

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

—2. 貪食およびライソゾーム酵素活性に及ぼす作用—

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: 我々は前報で, 副腎皮質ステロイド剤(ステロイド剤)であるリン酸ベタメタゾンナトリウム(ベタメタゾン)が, 培養ブタ網膜色素上皮細胞(RPE)の増殖を抑制することを報告した。今回は, ベタメタゾンが RPE の貪食機能に対して, どのように影響するかを検討した。

方 法: 継代培養 2 代目のブタ RPE を実験に使用した。各種濃度(10, 50, 100, 500, 1, 000 nM)でベタメタゾンを培地に添加し RPE に作用させ, 24 時間後および 3 日後に RPE のラテックス粒子貪食能を測定した。また, ベタメタゾン添加後の RPE のライソゾーム(acid phosphatase, β -glucuronidase)活性を酵素組織化学的に染色し, 酵素活性を比較した。

結 果: ベタメタゾンを 24 時間作用させると, 50 nM 以上の濃度で RPE のラテックス粒子の貪食が抑制され

た($p < 0.05$)。3 日では, 10 nM の低濃度でもラテックス粒子の貪食が抑制された($p < 0.001$)。また, 高濃度(500 nM)のベタメタゾンの添加で, acid phosphatase, β -glucuronidase とともに染色性が低下した。

結 論: ステロイド剤は, 培養 RPE の貪食機能およびライソゾーム酵素活性を抑制した。細胞の増殖や抑制には作用しない低濃度のベタメタゾンで, RPE のラテックス粒子の貪食が抑制され, RPE が影響を受けるステロイド剤の濃度はその機能別に異なることがわかった。(日眼会誌 104: 86—90, 2000)

キーワード: 網膜色素上皮細胞, 副腎皮質ステロイド剤, ラテックス粒子, 貪食能, ライソゾーム酵素活性

Effects of Corticosteroid on Porcine Retinal Pigment Epithelial Cells in Culture

—2. Effects on Phagocytosis and Lysosomal Activity—

Sumie Kawahara, Naoko Kishimoto, Keiji Sugawara and Masanobu Uyama

Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

Abstract

Purpose: The effects of a corticosteroid on the phagocytosis and lysosomal activity of cultured porcine retinal pigment epithelium (RPE) cells were investigated.

Methods: After exposing cultured RPE cells to various concentrations (10, 50, 100, 500, 1, 000 nM) of betamethasone sodium phosphate (betamethasone), the cells were incubated with latex microspheres for 6 hours.

Results: The number of latex microspheres phagocytized by the cultured RPE cells was inhibited by 50 nM betamethasone within 24 hours. Ten-nM betamethasone did not inhibit the proliferation of

cultured RPE cells, but ingestion of latex microspheres by the cells was inhibited after 3 days.

Lysosomal activity (acid phosphatase, β -glucuronidase) of RPE cells was inhibited by a high concentration (500 nM) of betamethasone.

Conclusion: These results suggest that corticosteroid inhibits the phagocytosis and lysosomal activity of cultured RPE cells. (J Jpn Ophthalmol Soc 104: 86—90, 2000)

Key words: Retinal pigment epithelial cell (RPE), Corticosteroid, Latex microspheres, Phagocytosis, Lysosomal activity

I 緒 言

網膜色素上皮細胞(RPE)には, 物質輸送, 血液—網膜関

門, 視細胞外節の貪食・消化, ムコ多糖の産生, 光の吸収などの多くの種類の機能がある¹⁾²⁾が, 特に, 脱落した視細胞外節を貪食消化することにより視細胞および網膜の

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 11 年 3 月 26 日受付, 平成 11 年 8 月 24 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 March 26, 1999 and accepted in revised form August 24, 1999)

機能を維持しており, RPE に発生した障害は様々な疾患の誘因となる. 培養 RPE の貪食作用に及ぼす種々の薬剤の影響については, 既に多くの報告^{1)3)~6)}がある. 我々は副腎皮質ステロイド剤(ステロイド剤)が, 培養ブタ RPE の増殖を抑制することを前報⁷⁾で報告した. 今回は, RPE の貪食機能への影響を検討するために, リン酸ベタメタゾンナトリウム(ベタメタゾン)を培養 RPE に投与して, ラテックス粒子の貪食およびライソゾーム酵素活性について実験を行った.

