

Vitamin E succinate の培養ウシ脈絡膜血管内皮細胞に対する増殖抑制効果

坂本 泰二, 大島 裕司, 石橋 達朗, 猪俣 孟

九州大学医学部眼科学教室

要 約

Vitamin E succinate (VE succinate) が培養ウシ脈絡膜血管内皮細胞の増殖抑制に及ぼす効果を調べた。培養ウシ脈絡膜血管内皮細胞を vitamin E (VE), もしくは VE 誘導体 (γ -tocopherol, VE phosphate, VE succinate, VE nicotinate, VE acetate, trolox : 濃度 0.1~100 μ M) を含む培養液で培養し, 脈絡膜血管内皮細胞の増殖能を, 3 H-thymidine 取り込み法ならびに細胞数計測法により検討した。特に, VE と VE succinate については, 増殖期と増殖停止期に分けて, 細胞増殖能の検討を行った。また, VE succinate が脈絡膜血管内皮細胞増殖に及ぼす作用にプロテインキナーゼ C (PKC) が働いているかどうかをみるために, PKC 刺激薬 phorbol ester を加えて VE succinate と共培養し, 細胞増殖を調べた。

その結果, VE succinate は 10 μ M 以上の濃度で, 著明な細胞増殖抑制効果を示した。これは, チミジン取り込み試験, 細胞数計測の双方でみられた。他の VE 誘導体にこの作用はみられなかった。細胞増殖抑制効果は, 増殖期細胞でより著明であった。Phorbol ester と共培養することで, VE succinate の細胞増殖抑制効果は減弱した。VE succinate は脈絡膜血管内皮の増殖を抑制し, この作用には PKC が関係している。(日眼会誌 100 : 777-782, 1996)

キーワード : 脈絡膜血管内皮細胞, 加齢性黄斑変性, 脈絡膜血管新生, Vitamin E, Vitamin E succinate, 抗酸化作用

Inhibitory Effect of Vitamin E Succinate on the Proliferation of Cultured Bovine Choroidal Endothelial Cells

Taiji Sakamoto, Yuji Oshima, Tatsuro Ishibashi
and Hajime Inomata

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyushu University

Abstract

We report the effect of vitamin E succinate (VE succinate) on the proliferation of cultured bovine choroidal endothelial cells (BCECs). BCECs were incubated with a medium containing vitamin E (VE) or one of the VE derivatives γ -tocopherol, VE phosphate, VE succinate, VE nicotinate, VE acetate, or trolox, at a concentration of 10 μ M. The proliferation of BCECs was assessed by 3 H-thymidine uptake and cell counting. Especially in VE and VE succinate, the proliferation assay was performed on BCECs at two different stages, that is, the proliferating stage and the quiescent stage. The effect of protein kinase C (PKC) stimulator phorbol ester (PMA) on the VE succinate-induced inhibition of BCEC proliferation was also examined. VE suc-

cinatate was found to significantly inhibit BCEC proliferation at a concentration of 10 μ M or greater both by 3 H-thymidine uptake assay and by cell counting. This inhibitory effect was not noted in other VE derivatives. The inhibitory effect was the most prominent in the proliferating BCECs and co culture of PMA. VE succinate inhibits the proliferation of cultured BCECs and PKC is involved in this action at least in part. (J Jpn Ophthalmol Soc 100 : 777-782, 1996)

Key words : Choroidal vascular endothelial cells, Age-related macular degeneration, Choroidal neovascularization, Vitamin E, Vitamin E succinate, Antioxidant

別刷請求先 : 812 福岡県福岡市東区馬出 3-1-1 九州大学医学部眼科学教室 坂本 泰二
(平成8年3月22日受付, 平成8年5月30日改訂受理)

Reprint requests to : Taiji Sakamoto, M.D. Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka-ken 812, Japan
(Received March 22, 1996 and accepted in revised form May 30, 1996)

