

培養網膜色素上皮細胞とフィブロネクチンについて

1. 特異抗体の作成 (図6)

山川 良治・吉村 長久・岡田 守生
 小林 博・松村 美代・白川 弘泰 (京都大学医学部眼科学教室)
 荻野 誠周 (眼細胞学研究室)

Fibronectin in Cultured Chick Retinal Pigment
 Epithelial Cells

1. An Specific Antibody

Ryoji Yamakawa, Nagahisa Yoshimura, Morio Okada,
 Hiroshi Kobayashi, Miyo Matsumura, Hiroyasu Shirakawa,
 Nobuchika Ogino

Laboratory of Ocular Cell Biology

Department of Ophthalmology, Kyoto University Faculty of Medicine

要 約

培養ニワトリ胚網膜色素上皮細胞がフィブロネクチンを自ら合成し利用していることを免疫組織化学的に証明した。フィブロネクチンは増殖性硝子体網膜症の発症を考えると、key protein である可能性があり網膜色素上皮細胞がフィブロネクチンを合成することは、網膜色素上皮細胞の役割が大きいと考えられる。このように網膜色素上皮細胞でのフィブロネクチンの役割についてはさらに詳しく検討する必要があると考える。(日眼 91: 80—86, 1987)

キーワード: 網膜色素上皮細胞, 培養, フィブロネクチン, 免疫組織化学, 特異抗体

Abstract

To determine the production of fibronectin by cultured chick retinal pigment epithelial cells which are grown in the presence of fetal bovine serum, chick fibronectin-specific antisera, non-crossreactive to bovine fibronectin, was prepared. Fibronectin from fetal bovine serum and chick plasma were purified using Gelatin-Sepharose affinity chromatography and their purity was checked by SDS gel electrophoresis. Bovine fibronectin was coupled with CNBr activated Sepharose 4B column. Antisera for chick plasma fibronectin was applied to this column and non-crossing antisera was collected. Cross-reactivity was checked by immunoelectrophoretic blotting. Typical fibrillary net pattern of fibronectin was observed by indirect immunofluorescent technique when this specific antisera was reacted with cultured chick retinal pigment epithelial cells. Staining was abolished by absorption with the homologous antigen. Cultured chick retinal pigment epithelial cells were revealed to produce fibronectin. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 80—86, 1987)

Key words: Retinal pigment epithelial cell, Culture, Fibronectin, Immunohistochemistry, Specific antibody

別刷請求先: 606 京都市左京区聖護院川原町53 京都大学医学部眼科学教室 山川 良治

Reprint requests to: Ryoji Yamakawa, M.D. Dept. of Ophthalmol., Faculty of Med., Kyoto Univ.

53 Shogoinkawara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

(昭和61年7月3日受付) (Accepted July 3, 1986.)

I 緒 言

フィブロネクチンは、還元時の単量体分子量が約23万の糖蛋白で、主に動物細胞表面及び血漿中に存在している¹⁾。その生理活性としては細胞接着と伸展²⁾、走化性³⁾、食作用⁴⁾、細胞の運動性⁵⁾など多岐にわたっており、細胞生物学、発生学、生化学などの基礎医学、さらには臨床医学を含む広範な領域で注目されているのは周知のとおりである。そして眼においては、最近網膜硝子体中での役割が注目されつつある⁶⁾⁷⁾。しかし、網膜においてどの細胞がフィブロネクチンを合成しているかについては定かではない。ニワトリ胚培養網膜色素上皮細胞では、フィブロネクチンが細胞骨格の研究対象として報告されている⁸⁾⁹⁾。つまり、網膜色素上皮細胞がフィブロネクチンの合成の場として考えられるわけである。しかし、Turksen ら⁸⁾の報告では蛍光抗体法の際にはブタ血漿フィブロネクチンに対するモノクローナル抗体を使用しており、Crawford ら⁹⁾の報告では、培養液中のウシ胎児血清フィブロネクチンと交叉反応については検定していない抗ニワトリ血漿フィブロネクチン抗体を使用している。Hyman ら¹⁰⁾が述べているように、細胞によってウシ胎児血清中のフィブロネクチンを取り込み、extracellular matrixとして使用している場合があり、単に種非特異性の抗体を使って蛍光抗体法で染色像が得られたとしても、そのフィブロネクチンが細胞そのものが合成しているとはならない。事実、Crawford ら⁹⁾は抗ウシフィブロネクチン抗体を使用しても同じ染色像が得られ、網膜色素上皮細胞がフィブロネクチンを合成しているかどうかについては不明であると述べている。このよに網膜色素上皮細胞がフィブロネクチンを合成しているかどうかについては明確ではない。そこで今回我々は、ウシ胎児血清中のフィブロネクチンと交叉しない特異抗体を作り網膜色素上皮細胞が自らフィブロネクチンを合成し利用しているかを検索した。

