

網膜色素上皮細胞における細胞間連絡と増殖能との関連

矢守 康文

大阪市立大学医学部眼科学教室

要 約

白色家兎眼に実験的に網膜裂孔を作製し、同部における網膜色素上皮細胞のギャップ結合を介する細胞間連絡の変化を、蛍光色素 lucifer yellow CH の拡散を観察する dye-coupling 法により検討した。さらに、抗 proliferating cell nuclear antigen 抗体により同細胞の増殖能の発現について検討し、細胞間連絡の変化と比較した。裂孔作製直後には lucifer yellow CH の隣接する細胞への拡散は広範囲に観察されたが、1週間後ではその程度は著明に制限されていた。1か月後には再び隣接する細胞への色素拡散が認められた。一方、細胞増殖能は1週間

後には亢進し、1か月後には低下していた。増殖能の亢進した腫瘍細胞などではギャップ結合を介する細胞間連絡が低下することが知られているが、裂孔底部の網膜色素上皮細胞においても細胞間連絡と細胞増殖能とが関連を持ち得るものと思われた。(日眼会誌 102:481-486, 1998)

キーワード: 網膜色素上皮細胞, 細胞間連絡, dye-coupling 法, 細胞増殖, 抗 proliferating cell nuclear antigen 抗体

The Correlation between Gap Junction-mediated Communication and Cell Proliferation among Retinal Pigment Epithelial Cells

Yasufumi Yamori

Department of Ophthalmology, Osaka City University School of Medicine

Abstract

I investigated gap junction-mediated intercellular communication during cell proliferation of retinal pigment epithelium (RPE) following experimental retinal tear formation in albino rabbit eyes. I used a dye-coupling method with lucifer yellow CH. I also evaluated the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the RPE cells. Immediately after tear formation, lucifer yellow CH introduced into a target RPE cell appeared in neighboring cells. The number of dye-recipient cells was 33.8 ± 4.7 (mean \pm standard error of the mean). One week later, the number of fluorescent RPE cells decreased to 2.3 ± 0.9 . The extent of dye transfer between RPE cells increased (17.5 ± 4.1). There was no expression of PCNA in RPE cells immediately after

tear formation, but it became apparent as the nuclei of RPE cells became positive for PCNA. The immunoreactive cells and cell population decreased one month later. Because the duration of decreased dye-coupling coincides with that of cell proliferation, these findings suggest that an alteration of gap junctional intercellular communication is involved in RPE cell proliferation in the present experimental setup. (J Jpn Ophthalmol Soc 102: 481-486, 1998)

Key words: Retinal pigment epithelial cell, Intercellular communication, Dye-coupling method, Cell proliferation, Proliferating cell nuclear antigen

I 緒 言

網膜色素上皮(以下、RPE)細胞における細胞間接着装置の一つとしてギャップ結合が存在することは形態学によく知られている¹⁾。ギャップ結合は隣接する細胞間の

細胞質同志を連絡する細胞小器官であって、親水性のチャンネルを形成し、このチャンネルを通じて電流や糖・アミノ酸・ビタミン・ヌクレオチドなどの低分子の物質が移動することで、細胞間の情報伝達が行われる場であるとされている²⁾。電氣的に非興奮性の細胞において、

別刷請求先: 554-0051 大阪府大阪市阿倍野区旭町1-5-4 矢守 康文
(平成9年10月28日受付, 平成10年3月13日改訂受理)

Reprint requests to: Yasufumi Yamori, M.D. Department of Ophthalmology, Osaka City University School of Medicine, 1-5-4 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka-shi, Osaka-fu 554-0051, Japan

(Received October 28, 1997 and accepted in revised form March 13, 1998)

ギャップ結合を介する細胞間連絡が機能的にどのような意義をもつかという点については今なお不明の要素が多いが、腫瘍細胞などを用いた研究成果によれば³⁾、ギャップ結合が細胞の分化と増殖の調節に深く関与していることが次第に明らかになっている。

ギャップ結合の検索にはフリーズフラクチャなどの形態学的手法によるもの、パッチクランプなどの電気生理学的手法によるものがあるが、蛍光色素 lucifer yellow CH をガラス微小電極を用いて細胞内に電気泳動的に注入し、隣接細胞への拡散を観察する dye-coupling 法は両者の特徴を併せ持った手法といえる。Lucifer yellow CH はギャップ結合を通じてのみ細胞間を移動し細胞壁を通過しない特性をもつため、その拡散はギャップ結合を介する細胞間連絡の指標とみなすことができる。これが dye-coupling 法の原理とされている⁴⁾。

