

培養ブタ網膜色素上皮細胞に対する副腎皮質ステロイド剤の影響

—1. 増殖抑制作用—

河原 澄枝, 岸本 直子, 菅澤 啓二, 宇山 昌延

関西医科大学眼科学教室

要 約

目 的：網膜色素上皮細胞の機能の一つである増殖に対する副腎皮質ステロイド剤の影響を検討した。

方 法：培養ブタ網膜色素上皮細胞に各種濃度(10～1,000 nM)のリン酸ベタメタゾンナトリウム(ベタメタゾン)を投与して、投与 1, 3, 6, 9, 14 日後の細胞増殖率を算定した。

結 果：ベタメタゾンは濃度依存性に網膜色素上皮細胞の増殖を抑制し、投与後 9 日目からは、300 nM 以上の濃度で網膜色素上皮細胞の増殖を有意に抑制した。10

nM のベタメタゾンでは、網膜色素上皮細胞の増殖抑制・促進のいずれもみられなかった。

結 論：ベタメタゾンは培養網膜色素上皮細胞の増殖を抑制する。(日眼会誌 103: 436—441, 1999)

キーワード：網膜色素上皮細胞, 副腎皮質ステロイド剤, リン酸ベタメタゾンナトリウム(ベタメタゾン), 細胞増殖

Effects of Corticosteroid on Porcine Retinal Pigment Epithelial Cells in Culture

—1. Inhibitory Effect on Cell Proliferation—

Sumie Kawahara, Naoko Kishimoto, Keiji Sugasawa and Masanobu Uyama

Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

Abstract

Purpose : Proliferation is an important function of the retinal pigment epithelial (RPE) cells. The effect of a corticosteroid on the proliferation of cultured porcine RPE cells was investigated.

Methods : After administration of various concentrations (10～1,000 nM) of betamethasone sodium phosphate (betamethasone), we counted RPE cell numbers at 1, 3, 6, 9, and 14 days.

Results : Betamethasone administration resulted in a dose-dependent decrease in RPE cell proliferation. The proliferation of the cultured RPE cells was significantly inhibited by betamethasone, at a dose

of 300 nM in 9 days. Ten-nM betamethasone neither inhibited nor promoted the RPE cell proliferation in culture.

Conclusions : These results suggest that corticosteroids inhibit proliferation of cultured porcine RPE cells. (J Jpn Ophthalmol Soc 103 : 436—441, 1999)

Key words : Retinal pigment epithelial (RPE) cell, Corticosteroid, Betamethasone sodium phosphate (betamethasone), Cell proliferation

I 緒 言

副腎皮質ステロイド剤(ステロイド剤)は、抗炎症作用・抗免疫作用・抗腫瘍作用など種々の薬理作用を持ち¹⁾、炎症性疾患や免疫性疾患・臓器移植後の拒絶反応・白血病や悪性リンパ腫などの悪性腫瘍を始め、様々な疾患の治療に用いられている。ステロイド剤の細胞増殖

に対する影響は、作用する細胞や組織、また、ステロイド剤の投与量によって異なり、その反応は極めて多様性に富んでいる^{1)～5)}。一般にはリンパ球系細胞でみられるように、細胞増殖に抑制的に作用することが多いが、ヒト胎児肺線維芽細胞、ヒト卵巣細胞、ヒト乳腺線維腫由来上皮細胞、ヒト表皮細胞、マウス筋芽細胞などには増殖促進的に作用する^{2)～5)}。また、ヒト線維芽細胞への影響について

別刷請求先：570-8506 守口市文園町 10-15 関西医科大学眼科学教室 河原 澄枝

(平成 10 年 9 月 11 日受付, 平成 11 年 1 月 26 日改訂受理)

Reprint requests to: Sumie Kawahara, M.D. Department of Ophthalmology, Kansai Medical University, 10-15 Fumizono-cho, Moriguchi 570-8506, Japan

(Received September 11, 1998 and accepted in revised form January 26, 1999)

も、正常皮膚由来の細胞では増殖促進、強皮症患者皮膚由来の細胞では不変、慢性関節リウマチ患者の滑膜由来の細胞では抑制と線維芽細胞の由来組織によっても作用の異なる報告⁴⁾があり、一定の傾向は得られていない。

