

培養家兎角膜内皮細胞における F-アクチンの分布と cytochalasin B の影響 (図5, 表1)

藤野 淑江・谷島 輝雄 (東京大学医学部眼科学教室)

The Distribution of F-actin and the Effects of Cytochalasin B on Cultured Rabbit Corneal Endothelial Cells

Yoshie Fujino and Teruo Tanishima

Department of Ophthalmology, School of Medicine, University of Tokyo

要 約

家兎角膜内皮培養細胞を用いて、内皮細胞内 F-アクチンの分布を nitrobenzoxadiazole-phalloidin 染色により観察した。培養7日目に移植片を除去し、さらに培養を続け confluent な細胞層を形成した段階で、中央部を機械的に取り除き損傷治癒過程にある細胞と同様に観察した。また培養液中に cytochalasin B を加えて、その細胞の形態、遊走などに及ぼす影響および F-アクチンの分布に対する影響を見た。F-アクチンは、confluent な状態の内皮細胞では、細胞膜に沿った分布を示し、損傷治癒過程の細胞では、細胞質内に線維状に分布していた。cytochalasin B を培養液に加えると、損傷治癒過程における細胞の伸びが阻止されるとともに、細胞の形態に変化が見られ、F-アクチンの分布は顆粒状の分布となった。以上より、cytochalasin B により F-アクチンの合成が阻害され損傷治癒過程が遅延したと考えられ、F-アクチンが、角膜内皮細胞の損傷治癒過程に重要な役割を果たすと思われる。(日眼 91: 448—455, 1987)

キーワード: F-アクチン, 家兎, 培養角膜内皮細胞, 損傷治癒, サイトカラシン B

Abstract

The distribution of actin in cultured rabbit corneal endothelial cells was studied by means of nitrobenzoxadiazole-phalloidin. Confluent cell layers were grown on cover-slips and the cells of the central area were removed to make a wound. Cytochalasin B was applied to the medium at concentrations of 0, 1, 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and the effects on the actin distribution and the wound healing processes were examined. In the cytochalasin B free medium, the confluent cells showed the distribution of actin filaments mainly along the cell membrane and migrating cells covering the wound displayed stress fibers in the cytoplasm. The addition of cytochalasin B to the medium resulted in inhibition of cell migration, alteration of cell shape and reduction in the number of stress fibers. This study indicates that actin filaments are necessary for the wound healing of cultured corneal endothelial cells. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 448—455, 1987)

Key words: F-actin, Rabbit, Cultured corneal endothelial cells, Wound healing, Cytochalasin B

別刷請求先: 113 東京都文京区本郷7-3-1 東京大学医学部眼科学教室 藤野 淑江

Reprint requests to: Yoshie Fujino, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Univ. of Tokyo
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

(昭和61年12月5日受付) (Accepted December 5, 1986.)

I 緒 言

細胞収縮性蛋白質であるアクチンが、角膜を構成する各細胞にも存在することは、H-メロミオシンを用いた電子顕微鏡的観察により¹⁾、また抗アクチン抗体を用いた蛍光抗体法²⁾³⁾や酵素抗体法⁴⁾⁵⁾により報告されている。

角膜上皮細胞の損傷治癒過程とアクチンとの関係については、のびている上皮細胞の先端に、アクチンフィラメントが密に集合しているとの報告がある¹⁾。また、角膜の器官培養下で、アクチンの重合を阻害する cytochalasin B (以下 cytB) や cytochalasin D (以下 cytD)^{6)~10)}を培養液中に投与すると、角膜上皮細胞の損傷治癒過程が遅延することから、アクチンフィラメントが、上皮細胞の損傷治癒過程に重要であると考えられている^{11)~14)}。

角膜内皮細胞については、筆者らが、flat preparation を用いて、抗アクチン抗体による酵素抗体法⁵⁾および F-アクチンに特異的に結合する phalloidin に蛍光標識した 7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazole (NBD)-phalloidin を使って¹⁵⁾、損傷治癒過程において、内皮細胞内におけるアクチンの分布が変化することを明らかにし、内皮細胞の損傷治癒過程にも、アクチンが重要な役割を持つことを推論した。この推論を裏付ける目的で、今回、培養角膜内皮細胞内 F-アクチンの分布を NBD-phalloidin を用いて検討すると共に、アクチンの重合阻害剤である cytB を培養液中に投与し、アクチンの細胞内分布の変化と、その損傷治癒過程に与える影響を検討したので報告する。

