

水晶体上皮細胞の増殖に及ぼす細胞外基質の影響

黒坂大次郎, 加藤 克彦, 大島 剛, 黒坂 裕代, 吉野 真未, 緒方 雅郎

慶應義塾大学医学部眼科学教室

要 約

目 的: 細胞外基質の水晶体上皮細胞の増殖に及ぼす影響を検討すること。

材料と方法: 5% ウシ胎児血清を添加した培養液に分散したブタ水晶体上皮細胞を, I型コラーゲン, IV型コラーゲン, ファイブロネクチン, ラミニンでコートした, またはコートしていない(対照)24穴プレート上に播種した。24時間後, 96時間後の細胞数を計測し, 両者の細胞数の比を求め細胞増殖を評価した。

結 果: 細胞数の比は, 対照では約2.3倍と細胞数が増加していた。この比は, 細胞外基質でコートした場合に

は, I型コラーゲンで4.0倍, IV型コラーゲンで3.5倍, ファイブロネクチンで3.0倍で, 対照に比し有意に多く, 増殖が促進された。一方, ラミニンでは約2.5倍で, 対照と差がなかった。

結 論: 水晶体上皮細胞の増殖に対し, 細胞外基質が影響を与えることが推定された。(日眼会誌 103: 432—435, 1999)

キーワード: 水晶体上皮細胞, 細胞外基質, ラミニン, コラーゲン, ファイブロネクチン

Extracellular Matrix Influences Proliferation of Cultured Porcine Lens Epithelial Cells

Daijiro Kurosaka, Katsuhiko Kato, Takeshi Oshima, Hiroyo Kurosaka
Mami Yoshino and Masaro Ogata

Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine

Abstract

Purpose: To investigate whether extracellular matrix (ECM) influences the proliferation of cultured lens epithelial cells (LECs).

Material and Methods: Porcine LECs were cultured in F-12 nutrient mixture supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) for 24 or 96 hours on the dishes coated with laminin, fibronectin, type I collagen, or type IV collagen. As a control, LECs were cultured on uncoated dishes. Twenty-four or ninety-six hours later, the number of cells was determined. We determined the proliferation ratio of the number of cells 96 hours after plating to the number of cells 24 hours after plating. This ratio

was used to assess the cell proliferation.

Results: The ratio of the LECs on the uncoated dishes was 2.3. Dish coating with type I or type IV collagen, and fibronectin significantly increased this ratio (4.0, 3.5, and 3.0, respectively), whereas coating with laminin did not affect this ratio (2.5).

Conclusion: These findings suggest that ECM influences cultured porcine LEC proliferation. (J Jpn Ophthalmol Soc 103: 432—435, 1999)

Key words: Lens epithelial cells, Extracellular matrix, Laminin, Collagen, Fibronectin

I 緒 言

白内障術後に残存した水晶体上皮細胞が遊走・増殖・分化した後発白内障を形成する¹⁾。この細胞の遊走・増殖・分化には, 従来から様々な液性因子が関与していることが知られ^{2)~4)}、術後の家兎房水中には, 水晶体上皮細胞の増殖を促進する因子が含まれていることなどが報告⁵⁾

されている。

一方, 細胞外基質も, 細胞接着, 遊走, 増殖, 分化など細胞の活性に影響を及ぼすことが報告^{6)~11)}されている。最近, 人眼, 動物眼の白内障術後組織の免疫組織化学的検討が詳細に行われるようになり, 白内障術後の後発白内障の形成過程では, I, III, IV型コラーゲン, ラミニン, ファイブロネクチンといった細胞外基質の新たな産生や存在

別刷請求先: 160-8582 東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部眼科学教室 黒坂大次郎
(平成 10 年 10 月 8 日受付, 平成 11 年 1 月 26 日改訂受理)

Reprint requests to: Daijiro Kurosaka, M.D. Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine,
35-Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

(Received October 8, 1998 and accepted in revised form January, 26, 1999)

部位の変化などが報告¹²⁾¹³⁾された。これら細胞外基質の変化が術後の後発白内障の形成に関与していると思われるが、水晶体上皮細胞の細胞接着や遊走については、*in vitro* においてラミニンやコラーゲンなどの細胞外基質が影響を与えることが報告⁸⁾¹⁴⁾されている。しかしながら、その増殖に与える影響について検討した報告⁷⁾⁹⁾は少なく、我々は細胞外基質が水晶体上皮細胞の増殖に及ぼす影響について検討したので報告する。