眼科領域では、ステロイド剤は眼内増殖性変化に対して抑制的に作用するとされており、Graham ら⁶⁾および Raichand ら⁷⁾は硝子体手術時の灌流液中にステロイド剤を添加すると、線維芽細胞や網膜色素上皮細胞 (RPE) による術後の眼内増殖性変化が抑制されることを報告した。岸本ら⁸⁾はレーザー網膜光凝固後のサルに大量のベタメタゾン剤を投与すると、RPE 損傷部の修復反応が抑制されることを報告した。さらに、臨床的にも大量のステロイド剤投与が中心性漿液性網脈絡膜症や多発性後極部網膜色素上皮症の発生の誘因になることが示されている^{9)~17)}。これらのことから、RPE にステロイド剤が影響を及ぼすことが証明されているが、その詳細は不明である。

RPE の増殖が関連する疾患には、RPE の反応増殖によって治癒へと向かうもの、RPE の過剰増殖が病像の本態となるもの、RPE の障害が増殖の引き金となるものなどがあり、その病態は様々である。ステロイド剤による RPE の反応増殖抑制が、中心性漿液性網脈絡膜症や多発性後極部網膜色素上皮症の発症誘因の一つである可能性もあり、ステロイド剤の RPE に対する影響を研究することで、中心性漿液性網脈絡膜症や多発性後極部網膜色素上皮症の発生機序や治癒機転解明の手掛かりの一つになるのではないかと考えた。

ステロイド剤は種々の細胞に作用し、また、その作用は多様であるために、*in vivo* では RPE 以外の細胞や組織の影響を大きく受けることになり、RPE そのものの反応をみることは難しい。*In vitro* でも、培養細胞は継代を重ねることにより、細胞本来の生理的機能を失う可能性がある。今回の実験では RPE の増殖に対するステロイド剤の影響をみるために、継代 2 代目のブタ RPE にリン酸ベタメタゾンナトリウム (ベタメタゾン) を投与して、増殖

能の変化、特に投与濃度による細胞増殖率の変化について検討した。また、薬剤投与後の RPE の形態学的変化についても検討した。

II 実験材料および方法

1. ベタメタゾン投与方法

ベタメタゾンは原末を少量の蒸留水で溶解した後、それぞれ培地内で 10, 100, 200, 300, 400, 500, 1,000 nM の濃度になるように培地を調製した。培地としては、16.7% ウシ胎児血清、penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100 µg/ml を添加した Dulbecco 変法 Eagle's minimal essential medium (DMEM) 培地を使用した。

2. 培地の浸透圧

各濃度にベタメタゾンを添加した培地の pH, 浸透圧をそれぞれ測定した。測定には、pH meter (φ45 Beckman pH meter, Beckman Instruments, Fullerton), Auto-Osmometer (Osmostat OM 6020, 京都第一科学) を使用した。

3. RPE の採取・培養方法

屠殺後 8~10 時間以内のブタ眼球から RPE を採取し、1 回の初代培養には 10~15 個の眼球を使用した。

眼球を滅菌リン酸緩衝液で洗浄後、赤道部で半割し、後半部から硝子体・感覚網膜を除去した。残った後方の半球内に 0.25% トリプシン 1 ml を入れ、37℃ に 10 分間静置した。次に、ウシ胎児血清を 1 ml 加えトリプシンの反応を停止させた後、先端を丸くしたパストールピペットでピペッティングにより Bruch 膜を傷つけないように RPE を剥離した。得られた細胞液を遠沈し上清を除去後、16.7% ウシ胎児血清と penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100 µg/ml を添加した DMEM 培地を加え 35 mm プラスチックディッシュに分注し、37℃・5% CO₂・95% air 下で培養した。

初代培養後 10 日~2 週間後に継代培養を行った。シリコングリースを塗布したステンレスカラムを RPE のコロニー上に置き、0.125% トリプシン・0.01% ethyle-

表 1 リン酸ベタメタゾンナトリウム添加後の網膜色素上皮細胞の増殖率

リン酸ベタメタゾン ナトリウム濃度 (nM)		リン酸ベタメタゾンナトリウム添加後の培養日数				
		1 日	3 日	6 日	9 日	14 日
対照	(n = 6)	2.80 ± 0.17	4.30 ± 0.33	4.87 ± 0.43	6.42 ± 0.57	7.19 ± 0.60
10	(n = 5)	2.80 ± 0.78	3.89 ± 0.14	4.73 ± 0.68	5.55 ± 0.90	6.94 ± 0.76
100	(n = 6)	1.94 ± 0.28	2.94 ± 0.17	3.80 ± 0.22	4.12 ± 0.13	5.46 ± 0.52
200	(n = 6)	1.53 ± 0.10	2.53 ± 0.41	3.56 ± 0.04	3.40 ± 0.31	4.55 ± 0.23
300	(n = 6)	1.50 ± 0.16	2.61 ± 0.29	3.61 ± 0.13	2.93 ± 0.43	3.78 ± 0.45
400	(n = 6)	1.22 ± 0.08	1.88 ± 0.12	2.76 ± 0.20	2.38 ± 0.31	2.82 ± 0.15
500	(n = 4)	1.59 ± 0.14	2.32 ± 0.13	2.24 ± 0.23	2.34 ± 0.33	2.35 ± 0.20
1,000	(n = 4)	1.27 ± 0.12	2.10 ± 0.20	2.03 ± 0.10	2.11 ± 0.14	1.84 ± 0.08