II 方 法

白色家兎(体重2.0~2.5kg)を過量のネプタールにて屠殺し、眼球摘出した。実体顕微鏡下で、角膜片からデスメ膜ごと内皮細胞を剥離し、2~4mm 四方に細切した。直径35mm の培養皿に、24×24mm のカバーガラスを置き、その上に細切した移植片を12~14個ずつ置き、培養した。培養液は、10%牛胎児血清(GIBCO, Chagrin Falls, OH, USA), 10 μ g/ml Gentamicin (エセックス日本)を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DME) (GIBCO) を用い、37 $^{\circ}$ C 5%CO₂の条件下で培養した。

7日後、移植片を除去し、さらに培養を続け confluent な角膜内皮細胞の sheet を作った。実体顕微鏡下で、直径1mm の内皮細胞をピンセットにて剥離

し、機械的に損傷を作り、一部には cytB を加えた。cytochalasin B (SIGMA, St. Louis, MO, USA) は、dimethylsulfoxide (DMSO) (SIGMA) にて 1mg/ml に溶解し、さらに、蒸留水で希釈し、100 μ g/ml とした。これを、培養液中へ、1, 5, 10 μ g/ml の各濃度になるよう混合した。24時間培養後、半数は固定し、残り半数は cytB の作用の可逆性を観察するために、cytB を含まない DME のみの培養液に戻し、さらに24時間培養した。対照として、DME のみ、および DMSO 1% を含む液でそれぞれ24時間、48時間培養したものをを用いた。

それぞれ、固定前に、位相差顕微鏡にて観察し、写真撮影を行った。

固定時期：1. 移植片から細胞がのびているところ(培養開始後3日)。2. confluent な細胞の sheet(移植片除去後7日)。

3. 損傷作製後24時間。

4. 損傷作製後48時間。

固定法：培養液を捨て、培養皿ごと phosphate buffered saline (PBS, 0.01M pH 7.2) にて洗浄後、10%中性緩衝ホルマリンにて30分間固定し、PBS にて洗浄した。カバーガラスを取り出し-20 $^{\circ}$ C の absolute acetone に5分間通し、空気乾燥した。

アクチンの観察：NBD-phalloidin (Molecular probes, INC., Junction City, OR, USA) 1.67 $\times 10^{-7}$ M を37 $^{\circ}$ C で30分間反応させ、PBS にて洗浄後、グリセリンで無蛍光スライドガラス上にマウントし、Nikon 蛍光顕微鏡で観察、写真撮影を行った。

III 結 果

1. 移植片からのびている細胞は、胞体から、偽足のような突起を出しており、胞体内および突起内に、線維状の蛍光が観察された(図1A)。

2. confluent な細胞は、ほぼ正六角形の形をし、細胞膜に沿って強い蛍光が観察された。強い蛍光の間には、線維状の蛍光が多数見られた。細胞質内にも、わずかながら、線状の蛍光が観察された(図1B)。