II 実験方法

1. ブタ眼水晶体上皮細胞

屠殺場から新鮮なブタ眼を入手し、水晶体を摘出した。前囊側を下にして 60 mm 培養皿 (Falcon 社) 上に静置し、後囊側から水晶体囊を展開し、水晶体皮質・核を除去して培養した。培養液には 5% ウシ胎児血清 [fetal bovine serum (FBS), Bioserum, Victoria 社], 0.15% sodium bicarbonate solution (Life Technologies 社), 50 units/ml penicillin (Life Technologies 社) と 50 µg/ml streptomycin (Life Technologies 社) を添加した F-12 nutrient mixture (Life Technologies 社) を用いた。5% CO₂, 95% air 37°C の条件下で培養した。

水晶体上皮細胞は継代培養を重ねると本来の性質を失い、通常はあまり産生しない I 型コラーゲンを産生する細胞へ変化する¹⁵⁾。また、インテグリンの発現は培養基質の影響を受け¹⁰⁾、本来の水晶体上皮細胞の性質を調べるには、できるだけ継代せず、また、本来の基底膜上での培養を行うことが大切であると思われる。そこで本研究では、この点を考慮し、展開した水晶体囊上を細胞がほぼ覆った時点で trypsin-EDTA (Life Technologies 社) で細胞を分散し実験に用いた。

2. 細胞接着の評価法

細胞接着は細胞外基質の影響を受けるため、同じ密度の細胞分散液で細胞を播種しても、ウェルに接着した細胞数は一定にならない可能性が考えられる。細胞増殖はウェル中の細胞密度により影響を受ける可能性が考えられるので、播種後 24 時間の細胞数をほぼ一定に保つため、まず、今回の培養条件下での細胞接着に対する細胞外基質の影響を検討した。

5% FBS を添加した F-12 に分散した 1 ウェル当たり 1,700 個の水晶体上皮細胞を各種細胞外基質でコートした Becton Dickinson 社製の 24 穴プレート上に播種し、24 時間培養した。その後、trypsin-EDTA (Life Technologies 社) で細胞を分散し、Coulter Counter (Coulter Electronics 社製) を用いて細胞数を計測し比較した。コートされている細胞外基質はファイブロネクチン、ラミニン、I 型コラーゲン、IV 型コラーゲンで、コートしていない 24 穴マイクロプレートは対照とした。

3. 細胞増殖の評価法

上記の細胞接着の評価法と同様に、水晶体上皮細胞を

24 穴プレート上に播種した。対照のものには上記の細胞接着の時と同様に、5% FBS を添加した F-12 に分散した 1 ウェル当たり 1,700 個の細胞を播種し、残りの細胞外基質をコートしたウェルには培養 24 時間後の細胞数がほぼ等しくなるように、前述の細胞接着の結果を基に細胞数を調整した。培養 24 時間後、96 時間後に細胞数を計測した。しかしながら、24 時間後の細胞数が完全に一致するわけではないので、さらに、正確を期すため増殖の比較には 24 時間後の細胞数に対する 96 時間後の細胞数の比を算出したものを用いて比較した。

4. 統計学的解析

データは平均値±標準偏差で表示した。データの解析には一元分散分析法を用い、さらに、群間の比較には多重比較の方法として Scheffes の S 検定 (Scheffes test) を用いた。危険率 5% 未満を有意とした。

III 実験結果

1. 細胞接着に対する細胞外基質の影響

24 時間後の細胞数は、対照に比し、ラミニンで約 1.2 倍、IV 型コラーゲンで約 1.3 倍、ファイブロネクチンで約 1.1 倍、I 型コラーゲンで約 1 倍で、ラミニンと IV 型コラーゲンでのみ対照のコートしていないウェルに対し有意な差があった (図 1)。この結果を基に、ラミニンで 1/1.2 倍、IV 型コラーゲンで 1/1.3 倍、ファイブロネクチンで 1/1.1 倍に細胞分散液を希釈したものを細胞増殖の実験に用いた。