II 実験材料及び方法

1) 実験材料

網膜色素上皮細胞の培養にはEagle's minimum essential medium (MEM) (日本製薬、東京)と、ウシ胎児血清 (M.A. Bioproducts, Walkersville, U.S.A.)を使用した。イムノブロッティングのニトロセルロース膜はSchleicher & Schüll 社 (Dassel, West Germany)を使用し、カラムにはCNBr-activated

Sepharose 4BとGelatin Sepharose (Pharmacia, Upsala, Sweden)を使用した。FITC 標識ウサギ抗ヤギ IgG とペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヤギ IgG は Miles-Yeda Ltd. (Rehovot, Israel) のを、ヤギ抗ニワトリ血漿フィブロネクチン抗体はCalbiochem-Behring Corp. (San Diego, U.S.A.)を使用した。他の試薬は市販の特級指定のものを使用した。

2) フィブロネクチンの精製

フィブロネクチンはウシ胎児血清及び生後10日目のひよこ血液より Ruoslahti らの方法¹¹⁾で精製した。

3) ポリアクリルアミド電気泳動法

ポリアクリルアミド電気泳動法は、0.1%SDS (sodium dodecyl sulfate) 存在下に Laemli の方法¹²⁾で行った。

4) アフィニティークロマトグラフィー

ウシ胎児血清より精製したフィブロネクチン(2mg)をCNBr-activated Sepharose 4B(1g)とカップリングすることによりカラムを作成した。図1にその方法を示す。

5) イムノブロッティング

精製したフィブロネクチンを上記の方法で電気泳動後、Towbin の方法¹³⁾でニトロセルロース膜に転写した。このニトロセルロース膜に、抗フィブロネクチン抗体を室温で1時間反応させ、次にペルオキシダーゼ標識二次抗体を室温で1時間反応させた。最後にo-ジアニシジンを基質としてフィブロネクチンのバンドを検出した。また培養網膜色素上皮細胞のSDS抽出液についても同様の操作をおこなった。

6) 網膜色素上皮細胞の培養

網膜色素上皮細胞はニワトリ7日胚より林らの方

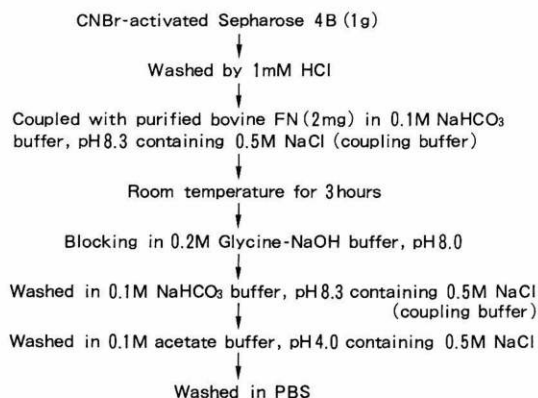


図1 フィブロネクチンとCNBr-activated Sepharose 4B とのカップリング法。

法¹⁴⁾で培養した。

7) 間接蛍光抗体法

培養細胞をカバーガラス上に培養し、いろいろな時期において3.5%ホルムアルデヒドにより室温で20分間固定後、0.2% Triton X-100処理を行い細胞膜の透過性を上昇せしめたのち、いろいろの濃度に希釈した抗フィブロネクチン抗体を1時間細胞培養用インキュベーター内で反応させた。次いでPBS(-) (カルシウムとマグネシウムを含まないダルベッコのリン酸緩衝液)で細胞を洗浄後、16倍希釈したFITC標識二次抗体を一次抗体と同じ条件で45分間反応させた。カバーガラスを洗浄した後50%グリセロールでスライドグラスにマウントし、オリンパス蛍光顕微鏡にて観察し、フジクロームフィルムにて撮影した。

8) タンパク定量

タンパク量はウシ血清アルブミン標準物質としてLowry法¹⁵⁾にて定量した。

III 実験結果

1) フィブロネクチンの純度

生後10日目のひよこ3匹より10mlの血液を集め、1% sodium citrateを添加し、10,000rpm, 4℃, 15分間遠沈した。上清(plasma)をGelatin Sepharose 4Bカラムにかけ、4M尿素にて溶出した。またウシ胎児血清130mlより同様のカラム操作にてフィブロネクチンを精製した。