n: 測定に使用したディッシュ数, 数値は平均値 ± 標準誤差を示す

nediaminetetraacetic acid(EDTA)を加え約3分間静置した。得られた細胞液を遠沈し上清を除去後,16.7%ウシ胎児血清添加DMEM培地を加え, 1.0×10^4 個/mlの濃度の細胞浮遊液を作製した。コラーゲンコートした24

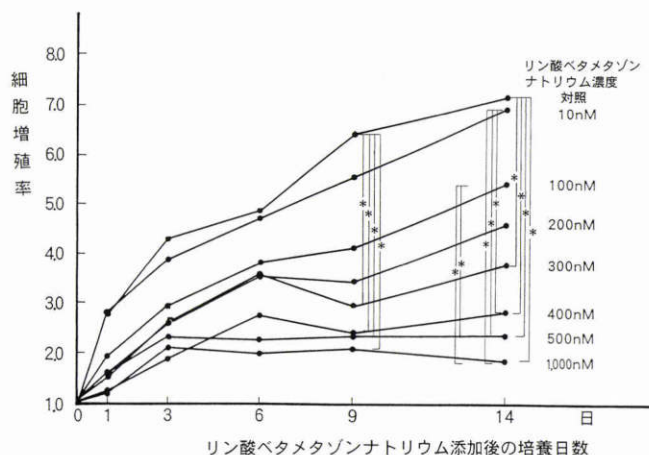


図1 リン酸ベタメタゾンナトリウム添加後の網膜色素上皮細胞(RPE)の増殖率曲線。
10~1,000 nM は培地に添加したリン酸ベタメタゾンナトリウム濃度を表す。*: $p < 0.05$

穴プラスチックディッシュに0.5 ml ずつ分注し,37℃・5% CO₂・95% air 下で培養した。

4. RPE 増殖率の算定方法

実験には,継代2代目の培養RPEを使用した。継代培養後3日目にHanks緩衝液でディッシュを2回洗浄後,上記各濃度のベタメタゾンを添加したDMEM培地と交換した。添加前,および添加後1,3,6,9,14日目にトリプシン・EDTAでプラスチックディッシュから細胞を剥離し,トリパンブルーで染色後,RPEの細胞数を血球計算板を用いて測定した。なお,この間,約3日毎に各種濃度のベタメタゾンを添加した培地を交換した。

5. 形態学的観察

ベタメタゾン添加後のRPEを,細胞の形態や大きさ,細胞間の様子について,位相差顕微鏡(OLYMPUS CK 2)で観察した。

III 結 果

1. 培地の pH・浸透圧

対照の培地は pH 7.72・浸透圧 292 mOsm,ベタメタゾン添加培地(濃度 10 nM~1,000 nM)は pH 7.95~8.27・浸透圧 293~296 mOsmであった。