2. 細胞増殖に対する細胞外基質の影響

細胞接着に対する影響を考慮し、上記のように播種する細胞数を調整した結果、24 時間後の細胞数はほぼ一定

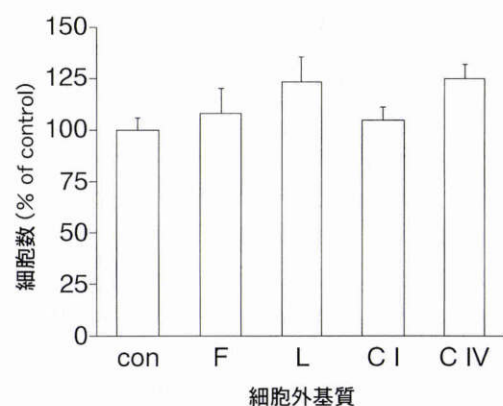


図 1 水晶体上皮細胞の細胞接着に対する細胞外基質の影響。

細胞外基質は細胞接着に影響を与え ($p=0.0041$, 1 元分散分析法), 各群間の比較 (Scheffes の S 検定) では対照に対し、ラミニン ($p=0.0403$) と IV 型コラーゲン ($p=0.0015$) でコートした場合には細胞接着が促進されていた。データは 4 穴の平均値±標準偏差で示す。con: 対照, F: ファイブロネクチン, L: ラミニン, CI: I 型コラーゲン, CIV: IV 型コラーゲン

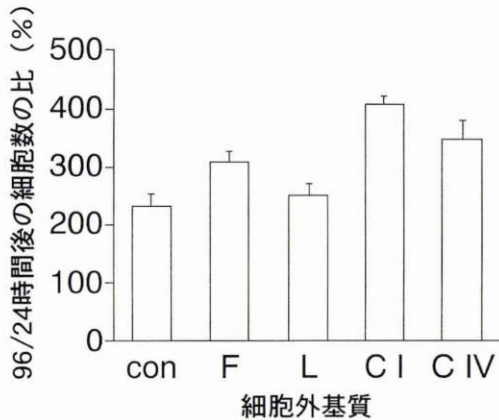


図2 水晶体上皮細胞の細胞増殖に対する細胞外基質の影響.

24時間後の細胞数に対する96時間後の細胞数の比を用いて、細胞増殖を評価した。細胞外基質は細胞増殖に影響を与え ($p < 0.0001$, 一元分散分析法), 各群間の比較 (Scheffes の S 検定) では対照に対し, ファイブロネクチン ($p = 0.0051$), I 型コラーゲン ($p < 0.0001$) と IV 型コラーゲン ($p < 0.0001$) でコートした場合には細胞増殖が促進されていた。データは4穴の平均値±標準偏差で示す。

で, 各群間に有意な差はなかった (Scheffes の S 検定で各群とも対照に対し $p > 0.225$, データは図示せず)。

24時間後の細胞数に対する96時間後の細胞数の比は, 対照では約2.3倍で, 72時間の培養中に細胞が増殖していた。この細胞数の比は, ファイブロネクチンでコートしたものでは約3倍, I型コラーゲンでコートしたものでは約4.0倍, IV型コラーゲンでコートしたものでは約3.5倍, ラミニンでは約2.5倍と対照と比し増加していたが, 前三者にのみ有意な差があった (図2)。

IV 考 按

本研究では, ブタ眼水晶体上皮細胞の増殖に対する細胞外基質の影響を *in vitro* で検討し, コートしていないウエル上での培養に比し, I, IV型コラーゲン, ファイブロネクチンのコートにより細胞増殖は促進され, 一方, ラミニンのコートでは, 増殖は軽度に促進されるものの有意な差はなかった。今回検討した4種類の細胞外基質は, いずれも水晶体上皮細胞の基底膜である水晶体嚢にある成分であるが⁸⁾¹⁶⁾¹⁷⁾, このうちIV型コラーゲンとラミニンが主要構成成分であり⁸⁾¹¹⁾¹⁷⁾, 一方, I型コラーゲン, ファイブロネクチンは, 主に白内障術後に多く存在するものである¹²⁾¹³⁾。従来から水晶体嚢は水晶体上皮細胞の接着・進展・増殖に促進的に働くことが報告⁸⁾¹⁹⁾されているが, 今回の検討からは, その主要構成成分であるIV型コラーゲンとラミニンのうち, 特に前者が増殖に対し促進的に働くことがわかった。三宅ら⁹⁾は水晶体嚢のレンズ側およびIV型コラーゲンのコート上では, マウス水晶体上皮細胞の細胞接着・増殖が旺盛であり, 培養30