I 緒 言

加齢性黄斑変性の患者数は年々増加している。特に、欧米では50歳以上の失明原因の第1位であり、加齢性黄斑変性の治療法の開発は眼科における極めて重要な問題である^{1)~3)}。脈絡膜血管新生は、加齢性黄斑変性の視力予後不良の主因であり、その原因は明らかではないが、組織学的検索や実験病理学的検索により、病変部におけるマクロファージなどの炎症細胞や網膜色素上皮細胞の反応が重要であると考えられている^{4)~8)}。それらの中で、血管新生の中心となるのは脈絡膜血管内皮細胞であり、この細胞の増殖を制御することが網膜下血管新生の抑制につながる。血管内皮細胞の性質は、その由来となる組織ごとに異なることが知られているが⁹⁾、*in vitro*における血管新生抑制薬の効果のほとんどは非脈絡膜血管内皮細胞を用いて調べられている。しかし、網膜下血管新生抑制薬の治療効果の判定のためには、脈絡膜血管内皮細胞を用いる方法が理想的である。

Vitamin E (VE) は抗酸化作用をもつ物質であり、生体中のVEの量は加齢性黄斑変性の発症に関係があるとされている¹⁰⁾¹¹⁾。VE succinate はVEの誘導体であり、腫瘍細胞の増殖や、トランスフォーミング増殖因子(TGF- β)分泌に影響を与えることが知られているので¹²⁾¹³⁾、脈絡膜血管内皮細胞の増殖抑制効果を調べることの意義は大きい。

II 実験方法

培養ウシ脈絡膜血管内皮細胞は、既報の方法を用いて採取した¹⁴⁾¹⁵⁾。10%ウシ胎仔血清(FCS, Grand Island, NY)を含む培養液M 199 (Gibco)を用いて培養し、継代数5~7のものを用いた。実験に用いた薬物は以下のとおりである。VE (Eastman Kodak, New York, NY), γ -tocopherol (Sigma, St Louis, MO), VE succinate (Acros, Geel, Belgium), VE nicotinate (Sigma), VE phosphate (Sigma), VE acetate (Sigma), trolox (Aldrich, Milw, WI)である。また、抗酸化薬を同じ実験に用いた。非水溶性の薬物、VE, γ -tocopherol, VE succinate, VE nicotinate, VE phosphate, VE acetate は95%エタノールに溶解し、エタノールの最終濃度が培養液の0.2%になるようにした。また対照群には、実験群と同様にエタノールの最終濃度を0.2%にした。エタノール濃度が0.5%以下であれば、細胞増殖に影響がないことを確認している¹⁶⁾。

1. 細胞増殖試験

細胞増殖は、細胞数計測法と³H-thymidine 取り込み法を用いた。細胞数計測法では、5,000個の脈絡膜血管内皮細胞を24穴細胞培養プレート(Costar, Cambridge, MA)に入れ、M 199培養液(10% FCSを含む)で培養した。VEもしくはVE誘導体(10 μ M)を上記培養液に加

えて培養した。ここで使用したVE誘導体(10 μ M)は、水溶性VEであるtrolox, VE succinateとその類似物質であるVE nicotinateとVE phosphateである。培養開始から、3日目、5日目に細胞数をヘモサイトメーターを用いて計測した。なお、培養液は3日目に同じものと交換した。

³H-thymidine 取り込み法は、5,000個の脈絡膜血管内皮細胞を24穴細胞培養プレートに入れ、M 199培養液(10% FCS)で培養した。それぞれの培養液に0.1~100 μ MのVE,あるいはVE succinateを入れた。各培養穴に³H-thymidine(0.5 mCi/well, Amersham, Arlington Heights, IL)を入れて12時間培養し、³H-thymidineの活性を既報の方法で測定した¹⁶⁾。一般に、成長因子などが培養細胞の増殖に与える影響は、細胞密度により異なるので、脈絡膜血管内皮細胞25,000個を培養皿に入れて最低48時間培養して、細胞がコンフルエント状態になったのを確認して、同様の方法で³H-thymidineの取り込みを測定した。抗酸化薬butylated hydroxytoluene (BHT, Sigma)を同量加えたものについても同様の実験を行った。