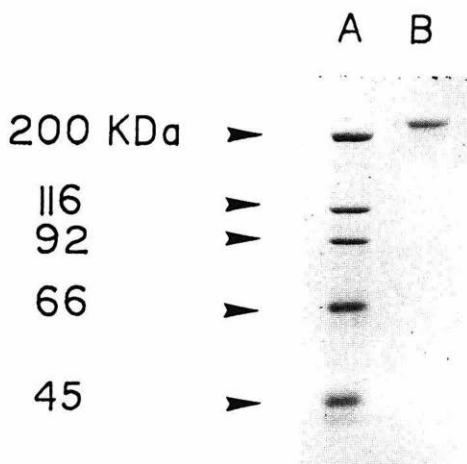


図2 精製されたフィブロネクチンのSDSゲル電気泳動像。

A. Standards. B. ウシ胎児血清より精製したフィブロネクチンの7.5%SDSゲル電気泳動像

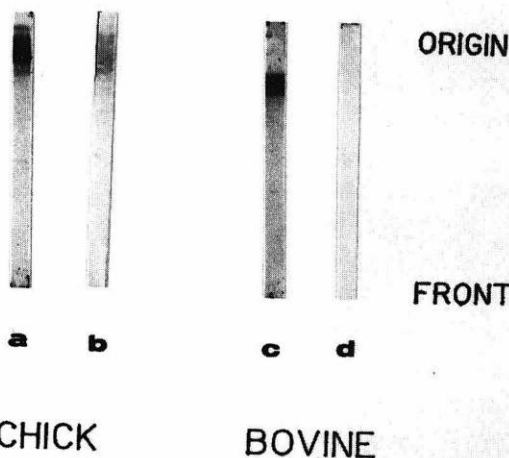


図3 ウシ胎児血清及びニワトリ血液より精製したフィブロネクチンに対するカラム通過分画を1本抗体としたイムノブロッティング。

a. amido black 染色されたニワトリフィブロネクチン。b. カラム通過分画を1次抗体としたニワトリフィブロネクチンのブロッティング。c. amido black 染色されたウシフィブロネクチン。d. カラム通過分画を1次抗体としたウシフィブロネクチンのブロッティング。

この抗体はウシフィブロネクチンを認識せず、ニワトリフィブロネクチンのみを認識している。

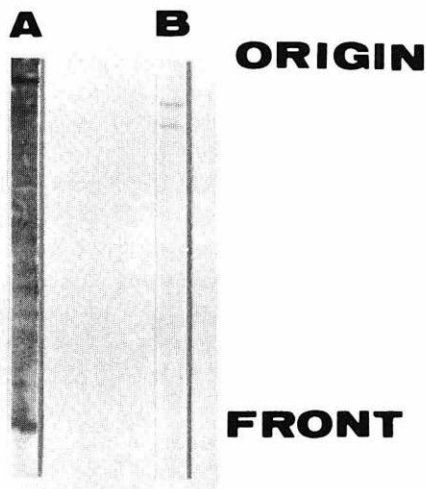


図4 培養網膜色素上皮細胞のイムノブロッティング

A. amido black 染色による網膜色素上皮細胞の蛋白染色。B. カラム通過分画を1次抗体としたブロッティング。

この抗体は分子量20万以上の蛋白を認識している。

透析後ウシ胎児血清よりフィブロネクチンは2.5 mg, ニワトリ血液より0.4mg 精製された。電気泳動にてその純度を確認したところ、図2の如く蛍光抗体法のコントロール実験に十分使用できるものであった。

2) 特異抗体の作成

ウシ胎児血清より精製したフィブロネクチン(2mg)を, 1g CNBr-activated Sepharose 4B とカップリングさせるとフィブロネクチンの89%が結合していた。このカラムにヤギ抗ニワトリ血漿フィブロネクチン抗体1ml (蛋白量1mg/ml) をかけ, PBS (—) を5ml 通

