

ヒト培養網膜色素上皮細胞の細胞骨格に関する研究

—ラテックス細粒貪食時の走査電子顕微鏡所見について—(図7)

明尾 潔・田中 靖彦・植村 恭夫 (慶応大学医学部眼科学教室)
 藤原 達 司 (慶応大学電子顕微鏡研究室)

The cytoskeletons of the cultured human retinal pigment epithelium
 during phagocytosis of latex microspheres
 : Scanning electron microscopic studies

Kiyoshi Akeo, Yasuhiko Tanaka and Yasuo Uemura
Department of Ophthalmology, School of Medicine, Keio University
 Tatsuji Fujiwara
Electron Microscope Laboratory, Keio University

要 約

1) ヒト培養 RPE には, 60~130nm にわたる口径をもつ stress fiber が認められ, ラテックス細粒貪食時には stress fiber より枝分かれした microfilament に相当すると考えられる口径25~30nm の fiber が絡み付き, 細胞内には stress fiber により包み込まれるようにして取り込まれていた. 2) 細胞内に取り込まれてゆくにつれて, ラテックス細粒は stress fiber などが癒合して生じた膜状物で包まれ, 完全に取り込まれるとラテックス細粒の周囲の stress fiber の間にはより大きな空洞が観察され, それは細胞骨格以外の成分が多いためと思われた. (日眼 91:112-117, 1987)

キーワード: 網膜色素上皮細胞, 細胞骨格, 貪食, ラテックス細粒

Abstract

The cytoskeletons of the cultured human retinal pigment epithelium (RPE) during phagocytosis of latex microspheres were studied by scanning electron microscopy (SEM) after treating with the nonionic detergent, saponin. After two and seven hours of incubation of the RPE with latex microspheres, the cultured RPE cells were treated with 0.1~0.2mg/ml of saponin at 4°C for 30 minutes and fixed for SEM studies. Thicker stress fibers, 60~130nm in diameter, were observed in cultured human RPE cells. After a few thinner branching fibers, 25~30nm in diameter, which corresponded to microfilaments entwined around the latex microspheres, many thicker stress fibers enveloped and ingested into the cytoplasm. When a number of latex microspheres were ingested into the cytoplasm totally, there were larger cavities and a few stress fibers left around the latex microspheres. It seemed that these cavities were due to components other than cytoskeletons. As results obtained from the SEM studies using the detergent, it is apparent that the cytoskeletons of the cultured human RPE cells play an important role to ingest microspheres into the cytoplasm. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 91: 112-117, 1987)

Key words: retinal pigment epithelium, cytoskeleton, phagocytosis, latex microspheres

別刷請求先: 160 東京都新宿区信濃町35 慶応義塾大学医学部眼科学教室 明尾 潔

Reprint requests to: Kiyoshi Akeo, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Keio Univ.

35 Shinano-machi, Shinjuku-ku, Tokyo, 160, Japan

(昭和61年8月4日受付) (Accepted August 4, 1986.)

緒 言

著者らは先に、ヒト培養網膜色素上皮細胞（以下 RPE と略す）のラテックス細粒^{1)~3)}やヒト視細胞外節³⁾⁴⁾の貪食過程において、初期には主として microvilli が機能することを走査電子顕微鏡（走査電顕と略す）により立体的に観察し、さらにこれらを細胞内に取り込む際には、細胞骨格である microfilament や microtubule が重要な働きをしていることを超薄切片法を用いて透過電子顕微鏡（以下透過電顕と略す）にて二次的に観察した。しかし、貪食時におけるこれらの細胞骨格の機能を走査電顕によって三次的に観察するためには、1978年 Bell ら⁵⁾によるトリトン X や、1983年 Ohtsuki ら⁶⁾によるサポニンなど、生体膜や可溶性成分の処理可能な detergent を作用させる必要がある。著者らの調査した範囲ではヒト培養 RPE にこれらの方法を応用した報告はこれまでにない。今回、著者らは detergent により影響されないラテックス細粒を貪食させたヒト培養 RPE をサポニンで処理し、その三次元的微細構造を走査電顕にて観察を行い、若干の知見を得たのでここに報告する。