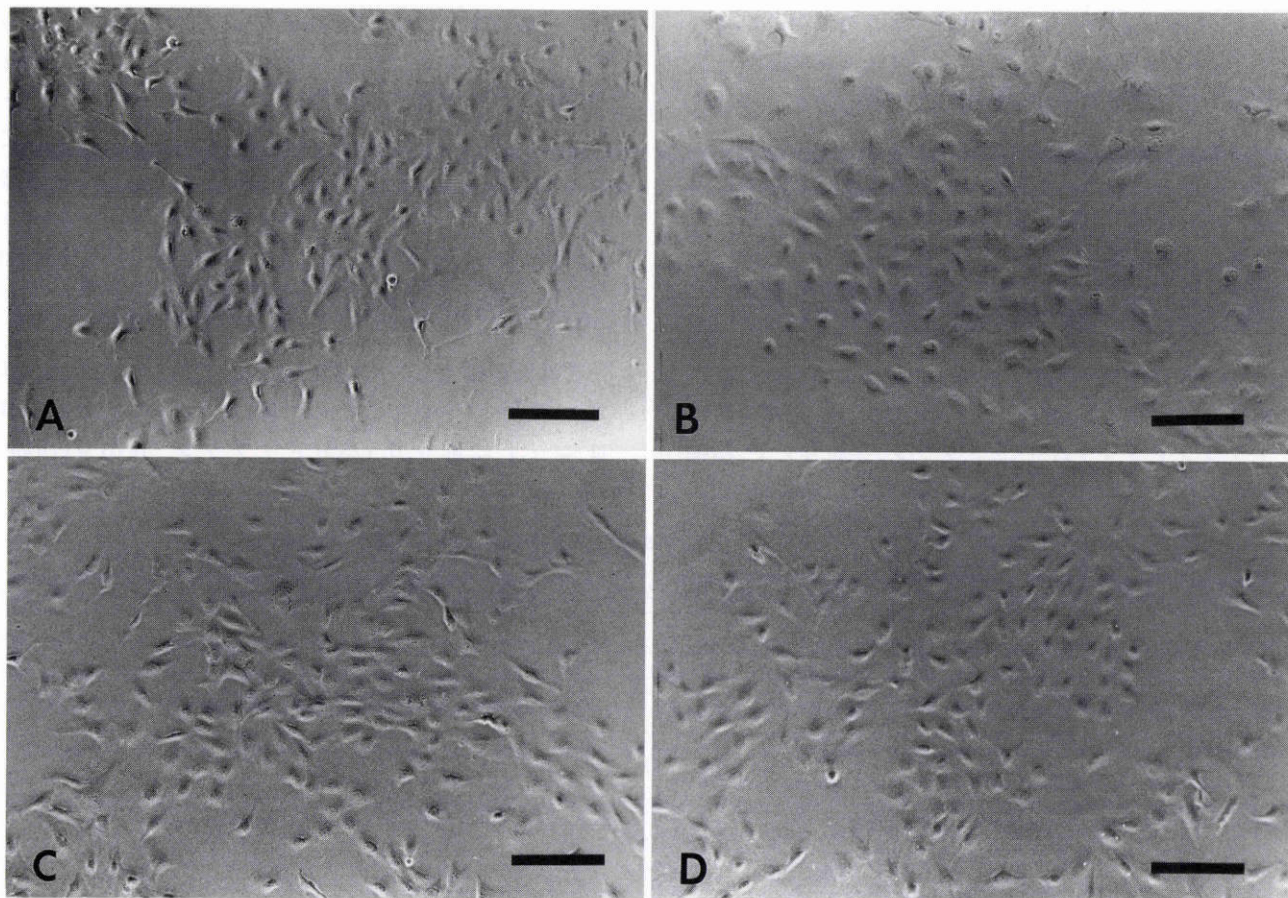


図2 リン酸ベタメタゾンナトリウム添加24時間後の位相差顕微鏡像。

A: 対照, B: 100 nM, C: 500 nM, D: 1,000 nM. 各濃度で細胞の形態に大きな変化はない。バーは0.1 mm, 図3, 4でも同様。