II 実験材料および方法

1. ベタメタゾン投与方法および RPE 採取方法

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, 50, 100, 500, 1,000 nM の濃度になるように培地を調製した. 培地は 16.7% ウシ胎児血清, penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100 µg/ml を加えた Dulbecco 変法 Eagle's minimal essential medium (DM-EM) 培地を使用した.

細胞はブタの眼球から分離培養した RPE を使用した. RPE の採取方法は前報⁷⁾で報告した. 初代培養後 10 日~2 週間後に継代培養を行い, 得られた継代第 2 代の RPE を使ってラテックス粒子貪食能およびライソゾーム酵素活性に関する実験を行った.

2. ラテックス粒子貪食能の測定

継代培養 6 日目に, 培地を先述した各濃度のベタメタゾンを添加したものと交換し, 24 時間および 3 日間培養を行った. Hanks 緩衝液でディッシュを 2 回洗浄後, ラテックス粒子(直径約 1 µm)を 1.0×10^8 個/ml の濃度で加えたベタメタゾンを含まない DMEM 培地で, 37.0°C で 6 時間培養した. 0.1 M リン酸緩衝液で洗浄し, 2% グルタルアルデヒドで固定, エタノール系列で脱水した後, エポキシ樹脂で包埋した. ラテックス粒子の算定は三嶋ら⁸⁾と同様の方法を用いた. すなわち, エポキシ樹脂包埋後, ディッシュ中心部で厚さ 2.0 µm の連続切片を垂直に作製してそれぞれ約 1,000 個の細胞が貪食したラテックス粒子数を光学顕微鏡下で計測し, 1 細胞断面当たりの貪食ラテックス粒子数を算定してラテックス粒子の貪食活性とした. 図 1 にラテックス粒子を貪食した RPE 断面の光学顕微鏡像を示す. 統計処理は, 対照と各濃度のベタメタゾン添加群との比較には Wilcoxon の順位和検定を行い, 有意差のあるものについて, その有意水準を示した. いずれも $p < 0.05$ を有意とした.

3. ライソゾーム染色

継代培養後 6 日目に培地を 100, 500 nM の濃度のベタメタゾンを添加したものと交換し, 3 日目にライソゾーム酵素である acid phosphatase, β -glucuronidase を染色して, その酵素活性を比較した.

Acid phosphatase の染色は, 細胞をホルマリン・アセトン緩衝液で, 4°C で 30 秒間固定し, naphthol AS-BI

phosphate を N-N' ジメチルホルムアルデヒドで溶解した基質液と 0.1 M 酢酸緩衝液, hexazotized pararosanilin 液を混合した反応液で, 37°C で 60 分間反応させた. β -glucuronidase も同様に, ホルマリン・アセトン緩衝液で, 20°C で 10 秒間固定した後, naphthol AS-BI β -D glucuronide を炭酸水素ナトリウムと 0.2 M 酢酸緩衝液に溶解した基質液と fast red ITR, 蒸留水を混合した反応液で, 37°C で 3 時間反応させた.

III 結 果

1. RPE の貪食能

RPE の貪食したラテックス粒子数を図 2, 3 に示す.

24 時間ベタメタゾンを作用させたものは, 50 nM でラテックス粒子の貪食を有意($p < 0.05$)に抑制し, 100 nM 以上の濃度ではさらに強く抑制した($p < 0.001$).

ベタメタゾンを 3 日間作用させると, 24 時間ではほとんど抑制されなかった 10 nM の低濃度での貪食活性も強く抑制された($p < 0.001$).

2. RPE のライソゾーム酵素活性

Acid phosphatase 染色を行うと, 対照では細胞質と特に核周囲に強い染色性がみられた. ベタメタゾン 100 nM を添加したものでは僅かに染色性が弱くなっている程度であったが, 500 nM では反応が減弱していた(図 4).

β -glucuronidase 染色では, 対照は反応が細胞質全体にみられた. ベタメタゾン 100 nM を添加したものは対照とほぼ同様の反応を呈していたが, 500 nM のベタメタゾンを添加した RPE の反応は弱く, 減弱していた(図 5).

IV 考 按

RPE は視細胞の機能維持に重要な役割を果たしている^{1)~3)}. RPE は生体内では脱落した視細胞外節を貪食消化することにより視細胞外節の更新に役割を果たしており, RPE の機能異常は視細胞, さらに網膜の障害を来す. RPE の貪食能は培養細胞にも維持されており^{9)~15)}, 種々の薬剤によって可逆的にも不可逆的にも影響を受けることがわかっている^{1)3)~6)}.

