

ブタ培養線維柱帯細胞の増殖に対する細胞増殖因子の効果

安藤 彰, 金子 志帆, 松村 美代

関西医科大学眼科学教室

要 約

目的：線維柱帯細胞を増殖させる細胞増殖因子を同定する。

対象と方法：ブタ線維柱帯細胞をダルベッコ改変イーグル培地栄養混合物 F-12/Ham で培養し, 1, 10, 100 ng/ml の血小板由来細胞増殖因子(PDGF), 線維芽細胞増殖因子(FGF 2), インスリン様細胞増殖因子(IGF-1), 血管内皮細胞増殖因子(VEGF), 肝細胞増殖因子(HGF), 脳由来神経栄養因子(BDNF)を添加してチミジン取り込み実験を行った。

結果：24 時間と 48 時間で 10 および 100 ng/ml の PDGF, IGF-1, FGF 2 において増殖が促進された。1,

10 および 100 ng/ml の VEGF では 48 時間で増殖が抑制されていた。HGF と BDNF は顕著な影響を及ぼさなかった。

結論：線維柱帯細胞を細胞増殖因子で刺激して増殖させ, 線維柱帯の機能を活性化させることで眼圧下降を図るためには PDGF, IGF-1, FGF 2 がよい候補であると考えられた。(日眼会誌 108 : 549-553, 2004)

キーワード：線維柱帯細胞培養, 線維柱帯組織培養, チミジン取り込み, 低分子量リポ蛋白(LDL)染色, 細胞増殖因子

The Effect of Growth Factors on the Proliferation of Cultured Porcine Trabecular Meshwork Cells

Akira Ando, Shiho Kaneko and Miyo Matsumura

Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

Abstract

Purpose : We attempted to identify cell growth factors that cause a multiplication of trabecular meshwork(TM) cells.

Methods : Porcine TM cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient mixture F-12/Ham to which we added 1, 10, and 100 ng/ml of platelet-derived growth factor(PDGF), fibroblast growth factor 2(FGF 2), insulin-like growth factor-1(IGF-1), vascular endothelial cell growth factor(VEGF), hepatocyte growth factor(HGF), or brain-derived neurotrophic factor(BDNF). We measured [³H] thymidine incorporation to evaluate the influence of the growth factors on TM cell proliferation.

Results : [³H] thymidine incorporation into TM cells was promoted by 10 and 100 ng/ml of PDGF,

IGF-1, and FGF 2 after 24 and 48 hours, whereas 1, 10, and 100 ng/ml of VEGF restrained cell proliferation after 48 hours. HGF and BDNF did not show any remarkable influence on TM cell proliferation.

Conclusions : Our results suggest that PDGF, IGF-1, and FGF 2 may cause a drop in intraocular pressure followed by activation of a TM function, by multiplying TM cells.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi(J Jpn Ophthalmol Soc 108 : 549-553, 2004)

Key words : Trabecular meshwork cell culture, Trabecular meshwork organ culture, Thymidine uptake, Low density lipoprotein(LDL)staining, Cell growth factor

I 緒 言

原発開放隅角緑内障の剖検眼では正常眼と比べて線維

柱帯細胞数の減少と細胞外基質の増加がみられ¹⁾, このような変化によってもたらされる線維柱帯の機能低下が房水流出抵抗の増大に関与すると考えられている。細胞

別刷請求先：570-8507 守口市文園町 10-15 関西医科大学眼科学教室 安藤 彰

(平成 15 年 12 月 2 日受付, 平成 16 年 3 月 11 日改訂受理)

Reprint requests to: Akira Ando, M.D. Department of Ophthalmology, Kansai Medical University. 10-15 Fumizono-cho, Moriguchi 570-8507, Japan

(Received December 2, 2003 and accepted in revised form March 11, 2004)