一方、proliferating cell nuclear antigen (以下、PCNA) は細胞周期の G1 期から S 期にかけて核内に特異的に増加するポリペプチドであり、DNA 複製時に働く DNA ポリメラーゼ δ の補助蛋白として、その活性化に必須の物質とされている⁵⁾。したがって、核内において PCNA が陽性であることは細胞が DNA 複製を行い、増殖の段階に入ったことを示している。このような特性から、PCNA は様々な細胞の増殖活性の安定した指標であることが確認されており、RPE 細胞について検討した報告⁶⁾もある。当教室では従来から実験的網膜裂孔底部における RPE 細胞の形態的・機能的変化に関して検討を加えてきた⁷⁾。今回は、同部の RPE 細胞について、dye-coupling 法によりギャップ結合を介した細胞間連絡の変化を観察するとともに、細胞間連絡と細胞増殖との関連について検討するために、抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色を行い、同細胞の増殖能の変化を観察し、両者の結果を比較した。

II 実験方法

体重 2~3 kg の白色家兎で、検眼鏡検査で眼底に異常のない 40 匹 40 眼を使用した。既報⁷⁾のごとく、硝子体吸引法により眼底後極部に 1 乳頭径前後の網膜裂孔を作製し、そのうち網膜剥離や出血のない 34 匹 34 眼を選んだ。裂孔作製直後、1 週間後、1 か月後の各時期に致死量のペンタバルビタールナトリウム (ネンプタール[®]) を静注して屠殺後、眼球摘出を行った。摘出した眼球は赤道部で半割し、後半部からレーザーを用いて裂孔底部を含む約 15 × 15 mm 大の網脈絡膜切片を切り出した。

1. 細胞間連絡の評価

処置を加えた白色家兎のうち、25 匹 25 眼を使用した。Dye-coupling 法の実際は、以下の手順によった。Lucifer yellow CH (Sigma Chemical Co, Ltd) は 1 M LiCl 溶液に溶かし 2% とし、外径 1.2 mm、内径 0.8 mm ファイバー入りガラス毛細管 (Pyrex Co, Ltd) から作製したガラス微小電極に充填した。この微小電極をマイクロマニピ

レーターにセットし、銀-塩化銀電極を介して微小電極用増幅器 (MEZ-8201, 日本光電) に接続した。マイクロマニピレーターを操作して、リングル液中の支持台にピンで固定した網脈絡膜切片の裂孔底部のほぼ中央に位置する RPE 細胞内に電極を進め、-30~-40 mV の電位低下を記録した時点をもって細胞内に電極が刺入されたものとして負荷流パルス通電による色素注入を開始した。通電は 3 分間行い、この間、通電中の細胞膜電位をモニターし、膜電位を保てなかったものは色素注入不成功例とした。色素注入を終えた RPE 細胞を含む切片はスライドグラスにのせ、無蛍光グリセリンで封入後、落射型蛍光顕微鏡 (BH 2-RFK, オリンパス社) で観察し、Kodak Tri-X pan 400 に撮影した。さらに、全体が均等に染色された細胞を陽性細胞として各時期にその個数を計算し、比較、検討した。

2. 細胞増殖

網膜裂孔を作製した白色家兎のうち、9 匹 9 眼を使用した。網脈絡膜切片は 3.7% ホルムアルデヒドで 1 分間、100% メタノールで 10 分間固定した後に、一次抗体としてマウスモノクローナル抗 PCNA 抗体 (1:100) (Novacastra Laboratories Ltd) を室温で 60 分間反応させ、二次抗体としてフルオレセイン・イソチオシアネイト (FITC) 標識山羊抗マウス IgG+A+M 抗体 (1:30) (Southern Biotechnology Associates, Inc) を室温で 40 分間反応させた。反応を終えた切片は、直ちに無蛍光グリセリンで封入後、蛍光顕微鏡で観察、記録し、Kodak Tri-X pan 400 に撮影した。対照群として、一次抗体の代わりに同量のリン酸緩衝食塩水を滴下したものをを用いた。

III 結果

1. 細胞間連絡の評価

ガラス微小電極を細胞内に 3 分間留置することができ色素注入成功例と考えられたものは、網膜裂孔作製直後 8 眼中 4 眼、1 週間後 9 眼中 4 眼、1 か月後 8 眼中 4 眼であり、色素注入成功率は各時期それぞれ 50, 44, 50% で、全体では 48% であった。