我々は前報⁷⁾で, 培養 RPE の増殖をベタメタゾンが抑制することを報告した. RPE の増殖はベタメタゾン 100 nM 以上で濃度依存性に抑制され, また, 10 nM の低濃度では細胞の増殖促進や抑制のいずれの作用もなかった. 今回, 貪食への影響をみたところ, 10 や 50 nM の低濃度のベタメタゾン作用をさせるとラテックス粒子の貪食を抑制し, RPE の機能によって影響を受けるベタメタゾンの濃度に違いがあることがわかった.

貪食の過程には, 貪食されるものの認識, 接着, 取り込み, 消化の段階がある. 今回の実験では, ラテックス粒子の貪食活性を調べることによって取り込みまでの過程を, また, 消化の際に中心的な役割を果たすライソゾーム酵素の染色性の程度をみることにより, 消化について

タメタゾンの影響を調べた。今回、ライソゾームの指標として acid phosphatase と β -glucuronidase を使用した。Acid phosphatase や β -glucuronidase は、眼組織内では網膜色素上皮・毛様体・虹彩などの組織に酵素活性が高く、他臓器の acid phosphatase や β -glucuronidase の染色性と相違がない¹⁶⁾¹⁷⁾。また、acid phosphatase や β -glucuronidase にはライソゾーム系由来のものと非ライソゾーム系由来のものがあるとされている¹⁸⁾が、活性の主体はライソゾームに存在しており、acid phosphatase や β -glucuronidase 染色でみられた反応はライソゾームにほぼ一致すると考えてもよいのではないかと考えた。

ステロイド剤は強い抗炎症作用を持ち、その作用点の一つがライソゾーム膜の安定化によるものである¹⁹⁾が、一方、ライソゾーム膜の安定化により貪食した異物の消化処理に影響を及ぼす。しかし、今回の実験からライソゾーム酵素の産生抑制が異物の消化処理に影響している可能性もあると考えられる。本実験は培養 RPE を用いた *in vitro* の実験であり、また、異物貪食過程での RPE のライソゾーム活性を定量したわけではないので断定はで

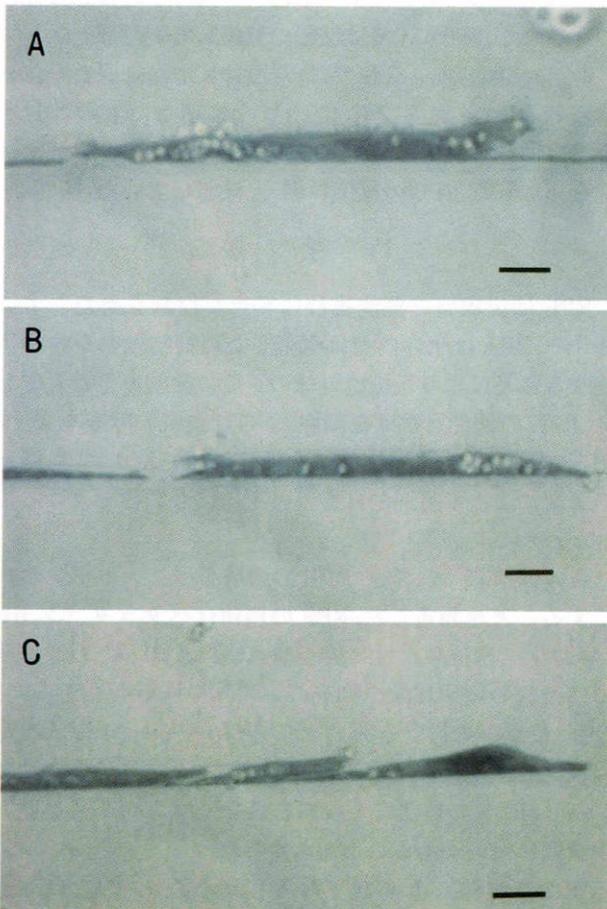


図1 ラテックス粒子を貪食した培養網膜色素上皮細胞断面の光学顕微鏡像。
A：対照，B：リン酸ベタメタゾンナトリウム（ベタメタゾン）100nM，C：ベタメタゾン 500nM。バーは 10 μ m