外基質については多くの報告^{1)~4)}がなされており、その役割は徐々に解明されてきている。一方、線維柱帯細胞については原発開放隅角緑内障でその数が減少するという報告はなされたが、細胞の性質や増殖を促す因子についての報告⁵⁾が少なく、未だに不明な点が多い。我々は線維柱帯細胞を細胞増殖因子で刺激して線維柱帯の機能を活性化させることで眼圧下降を図り、緑内障治療への応用の可能性を考察するための基礎実験として、線維柱帯細胞を増殖させる細胞増殖因子を同定することを試みた。

II 実験方法

1. 線維柱帯組織培養と細胞培養

実体顕微鏡を用いて直視下にブタ眼球から線維柱帯組織を採取して、プラスチック製6穴プレートに2 mlの5%ウシ胎児血清、100 U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン添加ダルベッコ改変イーグル培地栄養混合物 F-12/Ham (Gibco, New York, NY) で組織培養を行った。2~3 週後には線維柱帯組織は培養皿に接着し、線維柱帯組織から線維柱帯細胞が遊走、増殖してくるので、それらを0.005% エチレンジアミン四塩酸 (EDTA) 添加0.025% トリプシン溶液で処理して線維柱帯細胞を採取した。得られた細胞を同じ条件で培養してコンフルエント状態に達したところで同トリプシン溶液を用いて継代培養を行い、3~4 代目の細胞を実験に用いた。

2. 低分子量リポ蛋白 (LDL) 染色

線維柱帯細胞は LDL 受容体を高発現しているため、LDL は線維柱帯細胞のマーカーとなり得る⁶⁾。得られた細胞が線維柱帯細胞であるかどうかを確認するため、線維柱帯組織とサブコンフルエント状態の継代培養線維柱帯細胞の培養液に DiI で蛍光標識した低分子量リポ蛋白 (DiI-Ac-LDL, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) を20 μ g/ml の濃度で添加して培養し、12 時間後にリン酸緩衝液 (PBS, pH 7.4) で3回洗浄の後、グリセロールで封入して蛍光顕微鏡 (Fluoview, Olympus, Tokyo) を用いて観察した。

3. 培養線維柱帯細胞の thymidine 取り込みに対する各種細胞増殖因子の影響

1, 10, 100 ng/ml の血小板由来細胞増殖因子 (PDGF, Recombinant Human PDGF-BB, PeproTech EC LTD, 英国), 線維芽細胞増殖因子 (FGF 2, Recombinant Human Fibroblast Growth Factor-basic, PeproTech), インスリン様細胞増殖因子 (IGF-1, Recombinant Human Insulin Like Growth Factor-1, PeproTech), 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF, Recombinant Human VEGF, PeproTech), 肝細胞増殖因子 (HGF, Recombinant Human HGF, PeproTech), 脳由来神経栄養因子 (BDNF, Recombinant Human BDNF, PeproTech)

を添加してトリチウム [³H] で標識した thymidine ([methyl-³H]thymidine, Amersham Life Science, Tokyo) の取り込み実験を行い、線維柱帯細胞の増殖に対する影響をみた。線維柱帯細胞を24穴プレートに1×10⁴個ずつ撒き、24時間後に培地を1%ウシ胎児血清添加培地に交換して接着していない細胞を除去した後、24時間培養してstarvationを行った。各細胞増殖因子をPBSに100, 1,000, 10,000 ng/mlの濃度で溶解したものを5 μ l と [methyl-³H]thymidine 5 μ l を490 μ l の1%ウシ胎児血清添加培地に添加して培養した。24時間および48時間後に培養液を除去してPBSで3回洗浄した後、500 μ l の5%トリクロロ酢酸で水上で3回処理し、酸可溶分画を除去して染色体DNAに取り込まれなかった [methyl-³H]thymidine を除去した。500 μ l の0.5規定水酸化ナトリウム溶液で細胞を溶解した後、500 μ l の0.5規定塩酸で中和後、4 ml の液体シンチレーションカウンター液を入れて放射活性を測定した。

4. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

細胞増殖因子の受容体の線維柱帯細胞における発現は PDGF, FGF 2, IGF, HGF, BDNF について確認されている⁵⁾が、VEGF 受容体は報告がないため FMS-like tyrosine kinase 1 (Flt 1) と kinase insert domain protein receptor (KDR) の mRNA 配列を参考にして特異的プライマーを合成し、RT-PCR 法でその遺伝子発現を確認した。プライマーの塩基配列は Flt 1 に対しては 5'-CCAAGGCCTCCATGAAGATA-3' と 5'-ATACTGTCAGGGGCTGGTTG-3', KDR に対しては 5'-GGCGGTGGTGACAGTATCTT-3' と 5'-GTCAGTGCAGAGGCGATGA-3' を用いた。TRIzol (Invitrogen) を用いて細胞から抽出した RNA (1 μ g) を用いて SuperScript first-strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen) で cDNA を作製し、Taq DNA ポリメラーゼ (Takara) を用いて iCycler (BioRad) で 94°C 60 秒, 58°C 60 秒, 72°C 60 秒の条件で PCR を 40 サイクル行った。PCR 産物は 2% アガロースゲル電気泳動を行って確認した。

5. 統計処理

各時点におけるサンプルの放射活性を比較して、analysis of variance (ANOVA) 検定により有意差を検討した。

III 結果

ブタ眼球から採取した線維柱帯組織は培養2~3週後には培養皿に接着し、線維柱帯組織から線維柱帯細胞が遊走、増殖してくるのが観察された (図1A)。組織から離れた場所では増殖中の細胞が観察された (図1B)。それらを0.005% EDTA 添加0.025% トリプシン溶液で処理して線維柱帯細胞を採取し、継代培養を行った。線

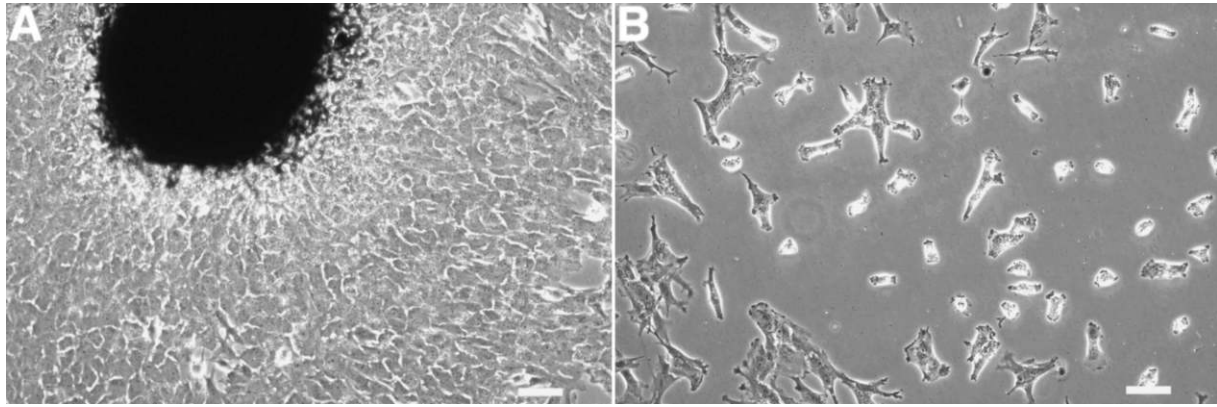


図 1 線維柱帯組織培養.