3. 損傷治癒過程において、損傷縁からのび始めた細胞は、移植片からのびつつある細胞と同様に、偽足様突起を出し、細胞内全体に線維状蛍光が見られた(図1C)。

4. 損傷作製後24時間(表1)。

1) DME のみの対照群では、損傷縁の全周から、それぞれ1, 2個ずつの細胞がのび出していた(図2A)。

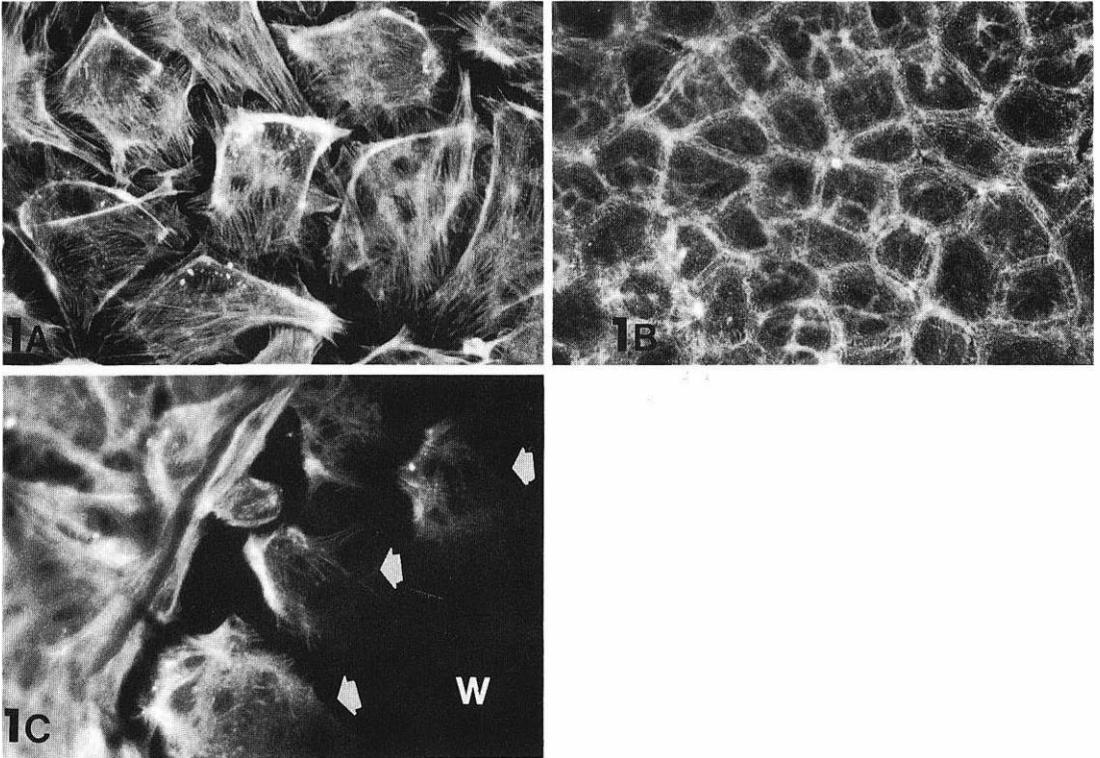


図1 NBD-phalloidin 反応後の蛍光顕微鏡写真 (×245). W: 損傷部. A: 移植片からのびつつある細胞を示す. 細胞質内に線維状蛍光が観察される. B: confluent な細胞では, 細胞膜に沿った強い蛍光とともに, 細胞質内にも, わずかな蛍光が観察される. 強い蛍光と蛍光の間には, 細かい線維状蛍光が見られる. C: 損傷作製後12時間の損傷部をのびつつある細胞 (矢印) を示す. 細胞質内に線維状蛍光が観察される.

表1 損傷作製後24時間ならびに48時間における各培養液での細胞の状態および蛍光所見の比較

	損傷作製後24時間	損傷作製後48時間
DMEのみ	損傷縁から1, 2層の細胞 細胞質内の線維状蛍光	損傷縁から4から6層の細胞 細胞質内に線維状の蛍光
DMSO 1%	同上	同上
cytB 1μg/ml	損傷縁から1, 2個の細胞 形は扁平で突起も短い 細胞質内に線維状の蛍光	*損傷縁から2, 3層の細胞 形も正常 細胞質内に線維状
cytB 5μg/ml	損傷縁からの細胞ののびは見られない	*損傷縁から1, 2個の細胞 細胞質内に線維状の蛍光
cytB 10μg/ml	同上	*同上

* cytB 1, 5, 10μg/mlで各々24時間培養後, DMEのみの培養液に戻し, さらに24時間経過したもの.

これらの細胞は, 多数の突起を出し, この突起内, 胞体内ともに, 線維状の蛍光が観察された (図3A).

2) DMSO 1%を加えた培養液中では, 1)と同様であった (図2B).

3) cytB 1μg/mlでは, 損傷縁からのびる細胞が観察されたが, 数は少なくまばらであり, その細胞の突起は, 短く扁平であった (図2C). しかし, のびている細胞の蛍光は, 線維状であった (図3C). 損傷周囲の細