実験材料および方法

田中^{7)~9)}の方法により培養された初代ヒト培養 RPE より継代された第2代継代培養細胞を、 $\phi 35\text{mm}$ の培養皿底に置いた2枚の $11 \times 22\text{mm}$ カバーガラス上に培養し、9日目より、 $\phi 1.091\mu\text{m}$ ラテックス細粒（The Dow Chemical Co. Indianapolis USA）を加え、培養液中の濃度を 4×10^7 個/ml となるように調整し、貪食期間を2, 7時間と設定した。

カバーガラス上に培養されたヒト RPE をまず、10 mM トリス・塩酸緩衝液 pH 7.2 により洗浄し、サポニン（0.1~0.2mg/ml）を4℃、30分間作用させた。10 mM トリス・塩酸緩衝液 pH 7.2 により再度洗浄し、4% グルタル・アルデヒドと4% タンニン酸の等量の等量混合固定液による4℃1時間の前固定の後、10 mM トリス・塩酸緩衝液 pH 7.2 中に浸漬し、さらに、1% OsO_4 により4℃1時間の後固定を行った。エタノール系列による脱水の後、酢酸イソアミルに10分間置換し、 CO_2 臨界点乾燥、カーボン・ゴールド真空蒸着を行い、日本電子 JSM-35C 走査電顕（加速電圧15KV）にて観察した。

結 果

ラテックス細粒を加える前のヒト培養 RPE では、細胞膜より細胞内へ向けて平行に走る口径110~130 nm の stress fiber が認められ、細胞内では枝分かれして細くなり、口径60~80 nm のより細い stress fiber が網目を形成していた（Fig. 1）。ラテックス細粒を貪食する際には、これらの stress fiber がラテックス細粒の下面に集中していたが、このヒト培養 RPE では、ラテックス細粒の表面には fiber はいまだ認められなかった（Fig. 2）。stress fiber はラテックス細粒に接触した後に枝分かれし、これらの枝分かれした口径25~30 nm の細い fiber がラテックス細粒の表面に絡みついてきた（Fig. 3）。さらに、stress fiber が網目状となって、ラテックス細粒の表面を包み込むようにして、細胞内に取り込み（Fig. 4）、ラテックス細粒が細胞内に完全に取り込まれると、その表面には、stress fiber が集中し癒合していると思われる膜状物が認め

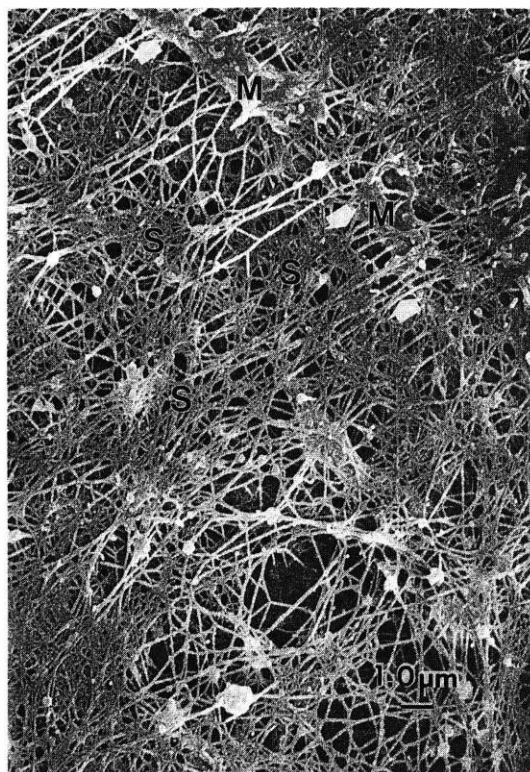


Fig. 1 Straight thicker stress fibers extend from a cell membrane (M) into the cytoplasm. These stress fibers are branching, and forming netlike (S) structure, 60~130 nm in diameter.

