

小分子量蛍光剤による角膜内皮細胞間コミュニケーションの観察

広川 仁則*, Ronald A. Laing**, Setsuko S. Oak**, Simon Levy***, 馬嶋 慶直*

*藤田保健衛生大学医学部眼科学教室, **ボストン大学眼科学教室, ***同 生理学教室

要 約

角膜内皮細胞層における細胞間コミュニケーションを検討するため、小分子量蛍光色素剤 Lucifer Yellow CH (457.3mol wt) を、ガラスマイクロエレクトロードを用いて直接家兎角膜内皮細胞内に注入し、細胞間の蛍光剤移行動態を観察した。その結果、摘出直後の角膜では非常に速やかに広範囲な細胞間コミュニケーションが存在することを認め、正常角膜における内皮細胞同志の機能的結合の強さが示唆された。しかし、すでに機械的傷害を受けていた細胞には蛍光の移行が認められず、また、摘出後長時間経過した角膜では、スペキュラーマイクロスコープ像の悪化と膜電位の低下と共に、細胞間蛍光剤移行動態は著明に低下していた。22°Cと35°Cの温度差では、蛍光剤の移行動態に有意な差を認めなかった。細胞間コミュニケーションをスペキュラーマイクロスコープ像、細胞膜電位と合わせて検討した結果、角膜内皮細胞活性の評価に有用であると考えられた。(日眼会誌 95:1057-1064, 1991)

キーワード: 細胞間コミュニケーション, 角膜内皮細胞, Lucifer Yellow CH, スペキュラーマイクロスコープ, 細胞膜電位

Observation of Cellular Communication in the Corneal Endothelium
Using a Small Molecular Weight Fluorescent DyeKiminori Hirokawa*, Ronald A. Laing**, Setsuko S. Oak**,
Simon Levy*** and Yoshinao Majima*

*Department of Ophthalmology, Fujita Health University School of Medicine

Department of Ophthalmology**, Department of Physiology***, Boston University School of Medicine

Abstract

The metabolic and functional connection between corneal endothelial cells is thought to depend on the transfer of small molecules via gap junctions, as has been reported for other tissues. Cell-to-cell communication in the corneal endothelium was studied by monitoring the spread of fluorescence following the direct injection of Lucifer Yellow CH into single endothelial cells of the excised rabbit cornea. The image of the endothelial cells was observed during the injection and post-injection periods using specular microscopy and fluorescence microscopy. In the fresh cornea, the dye transferred readily from the injected endothelial cell to its neighbors. In damaged cells, dye transfer was slower or did not occur. After 5 hours of incubation in tissue culture medium 199, the specular microscopic image degraded, lowered cell membrane potential and decreased dye transfer rate were measured. This study showed that in normal corneal endothelial cells there were efficient cell communication

別刷請求先: 470-11 豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98 藤田保健衛生大学医学部眼科学教室 広川 仁則
(平成2年10月26日受付, 平成3年2月6日改訂受理)

Reprint requests to: Kiminori Hirokawa, M.D. Department of Ophthalmology, Fujita Health University,
School of Medicine.

1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake 470-11, Japan

(Received October 26, 1990 and accepted in revised form February 6, 1991)

channels between neighboring cells, and as the endothelium becomes less viable, cell communication is inhibited. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 1057-1064, 1991)

Key words: Cell-to-cell communication, Corneal endothelial cells, Lucifer Yellow CH, Specular microscope, Cell membrane potential

I 緒 言

細胞間コミュニケーションは、組織の発達や恒常性の維持、そして創傷治癒に非常に重要であると考えられている¹⁾²⁾。細胞間 junction には、細胞間接着 junction、非透過性 junction そして、コミュニケーション junction とあり、代表的なコミュニケーション junction は gap junction と神経細胞のシナプスである^{3)~6)}。広くほとんどの組織に分布し、角膜内皮細胞にもその存在が認められている gap junction は^{7)~9)}、細胞膜に存在する管状の構造物で、相接する細胞の細胞質から細胞質への親水性 channel を形成している¹⁰⁾¹¹⁾。Gap junction を介した物質の移動は分子量依存性で、Loewenstein ら¹²⁾¹³⁾によれば、分子量 1,000~2,000 が通過可能な分子量の上限と報告されている。

Gap junction の透過性及びその調節因子が、眼組織においても網膜細胞¹⁴⁾、脈絡膜メラニン細胞¹⁵⁾、水晶体上皮細胞^{16)~19)}そして水晶体²⁰⁾では、すでに報告が見られるが、角膜内皮細胞での報告はあまりなされていない。