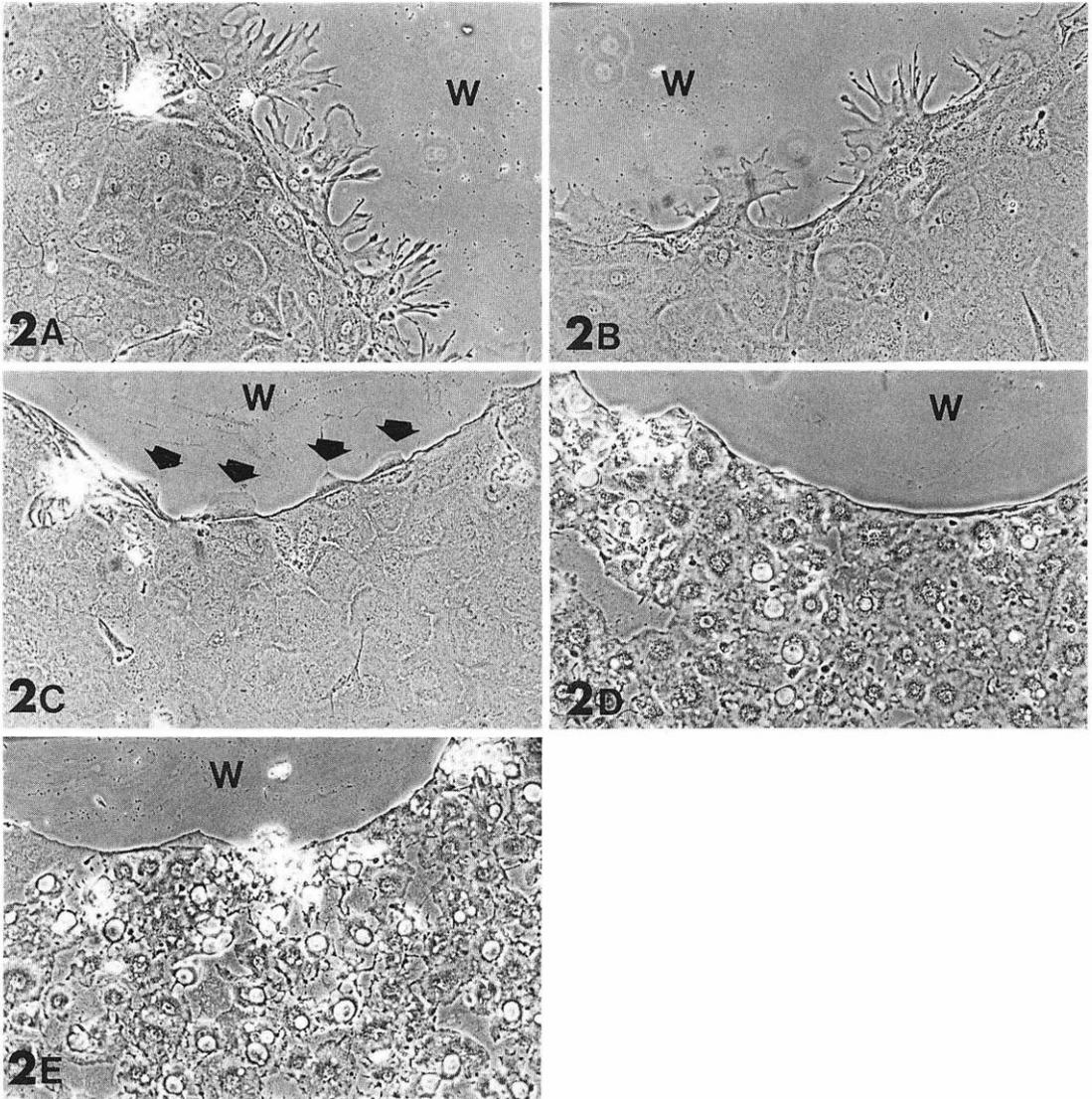


図2 損傷作製後24時間の位相差顕微鏡写真(×100). W: 損傷部, A: DMEのみの培養液. 損傷縁全周から細胞がのび出し, それぞれの細胞は細い突起を多数出している. B: DMSO 1%液. 損傷縁から, 細胞がのび出しており, それらの細胞は細長い突起を多数出している. C: cytB 1 μ g/ml液. 損傷縁から, わずかに細胞がのび出しているが(矢印), 先端も平滑で, 突起もほとんどない. 損傷周囲の細胞も, DMEのみの場合に比して, やや疎である. D: cytB 5 μ g/ml液. 損傷縁からの細胞の遊走は見られない. 損傷周囲の細胞は, 間隙が広がり, 形も不整となった. E: cytB 10 μ g/ml液. 損傷縁からの細胞の遊走は見られず, 損傷周囲の細胞は, バラバラで, 細胞間隙も広く, 細胞質内に空胞が見られる.

胞は, 位相差顕微鏡で観察すると, 1)と比較して, 疎な感じであったが(図2C), 蛍光は細胞膜に沿って, 対照とはほぼ同様に見られた(図3C).

4) cytB 5 μ g/mlでは, 損傷縁からの細胞の遊走は

見られなかった. 損傷周囲の細胞も, 間隙が広がり, 形も不整となった(図2D). その蛍光は, 固まったような顆粒状で, 細胞膜に沿った蛍光は, 強くなく, 細胞質内の線維状蛍光も不明瞭であった(図3D).

