

## 培養網膜神経細胞に与える糖質コルチコイドの効果 (図10, 表1)

湯田 兼次・石原 広文・三井 健正 (横浜市立大学医学部眼科学教室)

## Steroid Effect on Cultured Retinal Neuronal Cells

Kenji Yuda, Hirobumi Ishihara and Takemasa Mitsui

Department of Ophthalmology Yokohama City University School of Medicine

## 要 約

糖質コルチコイドが網膜神経細胞に与える効果を調べる目的で、培養網膜神経細胞を用い、培養液中の合成糖質コルチコイドの濃度を様々に変えて細胞生存率、細胞突起再生率を調べる実験を行った。糖質コルチコイドにはデキサメサゾンを用いた。生後3日目以前のマウスよりの網膜神経細胞では生存率、細胞突起再生率とも DEX 0.1~1.0 $\mu$ g/ml の濃度でコントロールに比し良好な結果が得られた。生後4日目以降のマウスよりの細胞では生存率では有意差はでなかったが、細胞突起再生率が DEX 3~10 $\mu$ g/ml でコントロールにくらべ有意に成績が良かった。これらの値はステロイドリセプターの飽和濃度よりかなり高い値で、糖質コルチコイドが網膜神経細胞に与えるこれらの促進的な効果は、他の因子を介した間接的なものと推定された。(日眼 92: 1117—1121, 1988)

キーワード：糖質コルチコイド，網膜神経細胞，細胞培養，ステロイドリセプター

## Abstract

The effect of glucocorticoid hormone on retinal neuronal cells was examined using a cell culture technique. Neuronal cells were dissociated from neonatal mouse retinas within one week after the birth. The cells were seeded in an F12 medium containing 1% FCS, 5 $\mu$ g/ml insulin, 5 $\mu$ g/ml transferrin, 100 $\mu$ M putrescine, 30nM selenium and dexamethasone (DEX) of various densities; 0.01, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10, 30 $\mu$ g/ml respectively. Cells cultured without DEX were used as controls. The results were estimated in terms of both survival and regeneration rates of the cultured cells. There were some differences in the outcome according to the age of the mice; therefore, the results were divided into two groups in accordance with the age factor; 3-day or-younger group and 4-day or-older group. In the first group, both survival and regeneration rate results were statistically better than the control at DEX densities of 0.3 and 1.0 $\mu$ g/ml, which are far denser than the suspected physiological density. In the second group, there was no statistical difference between the steroid cultured cells and the control cells regarding the survival rate but the regeneration rates of neuronal dendrites of the cells cultured with 3.0 and 10 $\mu$ g/ml DEX were better than that of the control. Those effects did not continue after one week of culture in both groups. Thus it was shown that the effect of DEX on the retinal neuronal cell was transient and neurotrophic in the culture system. Those effects might be indirectly induced by some factor, other than a receptor-mediated factor, because the effective dose of DEX was much denser than the suspected steroid-receptor saturate level. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1117—1121, 1988)

Key words: Glucocorticoid, Retinal neuronal cell, Cell culture, steroid-receptor

別刷請求先：232 横浜市区南浦舟町3-46 湯田 兼次 (昭和62年11月26日受付)

Reprint requests to: Kenji Yuda, M.D.

3-46, Urafune-cho, Minami-ku, Yokohama 232, Japan

(Accepted for publication November 26, 1988)

## I 緒 言

糖質コルチコイドは炎症などを抑える目的で、眼科領域でも日常よく使われるホルモン剤であるが、神経細胞などに様々な影響を与えることが知られている<sup>1)</sup>。しかし、その効果は一定したものではなく、細胞の種類によって、増殖を促進させたり抑制したりすることが知られており<sup>2)</sup>。ウサギ胎児脳の培養細胞の生存率を高めたとの報告<sup>3)</sup>もある一方で、新生マウスでは脳の DNA 合成が不可逆的に抑制され発育が抑制されたとの報告<sup>4)</sup>もあり中枢神経細胞に対しても一定した効果は示さない。これまでのところ網膜神経細胞に及ぼす糖質コルチコイドの効果については促進的なものか、抑制的なものかはよく知られていない。そこで、このホルモンが網膜神経細胞に与える効果を細胞レベルで調べることを目的として、新生仔から生後7日目までのマウス網膜より得た培養網膜神経細胞を用い実験を行った。

## II 方 法

網膜神経細胞の培養は既に報告した<sup>5)</sup>ので、簡単に述べる。幼弱マウスを冷却麻酔下に断頭し眼球を摘出し、赤道部より後極の網膜を4分割し、酵素処理により網膜神経細胞を単離させた。単離させた細胞は、ポリリジンでコーティングしたカバーガラス上に散布し37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件で培養した。