2. Phorbol esterの影響

プロテインキナーゼC(PKC)の代表的な刺激薬であるphorbol ester(phorbol 12-myristate 13 acetate, (PMA) Sigma; 50 nM)を培養液M 199(0.1% FCS含)に入れて30分間培養後、培養液でPMAを洗い流した。0.5 mCi/wellの³H-thymidineを加えて24時間培養後、³H-thymidineを計測した。対照としてphorbol esterの一種である4 α -phorbol 12,13-didecanoate(Sigma)を用いた。PKCをPMAで活性化した場合のVE succinateの細胞に与える影響を調べるため、PMAとVE succinateの同時刺激を行った。まず、PMA(10 nM)を含む培養液M 199(0.1% FCS含)で30分間培養後、phosphate buffered saline(PBS)で3回洗浄後、10 μ M VE succinateを含む培養液M 199(0.1% FCSおよび0.5 mCi/wellの³H-thymidineを含む)で12時間培養後、³H-thymidineを測定した。

3. 細胞障害試験

10 μ Mの薬物を加えた培養液で、脈絡膜血管内皮細胞を24時間培養した後、薬物が培養脈絡膜血管内皮細胞に及ぼす細胞障害性を色素排出試験で調べた¹⁷⁾。

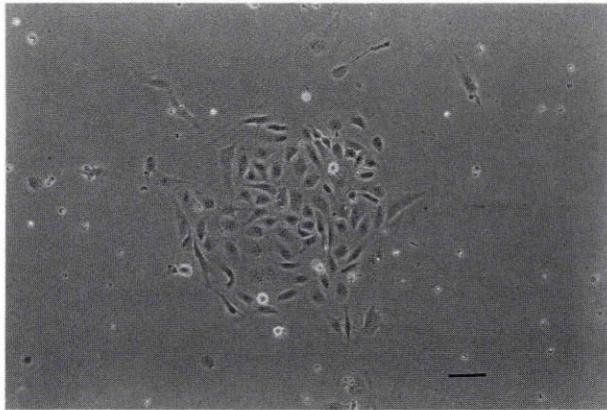
4. 統計学的解析

すべての実験は最低3回以上行い、student's t-testで検定した。有意水準は0.05以下を用いた。

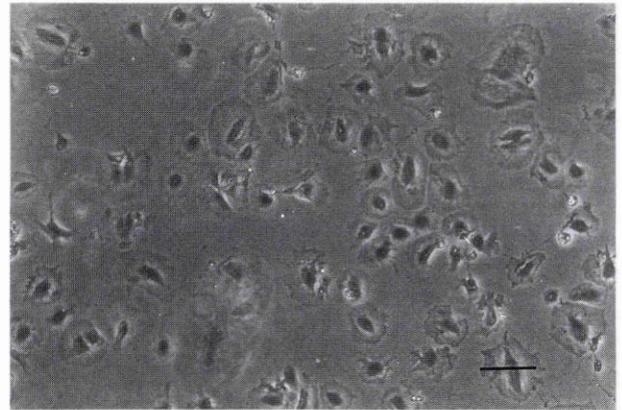
III 結 果

1. 細胞数計測法

薬物を含んだ培養液で脈絡膜血管内皮細胞を培養後3日目になると、VE succinate群では細胞数が増加しなかったのに比べ、他の薬物群ならびに対照群では細胞数



A



B

図1 培養ウシ脈絡膜血管内皮細胞の位相差顕微鏡写真。

A: 通常の脈絡膜血管内皮細胞. B: Vitamin E (VE) succinate (10 μM) を含む培養液で72時間培養した後の血管内皮細胞. 細胞の形態はやや扁平化しているが, 明らかな壊死細胞などは認めない. バーは50 μm

表1 細胞数計測の結果

3日目実験群		
	細胞数(個/well)	
	平均	標準偏差
対照群	8,800	2,200
VE succinate 群	4,100	2,800
VE 群	9,900	1,600
VE nicotinate 群	8,700	1,900
VE phosphate 群	6,900	800
Trolox 群	7,600	700
5日目実験群		
	細胞数(個/well)	
	平均	標準偏差
対照群	24,400	2,100
VE succinate 群	3,800	500*
VE 群	26,500	3,300
VE nicotinate 群	22,200	4,100
VE phosphate 群	22,500	2,700
Trolox 群	23,500	2,500

*: 対照群に比べて統計学的有意差が認められた(p<0.01)

VE: Vitamin E

が増加していたが, 統計学的有意差はなかった. 5日目には, VE succinate 群は対照群に比べ有意に細胞数が少なかった(p<0.01). VE 群の細胞数は, 対照群よりも少ない傾向にあったが, 統計学的有意差はなかった. 他の VE 誘導体と, 対照群の間には差はみられなかった(図1, 表1).