そこで今回我々は、小分子量蛍光色素剤 Lucifer Yellow CH²¹⁾を、家兎角膜内皮細胞内に注入し、その拡がりから角膜内皮における細胞間のコミュニケーションについて検討した。また、細胞間コミュニケーションに対するスペキュラーマイクロスコープ像、細胞膜電位、温度差そして機械的傷害との関連についても検討を加えた。

II 実験方法

図 1 に、実験系の模式図を示す。

1. 角膜処理

体重 2~3kg の白色家兎 9 羽 9 眼の角膜を使用した。致死量 phenobarbital sodium の静脈内投与にて屠殺後直ちに眼球を摘出、強角膜片を作製し内皮面を上にして組織培養液 TC-199 を満たした chamber 内に静置した。恒温槽からの水を chamber 外壁に沿って循環させ、顕微鏡下での温度調節を可能にした。実験は全

て角膜中央部にて行った。

2. 蛍光色素剤注入

細胞間コミュニケーション観察のため、蛍光色素剤 Lucifer Yellow CH (分子量 457.3) の 5% 溶液 (20mM KH_2PO_4 に溶解、 $\text{pH}=7.3$) を使用した²²⁾。蛍光剤の最大刺激波長及び最大励起波長は、それぞれ 430nm と 540nm であった。蛍光剤注入用マイクロエレクトロードは、外径 1mm のガラスピペット (Inner filament 付) を先端の直径 0.1~0.2 μm になるように引き伸ばして作製した。蛍光剤注入用エレクトロードは、Ag-AgCl ワイヤ付ホルダーに取付け、マイクロマニピュレーターにて操作した。蛍光剤注入用エレクトロードの電気抵抗は、180~200M Ω であった。細胞内蛍光剤注入のため、コンピューター制御の加圧注入装置を作製し使用した。注入圧は約 0.70kg/cm²、注入時間は 1 秒間の single shot 注入と、より多くの細胞を染めるための連続注入を行った。

色素注入に際し、蛍光剤注入用エレクトロードを通して細胞膜電位を連続的に記録することにより、マイクロピペットが確実に細胞内に刺入されていること、そして色素注入後も細胞が傷害されなかったかどうかを確認した。エレクトロードより得られた電気信号は、amplifier にて増幅し、オシロスコープで観察しながら同時にチャートレコーダーに記録した。

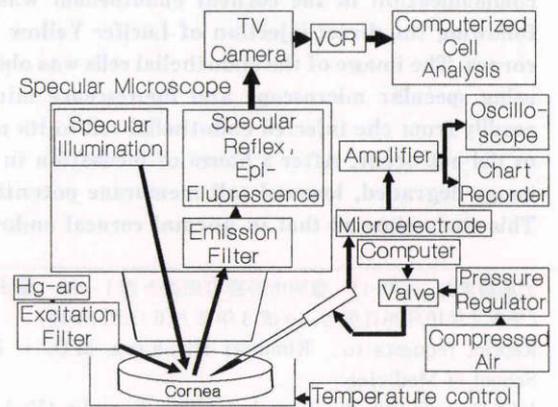


図 1 実験系の模式図。

加えて、蛍光剤注入用エレクトロードでは、電気抵抗が高くノイズが大きいため 3mol KCl を満たした標準エレクトロード（電気抵抗=約 40M Ω ）による細胞膜電位測定を、角膜処理直後及び実験終了前に施行した。

3. 細胞内蛍光の観察と解析

実験は全経過を通じてアイバンク用スペキュラーマイクロSCOPE 観察下で行ったが、鏡面反射光²³⁾は細胞内蛍光の観察に適正ではないため、細胞内の蛍光を観察する際はスペキュラーマイクロSCOPE の光源を消し、別角度からの蛍光刺激波長光照射に切替え、emission filter を通して観察した。細胞から細胞への蛍光の拡がりにはテレビカメラを通してビデオテープに記録し、さらにコンピューターによるモニター上での細胞解析システム（Bio-Optics 社製）を使用して、トレースした角膜内皮細胞境界線と蛍光像を同時に観察した。

4. 実験手順

各々の角膜につき以下の順序で実験を行った。

角膜処理後直ちに室温（22 $^{\circ}$ C）にて、細胞膜電位測定を標準エレクトロード（抵抗=約 40M Ω ）を用いて行い、次に蛍光剤注入用エレクトロードに交換して細胞内へ色素を注入し蛍光剤移行動態を記録した。色素注入は、3~5 個の相接しない異なる細胞へ行った。引き続き、細胞間コミュニケーションに対する温度差の影響を見るため、30 分間 35 $^{\circ}$ C で incubation した後、再び色素注入を行い、蛍光剤移行動態を記録した。その後、蒸発による medium の組成の変化を軽減させる目的で加温を中止し、5 時間後まで室温にて細胞内色素注入を数回行った。実験を終了する前に、再度標準エレクトロードに交換し細胞膜電位を測定した。