培養液としてF12培地に10%FCSを添加した培地を用いた場合、線維芽細胞がすぐに増殖し、神経細胞は増殖した線維芽細胞の上を良い状態でかなり長期に渡って生き続けたが、薬物の効果を調べるためには、線維芽細胞の存在は適切な条件とは言えないと考えられた。また、10%FCS中には0.003 $\mu$ Mのハイドロコチゾンが含まれているとの報告<sup>6)</sup>があり、今回の目的からは、使用する血清はなるべく少なくする必要がある。完全な無血清培地では網膜神経培養は実質的に不可能であったので、1%FCSに各種ホルモンを加えたものを基本的な培地とした(表)。この培地で培養を行ったところ、線維芽細胞の増殖はかなり抑えられ、また無血清培地に比較すると良好な培養状態が得られた。そこで、この培地をコントロールとして以後の実験を行った。

使用した糖質コルチコイドは合成糖質コルチコイドであるデキサメサゾン(DEXと略、Sigma)で、その濃度を0.01、0.1、0.3、1.0、3.0、10、30 $\mu$ g/mlと7

表 基本培地の成分

|             |              |
|-------------|--------------|
| F12 培地      |              |
| 1%FCS       |              |
| insulin     | 5 $\mu$ g/ml |
| transferrin | 5 $\mu$ g/ml |
| putrescine  | 100 $\mu$ M  |
| selenium    | 30nM         |

段階に調整した。

培養成績の判定は細胞生存率と神経突起再生率を比較することで行った。細胞の生死の判定<sup>7)</sup>には経過観察する必要性から、トリパンブルーなどを用いた染色法による判定法は採らず、位相差顕微鏡の所見をもとにして行った。生存細胞の条件としては、細胞がカバーガラスに接着し振動により動揺しないこと、細胞周囲にハローを伴っていること、細胞の核内に空胞変性を伴っていないこととし、その条件を満たさない細胞は死亡細胞とみなした。この条件のもとで、浮遊した細胞を含めた全細胞数中、生存細胞の占める割合を細胞生存率とした。また生存細胞のうち神経突起を細胞体以上の長さに伸ばした細胞が、全細胞に占める割合を神経突起再生率とした。細胞数の計算には顕微鏡の400倍の倍率を用い、同じ範疇の標本を4つ用い、それぞれ10視野を測定しそれらの平均値をとった。

用いたマウスはC57B1で1回の実験で日齢を合わせた2匹4眼を用い、日齢1週まで各日齢ごとにそれぞれ3回の実験を行い、成績は早期として培養2日目、後期として培養7日目を記録した。

## III 結 果

マウスの日齢により、生後3日以前のものとそれ以降のものとの成績に差が認められたので、成績はマウスの日齢により生後3日以内のものと、4日以後のものとの2群に分けて比較することにした。

生後3日以内のマウスでの培養2日目では、生存率、神経突起再生率ともDEX 0.1~1.0 $\mu$ g/mlの濃度では、T検定で危険率5%の有意差でコントロールに比べ良好な結果が得られた(図1, 2, 3, 4)。生後4日目以降のマウスでは培養2日目の成績で、生存率は、有意差はでなかったが、DEX 3 $\mu$ g/mlの濃度でコントロールに比べ良いように思われた(図6)。神経突起再生率は3および10 $\mu$ g/mlの濃度で有意差がありコントロールに比し良好であった(図5, 7, 8)。