2. ³H-thymidine 取り込み法

5,000 個の脈絡膜血管内皮細胞を培養皿に播いた実験では, VE, BHT ともに ³H-thymidine の取り込みを促進した. VE 群と対照群の間には統計学的有意差があった(p<0.05, 図2). 一方, VE succinate 群以外の VE 誘導体群は, 対照群との間に統計学的有意差はなかったが, VE succinate は著明に ³H-thymidine の取り込みを抑制した. 特に, 抗酸化作用がない VE 誘導体 γ-tocopherol

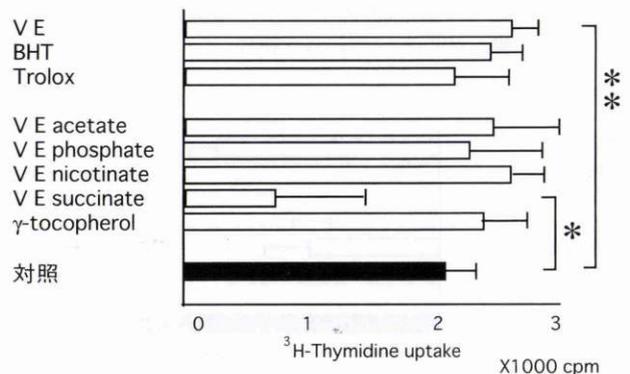


図2 Vitamin E(VE)誘導体が培養ウシ脈絡膜血管内皮細胞の³H-thymidine 取り込みに与える影響.

VE, 対照と比べて, 脈絡膜血管内皮細胞の³H-thymidine 取り込みを刺激したが, 他の VE 誘導体は作用は示さない(**: p<0.05). また, VE succinate は, 明らかに³H-thymidine 取り込みを抑制している(*: p<0.01). BHT: Butylated hydroxytoluene

群と対照群との差はみられなかった.

5,000 個の細胞を播いた実験では, 10 μM 以上の濃度の VE succinate は細胞の³H-thymidine の取り込みを有意に抑制した(p<0.01, 図3A). 25,000 個の細胞を播いた実験では, 100 μM の最高濃度でも対照群と VE succinate 群の間には統計学的有意差はなかった(図3B).

3. Phorbol ester の影響

PMA で30分間刺激すると, 脈絡膜血管内皮細胞の³H-thymidine 取り込みは軽度減少した. しかし, これは統計学的に有意な差ではなかった. 4 α-phorbol 12,13-didecanoate 群と対照群の間には, 統計学的有意差はなかった. PMA で刺激した後, VE succinate を含む培養液で培養すると, 上記実験でみられた VE succinate の³H-thymidine 取り込み抑制効果は減少して, 対照群と差がなくなった. VE succinate 群と VE succinate+PMA 群の間には, 統計学的有意差があった(p<0.05)(図4).

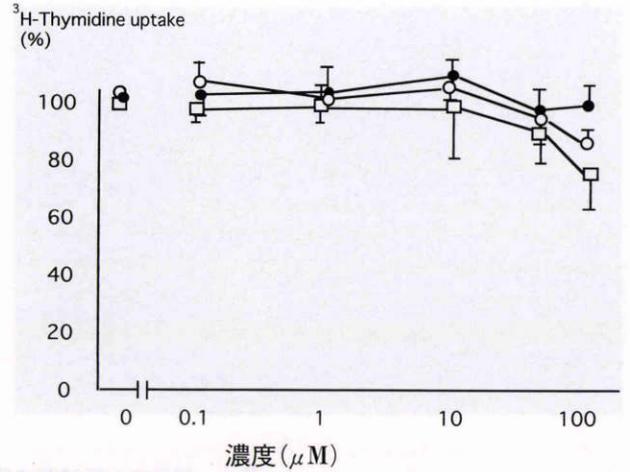
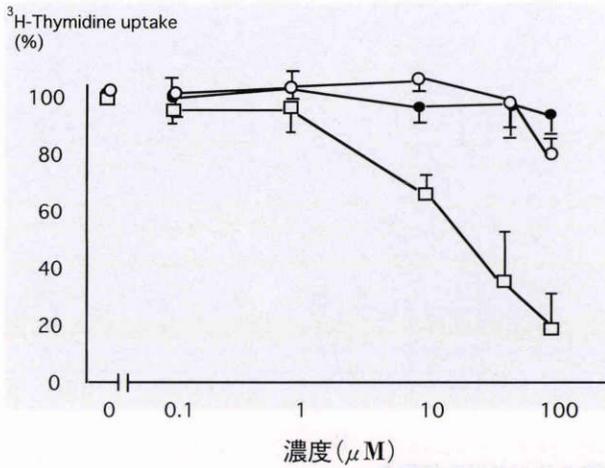