A: 培養 3 週後, 組織は接着し, 周囲に細胞が増殖している. B: 遊走, 増殖している細胞.
バーは 500 μ m

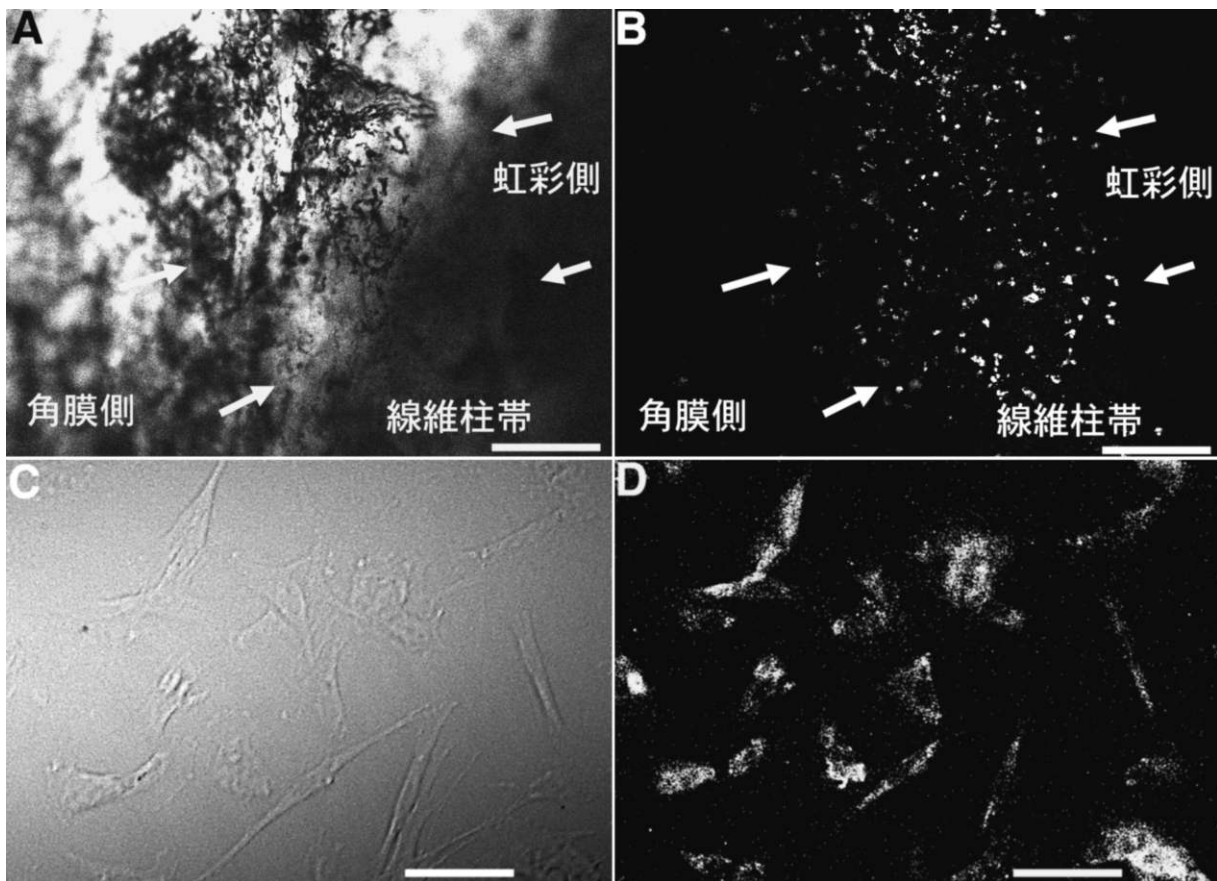


図 2 蛍光標識低分子量リポ蛋白染色.

A: 線維柱帯組織微分干渉像, B: 蛍光像, 矢印は線維柱帯の境界を示す. C: 線維柱帯細胞微分干渉像,
D: 蛍光像. バーは 500 μ m

維柱帯組織に LDL 染色を行った結果, 隅角周辺組織, 特にヒトでは線維柱帯に当たる組織で陽性細胞が多数観察された(図 2 B). 継代 2~3 代目の細胞に LDL 染色を行った結果, ほぼすべての細胞が陽性であった(図 2 D). 継代 3~4 代目の細胞を用いて 10 および 100 ng/ml の細胞増殖因子を添加後 24 時間と 48 時間で, PD-

GF, 次に IGF-1, FGF 2 の順で線維柱帯細胞の増殖が促進されていた(図 3 A~C). 1, 10 および 100 ng/ml の VEGF では 48 時間で逆に増殖が抑制されていた(図 3 D). HGF と BDNF は顕著な影響を及ぼさなかった(図 3 E, F). VEGF 受容体の Flt 1 と KDR に対する RT-PCR では期待される大きさの PCR 産物がみられた