作製直後には、隣接する RPE 細胞間に広範囲な色素の拡散が認められた (図 1)。また、周囲の細胞内に顆粒状の蛍光染が観察されたが、dye-coupling 法では細胞の障害部位を通して色素が流入する場合があります⁸⁾、本実験においても硝子体吸引により感覚網膜を剥離する際に RPE 細胞に障害を生じた可能性があるため、陽性細胞には含めなかった。

1 週間後では、色素拡散の程度は著明に制限されており、微小電極を刺入した細胞に色素が貯留し、隣接する細胞への色素の移動はごく僅かに観察されるのみであった (図 2)。1 か月後では、再び隣接する RPE 細胞間に色素拡散が認められた (図 3)。

各時期について陽性細胞の個数を平均値 ± 標準誤差で



図 1 裂孔作製直後の dye-coupling の観察像。
隣接する網膜色素上皮(RPE)細胞間に広範囲な色素の拡散が認められる。バーは 20 μ m



図 2 裂孔作製 1 週間後の dye-coupling の観察像。
色素拡散は著明に制限されている。バーは 20 μ m

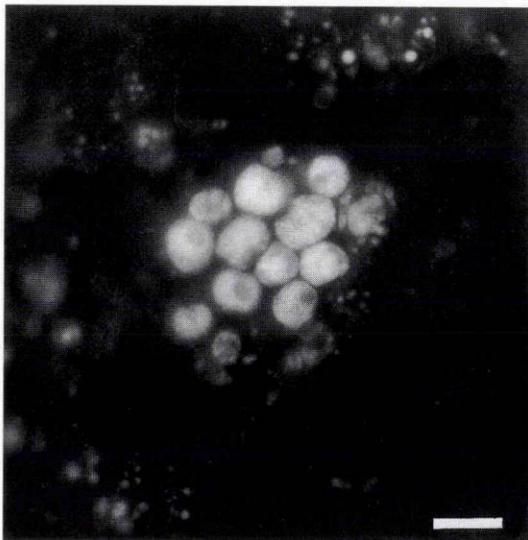


図 3 裂孔作製 1 か月後の dye-coupling の観察像。
隣接する RPE 細胞間に色素拡散が観察される。バーは 20 μ m

表 1 各時期における色素注入成功率と陽性細胞数

	色素注入成功率 (%)	陽性細胞数 (平均値 \pm 標準誤差)
裂孔作製直後	50 % (4/8)	33.8 \pm 4.7
裂孔作製 1 週間後	44 % (4/9)	2.3 \pm 0.9
裂孔作製 1 か月後	50 % (4/8)	17.5 \pm 4.1

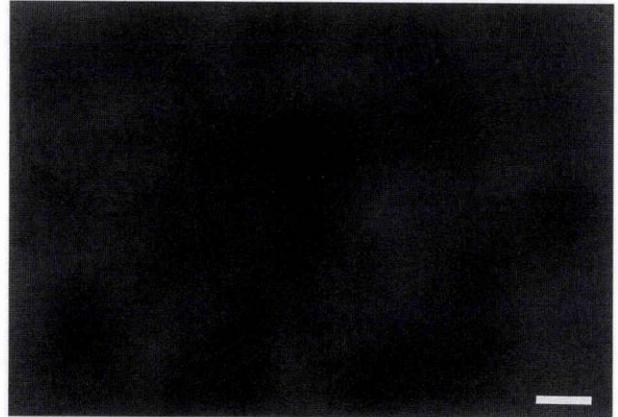


図 4 裂孔作製直後の proliferating cell nuclear antigen(PCNA)発現の観察像。
PCNA 陽性の RPE 細胞は認められない。バーは 50 μ m