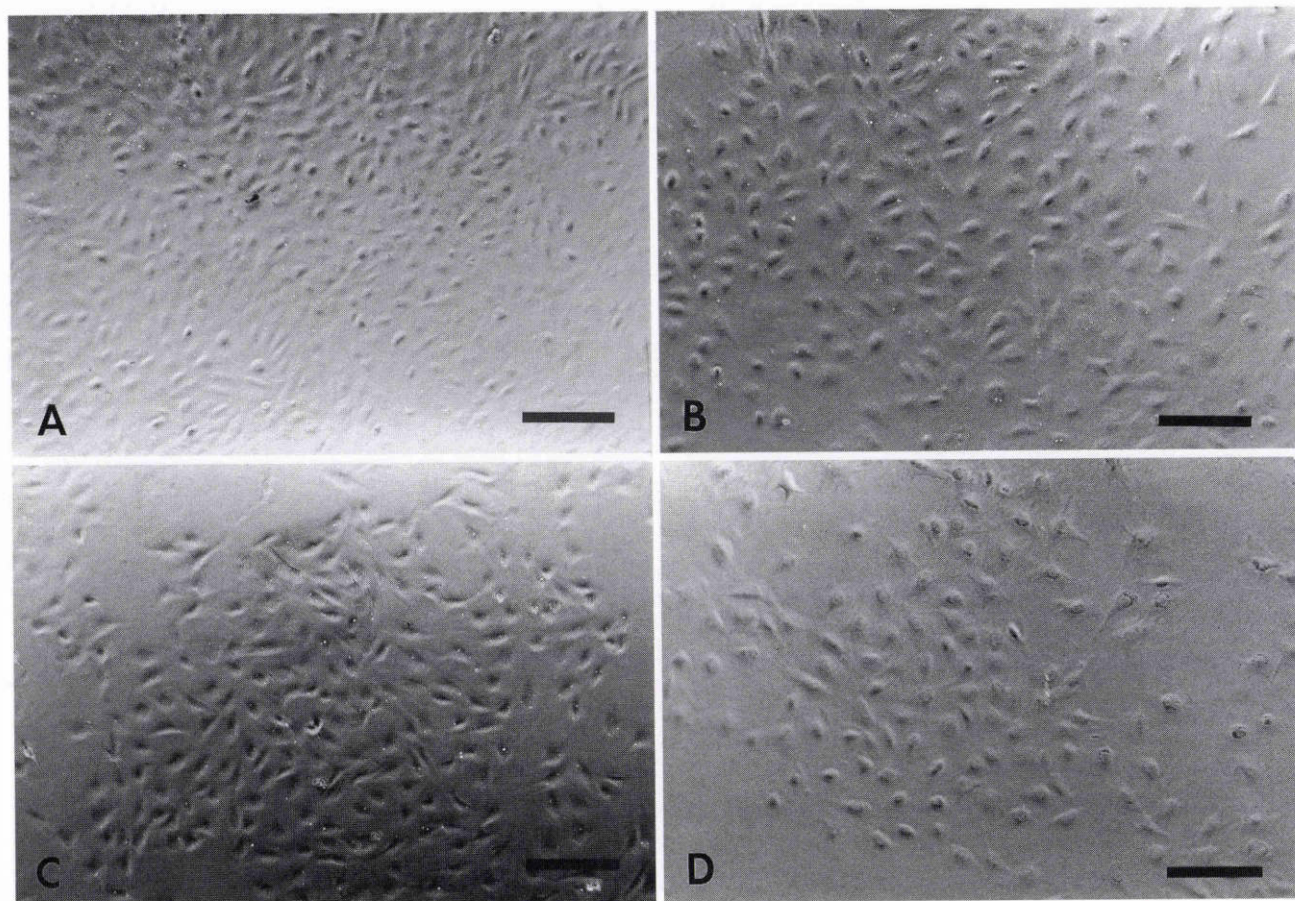


図3 リン酸ベタメタゾンナトリウム添加3日目の位相差顕微鏡像.

A: 対照, B: 100 nM, C: 500 nM, D: 1,000 nM. 対照と比較して, 100 nM, 500 nM, 1,000 nM では細胞数が減少している.

2. RPE 増殖率

RPE の増殖率は, ベタメタゾン添加前の RPE 数を 1.0 として算定した. ベタメタゾン添加後の細胞増殖率(平均値±標準誤差)を表 1 に, 増殖曲線を図 1 に示した. 統計処理は, 用量—反応関係の検出には回帰分析を用いた. また, 対照と各濃度のベタメタゾン添加群との比較には Wilcoxon の順位検定を行い, 有意差のあるものについてのみ, その有意水準を示した. いずれも $p < 0.05$ を有意とした.

添加したベタメタゾンの濃度依存性に RPE の増殖は抑制され, 有意水準 $p = 0.05$ で用量—反応関係が検出された. ベタメタゾン添加後 9, 14 日では, 300 nM 以上の濃度で, 有意に増殖を抑制した. 10 nM のベタメタゾンを添加した RPE の増殖曲線は, 対照のものとはほとんど変わらず, 増殖の促進も抑制もなかった.

3. 形態学的観察

RPE は一層で増殖し, ベタメタゾン添加後 24 時間, 3 日までは濃度に関係なく形態的にも相違はなかった(図 2, 3). 6 日には, ベタメタゾンを添加したものでは高濃度になるほど細胞の配列が乱れ, 細胞数が減少し細胞が扁平大型化した. 100, 500 nM では核小体が明瞭となり, 細胞質内には核周囲に小滴が集まっていた. 1,000 nM で

は, さらに細胞の変化が強くなり, 細胞間に偽足様の突起が出現した(図 4).