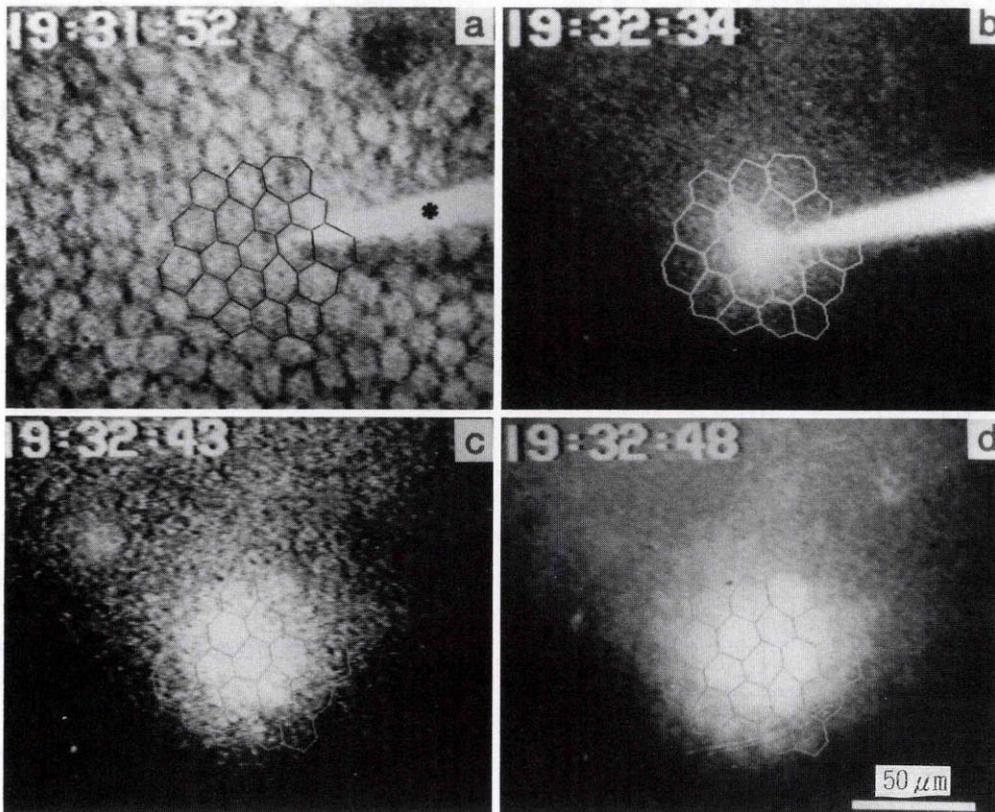


図 2 コンピューターによる画像修飾。角膜内皮細胞スペキュラーマイクロSCOPE 像解析システムを用いてトレースした細胞境界線によって、細胞内蛍光の拡がりと同内皮細胞の位置関係が同時に観察可能である。細胞刺入直前の蛍光剤注入用エレクトロード (*), ($\times 320$)

III 結 果

1. 新鮮角膜内皮細胞に於ける細胞間コミュニケーション

図2に、細胞内色素注入の1例を連続写真で示す。図2aは、注入前のスペキュラーマイクロスコープ像にて細胞境界線をトレースした像で、図中の白色楔型物(*)は、蛍光剤注入用エレクトロードを示す。図2b~dは、図2aでトレースした細胞境界線をモニター上に残し、蛍光剤の移行動態を観察した所である。時間経過に伴って拡がる蛍光と細胞の位置関係が確認可能となっている。

図3に、1秒間のsingle shot注入時の、蛍光剤注入用エレクトロードによる細胞膜電位チャートを示す。エレクトロードの細胞内刺入に伴った急速な電位下降の後、約-40mVの細胞内電位が続き、蛍光剤注入スパイク(矢印)後も直ちに元の安定した細胞内電位に復していることから、細胞が傷害されなかった事を示している。また、エレクトロード抜去に伴う細胞外電位への復帰も速やかであった。

図4に、1秒間のsingle shot例の連続写真を示す。細胞外のmedium中に放出された蛍光剤は、局所に留まることなく2秒後には拡散、消褪した(図4a~d)。