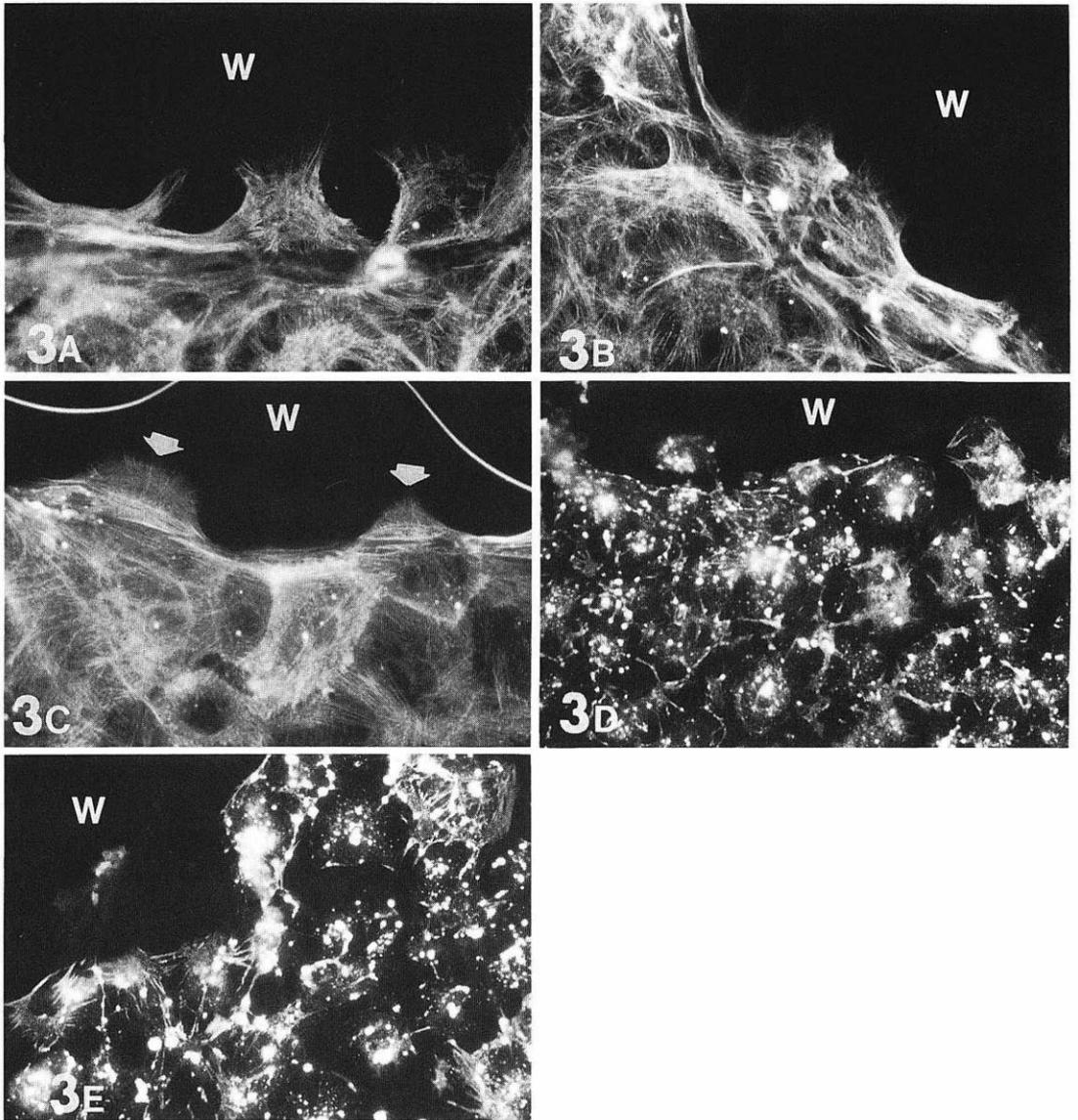


図3 損傷作製後24時間のNBD-phalloidinによる蛍光顕微鏡写真(×245)。W: 損傷部。A: DMEのみの培養液、のび出した細胞に線維状蛍光が観察される。B: DMSO 1%液、のび出している細胞には線維状蛍光が見られる。C: cyt B 1 μ g/ml液、ごく一部ののび出している細胞には(矢印)、線維状の蛍光が観察される。D: cytB 5 μ g/ml液、損傷周囲の細胞には、細胞膜に沿った蛍光は見られず、集積したような顆粒状の蛍光が観察される。E: cyt B 10 μ g/ml液、損傷周囲の細胞は、バラバラで、顆粒状の蛍光が見られる。

5) cytB 10 μ g/mlでは、損傷縁からの細胞の遊出は見られず、損傷周囲の細胞は、バラバラで、細胞間隙も広く、細胞質内に空が見られた(図2E)。蛍光も顆粒状に集積していた(図3E)。

5. 損傷作製後48時間(表1)。

1) DMEのみの培養液では、損傷部をのびる細胞は、損傷縁から、各々4から6層に達し、先端の細胞は24時間後と同様に細い突起を多数出していた(図4A)。そして、これらは、線維状の蛍光を示した(図5A)。

