた。露出したコラーゲン膜への細胞の被膜は、この時点ではほとんど起きていなかった(図2)。

凝固後36時間目では、照射部位の細胞による被覆が始まっていた。剝離部分の小さいものの一部は移動した細胞にほぼ覆われたが、多くの照射部位で依然コラーゲン膜が露出していた。24~36時間ラベルでは、照射部位上を覆った多くの細胞の核がBrDu陽性であった(図3)。48時間目では、剝離部分の小さいものは色素上皮細胞にほぼ覆われ(図4)、72時間目には大きな剝離も完全に細胞に覆われた。照射部位を被覆した細胞では、3~3½日ラベルまでDNA合成が継続していた。

3½日~4½日にかけてDNA合成はいったん低下したが(図5, 6)、4½日以降再びDNA合成が上昇し(図7)、実験を終了した7日~7½日ラベルまで継続していた(図8)。実験期間を通してDNA合成は照射部位を囲む細胞と照射部位を覆った細胞で起こり、照射部位から離れた細胞にはDNA合成は起きなかった。試料当たりの光凝固数はDNA合成の変化に影響なく、4発凝固も50発凝固も個々の照射部位でのDNA合成細胞の分布と照射部位の被覆過程でのその消長はほぼ同様であった。

IV 考 按

本研究では、光凝固の網膜色素上皮細胞の細胞増殖に対する影響を調べるため、培養条件下でも生体に近い状態を維持できるニワトリ胚の細胞を利用した。ヒトの網膜色素上皮細胞は、分化形質を保った状態で培養するためには細胞間基質成分や成長因子を利用しなければならないが¹⁰⁾¹¹⁾、ニワトリ胚網膜色素上皮細胞はウシ胎児血清添加培地と通常の組織培養皿上で容易に色素化し、多角形の一層の細胞層を形成する。培養された細胞は色素

化することでレーザーのエネルギーを効率よく吸収し、また、ヒト生体眼網膜色素上皮細胞に類似した多角形構造を維持している。本研究では、脈絡膜を想定したコラーゲンゲル上にBruch(ブルッフ)膜に相当するコラーゲン膜を置き、その上に色素上皮細胞を培養してより生体に近い状態にした。

網膜色素上皮細胞は、細胞層に一定範囲以上の欠損が起きると、細胞は欠損部へ移動するとともに増殖を開始し、欠損部を再被覆する¹²⁾。培養色素上皮細胞が照射部位を顕微鏡レベルで再被覆するのに要した時間は約3日で、器官培養した眼球¹³⁾や生体の眼球⁶⁾⁷⁾を光凝固した場合より短時間であった。この理由としては、細胞培養では細胞の増殖が器官培養や生体より活発なことが挙げられる。培養色素上皮細胞の光凝固後の再被覆の速度をトレパンでの剝離¹⁴⁾と比較すると、被覆の開始、被覆速度ともトレパンでの剝離より遅れていた。この原因として、光凝固時に熱によって死滅した細胞が基質に付着してまわりの細胞の移動を妨げたり、熱のため基質が損傷を受けて変性し、細胞の移動が低下したことが考えられる。

本研究では、光凝固後の色素上皮細胞について、凝固位置に対してDNA合成がどのような範囲で起きているのかを調べた。DNA合成は、初めにレーザー照射部位の周囲の細胞に起こり、その後は細胞が細胞層の剝離部を覆いながらDNA合成をしていた。ラットおよびサル眼を用いた研究⁶⁾⁷⁾では、凝固部位から離れた部位のDNA合成についての記載はないが、本研究でDNA合成は照射部位から離れた細胞には起きていなかったことから、生体でもDNA合成は光凝固部位に限局して起きていると推測される。