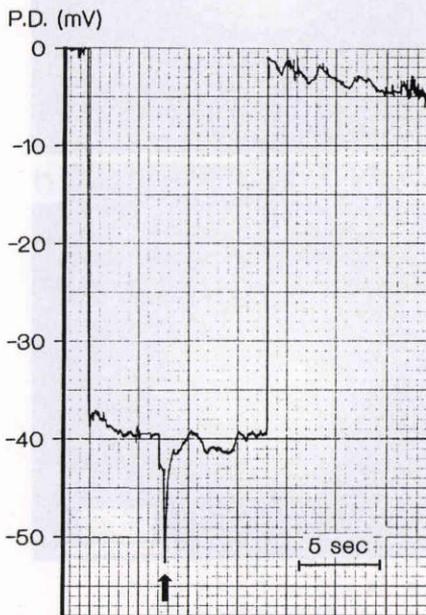


図3 蛍光剤注入に伴った細胞膜電位の変化。1秒間のsingle shot注入(矢印)。P.D.;膜電位

それに対し細胞内注入例(図4e~k)では、蛍光剤は先ず注入された細胞内に局在傾向を示し、漸次周辺の細胞に移行していった。細胞から細胞への蛍光剤の移行は速やかで、かつ全方向に均一であった。隣接細胞内には、注入開始0.4秒後から量輪状に蛍光を認めはじめ、徐々にその濃度を増した。さらに遠位の細胞への蛍光の移行も速やかで、注入開始から10~15秒で10~16個の細胞が造影された。注入された蛍光剤の濃度は、その拡がりに伴って減少し、注入開始から約60秒で観察不能となった。図4aに示すとおり、蛍光剤注入終了後のスペキュラーマイクロスコープ観察上、蛍光剤注入操作による細胞の傷害は認められなかった。

図5に連続注入例(35秒, 0.45~0.50pl)の連続写真を示す。3分前にマイクロピペットによって機械的傷害を与えた細胞から、3細胞径離れた細胞に蛍光剤連続注入を行った(図5a)。蛍光の拡がりは全方向に均一でかつ速やかで、10秒以内に3細胞径まで達し2分以内に全視野に及んだ(図5a~e)。しかし、すでに傷害を受けていた細胞には蛍光の移行が認められず(図5e, f: 黒矢印)、さらに過剰の蛍光剤注入によって傷害された細胞に、蛍光剤注入用エレクトロード抜去後約60秒間、蛍光剤の停滞が認められた(図5e, f: 中抜き矢印)。被傷害細胞はスペキュラーマイクロスコープ観察上、周辺の正常細胞に比べて輝度に違いを生じていた(図5f)。

2. 細胞間コミュニケーションに対する温度差の影響

蛍光剤移行動態を細胞全体に蛍光を認めたものを移行の判断基準として測定した。蛍光が蛍光剤注入細胞から遠位に広がるに従い移行の判断が困難となったが、図6に示す如く同一条件で蛍光剤注入を行った所、22℃と35℃の両温度間で蛍光剤移行動態に有意な差を認めなかった。隣接細胞への蛍光剤移行時間は0.4~1.5秒で、60秒で半径5~6細胞径内の細胞が造影された。

3. 角膜内皮細胞活性低下例に於ける細胞間コミュニケーション

摘出後5時間以上経過した角膜を、スペキュラーマイクロスコープによる内皮細胞観察と細胞膜電位測定によって、同一角膜の摘出直後の状態と比較した(図7)。5.5時間経過後角膜内皮のスペキュラーマイクロスコープ像は、新鮮角膜に比して著明に悪化し、dark spotの散在を認めた(図7b)。細胞膜電位は、同一角膜内では細胞間の差異をほとんど認めなかったが、摘