このようにDEX添加培地での培地2日目ではマウ



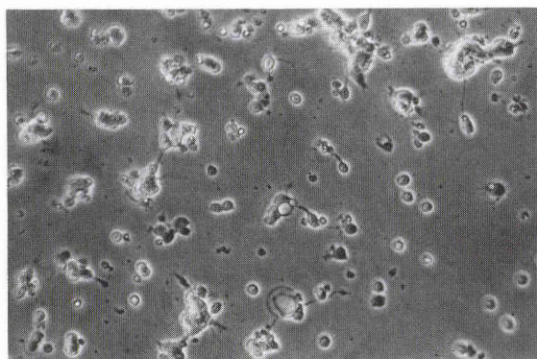


図1 生後1日目のマウスよりの網膜神経細胞培養  
2日目のコントロールの位相差顕微鏡像。200倍。

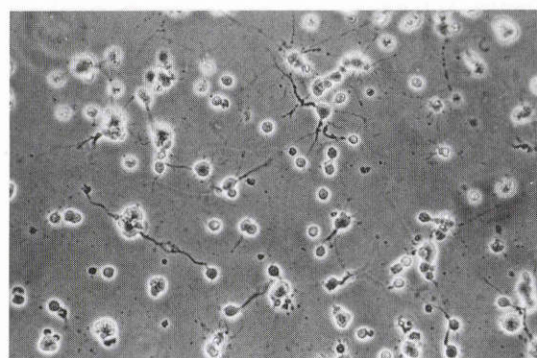


図2 同じく DEX 0.3 μg/ml の濃度で培養2日目の  
位相差顕微鏡像。コントロールに比し細胞の生  
存が良く、突起の再生も良好であった。

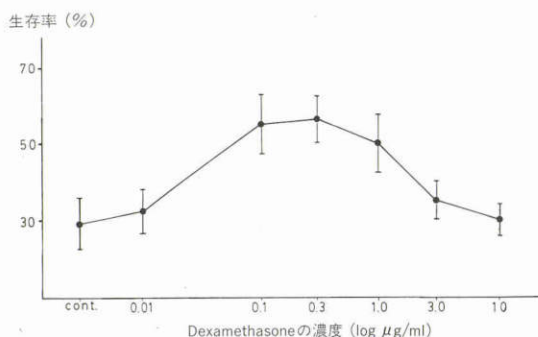


図3 生後3日目以内のマウスからの細胞培養での  
細胞生存率。DEX 0.3および1.0 μg/ml でコン  
ロールに比し良好な成績であった。

スの年齢で最適濃度に差はあるもののいずれもコン  
ロールに比較して良い成績が得られたが、培養を継続  
していくと、やがてははっきりした差は見られなくなっ

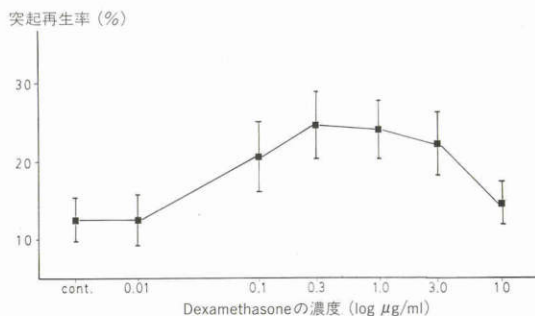


図4 同じく細胞突起再生率にも有意差がみられ  
た。

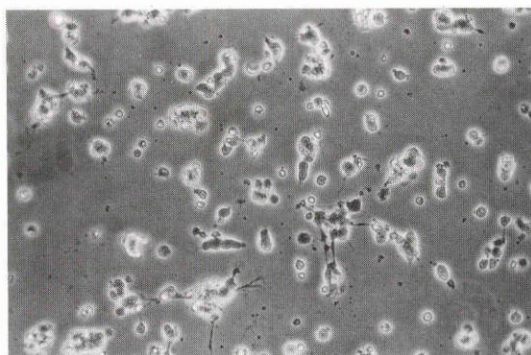


図5 生後6日目のマウスよりの網膜神経細胞培養  
2日目のコントロールの位相差顕微鏡像。200倍。

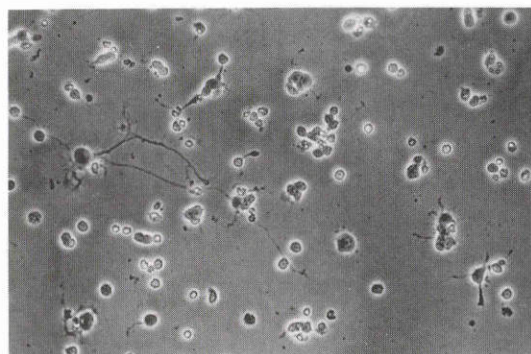


図6 同じく DEX 3 μg/ml の濃度で培養2日目の  
位相差顕微鏡像。細胞突起の再生がコントロール  
に比し良好であった。

た。生後3日目までのマウスでの培養1週目では全  
ての濃度でコントロールとの差がなくなっていた(図9,  
10)。同様に、生後4日目以降のマウスよりの細胞の状  
態も培養1週目では差がなくなっていた。

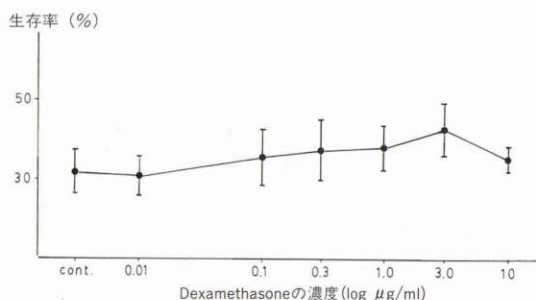


図7 生後4日目以降のマウスからの細胞培養での細胞生存率. 全ての濃度で有意差は認められなかった.

