

網膜色素上皮細胞に対する網膜抽出物中のヘパリン親和性 細胞成長因子の増殖刺激作用 (図 1, 表 1)

加藤 整・林 英之・大島 健司 (福岡大学医学部眼科学教室)

要 約

増殖性硝子体網膜症における眼内の線維性増殖には、網膜色素上皮細胞が関与している。この網膜色素上皮細胞の増殖・遊走には線維芽細胞成長因子をはじめとする多くの成長因子の関与がわかってきている。そこで、我々はウシ網膜神経上皮から網膜抽出物を取り出し、ヘパリン・アフィニティ・クロマトグラフィーでヘパリン親和性成分を分離・精製し、培養ヒト網膜色素上皮細胞に対するその増殖刺激活性を調べた。その結果、網膜色素上皮細胞はヘパリン親和性成分により増殖促進された。一方、ヘパリン非親和性成分では、増殖刺激活性はほとんどなかった。以上のことから網膜色素上皮細胞に対する網膜の増殖刺激活性はヘパリン親和性成分すなわちヘパリン親和性細胞成長因子によるものであると考えた。(日眼会誌 93: 453—457, 1989)

キーワード：増殖性硝子体網膜症，網膜色素上皮細胞，ヘパリン親和性細胞成長因子，細胞培養，ヘパリン・アフィニティ・クロマトグラフィー

Growth stimulating activity of heparin-binding growth factor in the neural retina for retinal pigment epithelial cells.

Hitoshi Kato, Hideyuki Hayashi and Kenji Oshima

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Fukuoka University

Abstract

Retinal pigment epithelial cells (RPE cells) participate in intraocular fibrocellular proliferation in proliferative vitreoretinopathy (PVR). The initial signal for proliferation and migration of RPE cells on PVR is not clear. However, water soluble extract from neural retina has been known to stimulate RPE cells, and fibroblast growth factor had a high affinity for heparin. In this experiment, we purified heparin-binding growth factor (HBGF) from neural retina using heparin-affinity chromatography. Then we examined the growth stimulating activity of HBGF for RPE cells proliferation. RPE cells were stimulated by HBGF, on the other hand heparin non-binding component could not stimulate RPE cells. This result suggests that the growth-stimulating activity of retinal extract on RPE cells is related to HBGF. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 93: 453—457, 1989)

Key words: proliferative vitreoretinopathy (PVR), retinal pigment epithelial cells, heparin-binding growth factor, cell culture, heparin affinity chromatography

別刷請求先：814-01 福岡市城南区七隈 7—45—1 福岡大学医学部眼科学教室 加藤 整

(昭和63年11月24日受付，平成元年 3 月 7 日改訂受理)

Reprint requests to: Hitoshi Kato, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Fukuoka Univ.

7-45-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-01, Japan

(Received November 24, 1988 and accepted in revised form March 7, 1989)

I 緒 言

増殖性硝子体網膜症 (proliferative vitreoretinopathy ; PVR)¹⁾における増殖組織の発生には、網膜色素上皮細胞 (retinal pigment epithelial cell ; RPE cell)由来の細胞, グリア要素の細胞および線維芽細胞様の細胞などが重要な役割を果たすことが知られている^{2)~5)}. *in vitro*でRPE cellは線維芽細胞やグリア細胞の増殖・遊走促進物質を産生⁶⁾, 逆に血管内皮細胞に対する抑制物質を産生する⁷⁾⁸⁾と報告されている. このRPE cellの産生物質が, 血清中より抽出された血小板由来細胞成長因子 (platelet-derived growth factor ; PDGF) やフィブロネクチンなどと協同で働いて, PVRにおける血管を含まない線維性の膜を網膜周囲に形成するのではないかと考えられている^{9)~11)}. このように網膜剥離発症初期のRPE cellの増殖遊走には, PDGFやフィブロネクチンの働きが強調されているが, なぜ網膜の周囲で強い増殖を起こすのかは必ずしも説明できない. 我々は以前, 網膜および硝子体にRPE cellに対する増殖刺激活性が存在することを確認し¹²⁾, これがPVRにおけるRPE cellの増殖に関与すると考えてきた¹³⁾¹⁴⁾. 一方, 網膜には血管内皮細胞に対する増殖因子が存在することはよく知られているが^{15)~20)}, これが既知の細胞増殖因子のいずれに当たるかは完全に明らかにはなっていない. 一方, 線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor ; FGF)をはじめいくつかの増殖因子はヘパリンに親和性があり, ヘパリン・アフィニティ・カラム・クロマトグラフィーで分離抽出できることから²¹⁾²²⁾, この一群をしばしばヘパリン親和性細胞増殖因子と呼ぶことがある. また, 網膜神経上皮から網膜由来細胞成長因子 (retina derived growth factor) をヘパリン・アフィニティ・カラム・クロマトグラフィーで分離抽出し, これもヘパリン親和性細胞成長因子の一群に入れている報告も見られる^{23)~25)}. しかし, このヘパリン親和性成分, 言いかえるとFGFグループの増殖因子のみがRPE cellに対する網膜の唯一の増殖因子であるか否かは明らかではない. そこで今回我々は, ウシ網膜からヘパリン親和性成分を分離し, RPE cellに対する増殖刺激活性を検討したので報告する.