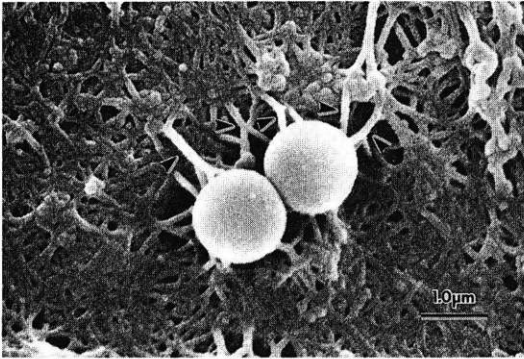


Fig. 2 Stress fibers (arrows) concentrate under the latex microspheres, but are not recognized on the surfaces of the microspheres.

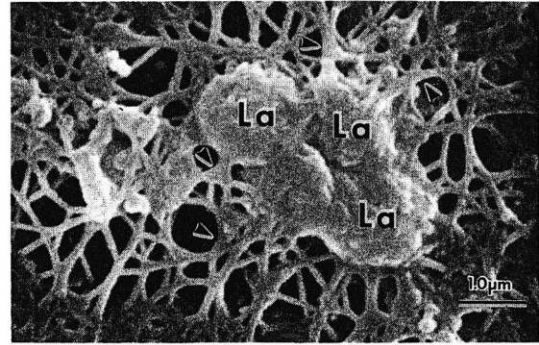


Fig. 5 Stress fibers conglomerate around the latex microspheres (La) which are ingested into the cytoplasm by enveloping in membranous materials.

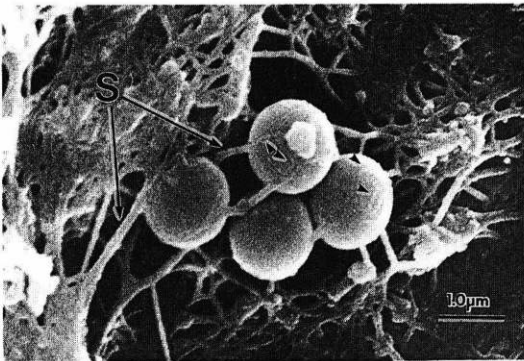


Fig. 3 A few slender fibers, 25~30 nm in diameter (arrows), which are branching from stress fibers (S), entwine around the microspheres. These fibers could correspond to microfilaments.

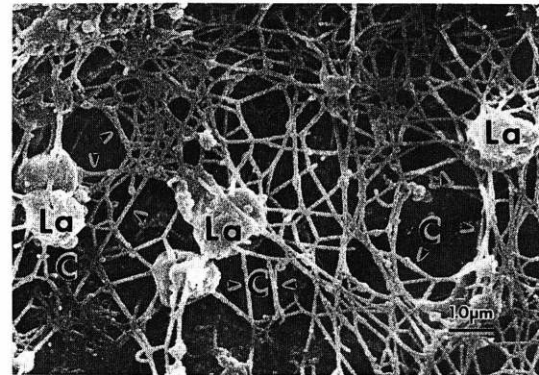


Fig. 6 The latex microspheres (La) are ingested into the cytoplasm totally. Larger cavities (C) appear around the latex microspheres.

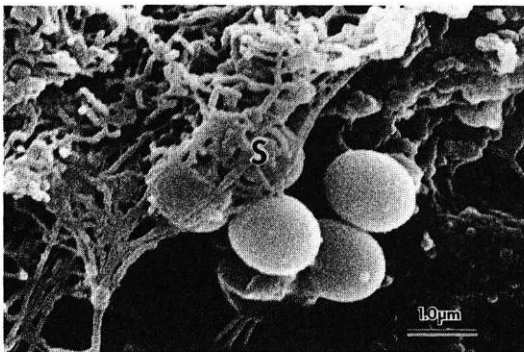


Fig. 4 Netlike stress fibers (S) are enveloping the latex microspheres.