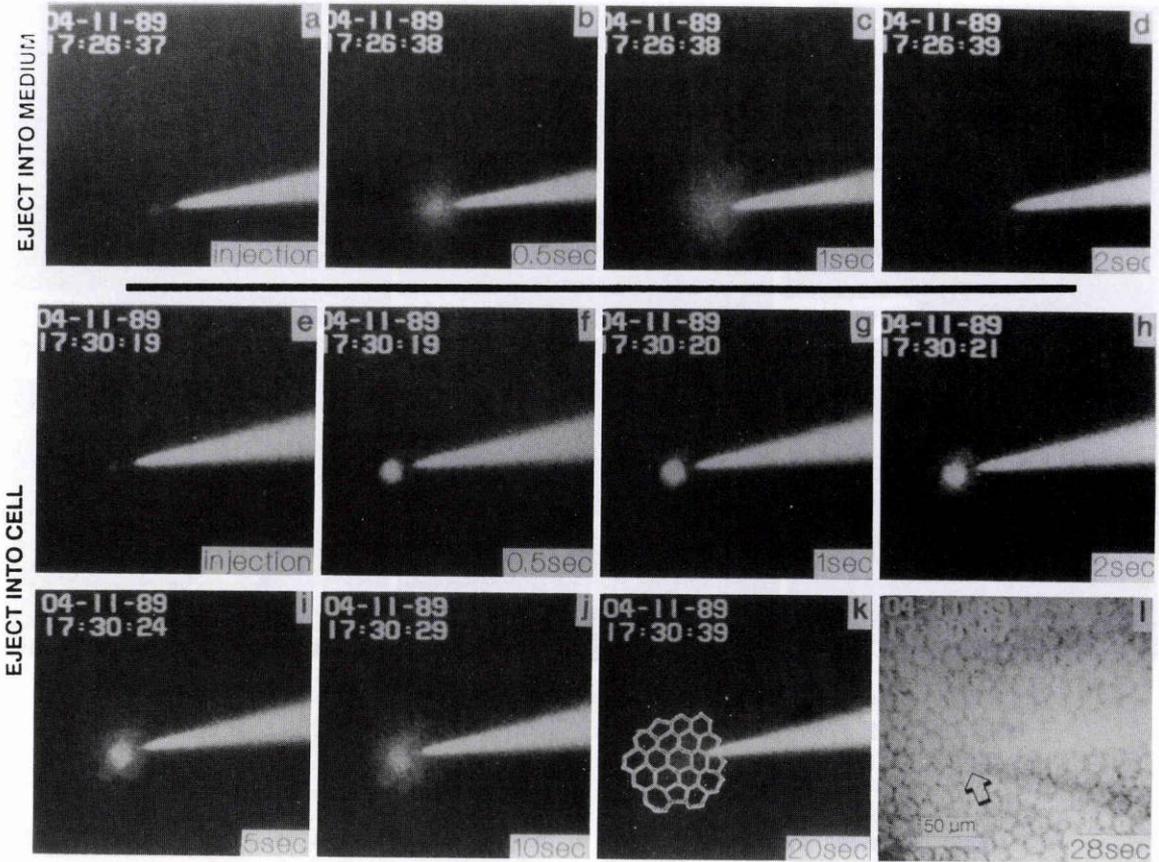


図 4 1 秒間の single shot 注入例の連続写真. a~d: 細胞外の medium 中への放出. e~k: 細胞内の注入. 単一細胞から周辺細胞への速やかな蛍光剤移行が認められる. スペキュラーマイクロスコープ像にて蛍光剤注入細胞に異常を認めない (矢印). (×170)

出後の経過時間に応じて変化を示し, 新鮮角膜では $-35 \sim -75 \text{ mV}$ ($-57 \pm 6 \text{ mV}$, mean \pm SD, $n=9$), 5.5 時間経過後では $-5 \sim -10 \text{ mV}$ ($-7 \pm 1 \text{ mV}$, mean \pm SD, $n=9$) であった. スペキュラーマイクロスコープ像の変化と細胞膜電位の変化に, 相関がみられた. 図 8 に示す如く, 細胞間の蛍光剤移行もこの摘出後の時間経過に伴って変化し, 摘出直後の角膜では, 注入された蛍光剤は, すみやかに移行, 消退したにもかかわらず, 2.5 時間後では 3 細胞径まで蛍光が拡がるのに 18 秒と遅延しており (新鮮角膜では平均 10 秒), 加えて, 蛍光剤移行の各方向への均一性が失われていた (図 8a~c). さらに 5 時間経過後では, 蛍光剤の移行は著明に低下し, 注入された細胞に 20 分以上の停滞を示した (図 8d~f).

IV 考 按

角膜内皮細胞層における細胞間コミュニケーションについての報告は少ないが, 他組織での報告同様 gap junction を介した細胞間コミュニケーションが, 組織の正常な代謝や機能の維持に非常に重要であると考えられる¹²⁾.

今回我々は, 角膜内皮細胞層における細胞間コミュニケーションを検討するため, 蛍光色素剤 Lucifer Yellow CH を, ガラスマイクロエレクトロードを用いて直接家兎角膜内皮細胞内に注入し, 細胞間の蛍光剤移行動態を観察した. その結果, 新鮮角膜に於いて, 注入された蛍光剤は 1 個の細胞から隣接する細胞へと次々と移行し速やかに全視野の細胞に広がった. このことから, 多数の角膜内皮細胞がコミュニケーション