II 実験方法

1. 実験材料

ヒトRPE cellは, 摘出眼球を75%エタノールに2分

間つけ滅菌し, メス刃で半割し前半部を除去する. さらに, 網膜神経上皮層を慎重に剝離した後, 0.05% EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) 中に10分間静置する. その後, メス刃にて網膜色素上皮をゆっくりと擦過し, 10% fetal calf serum (FCS) 含有 Ham's F-10培地中に採取し, ピペッティング, 遠沈 (800r.p.m., 5分間) の後, 10% FCS (fetal calf serum) 含有 Ham's F-10培地に再浮遊させ, 25ml フラスコ中で培養した. 図1は, その培養ヒトRPE cellの位相差顕微鏡写真 (×200) で, 今回の実験には培養8継代のものを用いた. また, 対象として用いたウシ肺動脈内皮細胞は Association of Tissue Culture Center 株 (Bethesda, USA) を使用した.

網膜抽出物は, 成熟ウシ眼球を赤道部よりやや前方で半割し, 硝子体を除いた後, 網膜神経上皮をとり, それに一眼当たり1mlの精製水を加え, Potter-grinderでホモジネートし凍結する. その後室温で融解し, 20,000×gで1時間遠沈してその上清を採取し, 直径0.22μのミリポア・フィルターでろ過滅菌したものを網膜抽出物とした. さらに, この網膜抽出物を硫酸250g/lで塩析し, Klagsbrunらの方法²²⁾に準じてヘパリン・アフィニティ・カラムで分子量15,000~20,000の画分を分離して, 吸着抽出できたものをヘパリン親和性成分, 残渣をヘパリン非親和性成分として実験に用いた.

2. 実験方法

2.1cm²のウエル中に, ヒトRPE cellを2×10⁴個植え込み, 0.5% new born calf serum 含有 Dalbecco's minimal essential medium 培地中で24時間培養し, それぞれに0.5%ウシ胎児血清 (コントロール), 網膜抽出物, ヘパリン親和性成分およびヘパリン非親和性成分の各試料を加えた後, さらに48時間培養し, 1μCi/mlの³H-チミジンを加えた培地に4時間入れ, 0.25%トリプシン処理し, 0.1N NaOHで細胞を溶解し, 20%トリクロール酢酸 (TCA) によりDNAを沈殿させ, それをフィルターにトラップし, DNAに摂り込まれた³H-チミジンのβ線を液体シンチレーターで測定し増殖活性を調べた. ウシ肺動脈内皮細胞についても同様に測定した. 以上の実験を各群につきウエル3個行った数値を平均し, さらに同一の実験を2回行った.