図3 VE succinate が培養ウシ脈絡膜血管内皮細胞の ³H-thymidine 取り込みに与える影響.

A : 5,000 個の細胞を用いた場合, B : 25,000 個の細胞を用いた場合, 対照群の平均 1,200 cpm を 100% としている (n=4). 増殖状態にある細胞 (A) の ³H-thymidine 取り込みは VE succinate により抑制される (p < 0.01) が, 増殖停止状態 (B) の細胞の ³H-thymidine 取り込みは VE succinate により抑制されない.

● : 対照, □ : VE succinate, ○ : VE

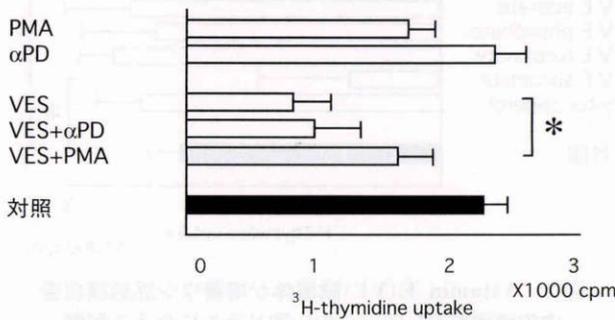


図4 Phorbol ester が培養ウシ脈絡膜血管内皮細胞の ³H-thymidine 取り込みに与える影響.

PMA (10 nM) を含む培養液で 30 分間培養すると, 脈絡膜血管内皮細胞の ³H-thymidine 取り込みは抑制されるが, αPD にはそのような作用はない. PMA を含む培養液で 30 分間培養後, VE succinate で培養すると VE succinate による ³H-thymidine 取り込み抑制作用は減弱される (* : p < 0.05). VES : VE succinate, PMA : phorbol 12-myristate 13 acetate, αPD : 4 α-phorbol 12,13-didecanoate

4. 細胞障害試験

10 μM の VE ならびに VE 誘導体を含む培養液で 24 時間培養した後でも, 生細胞率はすべて 90% 以上であり, これらの薬物は明らかな細胞障害性を示さなかった (表 2).

IV 考 按

本実験では, 培養ウシ脈絡膜血管内皮細胞を用いて VE succinate の増殖抑制効果を調べた. VE は, 培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の増殖を刺激することが報告¹⁸⁾されている. この作用は, 主に VE の抗酸化作用によることが推察されている. 本実験では, 抗酸化薬 BHT が VE

表 2 細胞障害試験の結果

薬 物	生細胞率
VE	94.7%
γ-tocopherol	96.2%
VE succinate	93.3%
VE nicotinate	95.5%
VE phosphate	97.2%
VE acetate	92.9%
Trolox	96.8%

生細胞率は, 5 回の実験の平均である.