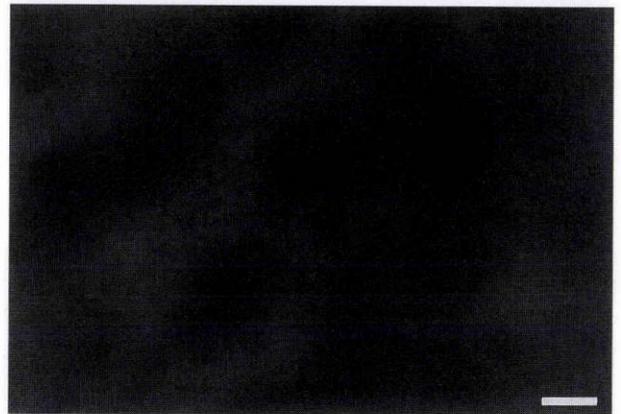


図 5 裂孔作製直後の陰性対照。
PCNA 陽性細胞は認められない。バーは 50 μ m

表し, 有意差の検定を Kruskal-Wallis 検定で行った。作製直後, 1 週間後, 1 か月後の陽性細胞数は 33.8 \pm 4.7 (平均値 \pm 標準誤差), 2.3 \pm 0.9, 17.5 \pm 4.1 であり, 作製直後に比べ 1 週間後では有意に減少していた ($p < 0.05$)。また, 1 か月後の陽性細胞数は 1 週間後に比較すると増加していたが, 作製直後に比べると減少していた (いずれも $p < 0.05$)。表 1 に各時期における色素注入の成功率と陽性細胞数の比較を示した。

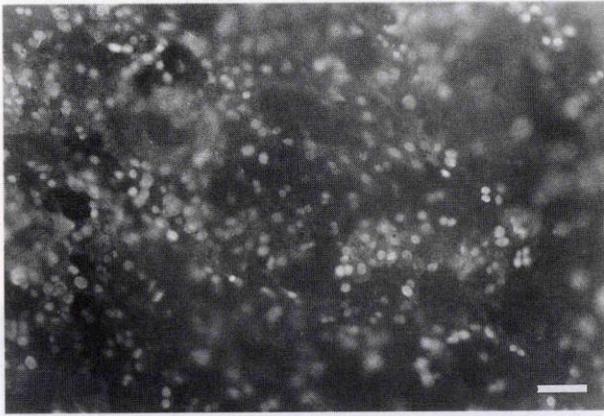


図6 裂孔作製1週間後のPCNA発現の観察像。

裂孔底部のほぼ全面にわたってPCNA陽性細胞が出現している。陽性細胞の中には多核の細胞も多数観察される。バーは50μm

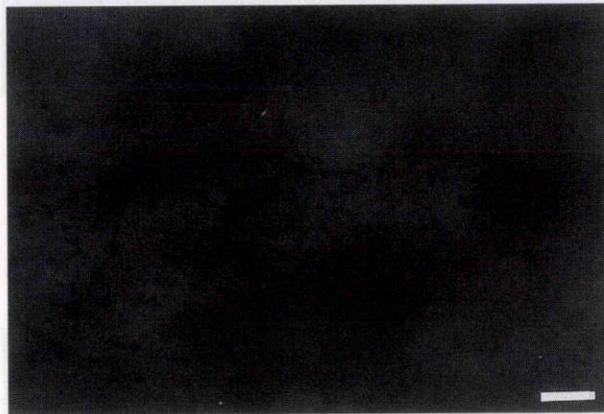


図7 裂孔作製1週間後の陰性対照。

PCNA陽性細胞は認められない。バーは50μm



図8 裂孔作製1か月後のPCNA発現の観察像。

裂孔中央部にPCNA陽性細胞が残存している。バーは50μm

2. PCNA

網膜裂孔作製直後に摘出した3眼では、裂孔底部にPCNA陽性のRPE細胞は認められなかった(図4)。

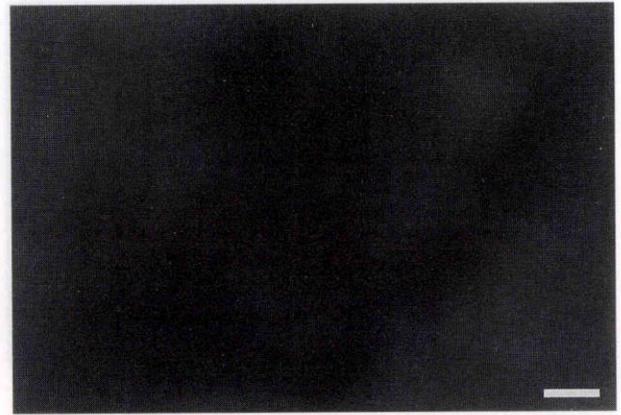


図9 裂孔作製1か月後の陰性対照。

PCNA陽性細胞は認められない。バーは50μm

作製1週間後の3眼では、裂孔底部のほぼ全面にわたってPCNA陽性のRPE細胞が出現していた。PCNA陽性細胞の中には2ないしそれ以上の核をもった細胞も多数存在していた(図6)。