2) DMSO 1%を加えた培養液では、DMEのみの

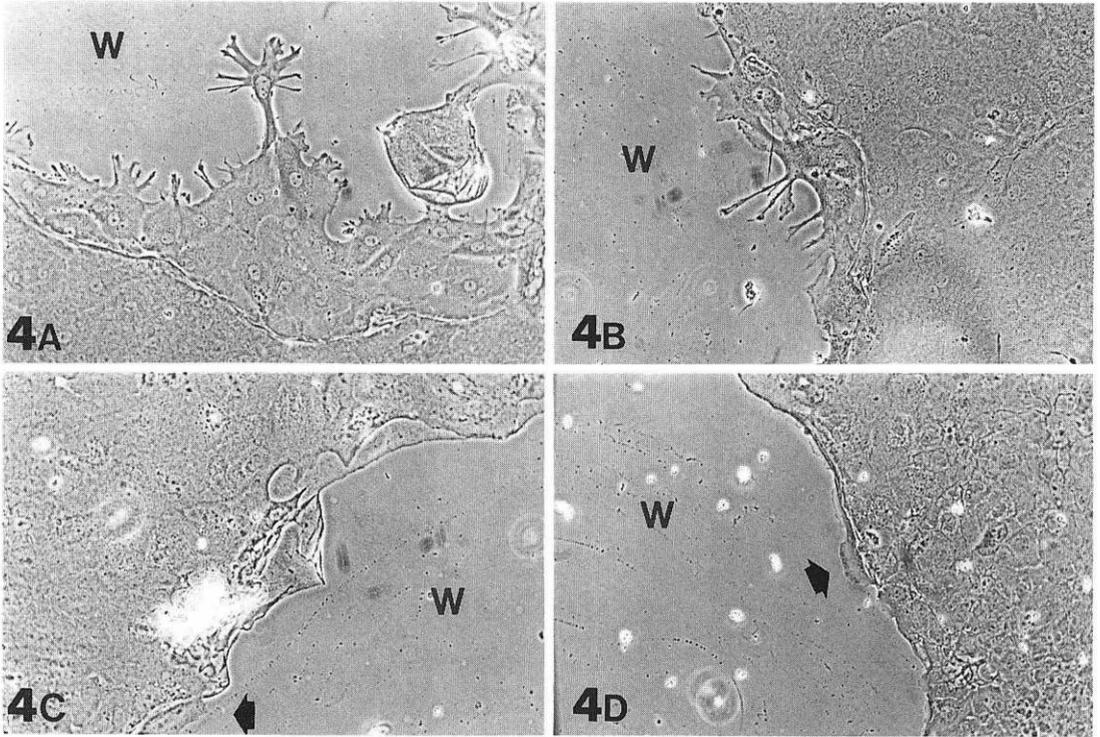


図4 損傷作製後48時間の位相差顕微鏡写真(×100)。W:損傷部。A:DMEのみの培養液。損傷縁から4から6層の細胞がのび出し、先端の細胞は、細長い突起を多数出している。cytB 1 μ g/ml (B), 5 μ g/ml (C), 10 μ g/ml (D)で各々24時間培養後、cytBを入れないDMEのみの培養液で24時間培養したものを示す。B:損傷縁から細胞ののびが見られ、先端に細長い突起を出しているのが観察される。損傷周囲の細胞は、正常と同様に密な配列となっている。C:損傷縁から、わずかの細胞の遊出が見られる(矢印)。周囲の細胞も密となり、細胞同志も接着している。D:損傷縁から、ごくわずかの細胞ののびが見られ(矢印)、周囲の細胞も、かなり密になってきている。

場合と同様であった。

3) cytB 1 μ g/ml液で24時間培養後、cytBを含まないDMEのみの培養液にてさらに24時間培養すると、損傷縁から活発な細胞の遊走が見られ、これらの細胞は、細長い突起を持ち(図4B)、線維状の蛍光を示した(図5B)。損傷周辺部の細胞は、ほぼ正常の形をし、細胞膜に沿った蛍光を示した。

4) cytB 5 μ g/ml液で24時間、さらにDMEのみの培養液で24時間培養したものは、損傷縁の全体で計3、4個の細胞の遊走が見られ、周囲の細胞の間隔も縮まり、密になってきた(図4C)。損傷部をのびる細胞は、線維状の蛍光を示し、損傷周囲の細胞の顆粒状の蛍光は消え、細胞膜に沿った強い蛍光となった(図5C)。

5) cytB 10 μ g/mlで24時間、さらにDMEのみの培

養液で24時間培養したものは、やや形は元に戻ったが、損傷縁からは、1、2個の細胞が、のび出している程度であり、これらは多くの突起を持たず扁平な形であったが(図4D)、細胞質内の蛍光は線維状であった。周囲の細胞は、密になってきたが、間隙も残っていた。蛍光は、顆粒状ではなくなり、細胞膜に沿った線維状となった(図5D)。