III 結 果

ウシ肺動脈内皮細胞に対する各試料の増殖刺激活性は, ヘパリン親和性成分で107.7±6.4d.p.m./10³cells

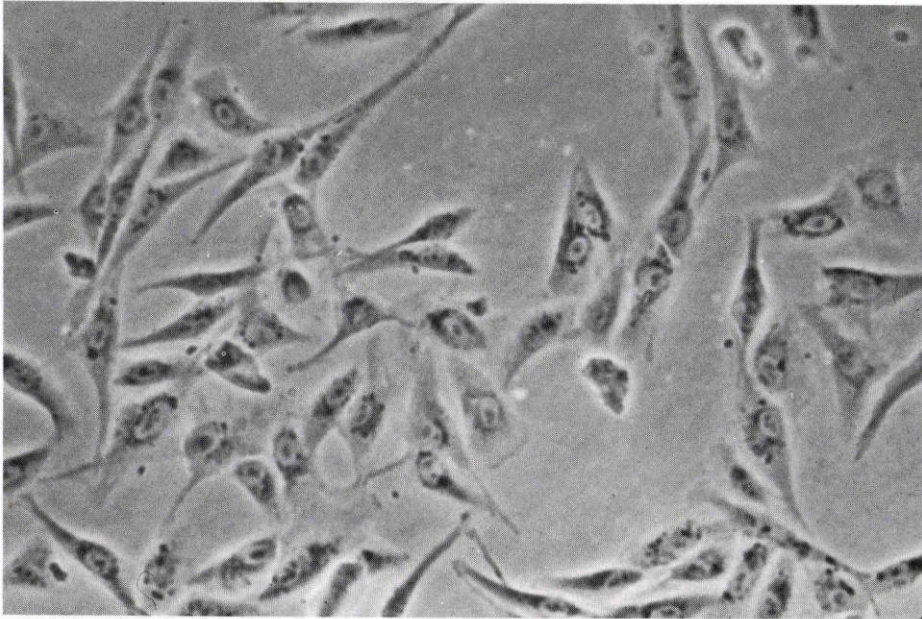


図1 培養ヒト網膜色素上皮細胞(位相差顕微鏡, $\times 200$), 紡錘型の色素顆粒を有する細胞(培養8継代)

表1 網膜色素上皮細胞(RPE cell)およびウシ肺動脈内皮細胞に対する増殖刺激活性を ^3H -チミジン取り込み率で表す。

RPE cell では網膜抽出物とヘパリン親和性成分でコントロールに比べ有意な増加を示しているが($p < 0.05$), ヘパリン非親和性成分では増殖刺激活性は認められなかった。ウシ肺動脈内皮細胞(CPAE)では、ヘパリン親和性成分で有意な増殖刺激活性があったが($p < 0.05$), ヘパリン非親和性成分では認められなかった。(各群の数値はウェル3個について行ったものを平均し、同一の実験を2回行った平均で示している。)

	RPE cell	CPAE
コントロール	39.6 \pm 3.7	40.8 \pm 1.3
ウシ網膜粗抽出物	50.2 \pm 4.0	152.8 \pm 90.7
ヘパリン親和性成分	50.9 \pm 3.3	107.7 \pm 6.4
ヘパリン非親和性成分	43.7 \pm 7.9	47.3 \pm 6.3

(d.p.m./ 10^3 cells)

とコントロール(40.8 \pm 1.3d.p.m./ 10^3 cells)に比べ極めて高い ^3H -チミジン取り込み率を示し、統計学的にも有意な増殖刺激活性を示していたが($p < 0.05$), ヘパリン非親和性成分では47.3 \pm 6.3d.p.m./ 10^3 cellsと増殖刺激活性はほとんど示さなかった(表1)。

ヒトRPE cell に対しては、網膜抽出物は50.2 \pm 4.0 d.p.m./ 10^3 cells, ヘパリン親和性成分は50.9 \pm 3.2d.p.

m./ 10^3 cell と共にコントロールに比べ高い取り込み率を示し($p < 0.05$), 増殖刺激活性が認められたが, ヘパリン非親和性成分(43.7 \pm 7.9d.p.m./ 10^3 cells)では増殖刺激活性は認められなかった(表1)。

IV 考 按

PVRにおける眼内線維組織はRPE cell由来の細胞, ミューラー細胞やAstrocyteなどのグリア要素のものおよび線維芽細胞様の細胞からなっていることが知られている^{2)~5)}。これらの構成要素が, 線維芽細胞あるいは筋線維芽細胞となって, collagenの合成, 組織の収縮を引き起こし, PVRとしての病変を形成する。さらに, これらの構成要素の増殖に網膜および硝子体のある種の因子が関与していることもわかって来ている^{12)~14)}。我々が先に報告したように, ウシ硝子体抽出物は, ヒト眼内線維芽細胞およびRPE cellの両者に対し増殖刺激作用を有しているが, ウシ網膜抽出物は, ヒト眼内線維芽細胞には増殖刺激作用がなく, ヒトRPE cellに対してのみ増殖刺激作用を有している^{12)~14)}。しかしながら, これら両抽出物中には血液由来の成分をはじめとする多くの成分が含まれており, 特にRPE cellに対する増殖因子と抑制因子の両者が共存している可能性が考えられる。そこで, 今回この中

の網膜抽出物からヘパリン・アフィニティ・カラム・クロマトグラフィーを用いて分子量15,000~20,000の画分にあるヘパリン親和性成分を分離抽出しヒト RPE cell に対する増殖刺激活性を調べたところ、ヘパリン親和性成分は、ヒト RPE cell に対して増殖刺激活性を有していたが、ヘパリン非親和性成分では増殖刺激活性がなかった。このことから網膜抽出物のヒト RPE cell に対する増殖刺激作用は、網膜抽出物中のヘパリンに親和性のある成分による作用であることが考えられた。また、FGF はヘパリン親和性成分とほぼ同様にヒト RPE cell とヒト眼内線維芽細胞に対し増殖促進作用を示しており¹³⁾、このことからヘパリン親和性成分は FGF と同類のものであると考えられた。以上のことから、FGF の作用を抑制する物質が眼内における無血管性線維性増殖を抑制することができ、その結果、PVR の発生防止に有効となるのではないかということが示唆された。