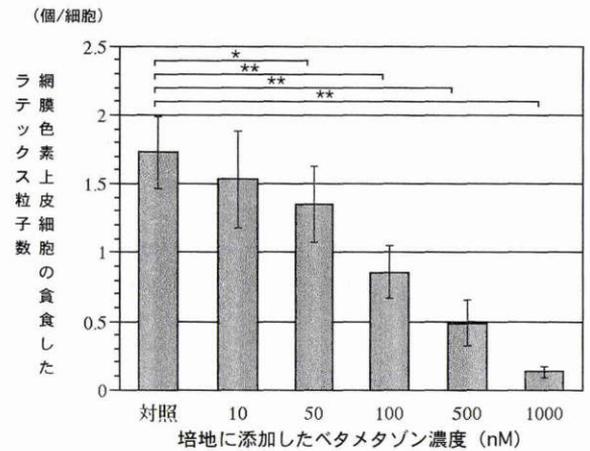


図2 ベタメタゾン添加培地で24時間培養した網膜色素上皮細胞のラテックス粒子貪食能。
ベタメタゾン 50 nM 以上の濃度ではラテックス粒子の貪食を有意に抑制した。バーは標準誤差
* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.001$

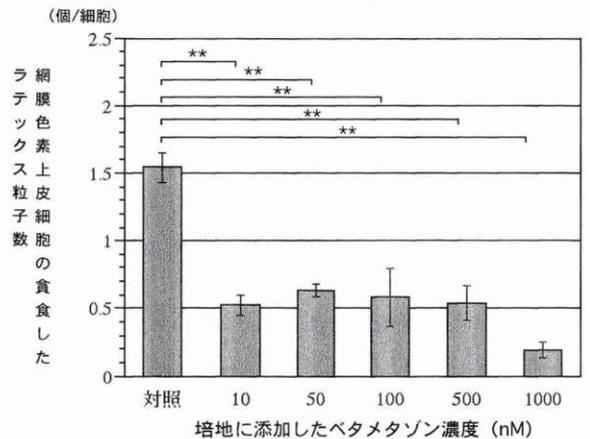


図3 ベタメタゾン添加培地で3日間培養した網膜色素上皮細胞のラテックス粒子貪食能。
ベタメタゾン 10 nM 以上でラテックス粒子の貪食を強く抑制した。バーは標準誤差
** : $p < 0.001$

きないが、ステロイド剤により異物の貪食消化という RPE の一連の機能に障害を来す可能性が示された。

ステロイド剤投与により、培養 RPE のラテックス粒子貪食能およびライソゾーム活性が抑制された。RPE の細胞増殖や増殖抑制に影響を及ぼさない程度の低濃度のステロイド剤でもラテックス粒子の貪食を抑制し、RPE の機能の種類によってステロイド剤の影響を受ける濃度が異なることがわかった。

文 献

1) 塚原 勇, 本田孔士, 大熊正人, 浅山邦夫, 林 倫子, 荻野誠周, 他：網膜色素上皮細胞の機能。日眼会誌 88: 1—21, 1983.