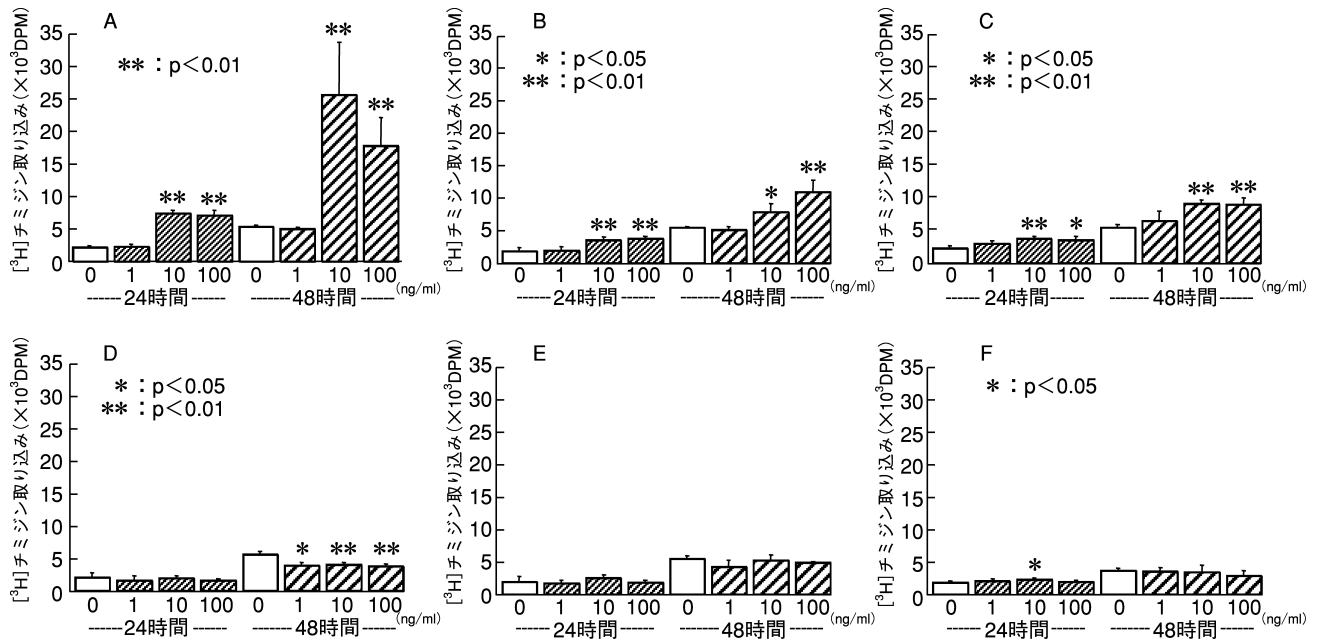


図3 $[^3\text{H}]$ methyl- ^3H thymidine 取り込み。

A: 血小板由来細胞増殖因子 (PDGF). B: インスリン様細胞増殖因子 (IGF-1). C: 線維芽細胞増殖因子 (FGF 2). D: 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF). E: 肝細胞増殖因子 (HGF). F: 脳由来神経栄養因子 (BDNF). DPM: degradation per minute.

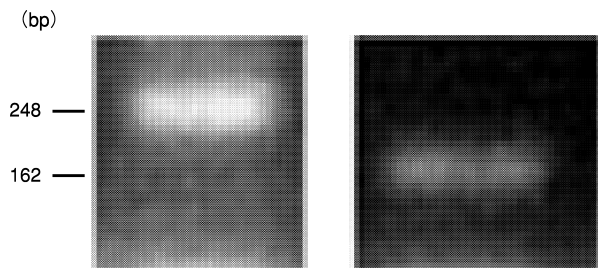


図4 血管内皮細胞増殖因子受容体遺伝子に対する polymerase chain reaction. 左: FMS-like tyrosine kinase 1(248 bp), 右: kinase insert domain protein receptor(162 bp).