文 献

- 1) The Retina Society Terminology Committee: Classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmol* 90: 121-125, 1983.
- 2) **Machemer R, Laqua H**: Pigment epithelium proliferation in retinal detachment (Massive periretinal proliferation). *Am J Ophthalmol* 80: 1-23, 1975.
- 3) **Laqua H, Machemer R**: Glial cell proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). *Am J Ophthalmol* 80: 602-618, 1975.
- 4) **Machemer R, van Horn D, Aaberg T**: Pigment epithelial proliferation in human retinal detachment with massive periretinal proliferation. *Am J Ophthalmol* 85: 602-618, 1975.
- 5) 大平明弘, 大島健司, 菊地昌弘: 人眼 Massive periretinal proliferation (MPP) の組織学的研究 (予報). *日眼* 85: 622-630, 1981.
- 6) **Rowen SL, Glaser BM**: Retinal pigment epithelial cells release a chemoattractant of astrocytes. *Arch Ophthalmol* 103: 704-707, 1985.
- 7) **Glaser BM, Campochiaro PA, Davis JL, et al**: Retinal pigment epithelial cells release an inhibitor of neovascularization. *Arch Ophthalmol* 103: 1870-1875, 1985.
- 8) **Avery RL, Glaser BM**: Inhibition of retinal pigment epithelial cell attachment by a synthetic peptide derived from the cell-binding domain of fibroectin. *Arch Ophthalmol* 104: 1220-1222, 1986.
- 9) **Campochiaro PA, Jerdan JA, Glaser BM**: Serum contains chemoattractant for human retinal pigment epithelial cells. *Arch Ophthalmol* 102: 1830-1833, 1984.
- 10) **Yeo JH, Sadeghi J, Campochiaro PA, et al**: Intravitreal fibronectine and platelet-derived growth factor. *Arch Ophthalmol* 104: 417-421, 1986.
- 11) **Campochiaro PA, Glaser BM**: Platelet-derived growth factor is chemotactic for human retinal pigment epithelial cells. *Arch Ophthalmol* 103: 576-579, 1985.
- 12) 林 英之, 大島健司: 硝子体, 網膜抽出物の培養ヒト眼内線維芽細胞の増殖に及ぼす影響. *日眼* 88: 940-947, 1984.
- 13) 林 英之: 眼内無血管性線維増殖における細胞成長因子の役割. *眼科研究最近の進歩*, 332-345, 1986.
- 14) 林 英之: 硝子体細胞増殖促進因子と抑制因子. *あたらしい眼科* 2: 1211-1217, 1985.
- 15) **Glaser BM, D'Amore PA, Michels RG, et al**: The demonstration of angiogenic activity from ocular tissues. *Ophthalmol* 87: 440-446, 1980.
- 16) **Glaser BM, D'Amore PA, Michels RG, et al**: Demonstration of vasoproliferative activity from mammalian retina. *J Cell Biol* 84: 298-304, 1980.
- 17) **D'Amore PA, Glaser BM, Brunson SK, et al**: Angiogenic activity from bovine retina: Partial purification and characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3068-3072, 1981.
- 18) **Glaser BM, D'Amore PA, Seppa H, et al**: Adult tissues contain chemoattractants for vascular endothelial cells. *Nature* 288: 483-484, 1980.
- 19) **Chen CH, Chen SC**: Angiogenic activity of vitreous and retinal extract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 596-602, 1980.
- 20) **Chen SC, Chen CH**: Vascular endothelial cell effectors in fetal calf retina, vitreous, and serum. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23: 340-350, 1982.
- 21) **Gospodarowicz D**: Purification of fibroblast growth factor from bovine brain *J Biol Chem* 250: 2515-2520, 1975.
- 22) **Klagsbrun M, Shing Y**: Heparin affinity of anionic and cationic capillary endothelial cell growth factors: Analysis of hypothalamus-derived growth factors and fibroblast growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 805-809,

- 1985.
- 23) **Arruti C, Courtoirs Y**: Morphological changes and growth stimulation of bovine epithelial lens cells by a retinal extract in vitro. *Exp Cell Res* 117: 283—292, 1978.
- 24) **Barritault D, Arruti C, Courtoirs Y**: Is there a ubiquitous growth factor in the eye? Proliferation induced in different cell types by eye-derived growth factors. *Differentiation* (Berlin) 18: 29—42, 1981.
- 25) **Plouet J, Barritault D, Coutoires Y, et al**: Eye-derived growth factor are immunologically distinct and bind to different receptors on human foreskin fibroblasts. *FEBS Letters* 144: 85—88, 1982.
-