作製1か月後の3眼についてもPCNA陽性のRPE細胞が認められるものの、その数は1週間後に比べて著明に減少していた(図8)。また、作製1週間後にみられた多核の細胞は観察されなかった。PCNA陽性細胞の存在部位については、3眼ともに裂孔底部中央部に存在していたが、2眼では裂孔縁部にも残存していた。また、中間周辺部にはほとんど認められなかった。

また、対照群では作製直後、1週間後、1か月後のいずれの時期においても陽性細胞は観察されなかった(図5, 7, 9)。

IV 考 按

今回の実験では、実験的網膜裂孔底部におけるRPE細胞に関し、ギャップ結合を介する細胞間連絡は裂孔作製1週間後に低下しており、1か月後には回復に向かうこと、RPE細胞の増殖能は裂孔作製1週間後に亢進した状態にあり、1か月後には低下することを示唆する所見が得られた。以下に、両所見の意味するところについて過去の報告をふまえて検討を加えてみたい。

ギャップ結合による細胞間連絡の変化に関する研究は、発癌過程において盛んに行われてきた。腫瘍細胞において細胞間連絡が低下していることは、Lowenstein²⁾が既に1966年に電気生理学的手法を用いて証明しているが、その後の検討により、腫瘍細胞同志というよりはむしろ腫瘍細胞と正常細胞との間で細胞間連絡が低下する例が多いことが明らかにされてきた⁹⁾¹⁰⁾。また、腫瘍細胞と正常細胞とを接触させ細胞間連絡を回復させると、腫瘍細胞の増殖の抑制と形態の正常化が引き起こされることも報告¹¹⁾されている。これらの成果に基づき、小山田ら¹²⁾はギャップ結合による細胞間連絡が腫瘍の形質発現に抑

制的に働く効果があるとの仮説を立てており、現在ではおおむね定説となっている。

一方、RPE 細胞の増殖とギャップ結合との関連については、江口¹³⁾の研究が知られている。彼の実験によれば、フェニルチオ尿素とヒアルロニダーゼの存在下で培養した RPE 細胞は活発に増殖し、やがて分化形質を失って脱分化された状態になり、特定の培養条件ではレンズ細胞の特異性を示すに至るといふ。このような RPE 細胞は、形態的には正常を保っているが、細胞間には dye-coupling が認められず、増殖性の高い脱分化 RPE 細胞はギャップ結合を通じた相互間の連絡を失い、互いに独立した状態にあると述べている。

以上のように、増殖能の亢進した腫瘍細胞あるいは培養 RPE 細胞ではギャップ結合による細胞間連絡が低下した状態にあることを示唆する報告が多い。それでは、網膜裂孔底部 RPE 細胞についてはどうであろうか。同部の RPE 細胞の増殖能に関しては、森脇ら¹⁴⁾が 5-bromodeoxyuridine (以下、BrDU) を用いた検討により RPE 細胞が BrDU をとりこんで DNA 合成を行っていることを報告している。彼らの報告では同細胞の DNA 合成能は作製 3 日後の時点で認められ、その後、次第に上昇して少なくとも 2 か月後まで保持されており、裂孔底部 RPE 細胞が高い増殖能をもつことを証明するものである。同部の RPE 細胞の増殖能の変化に関して、今回は PCNA 発現の点からも改めて検討したところ、裂孔底部 RPE 細胞に PCNA 陽性像が観察されたが、これは森脇らの検討と同様に同部の RPE 細胞が増殖能を発現することを裏付けるものであると思われる。さらに、PCNA 陽性細胞数には変動が認められ、同細胞の増殖能が経時的に変化することを示していた。そこで、増殖能の変化する時期と dye-coupling 法によるギャップ結合を介した細胞間連絡の変化する時期とを比較してみると、増殖能が昂進する時期に細胞間連絡は低下し、その後、増殖能が低下する時期に細胞間連絡は安定化に向かっており、前述の腫瘍細胞や培養 RPE 細胞の増殖能と細胞間連絡との関連に関する見解とよく一致していた。したがって、裂孔底部の RPE 細胞に関してもギャップ結合による細胞間連絡と増殖能とが関連を持ち得るものではないかと考えられる。