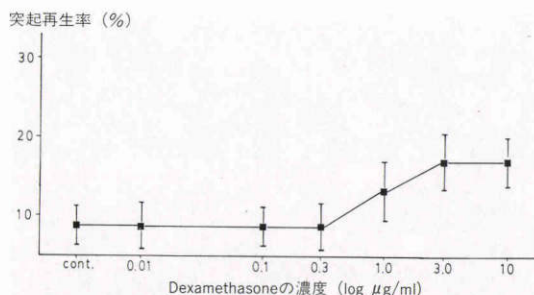


図8 細胞突起再生率はDEX 3および10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で有意差がありコントロールに比し良好な成績であった.

#### IV 考 察

合成糖質コルチコイドであるデキサメサゾン<sup>8)</sup>は、交感神経節細胞に与える NGF のような著明な効果ではなかったが、適当な濃度下で網膜神経細胞にある程度の促進的な効果を示した。その効果は細胞の成熟度により差が見られ、生後3日以内のマウスよりの細胞では、0.1~1.0 $\mu\text{g/ml}$  でよい結果が得られ、生後4日目以降のマウスよりの細胞では、3.0~10 $\mu\text{g/ml}$  で良い結果が得られ、成熟するに伴いより高い濃度で効果が現われる傾向が見られた。

Sarkar ら<sup>9)</sup>によると糖質コルチコイドは標的細胞のリセプターに結合すると、温度依存性の活性をもつホルモン・リセプター結合物を形成し、これが核内のDNAに作用し遺伝因子の発現を促すという。ニワトリ胎児では網膜神経層にこのような糖質コルチコイドレセプターがあることが証明されており<sup>9)</sup>、ミューラー細胞においてはこのリセプターを介してグルタミン合成を制御していることが知られている<sup>10)</sup>。ミューラー細胞以外の網膜神経細胞でステロイドリセプターの存在

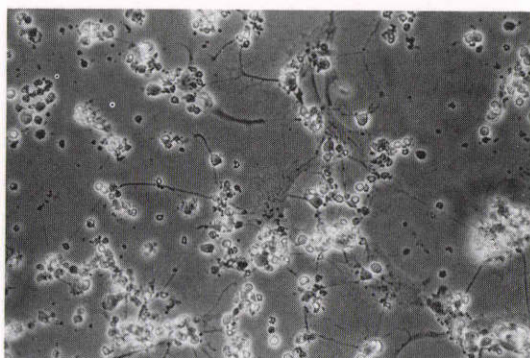


図9 生後1日目のマウスよりの網膜神経細胞培養7日目のコントロールの位相差顕微鏡像, 200倍.

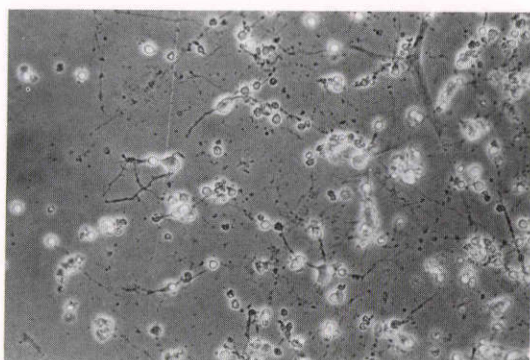


図10 同じくDEX 0.3 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で培養7日目の位相差顕微鏡像. コントロールとの差がほとんど見られなかった.

は証明されておらず、今回認められた糖質コルチコイドの効果がリセプターを介したものであるかが問題であった。

Ben-Or<sup>11)</sup>によるとニワトリ胎児ではステロイドリセプターは胎生早期に完成するが、利用する過程が未熟であるためにその効果が現れず、胎生後期になってはじめて効果が発現するという。したがって、リセプターを介したステロイドの効果は細胞の成熟度により変化しえるもので、今回の実験でも細胞の成熟度により効果に違いがみられたことは、マウス網膜神経細胞にリセプターが存在し、成熟によりそれが減少する、あるいは利用過程の効率が減弱すると仮定すると説明は可能であった。しかし、糖質コルチコイドがリセプターを飽和させる濃度は $10^{-8}\text{M}$ とされており<sup>12)</sup>、今回効果のみられた0.1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度は大体 $2.5 \times 10^{-7}\text{M}$ に相当するので、その飽和濃度よりかなり高く、リセプターを介する効果を考え難いものになっていた。