きな空洞が観察され、これは細胞骨格以外の成分が多いためと考えられた (Fig. 6)。

考 按

これまでに著者らはラテックス細粒の貪食過程を detergent を用いずに走査電顕²³⁾および超薄切片法による透過電顕¹³⁾にて観察した。走査電顕では microvilli がラテックス細粒に接触し徐々に包み込んでゆくところが観察され、透過電顕ではラテックス細粒が細胞内に取り込まれてゆく際には microfilament はラテックス細粒に集中しているが、多くのラテックス細粒が完全に細胞内に取り込まれると逆にその周囲には microfilament の数は著明に少なくなっていた。しかし、走査電顕では細胞内の微細構造を観察することができず、透過電顕ではラテックス細粒の周囲の fiber

られた (Fig. 5)。ラテックス細粒が細胞内に取り込まれるにつれて、その周囲の stress fiber の間にはより大

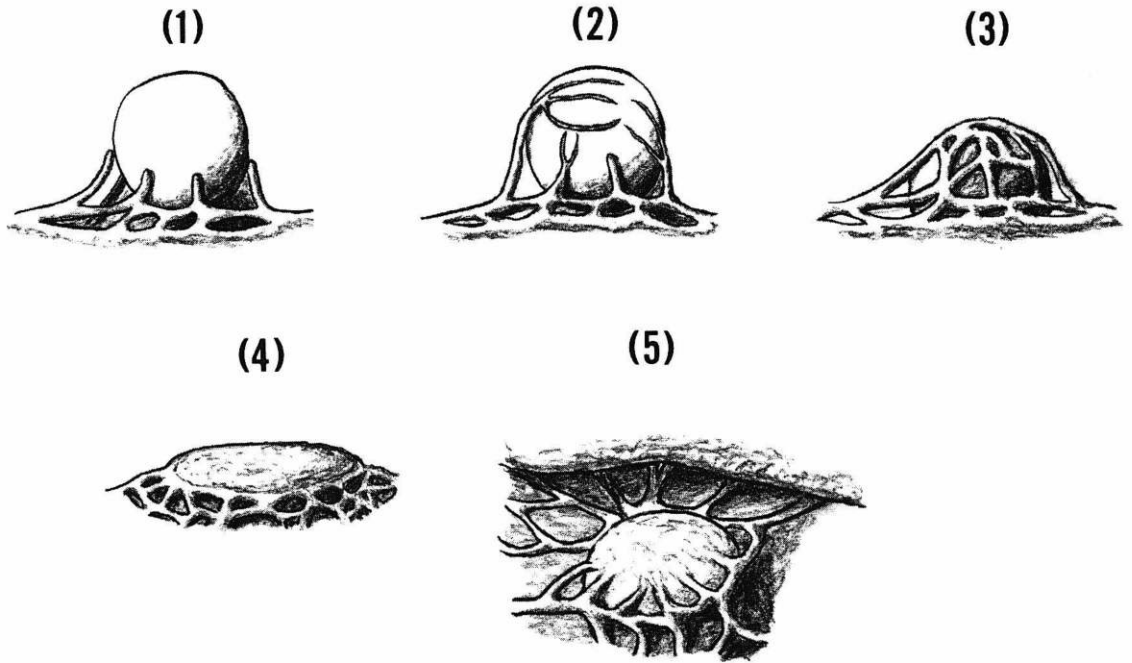


Fig. 7 Schematic diagrams of cytoskeletons of cultured human RPE during phagocytosis of latex microspheres.

(1) Stress fibers concentrate under latex microspheres. (2) A few slender branching fibers, 25~30nm in diameter, which correspond to microfilaments entwine around the latex microspheres. (3) Netlike stress fibers envelop the microspheres. (4) Stress fibers gather around the latex microspheres which are ingested into the cytoplasm and enveloped in membranous materials. (5) The latex microsphere is ingested into the cytoplasm totally. Larger cavities appear around the latex microspheres.