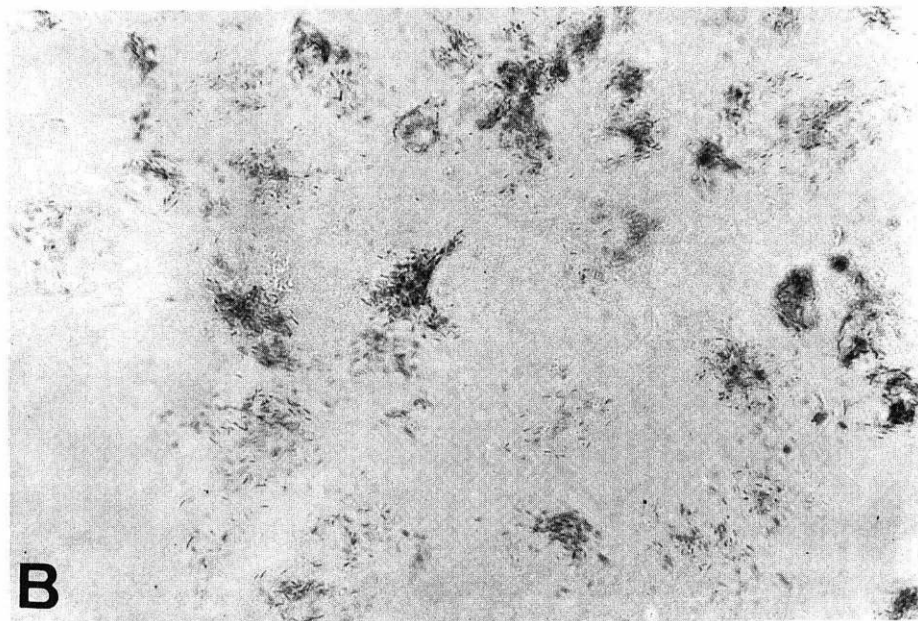


図5 カラム通過分画を1次抗体とした間接蛍光抗体像。

A, 培養中期の蛍光像, B, 位相差顕微鏡像。

細胞外に網目状の染色像がえられている。いずれも原倍率は132倍

しカラム通過分画を集めた、さらにこの通過分画を2回カラムに通した、このカラム通過分画はウシ胎児血清中のフィブロネクチンを認識せず、ニワトリ血漿中のフィブロネクチンのみを認識することを Western

blotting 法にて確認した、ウシ胎児血清及びニワトリ血漿より精製したフィブロネクチン $200\mu\text{g}$ をおのおの2%SDSをふくむ50mM Tris buffer (pH 6.8) 中に溶かし、Towbinの方法でニトロセルロース膜に転写