(図4)。

IV 考 按

1984年にAlvaradoら¹⁾は原発開放隅角緑内障の剖検眼で、線維柱帯細胞数の減少と細胞外基質の増加がみられることを報告した。他にも、これらが本疾患における房水流出抵抗の増大、眼圧上昇の原因の一つであることを推定する多くの報告^{1)~4)}がなされている。線維柱帯細胞は加齢により減少するが⁷⁾、線維柱帯細胞の減少に続いて起こる線維柱帯の機能低下は、房水流出抵抗増大に寄与する可能性があると考えられる。また、すでに臨床応用されているアルゴンレーザー線維柱帯形成術(argon laser trabeculoplasty, ALT)や、新しい治療法として選択的レーザー線維柱帯形成術(selective laser

trabeculoplasty, SLT)があり、その有効性について多くの報告^{8)~13)}がある。眼圧下降の作用機序は不明な点が多いが、ALTに関しては線維柱帯の機械的な収縮¹⁴⁾や、細胞レベルでの変化¹⁵⁾が報告されており、SLTに関しては線維柱帯細胞を活性化させて線維柱帯の機能を回復させ、房水流出抵抗を減少させることが考えられている¹⁶⁾。ALTとSLTを剖検眼で行った報告によると、ALTでは線維柱帯組織構築は強く破壊され、SLTにおいても細胞の色素顆粒の破壊が観察されている¹⁷⁾。このような光力学的な作用を線維柱帯に与える方法では長期的にわたっての効果が不明であるため、非破壊的な線維柱帯の活性化手段が望ましいと思われる。

線維柱帯細胞は神経外胚葉由来で¹⁸⁾、貪食能¹⁹⁾、遊走能を持ち²⁰⁾、網膜色素上皮によく似た性質を持っていると思われる。我々は以前に網膜色素上皮細胞において、PDGFが脱分化と細胞増殖および筋細胞への異分化を促進する因子であることを報告²¹⁾しており、またKavenら²²⁾は網膜色素上皮細胞がPDGFとFGF 2によって細胞増殖が促進され、VEGFは影響が少なく、さらにIGF-1やトランスフォーミング成長因子 β と組み合わせることで細胞増殖が抑制されることを報告している。今回我々が用いた細胞増殖因子の中で、PDGF、FGF 2、IGF-1は線維柱帯細胞の増殖を促進したがVEGFは抑制しており、線維柱帯細胞の細胞増殖因子に対する反応が網膜色素上皮細胞によく似ていることが推定された。このように、細胞増殖に関して網膜色素上皮細胞と共通のキャラクターを持つことは線維柱帯細胞の

性質や房水流出抵抗の増大の機序を考える上で非常に興味深い。細胞増殖因子の受容体については Wordinger⁵⁾がヒト線維柱帯細胞で PDGF 受容体や FGF 受容体をはじめ、少なくとも 15 種類の受容体の発現がみられると報告しており、VEGF 受容体の発現は今回我々が確認した。細胞増殖因子に対する反応は受容体と細胞内情報伝達を介したものであることが考えられる。今回の我々の実験結果から、細胞増殖因子に線維柱帯細胞の増殖を促進するものとしめないものがあることが示され、それは線維柱帯細胞における受容体や細胞内情報伝達経路の特徴を反映していると推察される。他の細胞増殖因子についてもさらなる検討が必要であるが、線維柱帯細胞を細胞増殖因子で刺激して増殖させ、線維柱帯の機能を活性化させることで眼圧下降を図るためには PDGF、IGF-1、FGF 2 がよい候補であると考えられた。