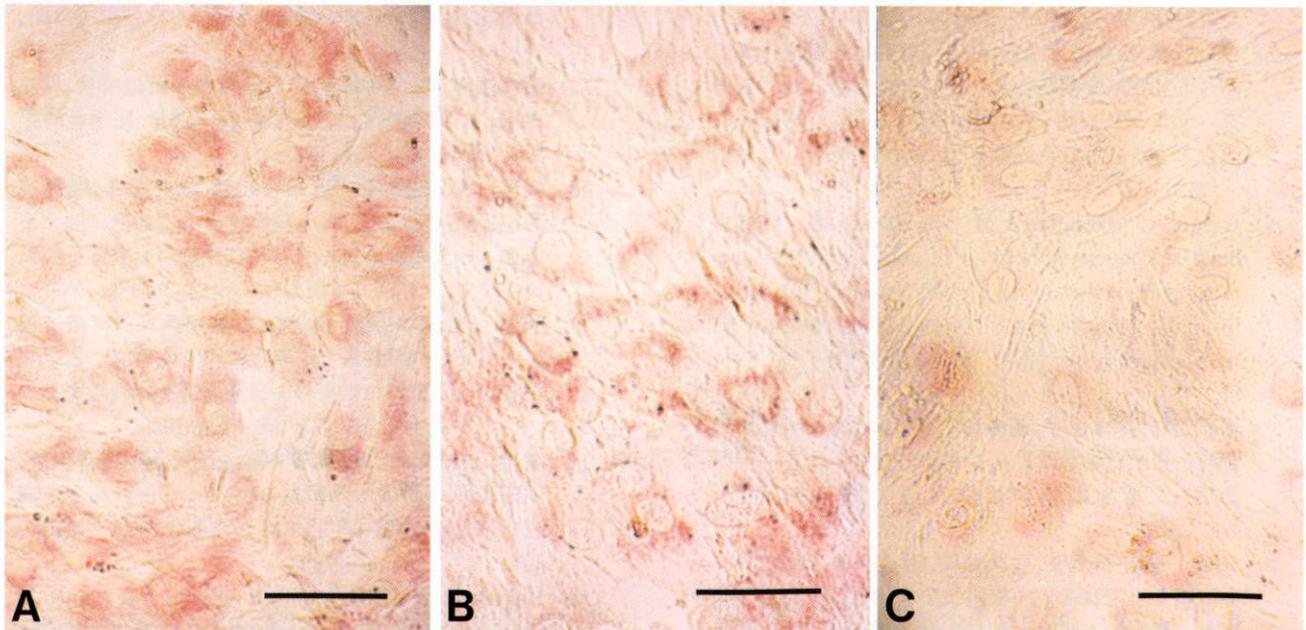


図 4 ベタメタゾン添加後の網膜色素上皮細胞の acid phosphatase 活性.

A: 対照, B: ベタメタゾン 100 nM, C: ベタメタゾン 500 nM. 対照では反応は細胞質と、特に核周囲に強い傾向があった。ベタメタゾン 100 nM では僅かに染色性が弱くなっている程度であったが、500 nM では反応が減弱していた。バーは 50 μ m

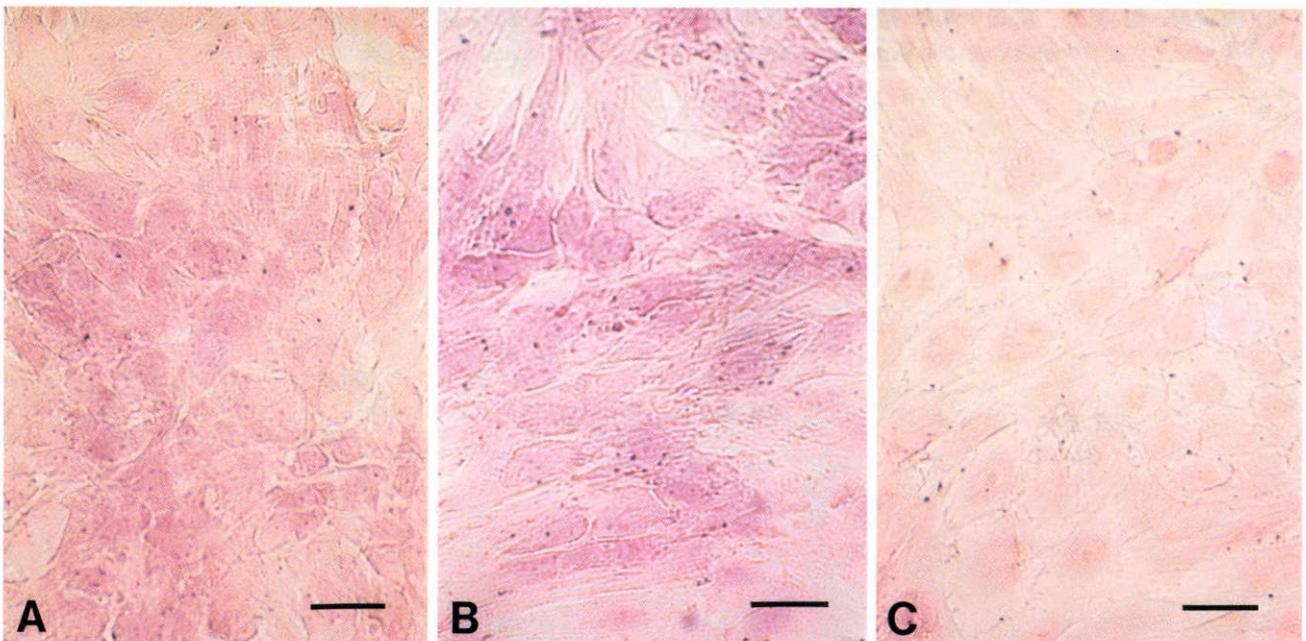


図 5 ベタメタゾン添加後の網膜色素上皮細胞の β -glucuronidase 活性.