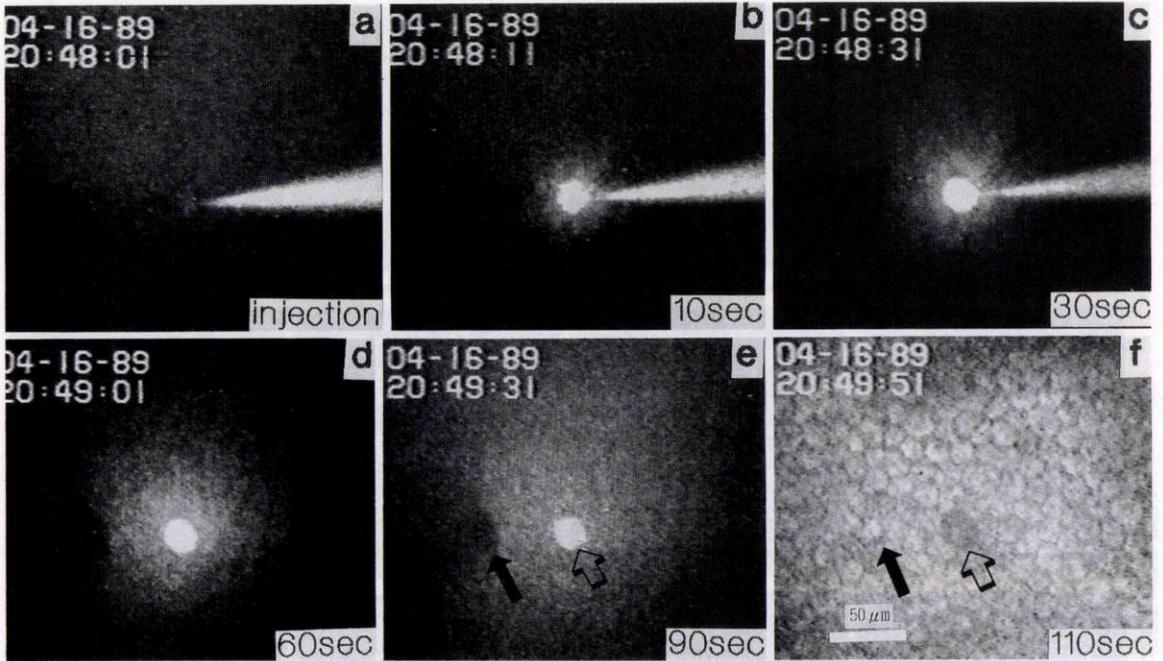


図5 連続注入例の連続写真。広範な細胞に漸次ほぼ均等に蛍光剤移行が認められる(a~e)。傷害細胞に一致して蛍光剤の欠損を認める(黒矢印)。過剰注入により細胞像は変化し、蛍光剤の貯留を認めた(中抜き矢印)。(×200)

Dye Transfer Time
Normal Cornea

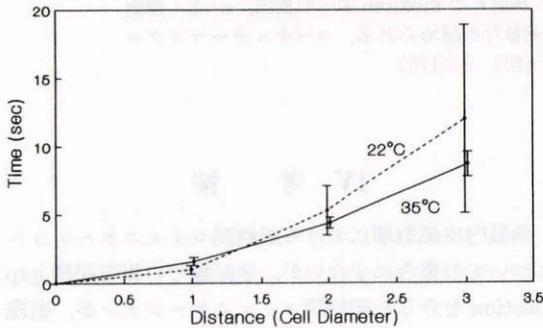


図6 蛍光剤移行と温度。22°Cと35°Cでは蛍光剤移行速度に有意な差を認めない ($p < 0.01$).

junctionによって連絡していることが明らかとなった。これは、他組織細胞での蛍光剤移行動態の報告とほぼ同様の結果であった¹⁹⁾²²⁾²⁴⁾。また、22°Cと35°Cで蛍光剤移行動態に差を認めなかったことは、エネルギーを要しない受動輸送の可能性を示しており、これもgap junctionを介した細胞間コミュニケーションと合

致する結果であった。しかし、摘出後5時間以上経過し細胞膜電位の著しい低下とスペキュラーマイクروسコープ像でdark spotの散在を認めた角膜では蛍光剤移行動態も低下しており、また機械的傷害を受けていた細胞においても蛍光剤の移行低下が認められた。それゆえ、細胞の機能的あるいは機械的傷害によりgap junctionの閉塞がひき起こされるものと考えられた。

蛍光剤移行動態の均等性については、Larsonら²²⁾が血管内皮細胞で認めた如く、新鮮で健康な角膜内皮細胞間では全方向に均等な蛍光剤移行が認められた。しかし、摘出後数時間経過した角膜では、蛍光剤移行動態の均等性が失われてきた。また、機械的傷害を受けた細胞において、受傷後直ちに周辺細胞から隔絶が認められたことは、周辺の健康な細胞の保護に役立っていると考えられると共に、引き続いておこるmigration等の創傷治癒機転との関連性も想像させられる¹¹⁾。細胞間コミュニケーションchannelの開閉機構の詳細は解明されていないが、Ca²⁺、H⁺や電位の関与が報告されている¹¹⁾。