培養色素上皮細胞のDNA合成は光凝固後12時間以降から始まり、光学顕微鏡の観察で細胞が照射部位を被覆した後も約4日目まで継続した後いったん低下し、再上昇するという過程を経た。細胞が照射部位を覆った後もDNA合成が継続することは、光学顕微鏡下で照射部位が被覆されたようにみえても、修復は未完成で、細胞の密度や細胞間の接着が必要であるためと考えられる。本報告ではDNA合成が二相性に起きたが、実験動物を用いた研究でもDNA合成細胞は光凝固後に急激に増加した後いったん低下し、50日後に再び上昇するという報告⁶⁾がある。この報告のDNA合成の一時低下が本報告での4日目付近のDNA合成の低下に現れているのかも知れない。

培養下の細胞の増殖や運動は、培地中および細胞自身が放出する成長因子によって制御されている。色素上皮細胞が合成して色素上皮細胞自身の増殖や運動を調整する因子の中で、光凝固によって変化を受けるものとして酸性および塩基性線維芽細胞成長因子(acidic and basic fibroblast growth factor, a-FGF, b-FGF)⁷⁾¹⁵⁾と腫瘍成長因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)¹⁶⁾があ

る¹⁷⁾¹⁸⁾。この中で、a-FGFとb-FGFは培養色素上皮細胞のDNA合成を促進し、TGF- β は逆にDNA合成を抑制する作用がある¹⁷⁾。FGFには細胞の移動を促進する作用もある¹⁸⁾。通常、signal peptideをもたないために合成されても細胞内にとどまるb-FGFが光凝固による細胞障害のため、細胞外に放出され血管新生を起こすこと¹⁹⁾²⁰⁾、光凝固後に増殖した網膜色素上皮細胞はFGF受容体のmRNAを発現すること²¹⁾、また、a-FGFとb-FGFは低細胞密度あるいは細胞間の結合が低下した状態で合成が盛んになることが報告²²⁾²³⁾されている。光凝固を受けた色素上皮細胞では、a-FGFとb-FGFが免疫学的に検出される⁶⁾。光凝固部周辺の生細胞の密度の低下が色素上皮細胞のFGF合成を促し、FGFがautocrineあるいはparacrineに作用して細胞のDNA合成を上昇させることが光凝固後の色素上皮細胞のDNA合成に対するFGFの作用として考えられる。TGF- β については、色素上皮細胞を光凝固するとその合成と分泌が上昇して、レーザー凝固による新生血管の抑制の分子的背景になることが報告²⁴⁾²⁵⁾されている。細胞の増殖や運動を調整する種々の因子や、その受容体の光凝固後の合成分泌や発現の時間変化を明らかにすることは、網膜色素上皮を含めた眼球組織の光凝固後の細胞の反応の調節に必要である。

培養細胞を用いた実験は光凝固後の細胞の変化の理解に有用な手段であり、本研究は培養色素上皮細胞の光凝固後の自然経過の基礎的な情報を提供するものである。生体内で色素上皮細胞の置かれている環境に近い培養条件でのレーザー光凝固は、色素上皮細胞単独の変化の情報として、治療目的で光凝固された眼球の変化を理解するために有用であると考えられる。