IV 考 按

家兎角膜内皮細胞におけるアクチンの分布は *in vivo* では、NBD-phalloidinを用いると、細胞膜に沿った強い蛍光が観察されている¹⁵⁾。

今回の培養家兎角膜内皮細胞では、細胞膜に沿った強い蛍光とともに細胞質内に線維状の蛍光が観察され

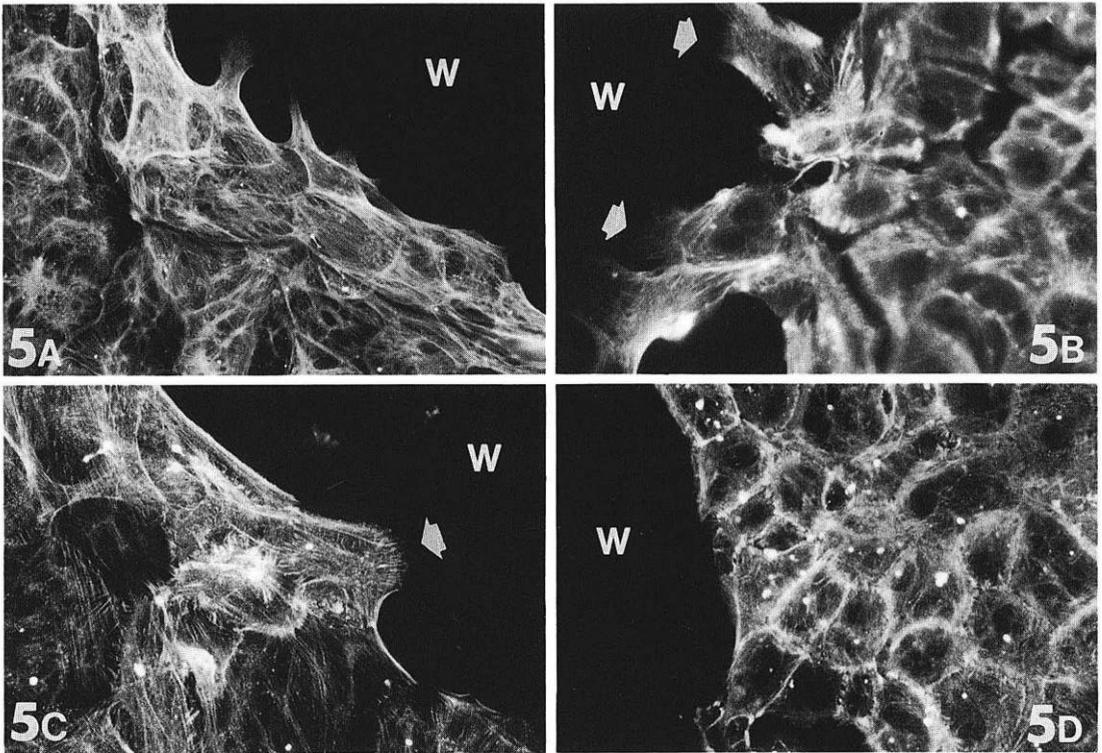


図5 損傷作製後48時間の NBD-phalloidin による蛍光顕微鏡写真($\times 245$). W: 損傷部. A: DME のみの培養液. 損傷縁からのび出した細胞層に線維状蛍光が明瞭に観察される. cytB $1\mu\text{g/ml}$ (B), $5\mu\text{g/ml}$ (C), $10\mu\text{g/ml}$ (D) にて各々24時間培養後, DME のみの培養液で24時間培養したものを示す. B, C: 損傷縁からのび出している細胞は(矢印), 線維状蛍光を示している. D: 損傷周囲の細胞も, 細胞膜に沿った線維状の蛍光を示す.

た. 細胞質内に線維状の蛍光がはっきりと見られたことは, 培養下 (in vitro) では, 細胞の monolayer が作られるため, 実質層を含む flat preparation を作製して観察したとき (in vivo) より蛍光が見やすいことによるためか, あるいは, 培養条件下と生体内では, アクチンの分布に差があるためなのかは不明である. 培養細胞では強い蛍光と蛍光の間にすき間があり, 線維状の蛍光が見られた. この所見は in vivo でも観察されたが¹⁵⁾, in vivo よりも in vitro の方が多かった. これは, 細胞と細胞の間隙が培養細胞の方が広く, interdigitation が多く¹⁶⁾, 見やすいためと思われる.