の全体像を立体的に把握することが不可能であった。

今回、detergentを用いることによって細胞内に取り込まれてゆくラテックス細粒と細胞骨格との関係を走査電顕により立体的に観察することが可能となり、その結果を要約し、図に示すと Fig. 7 のようになる。すなわち、貪食過程の初期では口径の太い stress fiber より枝分かれした最も細い fiber が数本ラテックス細粒に絡み付いているだけであるが、ラテックス細粒が細胞内に取り込まれてゆくにつれて stress fiber がラテックス細粒に数多く集中しその表面を包み込んでいく。しかし、これまでの透過電顕による観察結果と同様に完全にラテックス細粒が細胞内に取り込まれると、その周囲には逆に stress fiber の数は少なくなっていた。すなわち、細胞骨格は細胞内にラテックス細粒が貪食される際に集中的に機能し、初期の段階や細胞内に完全に取り込まれてしまった後では、その機能は活発ではないことがうかがわれる。

貪食時における細胞骨格の機能に関するこれまでの報告では、1983年 Chaitin ら¹⁰⁾がラット培養 RPE において stress fiber が貪食された視細胞外節に集中していることを蛍光顕微鏡にて観察し、stress fiber の重要性を確認している。しかし、1982年 Ryder ら¹¹⁾は細菌を貪食させた多核白血球に detergent を作用させ、透過電顕により立体的に細胞骨格の動きを観察したところ、まず 5~25nm にわたる口径をもつ網目状の fiber が細菌を包み込み、細胞内に細菌を取り込む際にはこの網目状の fiber の数は細菌の周囲に著明に増加すると報告しており、多核白血球においても細胞骨格は貪食時に集中的に機能するものと思われる。さらに、好中球では 1984年 Sheterline ら¹²⁾によりラテックス細粒貪食時におけるアクチン蛋白の生化学的な定量化も試みられている。

また、細胞質中には一般によく知られているように口径 25nm の microtubule、10nm の intermediate

sized filament, 4nm の microfilament があるとされているが、今回観察された60nm から130nm にわたる口径をもつ stress fiber やラテックス細粒に絡みついていて、さらに細い口径25~30nm の fiber がこれらの3種類の細胞骨格のいずれに相当するのかが考察すると、今回実験に用いた試料にはカーボン・ゴールドの蒸着を20nm 程度の厚さで行っているため、実際の口径は最も細い fiber は5~10nm, stress fiber は40~110nm と推定され、ヒト培養 RPE の細胞質中には透過電顕によりこれまで microfilament が数多く観察されたこと³⁾とを考え合わせると、おそらく最も細い fiber は microfilament に相当し、stress fiber は主として microfilament が束状になっているものと考えられる。

細胞骨格の微細構造を詳細に観察したこれまでの報告においても、1978年 Bell ら⁵⁾は Chinese hamster の卵巣細胞にトリトン-X を作用させ、12nm 程度のゴールド・パラジウムの蒸着を行い、細胞骨格の微細構造を走査電顕にて三次元的に観察したところ、16nm から300nm にわたる口径をもつ fiber を認め、最も細い fiber は実際の口径が約4nm の microfilament であろうと述べている。一方、RPE においては1982年 Owaribe ら¹³⁾が鶏胚培養 RPE を、1983年 Haley ら¹⁴⁾がヒト培養 RPE を、それぞれトリトン-X により処理し、negative staining 法や超薄切片法を用いて透過電顕にて二次的に観察し、intermediate sized filament や microfilament の存在を確認している。今回、サポニンを用いることによってヒト培養 RPE における細胞骨格の微細構造の立体的な観察が可能となったが、これまでの報告とは異なり最も細い fiber はラテックス細粒の表面にのみ観察され、その他は口径の太い stress fiber であった。おそらく stress fiber よりさらに枝分かれしたこれらの細い fiber はサポニンを作用させた際に、生体膜などとともに処理されてしまった可能性があり、今後、detergent の種類や濃度、作用時間を検討する必要がある。

また、stress fiber やこれらの口径の細い fiber がどのような成分で構成されているのかという点について、今後、さらに検索してゆくためには1978年 Webster ら¹⁵⁾や1982年 Ryder ら¹¹⁾の報告に見られるようにグリッド上に培養された細胞を detergent で処理し、傾斜を加えて透過電顕にて個々の fiber を立体的に直接観察するか、もしくは1980年 Heuser ら¹⁶⁾により報告された方法を発展させた1981年 Hirokawa