文 献

- 1) Wilson DJ, Finkelstein D, Quigley HA, Green WR: Macular grid photocoagulation. An experimental study on the primate retina. Arch Ophthalmol 106: 100-105, 1988.
- 2) Folk JC, Sneed SR, Folberg R, Coonan P, Pulido JS: Early retinal adhesion from laser photocoagulation. Ophthalmology 96: 1523-1525, 1989.
- 3) 沖坂重邦: 眼底疾患とレーザー光凝固. 日本の眼科 61: 1149-1162, 1990.
- 4) Pollack A, Korte GE: Repair of retinal pigment epithelium and its relationship with capillary endothelium after krypton laser photocoagulation. Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 890-898, 1990.
- 5) Pollack A, Korte GE: Restriction of the outer blood-retinal barrier after krypton laser photocoagulation. Ophthalmic Res 25: 201-209, 1993.
- 6) Smiddy WE, Fine SL, Quigley HA, Dunkelberger G, Hohman RM, Addicks EM: Cell proliferation after laser photocoagulation in primate retina. An autoradiographic study. Arch Ophthalmol 104: 1065-1069, 1986.
- 7) Zang NL, Samadani EE, Frank RN: Mitogenesis and retinal pigment epithelial cell antigen expression in the rat after krypton laser photocoagulation. Invest Ophthalmol Vis Sci 34: 2412-2424, 1993.
- 8) Eidinoff ML, Cheong L, Rich MA: Incorporation of unnatural pyrimidine bases into deoxyribonucleic acid of mammalian cells. Science 129: 1550-1551, 1959.
- 9) Itoh Y, Eguchi G: *In vitro* analysis of cellular metaplasia from pigmented epithelial cells to lens phenotypes: A unique model system for studying cellular and molecular mechanisms of "transdifferentiation". Dev Biol 115: 353-362, 1986.
- 10) Song M-K, Lui GM: Propagation of fetal human RPE cells: Preservation of original culture morphology after serial passage. J Cell Physiol 143: 196-203, 1990.
- 11) Campochiaro PA, Hackett SF: Corneal endothelial cell matrix promotes expression of differentiated features of retinal pigmented epithelial cells: Implication of laminin and basic fibroblast growth factors as active components. Exp Cell Res 57: 539-547, 1993.
- 12) Hergott GE, Kalnins VI: Expression of proliferating cell nuclear antigen in migrating retinal pigment epithelial cells during wound healing in organ culture. Exp Cell Res 195: 307-314, 1991.
- 13) Del Priore LV, Glaser BM, Quigley HA, Green WR: Response of pig retinal pigment epithelium to laser photocoagulation in organ culture. Arch Ophthalmol 107: 119-122, 1989.
- 14) Verstraeten TC, Buzney SM, Macdonald SG, Neufeld AH: Retinal pigment epithelium wound closure *in vitro*. Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 481-488, 1990.
- 15) Schweigerer L, Malerstein B, Neufeld G, Gospodarowicz D: Basic fibroblast growth factor is synthesized in cultured retinal pigment epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 143: 934-940, 1987.
- 16) Tanihara H, Yoshida M, Matsumoto M, Yoshimura N: Identification of transforming growth factor- β expressed in cultured human retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 34: 413-419, 1993.
- 17) Leschey KH, Hackett SF, Singer JH, Campochiaro PA: Growth factor responsiveness of human retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 839-846, 1990.
- 18) Campochiaro PA, Glaser BM: Platelet-derived growth factor is chemotactic for human retinal pigment epithelial cells. Arch Ophthalmol 103: 576-579, 1985.
- 19) Amin R, Pulkin JE, Frank RN: Growth factor localization in choroidal neovascular membranes

- of age-related macular degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 35 : 3178—3188, 1994.
- 20) **Frank RN, Das A, Wever ML**: A model of subretinal neovascularization in the pigmented rat. *Curr Eye Res* 8 : 239—247, 1989.
- 21) 松島正史, 緒方奈保子, 高田百合子, 戸部隆雄, 山田晴彦, 高橋寛二, 他: 実験的脈絡膜新生血管形成過程における線維芽細胞増殖因子のレセプター-1発現の *in situ* hybridizationによる証明. *日眼会誌* 99 : 642—648, 1995.
- 22) **Kitaoka T, Bost LM, Ishigooka H, Aotaki-Keen AE, Hjelmeland LM**: Increasing cell density down-regulates the expression of acidic FGF by human RPE cells *in vitro*. *Curr Eye Res* 12 : 993—999, 1993.
- 23) **Bost LM, Aotaki-Keen AE, Hjelmeland LM**: Cellular adhesion regulates bFGF gene expression in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 58 : 545—552, 1994.
- 24) **Matsumoto M, Yoshimura N, Honda Y**: Increased production of transforming growth factor- β 2 from cultured human retinal pigment epithelial cells by photocoagulation. Invest Ophthalmol Vis Sci 35 : 4245—4252, 1995.
- 25) **Yoshimura N, Matsumoto M, Shimizu H, Mandai M, Hata Y, Ishibashi T**: Photocoagulated human retinal pigment epithelial cells produce an inhibitor of vascular endothelial cell proliferation. Invest Ophthalmol Vis Sci 36 : 1686—1691, 1995.
-