勿論、両者の直接の相関関係を証明するには、dye-coupling 法と PCNA を用いた二重染色を行う必要がある。また、裂孔底部内の部位による細胞間連絡の違いについても検討が十分ではない。しかしながら、前述のごとく dye-coupling 法を行った切片は速やかに蛍光顕微鏡下での観察に移さなければ、細胞の障害部位を通じてアーチファクトを生じる恐れがあることや⁸⁾、lucifer yellow CH 溶液の蛍光褪色が早いことから⁴⁾、二重染色での処理や、同一切片に部位を変えて繰り返し微小電極を刺入して観察することができなかつた。さらに、今回の実験系で

は RPE 細胞を露出した状態にしなければ、電極を RPE 細胞内に正確に刺入することや、PCNA 抗体を効率よく反応させることができず、未処理の RPE 細胞と裂孔底部 RPE 細胞との比較が不足したことも問題点としてあげられる。今後、処理時間の短縮などの技法の改良を加えて検討していきたい。

ギャップ結合による細胞間連絡を制御する具体的なメカニズムや因子については、ごく一部が解明されているにすぎない。現在のところ、カルシウムイオンがギャップ結合に存在するカルシウムイオン受容体であるカルモジュリンを介してギャップ結合を閉鎖させることや¹⁵⁾、魚類の水平細胞において水素イオン濃度が細胞間連絡の変動に関与していること¹⁶⁾などが知られている。RPE 細胞に関しては未だ報告が少ないが、既述のごとく、ギャップ結合を介した細胞間連絡機構は細胞の分化・増殖を調節する上で重要な役割を果たすことが知られており、さらなる検討が望まれる。

稿を終えるに当たり、ご校閲を賜りました三木徳彦教授、実験につきご指導いただきました大阪市立大学生理学第一教室松裏修四教授、久野みゆき助教授に謝意を表します。

文 献

- 1) Crawford BJ: Development of the junctional complex during differentiation of chick pigment epithelial cells in clonal culture. Invest Ophthalmol Vis Sci 19: 223—237, 1980.
- 2) Lowenstein WR: Junctional intercellular communication and the control of growth. Biochem Biophys Acta 560: 1—65, 1979.
- 3) 榎本 平: 細胞増殖・分化および情報伝達とギャップ結合. 生体の科学 40: 662—665, 1989.
- 4) Stewart WW: Functional connections between cells as revealed by dye coupling with a highly fluorescent naphthalimid tracer. Cell 14: 741—759, 1978.
- 5) Bravo R, Frank R, Blundell PA: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . Nature 326: 515—517, 1987.
- 6) Hergott GJ, 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.
- 7) 三木徳彦, 三井敏子: 網膜裂孔に関する実験的研究. 1. 長期経過後の走査型電顕的観察. 日眼会誌 82: 10—14, 1978.
- 8) 大塚輝彌, 神山暢夫: 細胞内染色. 病態生理 4: 47—54, 1985.
- 9) Enomoto T, Yamasaki H: Lack of intercellular communication between chemically transformed and surrounding non transformed BALB/c 3 T 3 cells. Cancer Res 44: 5200—5203, 1984.
- 10) Yamasaki H, Hollstein M, Mesnil M, Martel N, Aguelon AM: Selective lack of intercellular com-

munication between transformed and nontransformed cells as a common property of chemical and oncogene transformation BALB/c 3T3 cells. *Cancer Res* 47:5658—5664, 1987.

- 11) **Mehta PP, Bertram JS, Lowenstein WR**: Growth inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells. *Cell* 44:187—196, 1989.
- 12) **小山田正人, 山崎 洋**: ギャップ結合の機能・調節と発癌・癌抑制における役割. *実験医学* 7:1181—1188, 1989.
- 13) **江口吾朗**: 視覚系細胞の分化形質転換とその制御. 武市雅俊, 他(編): シリーズ分子生物学の進歩 8 細胞コミュニテーターの形成. 丸善, 東京, 58—78, 1989.
- 14) **森脇光康, 白木邦彦, 阪本卓司, 上野珠代, 三木徳彦**: 実験的網膜裂孔底部における網膜色素上皮細胞の経時的な増殖能の変化. *眼紀* 42:2213—2216, 1991.
- 15) **藤本 和, 酒井真弘, 小川和朗**: ギャップ結合の細胞化学. *生体の科学* 40:645—649, 1989.
- 16) **菅野義信**: ギャップ結合のバイオロジー. *生体の科学* 40:650—657, 1989.