A: 対照, B: ベタメタゾン 100 nM, C: ベタメタゾン 500 nM. 対照では、反応は細胞質全体にみられた。ベタメタゾン 100 nM では対照と反応が大差なかったが、500 nM では反応が減弱していた。バーは 50 μ m

- 2) Hogan MJ: Role of the retinal pigment epithelium in macular disease. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 76: 64—80, 1972.
- 3) 荻野誠周, 松村美代, 白川弘泰, 山川良治, 吉村長久, 岡田守生, 他: ヒト網膜色素上皮細胞の組織培養. 塚

原 勇(編): 眼科領域における最新の進歩, 医学教育出版社, 東京, 358—395, 1985.

- 4) 荻野誠周, 松村美代, 浅山邦夫, 橋本 恵, 吉村長久: 培養網膜色素上皮細胞の貪食作用は cytochalasin B および colchicine によって可逆的に阻害を受ける.

- 日眼会誌 84:2108—2112, 1980.
- 5) 白川弘泰, 松村美代, 山川良治, 荻野誠周, 塚原 勇: ニワトリ胚培養網膜色素上皮の貪食機能に関する研究; ラテックス粒子貪食能に対する phenothiazines および chloroquine の効果について. 眼紀 34:213—217, 1983.
 - 6) Ogino N, Matsumura M, Shirakawa H, Tsukahara I: Phagocytic activity of cultured retinal pigment epithelial cells from chick embryo. Inhibition by melatonin and cyclic AMP, and its reversal by taurine and cyclic GMP. *Ophthalmic Res* 15:72—89, 1983.
 - 7) 河原澄枝, 岸本直子, 菅澤啓二, 宇山昌延: 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—. 日眼会誌 103:436—441, 1999.
 - 8) 三嶋 弘, 小野秀幸, 佐久間修, 後長道伸, 柴田哲夫, 井上恭一: 毛様体上皮細胞(CE)の培養とその応用. 塚原 勇(編): 眼科領域における最新の進歩, 医学教育出版社, 東京, 346—357, 1985.
 - 9) 白川弘泰, 荻野誠周, 松田晴子, 松村美代, 山川良治, 塚原 勇: 網膜色素上皮貪食能について. 眼紀 33:2387—2391, 1982.
 - 10) 白川弘泰, 松村美代, 荻野誠周: 網膜色素上皮細胞の継代培養と貪食機能. 日眼会誌 87:996—1002, 1983.
 - 11) 気賀沢一輝, 明尾 潔, 田中靖彦, 植村恭夫: ヒト網膜色素上皮細胞の組織培養に関する研究—培養細胞の貪食能について—. 日眼会誌 87:1101—1105, 1983.
 - 12) 田中靖彦: ヒト網膜色素上皮細胞の組織培養. 塚原勇(編): 眼科領域における最新の進歩, 医学教育出版社, 東京, 396—410, 1985.
 - 13) 明尾 潔, 気賀沢一輝, 田中靖彦, 植村恭夫, 藤原達司: 組織培養によるヒト網膜色素上皮細胞に関する研究—培養細胞の Latex 細粒貪食時の走査電子顕微鏡所見について—. 日眼会誌 89:433—439, 1985.
 - 14) 明尾 潔, 田中靖彦, 植村恭夫, 藤原達司: 組織培養によるヒト網膜色素上皮細胞に関する研究—ヒト視細胞外節貪食時の走査および透過電子顕微鏡所見について—. 日眼会誌 90:188—196, 1986.
 - 15) 高橋 広, 矢野 統, 秋谷 忍, 古川 博, 渡部和彦, 山田光則, 他: トランスフェクションされたヒト網膜色素上皮細胞の貪食能. その 1. latex 粒子の貪食. 眼紀 43:266—270, 1992.
 - 16) Hayasaka S: Distribution of lysosomal enzymes in the bovine eye. *Jpn J Ophthalmol* 18:233—239, 1974.
 - 17) 早坂征次: 眼疾患とライソゾームの関連. 眼科 17:203—212, 1975.
 - 18) 武内忠男, 小川和朗: 新酵素組織化学. 朝倉書店, 東京, 299—402, 1980.
 - 19) Weissmann G: The effect of steroids and drugs on lysosome. In: Dingle JT, et al(Eds): *Lysosomes in Biology and Pathology*. Vol. 1. North-Holland Publishing, New York, 276—295, 1969.