日目には, 水晶体嚢のレンズ側の方がさらに増殖が盛んであることを位相差顕微鏡で定性的に観察し報告している。今回の研究では, IV型コラーゲンとラミニンの相互作用については検討していないが, 水晶体嚢で, IV型コラーゲン単独よりも増殖が盛んであることは, 両者により相加効果が生じているのかも知れない。ただし, 一般にラミニンは上皮細胞の増殖を促進するが¹⁸⁾, 網膜色素上皮細胞の培養では, 基底膜構成要素から成る Matrigel 上では, その増殖が抑制されることが報告⁶⁾されており, 細胞によっては増殖を抑制している可能性がある。

一方, 白内障術後に増加すると思われるI型コラーゲンとファイブロネクチンは, 両者とも増殖を促進していた。I型コラーゲンについては, 三宅ら⁹⁾が前述の検討で, I型コラーゲンのシート上では, IV型コラーゲンのコートや水晶体嚢に比べ最も水晶体上皮細胞の接着・増殖が悪かったものとして報告している。今回の検討と結果が異なった原因として, 三宅らの用いたI型コラーゲンがコートでなくシートであったことや, また, 三宅らの研究では培養開始時の細胞数をそろえていなかったため, 培養初期の細胞密度が異なり細胞増殖に影響を与えてしまったことなどが考えられる。一方, ファイブロネクチンは血清中にも存在する物質¹⁹⁾で, 一般に細胞増殖よりも細胞接着・進展を促進する働きがよく知られている¹⁹⁾。今回の細胞接着の結果では, ファイブロネクチンに接着促進効果はなかったが, Olivero ら⁸⁾は無血清培地を用いて検討し, IV型コラーゲンとラミニンに加え, ファイブロネクチンにも細胞接着促進効果があることを報告している。このことは, 今回の細胞接着の結果は, 血清中に存在するファイブロネクチンによりコートしたファイブロネクチンの効果がマスクされてしまった可能性を示唆する。今回の増殖の結果についても同様に, 血清中のファイブロネクチンが影響を与えている可能性も考えられる。

白内障術後に残存した水晶体上皮細胞が遊走・増殖・分化し後発白内障を形成するが, この過程は一様ではない¹⁾¹²⁾¹³⁾。I型コラーゲンとファイブロネクチンが主に存在するようになる部位は, 前囊切開縁を中心として一部の水晶体上皮細胞が筋線維芽細胞様細胞に変化し白濁した線維性混濁を形成する部位である¹²⁾¹³⁾。家兎白内障術後の水晶体上皮細胞は, 術後早期には水晶体嚢の至る所で増殖するものの, 術後1~2か月目には, 水晶体嚢内は本来増殖部位であった赤道部に限局する。一方, 前囊切開縁を中心とした線維性混濁部では, 術後6か月の時点でも細胞が増殖する²⁰⁾。長く増殖活性が存在する部位に今回増殖促進作用があったI型コラーゲンとファイブロネクチンが存在することは, これらの細胞外基質が *in vivo* においても増殖に促進的な作用を及ぼしているのかも知れない。

細胞は細胞外基質と接着する際に, インテグリンを中心としたリセプターを介して結合する。それぞれの基質

には特有のインテグリンが存在している²¹⁾。Nishi ら¹⁴⁾は人眼から白内障手術の際に取り出した前囊片には $\beta 1$ インテグリンなどが存在し、これを 2 週間にわたって培養したものにも同様に存在が確認されることや、インテグリンの抗体とともに基底膜の主要構成要素である IV 型コラーゲンやラミニンでコートしたウエル上で培養すると、水晶体上皮細胞の増殖が抑制されることを報告している。一方、Grushkin-Lerner ら¹⁰⁾は角膜上皮細胞をファイブロネクチンまたはラミニン上で培養すると、発現するインテグリンの種類が異なり、インテグリンの発現は培養基質の影響を受けることを報告している。今回の研究でもコートしていないプラスチック上や I 型コラーゲン、ファイブロネクチンのコート上での培養では、水晶体上皮細胞のインテグリンの発現が変化している可能性が考えられる。これらインテグリンの発現の変化など、細胞の性質の変化が増殖動態に影響を与えている可能性も考えられる。

今回の検討により水晶体上皮細胞の増殖に細胞外基質が影響を与えることがわかったが、白内障術後の細胞外基質の役割を明らかにするためには、さらにインテグリンの発現の変化や水晶体上皮細胞の分化への影響などを検討することが必要である。

稿を終えるに当たり、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部眼科学教室小口芳久教授に深謝いたします。