今回我々は、角膜内皮細胞が、おそらくはgap junctionを介して、互いに連絡しあっていること、そして、

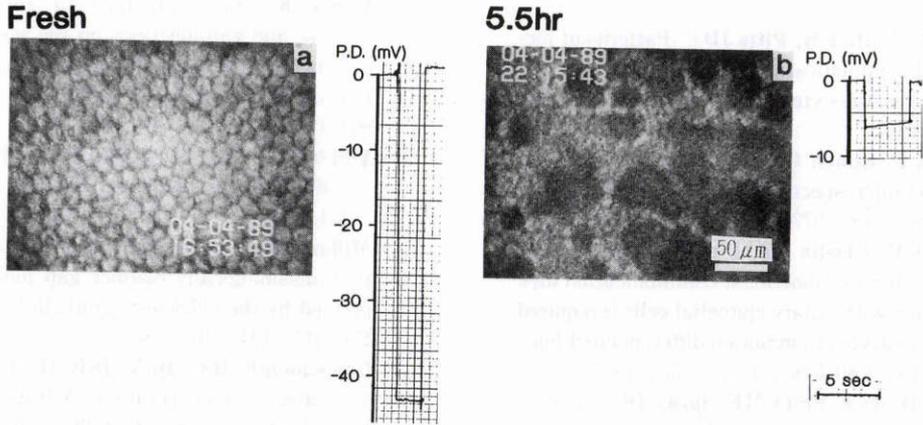


図7 新鮮角膜と摘出後5.5時間のスペキュラーマイクログラフ像と細胞膜電位, 経過時間に伴って, 内皮像では dark spot の散在, 膜電位は低下を示した. (×140) P.D.; 膜電位

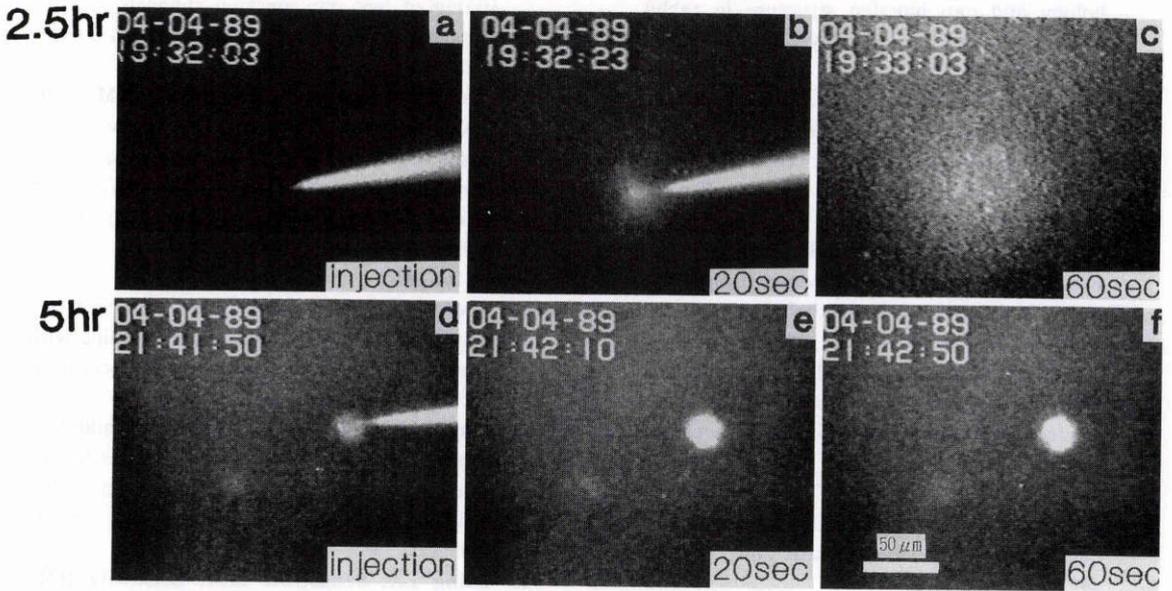


図8 摘出後2.5時間及び5時間経過後角膜での蛍光剤移行の連続写真. 2.5時間後では蛍光剤移行の不均一性と速度の低下を認める(a~c). 5時間後では注入細胞からの蛍光剤移行が観察されない(d~f). (×200)

この細胞間コミュニケーションは細胞の傷害によって抑制されることを示した。さらに、蛍光剤移行動態によって評価した細胞間コミュニケーションと、細胞の能動輸送の結果である膜電位ならびにスペキュラーマイクログラフ像でみた形態との関連性を示した。今後蛍光強度の定量化を進めさらに検討を加えていきたい。