IV 考 按

我々は培養ブタ RPE にベタメタゾンを添加し, その増殖率について検討した. ステロイド剤が網膜光凝固後の RPE の増殖を抑制することは既に報告⁸⁾されているが, *in vivo* では増殖因子や他の細胞成分の関与も考えられる. また, ヒト RPE の継代培養を続けると染色体変異が発現すると報告¹⁸⁾されている. 染色体変異が発現しても RPE としての細胞内小器官の特徴は維持されているが, RPE 本来の増殖能や貪食能などの生理的機能に変化を来している可能性がある. そのため, 本実験には RPE の生理的機能を失っていないと推測される継代 2 代目のブタの RPE を使用した.

今回の条件では, 培地に添加したベタメタゾンの濃度依存性に RPE の増殖抑制をみた. He ら¹⁹⁾は $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のデキサメタゾンは培養ヒト RPE の増殖を 2~3 倍促進させ, 成長因子類似の作用を持つと報告しているが, 我々の結果では, 同濃度同力価のベタメタゾン (10 nM) では増殖の抑制も促進もなかった. 使用した RPE の種の違い, 培養方法の違いによる可能性がある.

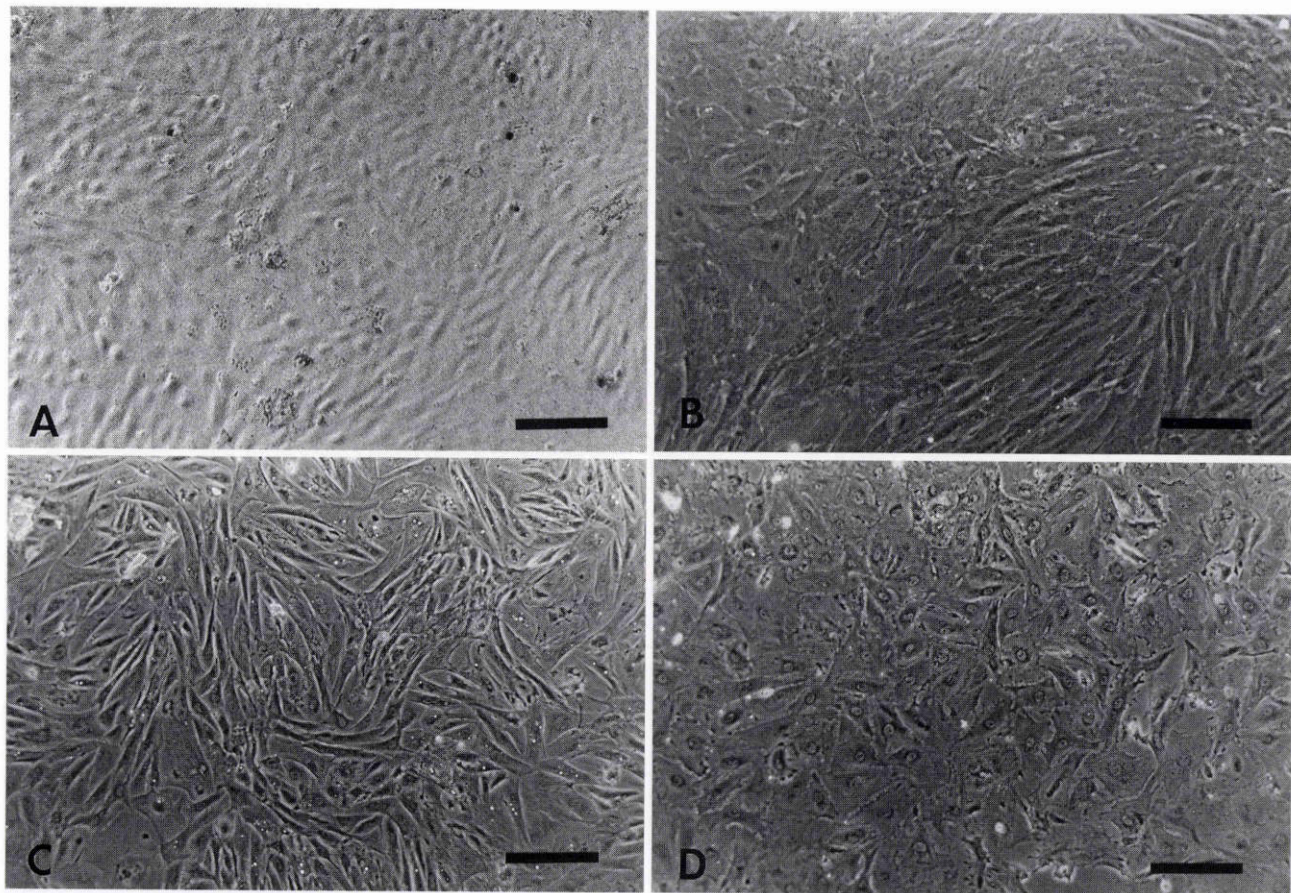


図4 リン酸ベタメタゾンナトリウム添加6日目の位相差顕微鏡像.