と同様に, 脈絡膜血管内皮細胞の ³H-thymidine 取り込み刺激作用を持ち, 抗酸化作用をもたない VE である γ-tocopherol にその作用がなかったことから, VE の様々な作用のうち, 特に抗酸化作用が細胞増殖を刺激したと考えられる. 対称的に, VE succinate は培養脈絡膜血管内皮細胞の増殖を抑制し, ³H-thymidine 取り込みも抑制した. この作用は, 10 μM から明らかになり, 100 μM では対照の 20% ほどになった. 10 μM の VE succinate が他の VE や VE 誘導体と同様に, 明らかな細胞障害性を示さなかったことから, この VE succinate の細胞増殖抑制作用は非特異的な細胞障害作用ではない. さらに, この ³H-thymidine 取り込み抑制作用は, コンフルエント状態になるような細胞には働かなかったことから, VE succinate は増殖期の脈絡膜血管内皮細胞に特異的に働く可能性がある. しかし, コンフルエント状態では細胞が増殖しないため, 通常どおりの ³H-thymidine 取り込みが得られないために, このような結果が得られた可能性がある.

PKC は, 細胞内の刺激伝達に関わる重要な蛋白質である. PMA は最も良く知られた PKC 刺激薬であり, 多く

のPKCサブタイプを活性化する。今回の実験で、PMAが脈絡膜血管内皮細胞の増殖を軽度抑制したことから、少なくともPKCの活性化は、脈絡膜血管内皮細胞増殖には抑制的に働くようである。ここで、VE succinateの細胞増殖抑制作用がPMAの前処置で軽減されたことは、VE succinateの細胞増殖抑制作用に、少なくとも細胞内PKCの活性化が関係あることを示唆する。しかし、PMAは強力なPKCの活性化作用があるためにVE succinateによるPKCの活性化、不活化のどちらもマスクした可能性があり、VE succinateの作用は細胞内PKCにどのように(活性化あるいは不活化)働いたかは確かではない。近年、PMAはPKC以外の酵素にも作用することが報告¹⁹⁾²⁰⁾されており、PKC以外の因子の関与も考慮する必要がある。

VE succinateは、培養腫瘍細胞や網膜色素上皮細胞の増殖を抑制することが報告¹²⁾¹³⁾されている。特に、腫瘍細胞のTGF- β の分泌を刺激するとされている。TGF- β は、培養血管内皮細胞の増殖を抑制することが知られており²¹⁾²²⁾、今回の実験ではVE succinateが脈絡膜血管内皮細胞からのTGF- β の分泌を刺激して、その結果として、細胞増殖を抑制した可能性がある。

実際上の脈絡膜血管新生においては、脈絡膜血管内皮のみならず、網膜色素上皮細胞などの周辺の細胞との相互作用が重要である⁶⁾⁷⁾¹⁴⁾。網膜色素上皮細胞はTGF- β をそれ自身で産生し²³⁾、その作用にはPKCが関与していることが証明されており²⁴⁾²⁵⁾、VE succinateの*in vivo*の状態での働きはさらに複雑であろう。また、TGF- β は*in vivo*の系では血管新生を刺激するので、血管新生抑制薬として使用可能かどうかについての*in vivo*の実験は必要である²⁶⁾。しかし、*in vitro*で脈絡膜血管内皮細胞の増殖抑制に働いたことは、VE succinateの脈絡膜血管新生治療薬としての大きな可能性を示唆する。

本研究の一部は、持田記念医学薬学振興財団の研究助成により行われた。

文 献

- 1) Ryan SJ, Stout JT, Dugel PU: Subretinal neovascularization. In: Ryan SJ (Ed): Retina vol 2. Mosby, St Louis, 1027-1047, 1994.
- 2) The Eye Disease Case-Control Study Group: Risk factors for neovascular age-related macular degeneration. Arch Ophthalmol 110: 1701-1708, 1992.
- 3) Evans J, Wormald R: Is the incidence of registrable age-related macular degeneration increasing? Br J Ophthalmol 80: 9-14, 1996.
- 4) Fung WE: Interferon alpha 2 α for treatment of age-related macular degeneration. Am J Ophthalmol 112: 349-350, 1991.
- 5) Thomas MA, Ibanez HE: Interferon alpha-2 α in the treatment of subfoveal choroidal neovas-

cularization. Am J Ophthalmol 115: 563-568, 1993.