また、糖質コルチコイドはヒト線維芽細胞で上皮成長因子の存在下で、この成長因子と共同して増殖性の効果をもつことが報告されており<sup>13)</sup>、その機構は糖質コルチコイドが成長因子の受容体を増加させることにあると考えられている。今回の実験の予備実験でも無血清下ではDEXの効果は現れないことを確認しており<sup>14)</sup>、DEXの網膜神経細胞に与える効果はこのような他の細胞成長因子を介した間接的なものである可能性が最も考えやすかった。

培養1週以降ではDEXの効果は見られなくなり、ステロイドが培養細胞に与える効果は長期には及ばないことが分かったが、網膜神経細胞の長期培養には線維芽細胞のような他の細胞の共存を必要としており<sup>5)</sup>、ステロイドは線維芽細胞の増殖を抑制する効果があることにその第一の原因があると思われる。新生ラットでは糖質コルチコイドの投与により髄鞘形成が障害されることが示されており<sup>15)</sup>、糖質コルチコイドの長期的な効果はこのような作用により、網膜神経に対し逆に抑制的なものである可能性も推定された。また、生後3日以内のマウスの培養2日目では糖質コルチコイドが高濃度では逆に細胞生存率、細胞突起再生率ともに不良で、高濃度の糖質コルチコイドは細胞毒性を示す可能性が考えられた。このように *in vitro* においても糖質コルチコイドの作用はいろいろな要素の影響を受けていると考えられ、まして *in vivo* においては多数の要因が絡んで複雑化することになるものと思われる。

いずれにしろ今回の実験からDEXは短期ではマウス培養網膜神経細胞の再生にある程度の促進的な影響を与えることが分かった。このことと実際の臨床とは同一レベルで論ずることはでもないことはいうまでもないことであるが、治療で用いられた糖質コルチコイドが何らかの因子の存在下で直接網膜神経細胞に作用する可能性は否定することはできないと思われる。

稿を終えるにあたりご校閲頂きました田中直彦教授に感謝致します。

#### 文 献

- 1) Meyer JS: Biochemical effects of corticosteroids on neural tissues. *Physiological Review* 65: 946—1020, 1985.
- 2) 近藤 昊: Glucocorticoid, 細胞成長因子. 日本組織培養学会編, 東京, 朝倉書店, 118—124, 1984.
- 3) Kari B, Gilbertson J, Barrada I: Effects of the synthetic glucocorticoid betamethasone on the survival of neurons in fetal rabbit brain cell culture. *Brain Res* 339: 1—7, 1985.
- 4) Howard E, Benjamins JA: DNA, ganglioside and sulfatide in brain of rats given corticosterone in infancy, with an estimate of cell loss during development. *Brain Res* 92: 73—87, 1975.
- 5) 湯田兼次: AVEC法を用いた培養網膜神経節細胞での軸索輸送の測定. *日眼* 90: 215—224, 1986.
- 6) Grasso RJ, Johnson CE: Dose-response relationships between glucocorticoids and growth inhibition in rat glioma monolayer cultures. *Pro Soc Exp Biol Med* 154: 238—241, 1977.
- 7) 山田 武, 大山ハルミ: 細胞死の実験的判定法. *細胞* 16: 236—237, 1984.
- 8) Sarkar PK, Moscona AA: Binding of receptor-hydrocortisone complexes to isolated nuclei from embryonic retina cells. *Biochem Biophys Res Commun* 57: 980—986, 1974.
- 9) Chader GJ, Meltzer R, Silver J: A soluble receptor for corticosteroids in the neural retina of the chick embryo. *Biochem Biophys Res Commun* 45: 2026—2033, 1972.
- 10) Linser P, Moscona AA: Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: Localization in Müller fibers and dependence on cell interaction. *Proc Natl Sci USA* 76: 6476—6480, 1979.
- 11) Ben-Or: Development of responsiveness to glucocorticoid hormones. *J Steroid Biochem* 19: 305—314, 1983.
- 12) Piperberg JB: Binding steroids to the cytoplasmic receptor of the embryonic chick retina: Kinetics and structural considerations. *Arch Biochem Biophys* 191: 367—374, 1978.
- 13) Baker JB, Barsh GS, Canney DH, et al: *Proc Nat Acad Sci USA* 75: 1882—1886, 1978.
- 14) 湯田兼次: 網膜神経の無血清培養. 第23回神経眼科学会, 佐賀, 1985.
- 15) Bohn MC, Friedrich VL: Recovery of myelination in rat optic nerve after developmental retardation by cortisol. *J Neurosci* 2: 1292—1298, 1982.