文 献

- 1) **Alvarado J, Murphy C, Juster R** : Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and nonglaucomatous normals. *Ophthalmology* 91 : 564—579, 1984.
- 2) **Rohen JW** : Why is intraocular pressure elevated in chronic simple glaucoma? Anatomical considerations. *Ophthalmology* 90 : 758—765, 1983.
- 3) **Lütjen-Drecoll E, Rittig M, Rauterberg J, Jander R, Mollenhauer J** : Immunomicroscopical study of type VI collagen in the trabecular meshwork of normal and glaucomatous eyes. *Exp Eye Res* 48 : 139—147, 1989.
- 4) **Sawaguchi S, Yue BY, Chang IL, Wong F, Higginbotham EJ** : Ascorbic acid modulates collagen type I gene expression by cells from an eye tissue trabecular meshwork. *Cell Mol Biol* 38 : 587—604, 1992.
- 5) **Wordinger RJ, Clark AF, Agarwal R, Lambert W, McNatt L, Wilson SE, et al** : Cultured human trabecular meshwork cells express functional growth factor receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 1575—1589, 1998.
- 6) **Chang IL, Elner G, Yue YJT, Cornicelli A, Kawa JE, Elner VM** : Expression of modified low-density lipoprotein receptors by trabecular meshwork cells. *Curr Eye Res* 10 : 1101—1112, 1991.
- 7) **Alvarado J, Murphy C, Polansky J, Juster R** : Age-related changes in trabecular meshwork cellularity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21 : 714—727, 1981.
- 8) **Wise JB, Witter SL** : Argon laser therapy for open-angle glaucoma. A pilot study. *Arch Ophthalmol* 97 : 319—322, 1979.
- 9) **山本哲也, 白土城照, 北澤克明** : 隅角半周照射による laser trabeculoplasty の成績. *日眼会誌* 88 : 486—492, 1984.
- 10) **Coakes R** : Laser trabeculoplasty. *Br J Ophthalmol* 76 : 624—626, 1992.
- 11) **狩野 廉, 桑山泰明, 溝上志朗, 伊藤訓子** : 選択的レーザー線維柱帯形成術の術後成績. *日眼会誌* 103 : 612—616, 1999.
- 12) **加治屋志郎, 早川和久, 澤口昭一** : 選択的レーザー線維柱帯形成術の治療成績. *日眼会誌* 104 : 160—164, 2000.
- 13) **Latina MA, Tumbocon JA** : Selective laser trabeculoplasty : A new treatment option for open angle glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* 13 : 94—96, 2002.
- 14) **Wise JB** : Glaucoma treatment by trabecular tightening with the argon laser. *Int Ophthalmol Clin* 21 : 69—78, 1981.
- 15) **Bylsma SS, Samples JR, Acott TS, Van Buskirk EM** : Trabecular cell division after argon laser trabeculoplasty. *Arch Ophthalmol* 106 : 544—547, 1988.
- 16) **Latina MA, Park C** : Selective targeting of trabecular meshwork cells : *In vitro* studies of pulsed and CW laser interactions. *Exp Eye Res* 60 : 359—371, 1995.
- 17) **Kramer TR, Noecker RJ** : Comparison of the morphologic changes after selective laser trabeculoplasty and argon laser trabeculoplasty in human eye bank eyes. *Ophthalmology* 108 : 773—779, 2001.
- 18) **Tripathi BJ, Tripathi RC** : Neural crest origin of human trabecular meshwork and its implications for the pathogenesis of glaucoma. *Am J Ophthalmol* 107 : 583—590, 1989.
- 19) **Buller C, Johnson DH, Tschumper RC** : Human trabecular meshwork phagocytosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31 : 2156—2163, 1990.
- 20) **Calthorpe CM, Grierson I** : Fibronectin induces migration of bovine trabecular meshwork cells *in vitro*. *Exp Eye Res* 51 : 39—48, 1990.
- 21) **Ando A, Ueda M, Uyama M, Masu Y, Ito S** : Enhancement of dedifferentiation and myoid differentiation of retinal pigment epithelial cells by platelet derived growth factor. *Br J Ophthalmol* 84 : 1306—1311, 2000.
- 22) **Kaven CW, Spraul CW, Zavazava NK, Lang GK, Lang GE** : Growth factor combinations modulate human retinal pigment epithelial cell proliferation. *Curr Eye Res* 20 : 480—487, 2000.