- 6) Ishibashi T, Miller H, Orr G, Sorgente N, Ryan SJ: Morphologic observations on experimental subretinal neovascularization in the monkey. Invest Ophthalmol Vis Sci 28: 1116-1130, 1987.
- 7) Miller H, Miller B, Ishibashi T, Ryan SJ: Pathogenesis of laser-induced choroidal subretinal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 899-908, 1990.
- 8) Penfold PL, Killingworth MC, Sarks SH: Senile macular degeneration: The involvement of immunocompetent cells. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 223: 69-76, 1985.
- 9) Lelkes PI: Conference report: Endothelial cell heterogeneity and organ specificity. Endothelium 1: 69-70, 1993.
- 10) Mares-Perlman JA, Brady WE, Klein R, Klein BEK, Bowen P, Stacewicz-Sapuntzakis M, Palta M: Serum antioxidants and age-related macular degeneration in a population-based case-control study. Arch Ophthalmol 113: 1518-1523, 1995.
- 11) Malinow MR, Feeney-Burns L, Peterson LH, Klein ML, Neuringer M: Diet-related macular anomalies in monkeys. Invest Ophthalmol 8: 857-863, 1980.
- 12) Kline K, Sanders BG: RRR- α -tocopheryl succinate inhibition of lectin-induced T cell proliferation. Nutr Cancer 19: 241-252, 1993.
- 13) Charpentier A, Groves S, Simmons-Menchaca M, Turley J, Zhao B, Sanders BG, et al: RRR- α -tocopheryl succinate inhibits proliferation and enhances secretion of transforming growth factor- β (TGF- β) by human breast cancer cells. Nutr Cancer 19: 225-239, 1993.
- 14) Sakamoto T, Sakamoto H, Murphy TL, Spee C, Soriano D, Ishibashi T, et al: Vessel formation by choroidal endothelial cells *in vitro* is modulated by retinal pigment epithelial cells. Arch Ophthalmol 113: 512-520, 1995.
- 15) Sakamoto T, Ishibashi T, Kimura H, Yoshikawa H, Spee C, Harris MS, et al: Effect of tecogalan sodium on angiogenesis *in vitro* by choroidal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 36: 1076-1083, 1995.
- 16) Sakamoto T, Sakamoto H, Kimura H, Spee C, Hinton DR, Ryan SJ: Vitamin E succinate inhibits proliferation and migration of retinal pigment epithelial cells *in vitro*: therapeutic implication for proliferative vitreoretinopathy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 234: 186-192, 1996.
- 17) Sakamoto T, Sakamoto H, Sheu SJ, Gabrielian K, Ryan SJ, Hinton DR: Intercellular gap formation induced by thrombin in confluent cultured bovine retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 35: 720-729, 1994.

- 18) **Kuzuya M, Naito M, Funaki C, Hayashi T, Yamada K, Asai K, et al:** Antioxidants stimulate endothelial cell proliferation in culture. *Artery* 18: 115—124, 1991.
- 19) **Blumberg PM, Acs G, Acs P, Areces LB, Kazanietz MG, Lewi NE, Szallasi Z:** Protein kinase C in cell signaling: Strategies for the development of selective inhibitors. *Agents & Actions-suppl* 47: 87—100, 1995.
- 20) **大野茂男:** プロテインキナーゼCを巡る新しい展開. (岡山博人 編): 細胞内シグナル伝達経路. メジカルビュー社, 東京, 78—91, 1995.
- 21) **Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA:** An activated form of transforming growth factor β is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4544—4548, 1989.
- 22) **Folkman J, Klagsbrun M:** Angiogenic factors. *Science* 235: 442—447, 1987.
- 23) **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.
- 24) **Sakamoto T, Hinton DR, Sakamoto H, Oganessian A, Kohen L, Gopalakrishna R, et al:** Collagen gel contraction induced by retinal pigment epithelial cells and choroidal fibroblasts involves the protein kinase C pathway. *Curr Eye Res* 13: 451—459, 1994.
- 25) **Sheu SJ, Sakamoto T, Osusky R, Wang HM, Ogden TE, Ryan SJ, et al:** Transforming growth factor- β regulates human retinal pigment epithelial cell phagocytosis by influencing a protein kinase C-dependent pathway. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 232: 695—701, 1994.
- 26) **林 英之:** 血管新生抑制因子. *眼科* 36: 755—764, 1994.