ら¹⁷⁾の報告に見られるように detergent で処理された培養細胞を急速凍結し切断の後、エッチングを行い、fiber の断面を観察する方法がある。さらに、アクチンやミオシンなどの蛋白質に対する抗体を用いることによりヒト培養 RPE の細胞骨格がどのような蛋白質により構成されているのか、将来同定が可能になるものと思われる。

なお、本論文の要旨の一部は昭和61年5月22日第90日本眼科学会総会にて講演した。また、本研究は昭和60年度文部省科学研究費補助金60480391の援助を受けた。記して謝意を表します。

文 献

- 1) 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 87(11): 1101—1105, 1983.
- 2) 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, 89(3): 433—439, 1985.
- 3) 明尾 潔: ヒト培養網膜色素上皮細胞の貪食能に関する電子顕微鏡的研究, 慶応医学 63(2): 111—140, 1986.
- 4) 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 90(1): 188—196, 1985.
- 5) Bell PB, Miller MM, Carraway KL, Revel JP: SEM-revealed changes in the distribution of the triton-insoluble cytoskeleton of chinese hamster ovary cells induces by dibutyl cyclic AMP. Scanning Electron Microsc II: 899—906, 1978.
- 6) Ohtsuki I, Manzi RM, Palade GE, Jamieson JD: Entry of macromolecular tracers into cells fixed with low concentrations of aldehydes. Biol Cellulaire 31: 119—128, 1978.
- 7) 田中靖彦: ヒト網膜色素上皮細胞の組織培養に関する研究—培養細胞の透過型電子顕微鏡所見について—, 日眼 86(11): 2010—2018, 1982.
- 8) 植村恭夫, 田中靖彦, 気賀沢一輝, 明尾 潔: ヒト網膜色素上皮細胞の組織培養法について, 厚生省特定疾患, 網膜脈絡膜萎縮症調査研究班, 昭和58年度報告書, 113—115, 1984.
- 9) 田中靖彦: ヒト網膜色素上皮細胞の組織培養について, 眼科領域における最新の進歩, 396—410, 医学教育出版社, 1985.
- 10) Chaitin MH, Hall MO: The distribution of actin in cultured normal and dystrophic rat

- pigment epithelial cells during the phagocytosis of rod outer segments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 821—831, 1983.
- 11) **Ryder MI, Niederman R, Taggart EJ**: The cytoskeleton of human polymorphonuclear leucocytes: Phagocytosis and degranulation. *Anat Rec* 203: 317—327, 1982.
 - 12) **Sheterline P, Rickard JE, Richards RC**: Involvement of the cortical actin filament network of neutrophil leucocytes during phagocytosis. *Biochem Soc Trans* 12: 983—987, 1984.
 - 13) **Owaribe K, Masuda H**: Isolation and characterization of circumferential microfilament bundles from retinal pigmented epithelial cells. *J Cell Biol* 95: 310—315, 1982.
 - 14) **Haley JE, Flood MT, Kjeldbye HM, Maiello ED, Bilek MK, Gouras P**: Two-dimensional electrophoresis of proteins in human retinal pigment epithelial cells: Identification of cytoskeletal proteins. *Electrophoresis* 4: 133—137, 1983.
 - 15) **Webster RE, Henderson D, Osborn M, Weber K**: Three-dimensional electron microscopical visualization of the cytoskeleton of animal cells: Immunoferritin identification of actin- and tubulin-containing structures. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 5511—5515, 1978.
 - 16) **Heuser JE, Kirschner MW**: Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. *J Cell Biol* 86: 212—234, 1980.
 - 17) **Hirokawa N, Heuser JE**: Quick-freeze, deep-etch visualization of the cytoskeleton beneath surface differentiations of intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* 91: 399—409, 1981.
- (第90回日眼総会原著)
-