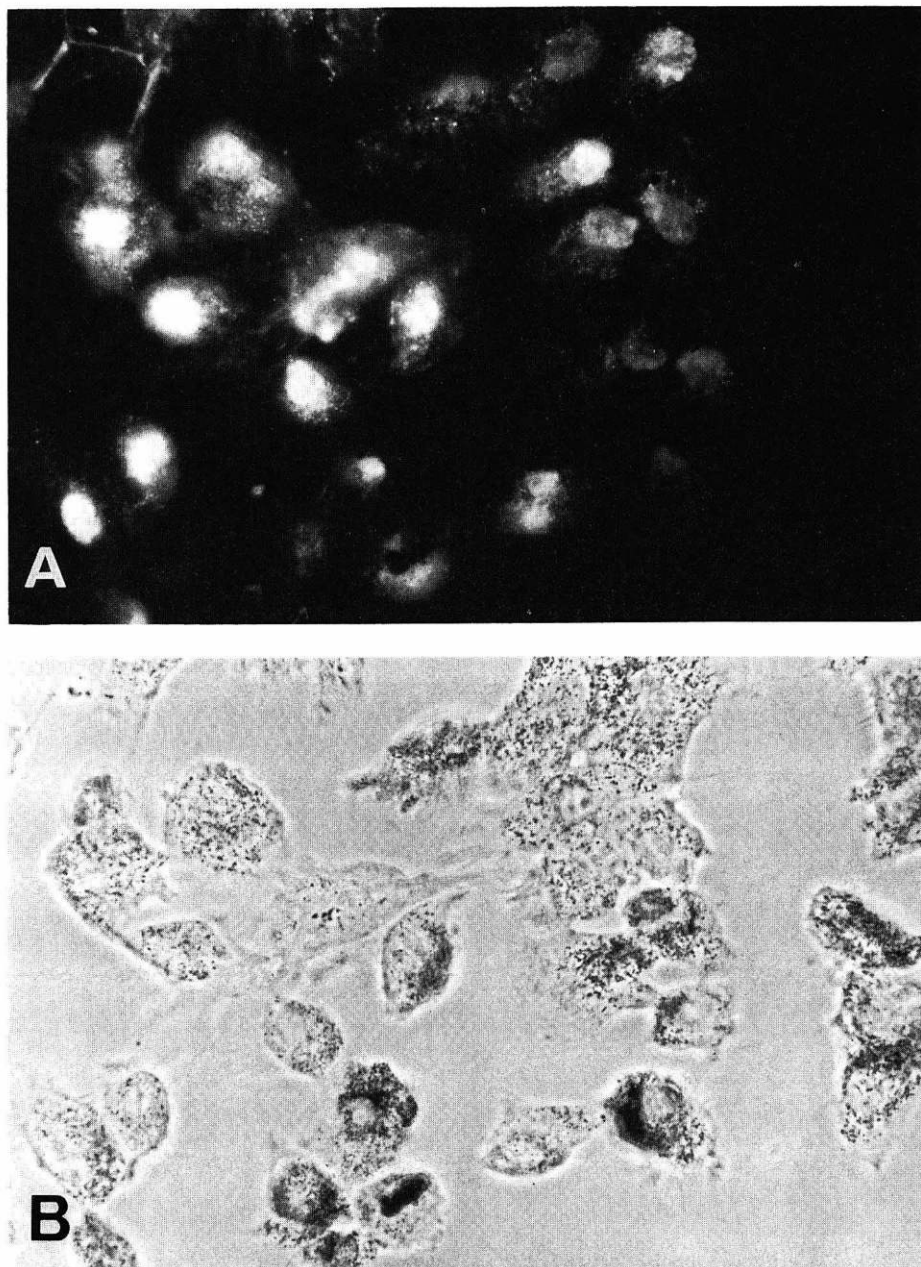


図6 カラム通過分画とニワトリフィブロネクチンとを反応させたものを1次抗体とした間接蛍光抗体像。

A. 培養中期の蛍光像。B. 位相差顕微鏡

細胞外の網目状の染色像が減弱している。いずれも原倍率は132倍

した、500倍に希釈したカラム通過分画を一次抗体として1時間反応させ、2,000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識二次抗体を1時間さらに反応させ、*o*-ジアニジンを基質としたペルオキシダーゼ反応でフィブロネクチンのバンドを確認した。カラム通過分画の抗体は図3のa, c (amido black 染色) に示された蛋白のうちニワトリから精製したフィブロネクチンのみを認識し、ウシ胎児血清から精製したフィブロネクチンを認識しないことが示された。

3) 抗フィブロネクチン抗体の純度

培養7日目の網膜色素上皮細胞を2% SDSを含む50mM Tris-HCl buffer (pH 6.8) でhomogenizeし、Towbinの方法でニトロセルロース膜に転写し同様にイムノブロッティングをおこなった。カラム通過分画の抗体は、図4 A (amido black 染色) に示したように網膜色素上皮細胞から抽出された多くの蛋白のうち分子量200,000以上の2本のバンドをなす蛋白を認識していることがわかった。

4) 間接蛍光抗体法

カラム通過分画抗体の50倍希釈を1次抗体として用いたところ、図5の如く培養7日目の培養中期には細胞外に網目状の染色像がえられた。またこのような染色像は培養初期(3日目)には強くなく、また培養後期(14日目以降)になると減弱した。

5) 吸収試験

ニワトリ血漿より精製したフィブロネクチンを最終濃度約80 μ g/mlになるようにカラム通過分画1次抗体と4 $^{\circ}$ C, 24時間 incubation した後、これを1次抗体として間接蛍光抗体法で網膜色素上皮細胞を染色してみると図6の如く網目状の染色像が明らかに減弱していた。

IV 考 按

In vitro でフィブロネクチンは網膜色素上皮細胞の分裂や運動、基底膜の構成要素としての役割が考えられている⁸⁾⁹⁾。しかし、網膜色素上皮細胞が自らフィブロネクチンを合成して利用しているかについては言及されていない。僅かにTurksen ら⁸⁾が³⁵S-メチオニンを前駆体としてフィブロネクチンの網膜色素上皮細胞による合成を証明している。今回我々は、ウシ胎児血清中のフィブロネクチンと交叉しない特異抗体を作成することにより免疫組織化学的に、網膜色素上皮細胞が自らフィブロネクチンを合成し利用していることを証明した。