本研究の一部は、文部省科学研究費(奨励 A 09771469)の補助によって行った。

文 献

- 1) Apple DJ, Solomon KD, Tetz MR, Assia EI, Holland EY, Legler UF, et al: Posterior capsule opacification. *Surv Ophthalmol* 37: 73—116, 1992.
- 2) 並木真理: 家兎眼内レンズ移植術後の房水中塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)・トランスフォーミング成長因子 α (TGF α)の定量. *日眼会誌* 98: 334—339, 1994.
- 3) Nishi O, Nishi K, Fujiwara T, Shirasawa E, Ohmoto Y: Effects of the cytokines on the proliferation of and collagen synthesis by human cataract lens epithelial cells. *Br J Ophthalmol* 80: 63—68, 1996.
- 4) Kurosaka D, Kato K, Nagamoto T, Negishi K: Growth factors influence contractility and α -smooth muscle actin expression in bovine lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 1701—1708, 1995.
- 5) Wallentin N, Wickstrom K, Lundberg C: Effect of cataract surgery on aqueous TGF-beta and lens epithelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 1410—1418, 1998.
- 6) Williams DF, Burke JM: Modulation of growth in retina-derived cells by extracellular matrices. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1717—1723, 1990.

- 7) Tassin J, Jacquemin E, Courtois Y: Interaction of bovine epithelial lens (BEL) cells with extracellular matrix (ECM) and eye-derived growth factor (EDGF). I. Effects on short-term adhesiveness and on long-term organization of the culture. *Exp Cell Res* 149: 69—84, 1983.
- 8) Olivero DK, Furcht LT: Type IV collagen, laminin, and fibronectin promote the adhesion and migration of rabbit lens epithelial cells *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2825—2834, 1993.
- 9) 三宅三平, 前久保久美子, 三宅謙作, 澤健次郎, 疋田光史: 水晶体上皮細胞の IOL 生体材料に対する接着性および増殖性に関する研究(第 1 報). *眼科手術* 6: 91—96, 1993.
- 10) Grushkin-Lerner LS, Kewalramani R, Trinkaus-Randall V: Expression of integrin receptors on plasma membranes of primary corneal epithelial cells is matrix specific. *Exp Eye Res* 64: 323—334, 1997.
- 11) Parmigiani CM, McAvoy JW: The roles of laminin and fibronectin in the development of the lens capsule. *Curr Eye Res* 10: 501—511, 1991.
- 12) 重光利朗, 馬嶋慶直, 清水美仁: ヒト後発白内障における各種因子の免疫組織化学的検索. *日眼会誌* 102: 531—539, 1998.
- 13) Saika S, Kawashima Y, Miyamoto T, Okada Y, Tanaka SI, Ohmi S, et al: Immunolocalization of prolyl 4-hydroxylase subunits, α -smooth muscle actin, and extracellular matrix components in human lens capsules with lens implants. *Exp Eye Res* 66: 283—294, 1998.
- 14) Nishi O, Nishi K, Akaishi T, Shirasawa E: Detection of cell adhesion molecules in lens epithelial cells of human cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 579—585, 1997.
- 15) Laurent M, Kern P, Courtois Y, Regnault F: Synthesis of types I, III and IV collagen by bovine lens epithelial cells in long-term culture. *Exp Cell Res* 134: 23—31, 1981.
- 16) Marshall GE, Konstas AG, Bechrakis NE, Lee WR: An immunoelectron microscope study of the aged human lens capsule. *Exp Eye Res* 54: 393—401, 1992.
- 17) Elgert KL, Zalik SE: Fibronectin distribution during cell type conversion in newt lens regeneration. *Anat Embryol* 180: 131—142, 1989.
- 18) 久保田俊一郎: ラミニンファミリー. 宮坂昌之, 他(編): *Bio Science 用語ライブラリー細胞接着*, 羊土社, 東京, 60—61, 1996.
- 19) 関口清俊: フィブロネクチン. 宮坂昌之, 他(編): *Bio Science 用語ライブラリー細胞接着*, 羊土社, 東京, 62—63, 1996.
- 20) McDonald JE, Roy FH, Hanna C: After-cataract of the rabbit: Autoradiography and electron microscopy. *Ann Ophthalmol* 6: 37—50, 1974.
- 21) 松浦成昭, 加藤玲子, 高田義一: インテグリン概論. 宮坂昌之, 他(編): *Bio Science 用語ライブラリー細胞接着*, 羊土社, 東京, 80—81, 1996.