A: 対照, B: 100 nM, C: 500 nM, D: 1,000 nM. 高濃度のリン酸ベタメタゾンナトリウム添加(500, 1,000 nM)では, 細胞が大型化し, 核小体が明瞭となり, 細胞質内には核周囲に小滴が集まっている. 1,000 nM では, さらに細胞の変化が強くなり偽足様の細胞質突起が出現している.

眼科領域では, 古くは Jain ら⁹⁾がステロイド剤の副作用としての黄斑症を報告したのを初めとして, ステロイド剤の大量投与後に, 中心性漿液性網脈絡膜症や多発性後極部網膜色素上皮症を発症したという報告^{10)~17)}がある. 若倉ら¹⁰⁾¹¹⁾¹⁷⁾は脈絡膜ないし外血液網膜層の脆弱性を持つものにステロイド剤を大量投与すると, 中心性網脈絡膜症や多発性後極部網膜色素上皮症が惹起される可能性が高く, ステロイド剤による外血液網膜層の破綻や脈絡膜循環への影響も発症誘因の一つと考えられると述べている.

RPE の反応性の増殖形式として, regenerative proliferation, papillary proliferation, tubular proliferation, diffuse hyperplasia, simple invasive proliferation, fibrous metaplasia, osseous metaplasia がある²⁰⁾が, 位相差顕微鏡で RPE の形態変化を観察したところ, 培養細胞を用いた今回の実験では RPE は一層で増殖し, ベタメタゾンを添加しても増殖の形式は変化しなかった. 細胞個々の形態を観察すると, 高濃度のベタメタゾンを添加した RPE の細胞質内の核周囲には多数の小滴をみた. また, RPE が大型化し偽足様の細胞質突起が出現していた. 本田²¹⁾は家兎の摘出眼で眼内灌流液の pH 変動における網膜電

位図(ERG)の変化をみているが, pH 7.2~9.5 の変動では ERG の変化は可逆性で, 一時的な機能抑制であると述べており, 柴田²²⁾は家兎摘出眼を用いた研究で, 浸透圧 250 mOsm 以下あるいは 350 mOsm 以上では ERG は変化を受けると報告している. 島田ら²³⁾は家兎眼の硝子体内にデキサメタゾンおよびベタメタゾンを注入し, 10 mg 以上のデキサメタゾンおよびベタメタゾン注入では著明な網膜の組織障害が起こることを確認したが, 両薬液ともに pH 8.3~8.8・浸透圧 186~347 mOsm で, この範囲の pH・浸透圧では形態学的な網膜障害は発生しにくく, むしろ薬剤毒性が眼内組織障害の主因であると考察している. 本田²¹⁾, 柴田²²⁾および島田ら²³⁾の研究は *in vivo* での網膜への影響をみており, 培養 RPE を用いた本実験との比較はできない. しかし, 今回我々が使用した培地では, 浸透圧はベタメタゾン添加・非添加にかかわらずあまり変わらなかったが, pH はベタメタゾン添加培地で変化しており, 細胞の形態変化に関与している可能性がある. 本実験での高濃度のベタメタゾンによる増殖抑制および形態の変化は, 薬剤毒性および pH の両方による可能性がある.

コルヒチンやサイトカラシン B は RPE のマイクロ

フィラメントやマイクロチューブに作用し、細胞の形態や増殖・食食の機能に影響する²⁴⁾²⁵⁾と報告されており、ラテックス粒子の食食を阻害するコルヒチンやサイトカラシン B の濃度では細胞の形態学的変化を伴っている²⁵⁾。今回の実験で RPE の増殖抑制や形態変化を起こした濃度のベタメタゾンが、RPE の食食の機能に対してどのような影響を及ぼすかを、次報で述べる。

ステロイド剤が RPE に及ぼす影響の一つとして、増殖能への影響を調べた。我々の実験からベタメタゾンは、培養ブタ RPE の増殖抑制作用があることがわかった。

本論文の要旨は、第 59 回日本中部眼科学会(1993 年 9 月 18 日)および第 98 回日本眼科学会総会(1994 年 4 月 21 日)で河原が発表した。