その蛍光像は、培養初期と後期では弱く、培養中期には強く染色された。Turksen ら⁸⁾はフィブロネクチンの分布は、type IV collagen と同じように cuboidal な differentiated cells のところに強く染色像が得られると述べているが、Crawford ら⁹⁾は cuboidal になると基底膜に、squamous 又は stratified の状態では apical と basal に多く分布すると述べている。このように相反する報告もあり、フィブロネクチンの分布についてはその役割を考える上でもさらに詳しく検討する必要があると思われる。

さて網膜色素上皮細胞がフィブロネクチンを合成しているのは大変興味深い。例えば最近フィブロネクチンは網膜色素上皮細胞の chemotactic factor であるとの報告があり⁶⁾。またフィブロネクチンを眼内に注入すると増殖性硝子体網膜症をおこすともいわれている⁷⁾。フィブロネクチンは増殖性硝子体網膜症の発症の key protein である可能性があると思われる。増殖性硝子体網膜症の発生にはグリア系細胞と網膜色素上皮細胞の関与が言われているが¹⁶⁾、グリア細胞はフィブロネクチンを作らないとされている¹⁷⁾。In vitro ではあるが、網膜色素上皮細胞がフィブロネクチンを合成し利用していることが示されたことは、増殖性硝子体網膜症の発症には、網膜色素上皮細胞の関与がより一層重要であると思われる。

このように網膜色素上皮細胞におけるフィブロネクチンの役割については今後様々な方面から検討してゆきたいと考えている。

本研究は文部省科学研究費一般 A61440075 の支援を受けた。記して謝意を表する。

References

- 1) Yamada KM: Cell surface interactions with extracellular materials. Ann Rev Biochem 52: 761—799, 1983.
- 2) Yamada KM, Yamada SS, Pastan I: Cell surface protein partially restores morphology, adhesiveness, and contact inhibition of movement to transformed fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA 73: 1217—1221, 1976.
- 3) Gauss-Müller U, Kleinman HK, Martin GR, Schiffmann E: Role of attachment factors and attractants in fibroblast chemotaxis. J Lab Clin Med 96: 1071—1080, 1980.
- 4) Grinnell F, McAbber DD: Fibronectin-mediated binding and phagocytosis of polystyrene latex beads by rabbit hamster kidney cells. J Cell Biol 97: 1515—1523, 1983.

- 5) **Ali IU, Hynes RO**: Effect of LETS glycoprotein on cell motility. *Cell* 14: 439—446, 1978.
- 6) **Campochiaro PA, Jerdan J, Glaser BM**: Serum contains chemoattractants for human retinal pigment epithelial cells. *Arch Ophthalmol* 102: 1830—1833, 1984.
- 7) **Yeo JH, Sadeghi J, Campochiaro PA, Green WR, Glaser BM**: Intravitreal fibronectin and platelet-derived growth factor. *Arch Ophthalmol* 104: 417—421, 1986.
- 8) **Turksen K, Aubin JE, Sodek J, Kalnins VI**: Changes in the distribution of laminin, fibronectin, type IV collagen and heparan sulfate proteoglycan during colony formation by chick retinal pigment epithelial cells in vitro. *Collagen Rel Res* 4: 413—426, 1984.
- 9) **Crawford BJ, Vielkind U**: Location and possible function of fibronectin and laminin in clones chick retinal pigmented epithelial cells. *In Vitro Cell Develop Biol* 21: 79—87, 1985.
- 10) **Hayman EG, Ruoslahti E**: Distribution of fetal bovine serum fibronectin and endogenous rat cell fibronectin in extracellular matrix. *J Cell Biol* 83: 255—259, 1979.
- 11) **Ruoslahti E, Hayman EG, Pierschbacher M, Engvall E**: Fibronectin: Purification, immunochemical properties, and biological activities. *Meth Enzymol* 82: 803—822, 1982.
- 12) **Laemmli UK**: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680—685, 1970.
- 13) **Towbin H, Staehelin T, Gordon J**: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some application. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350—4354, 1979.
- 14) **Hayashi M, Matsumoto A, Hamashima Y, Tsukahara I**: Phagocytic activity of cultured retinal pigment epithelium. Uptake of polystyrene spheres and staphylococcus aureus. *Exp Eye Res* 28: 427—434, 1979.
- 15) **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ**: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265—275, 1951.
- 16) **Newsome DA, Rodrigues MM, Machemer R**: Human massive periretinal proliferation in vitro characteristics of cellular components. *Arch Ophthalmol* 99: 873—880, 1981.
- 17) **Raff MC, Fields KL, Hakomari S, Mirsky R, Pruss RM, Winter J**: Cell-type-specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells in culture. *Brain Res* 174: 283—308, 1979.