文 献

- 1) **Spray DC, Harris AL, Bennett MVL:** Control of intercellular communication via gap junction, In Sheffield JB, Hilfer SR (ed), Cellular Communication During Ocular Development. New York, Springer-Verlag Inc, 57-84, 1982.
- 2) **Larson DM, Haudenschild CC:** Junctional transfer in wounded cultures of bovine aortic endothelial cells. Laboratory Investigation 59:

- 373—379, 1988.
- 3) **Kam E, Watt FM, Pitts JD**: Patterns of junctional communication in skin; studies on cultured keratinocytes. *Exp Cell Res* 173: 431—438, 1987.
 - 4) **Kohen E, Kohen C**: Rapid automated multi-channel microspectrofluorometry. *Exp Cell Res* 107: 261—268, 1977.
 - 5) **Mesnil M, Glaslin JM, Piccoli C, et al**: Cell contact but not junctional communication (dye coupling) with biliary epithelial cells is required for hepatocytes to maintain differentiated functions. *Exp Cell Res* 173: 524—533, 1987.
 - 6) **Bennett MVL, Spira ME, Spray DC**: Permeability of gap junctions between embryonic cells of *Fundulus*: A re-evaluation. *Dev Biol* 65: 114—125, 1978.
 - 7) **Kreutziger GO**: Lateral membrane morphology and gap junction structure in rabbit corneal endothelium. *Exp Eye Res* 23: 285—293, 1976.
 - 8) **Hirsch M, Renard G, Faure JP, et al**: Study of the ultrastructure of the rabbit corneal endothelium by the freeze-fracture technique: Apical and lateral junctions. *Exp Eye Res* 25: 277—288, 1977.
 - 9) **McLaughlin BJ, Caldwell RB, Sasaki Y, et al**: Freeze-fracture quantitative comparison of rabbit corneal epithel and endothelial membranes. *Current Eye Res* 4: 951—961, 1985.
 - 10) **Caspar DLD, Goodenough DA, Makowski L, et al**: Gap junction structures; correlated electron microscopy and X-ray diffraction. *J Cell Biol* 74: 605—628, 1977.
 - 11) **Peracchia C, Girsch SJ**: Functional modulation of cell coupling: Evidence for a calmodulin-driven channel gate. *Am J Physiol* 248: 765—782, 1985.
 - 12) **Loewenstein WR, Kanno Y, Socolar SJ**: The cell-to-cell channel. *Fed Proc* 37: 2645—2650, 1978.
 - 13) **Loewenstein WR**: Permeable junction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 11: 49—63, 1976.
 - 14) **Hama K**: Fine structure of the afferent synapse and gap junctions on the sensory hair cell in the saccular macula of goldfish: A freeze-fracture study. *J Neurocytol* 9: 845—860, 1980.
 - 15) **船田みどり, 広瀬 晶, 氏家和宣, 他**: 脈絡膜メラニン細胞間の dye-coupling. *日眼会誌* 92: 251—254, 1988.
 - 16) **Millar TM, Goodenough DA**: Evidence for two physiologically distinct gap junctions expressed by the chick lens epithelial cell. *J Cell Biol* 102: 194—199, 1986.
 - 17) **Goodenough DA, Dick JSB II, Lyons JE**: Lens metabolic cooperation: A study of mouse lens transport and permeability visualized with freeze-substitution autoradiography and electron microscopy. *J Cell Biol* 86: 576—589, 1980.
 - 18) **Peracchia C, Girsch SJ**: Permeability and gating of lens gap junction channels incorporated into liposomes. *Curr Eye Res* 4: 431—439, 1985.
 - 19) **Stewart S, Duncan G, Marcantonio JM, et al**: Membrane and communication properties of tissue cultured human lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 1713—1725, 1988.
 - 20) **Rae JL**: The movement of procion dye in the crystalline lens. *Invest Ophthalmol* 13: 147—150, 1974.
 - 21) **Stewart WW**: Functional connections between cells as revealed by dye coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer. *Cell* 14: 741—759, 1978.
 - 22) **Larson DM, Carson MP, Haudenschild CC**: Junctional transfer of small molecules in cultured bovine brain microvascular endothelial cells and pericytes. *Microvascular Research* 34: 184—199, 1987.
 - 23) **Laing LA, Sandstrom MM, Leibowitz HM**: Clinical specular microscopy: I. Optical principles. *Arch Ophthalmol* 97: 1714—1719, 1979.
 - 24) **Dean MF, Cooper JA, Stahl P**: Cell contact and direct transfer between cocultured macrophages and fibroblasts. *J Leukocyte Biol* 43: 539—546, 1988.