文 献

- 1) 鎮目和夫：副腎皮質ホルモンの生物作用と薬理作用。月刊薬事 26:1653—1655, 1984.
- 2) Baxter JD, Forsham PH: Tissue effects of glucocorticoids. Am J Med 53:573—589, 1972.
- 3) 西澤恭子, 松本圭史：ステロイド系物質—グルココルチコイドによる細胞増殖の調節。日本臨床 44:115—121, 1986.
- 4) 江川政昭：培養ヒト皮膚線維芽細胞の機能と形態に及ぼす Hydrocortisone の影響—特に増殖能と細胞骨格, フィブロネクチンに対する影響。日皮会誌 96:1259—1273, 1986.
- 5) 川合真一, 市川陽一：線維芽細胞の増殖と機能に及ぼす糖質コルチコイドの影響。最新医学 42:1891—1896, 1987.
- 6) Graham RO, Peyman GA: Intravitreal injection of dexamethasone. Treatment of experimentally induced endophthalmitis. Arch Ophthalmol 92:149—154, 1974.
- 7) Raichand M, Peyman GA, Schwartz H, Roe C: Anti-inflammatory action of dexamethasone in vitrectomy infusion fluid. Ophthalmic Surg 13:493—498, 1982.
- 8) 岸本直子, 宇山昌延, 福島伊知郎, 山田佳苗, 西川睦彦, 大熊 紘：網膜色素上皮の修復過程に対する副腎皮質ステロイド剤の影響。日眼会誌 97:360—369, 1993.
- 9) Jain IS, Kapaimit S: Maculopathy. A corticosteroid side-effect. J All India Ophthalmol Soc 14:250—252, 1966.
- 10) 若倉雅登, 石川 哲：中心性漿液性網脈絡膜症に対するコルチコステロイド剤の影響について。臨眼 34:123—129, 1980.
- 11) 若倉雅登, 吉田 寛, 谷いづみ：外血液網膜網病変に対するコルチコステロイド剤の影響。臨眼 35:1037—1041, 1981.
- 12) 加藤有紀子, 加藤昌久, 小暮美津子：コルチコステロイド剤投与中に生じた中心性漿液性網脈絡膜症の 2 症例。臨眼 76:1418—1421, 1982.
- 13) 水野 薫：腎移植後に発症した多巣性後極部網膜色素上皮症の 2 症例。眼紀 35:2164—2168, 1984.
- 14) 三浦恵子, 上野 眞, 三浦嘉久, 瀬尾孝寛：ステロイド剤投与により誘発された中心性漿液性網脈絡膜症様病変。眼紀 40:59—64, 1989.
- 15) 赤木 泰, 小川憲治, 原 育子, 坂口一之, 伊藤喜一郎, 佐川史郎：死体腎移植後に発症した多発性後極部網膜色素上皮症の 1 例。眼紀 41:1216—1220, 1990.
- 16) 松永裕史, 西村哲哉, 宇山昌延：多発性後極部網膜色素上皮症。最近の経験症例。臨眼 46:729—733, 1992.
- 17) Wakakura M, Song E, Ishikawa S: Corticosteroid-induced central serous chorioretinopathy. Jpn J Ophthalmol 41:180—185, 1997.
- 18) Kigasawa K, Soushi S, Tanaka Y, Obazawa H: Morphologic and chromosomal study of a human retinal pigment epithelial cell line. Jpn J Ophthalmol 38:10—15, 1994.
- 19) He S, Wang H, Ye J, Ogden TE, Ryan SJ, Hinton DR: Dexamethasone induced proliferation of cultured retinal pigment epithelial cells. Curr Eye Res 13:257—261, 1994.
- 20) Tso MOM: Developmental, reactive, and neoplastic proliferation of the retinal pigment epithelium. In: Zinn KM, et al(Eds): The Retinal Pigment Epithelium. Harvard University Press, Cambridge, 267—276, 1979.
- 21) 本田孔士：硝子体の諸問題 II. 硝子体外科のバイオロジー。日眼会誌 85:1910—1949, 1981.
- 22) 柴田二郎：家兔摘出眼 ERG に対する浸透圧の影響。日眼会誌 78:844—857, 1974.
- 23) 島田宏之, 松井瑞夫：硝子体内注入ステロイドの家兔眼内組織へ及ぼす影響。日眼会誌 93:501—510, 1989.
- 24) Axline SG, Reaven EP: Inhibition of phagocytosis and plasma membrane mobility of the cultivated macrophage by cytochalasin B. Cell Biol 62:647—659, 1974.
- 25) 橋本 恵, 浅山邦夫, 松村美代, 荻野誠周：培養網膜色素上皮細胞の形態に及ぼす cytochalasin B および colchicine の影響。日眼会誌 86:557—561, 1982.