移植片からのびている細胞も, 損傷治癒過程にある細胞も, 細長い突起を出し, この突起内および細胞質内に線維状の蛍光が見られた. この所見は in vivo でも損傷治癒過程では, 細胞質内にストレスファイバーが観察されたこと¹⁵⁾や3T3 cells などの cell line で見

られたストレスファイバーの形成¹⁷⁾と一致し, 動いている細胞ではアクチンが束になって, ストレスファイバーを形成しているものと思われる.

cytB を培養液内へ投与すると, 損傷縁からの細胞ののびが, cytB の濃度に比例して抑制されるとともに, のび出して来た細胞も突起が少なく扁平であった. 損傷周囲の細胞の形も, cytB の濃度に比例して不整となり, 細胞内に空胞を形成し, 細胞と細胞の間隙も広がった. また, F-アクチンの分布も, 正常の培養液で見られた, 細胞膜に沿った線維状と異なり, 集積した顆粒状となった. cytB は, モノマーの G-アクチンが, 重合して F-アクチンになるのを, 阻害すると考えられており^{9)~10)}, 今回も, 線維状の分布から, 集積したような顆粒状の分布が見られたことは, G-アクチンが F-アクチンに変換できずに集積したと考えられる. dihydrocytochalasin B¹⁸⁾または cytD¹⁹⁾を用いた実験にお

いても、細胞の膨化や空胞が見られており、細胞内の骨格としてのF-アクチンの崩壊によると考えられる。さらに、cytBを含む培養液にて24時間培養し、その後cytBを入れないDMEのみの培養液に戻すと、少しずつながら細胞のはび出し、損傷周囲の細胞も形が正常に戻り、細胞と細胞との接触が密になり、F-アクチンの分布も正常に戻った。

以上のように、cytBの投与により、F-アクチンへの重合が阻害され、損傷治癒過程における細胞のはびが阻止され、損傷治癒が遅延したことより、角膜内皮細胞の損傷治癒過程には、F-アクチンが重要であると考えられる。

稿を終えるに際し、御指導いただいた三島清一教授に深謝致します。

文 献

- 1) **Gipson IK, Anderson RA** : Actin filaments in normal and migrating corneal epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 16: 161-166, 1977.
- 2) **Higbee RG, Hazlett LD** : Actin filament localization and distribution in the young adult mouse cornea: A correlative immunofluorescent and cytochemical study. Exp Eye Res 36: 171-180, 1983.
- 3) **Dreckhahn D, Gröshel-Stewart U** : Localization of myosin and actin in ocular nonmuscle cells. Cell Tiss Res 181: 493-503, 1977.
- 4) **森林淑江, 谷島輝雄** : 角膜内におけるアクチンの免疫組織化学的検討. あたらしい眼科 1: 984-986, 1984.
- 5) **藤野淑江, 谷島輝雄** : 角膜内皮損傷治癒過程における内皮細胞内アクチンの分布と局在. 日眼 90: 503-510, 1986.
- 6) **MacLean-Fletcher S, Pollard TD** : Mechanism of action of cytochalasin B on actin. Cell 20: 329-341, 1980.
- 7) **Brown SS, Spudich JA** : Cytochalasin inhibits the rate of elongation of actin filament fragments. J Cell Biology 83: 657-662, 1979.
- 8) **Wessells NK, Spooner BS, Ash JF, et al** : Microfilaments in cellular and developmental processes. Science 171: 135-143, 1971.
- 9) **Brown SS, Spudich JA** : Mechanism of action of cytochalasin: Evidence that binds to actin filament ends. J Cell Biology 8: 487-481, 1981.
- 10) **Korn ED** : Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. Physiol Rev 62: 672-737, 1982.
- 11) **Gipson IK, Wiscott MJ, Broosby NG** : Effects of cytochalasin B and D and colchicine on migration of the corneal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 22: 633-642, 1982.
- 12) **Gipson IK, Keezer L** : Effects of cytochalasins and colchicine on the ultrastructure of migrating corneal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 22: 643-650, 1982.
- 13) **Jester JV, Delmage JM** : Effects of cytochalasin B on actin filament distribution in migrating rat corneal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 25(Suppl) 334, 1984.
- 14) **Soong HK, Citron C** : Disparate effects of calmodulin inhibitor on corneal epithelial migration in rabbit and rat. Ophthalmic Res 17: 27-33, 1985.
- 15) **藤野淑江, 谷島輝雄** : 角膜内皮損傷治癒過程における内皮細胞内F-アクチンの分布. 日眼 90: 1521-1525, 1986
- 16) **Schwartz BD, McCulley JP** : Morphology of transplanted corneal endothelium derived from tissue culture. Invest Ophthalmol Vis Sci 20: 467-480, 1981.
- 17) **Lazarides E** : Immunofluorescence studies on the structure of actin filaments in tissue culture cells. J Histochem Cytochem 23: 507-528, 1975.
- 18) **Atlas SJ, Lin S** : Dihydrocytochalasin B. Biological effects and binding to 3T3 cells. J Cell Biology 76: 360-370, 1978.
- 19) **Miranda AF, Godman GL, Tamenbaun SW** : Action of cytochalasin D on cells of established cell lines. II. Cortex and microfilaments. J Cell Biology 62: 406-423, 1974.