

豚毛様体上皮細胞における5-, 12-リポキシナーゼの局在

坂本 信一

大阪警察病院眼科

要 約

豚毛様体無色素上皮細胞と色素上皮細胞をプロテアーゼを使わずに分離し、1- ^{14}C アラキドン酸と反応させ、各々のリポキシゲナーゼ活性を測定した。高速液体クロマトグラフィーで測定できた代謝産物は、5-ヒドロキシエイコサテトラエン酸(5-HETE), 12-HETE, 5,12-diHETEであった。無色素上皮細胞の5-リポキシゲナーゼと12-リポキシゲナーゼ活性は色素上皮細胞よりそれぞれ5倍, 2.5倍高かった。5-HETE, 12-HETE, 5,12-diHETE産生は、50 μM ノルジヒドログアイアレチン酸で阻害された。無色素上皮細胞が、房水産生調節や眼内炎症に何らかの役割をしていることが推察された。(日眼会誌 96:309-312, 1992)

キーワード: 毛様体上皮細胞, リポキシゲナーゼ, 5-又は12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸, 5,12-ジヒドロキシエイコサテトラエン酸, ノルジヒドログアイアレチン酸

Distribution of 5-, 12-Lipoxygenases in Porcine Ciliary Epithelial Cells

Shinichi Sakamoto

Eye Clinic, Osaka Police Hospital

Abstract

Nonpigmented epithelial cells (NPE) and pigmented epithelial cells (PE) were separated from porcine ciliary processes without protease treatment. The relative capabilities of NPE and PE to synthesize 5-hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE), 12-HETE, 5,12-diHETE from 1- ^{14}C arachidonic acid were determined by high pressure liquid chromatography. The capability of NPE to synthesize 5-lipoxygenase and 12-lipoxygenase products was, respectively, 5-fold and 2.5-fold higher than that of PE. The formation of 5-HETE, 12-HETE and 5,12-diHETE was inhibited almost completely by 50 μM nordihydroguaiaretic acid. It was suggested that NPE played a role in the regulation of aqueous humor formation and intraocular inflammation. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 96: 309-312, 1992)

Key words: Ciliary epithelial cells, Lipoxygenase, 5- or 12-hydroxyeicosatetraenoic acid, 5, 12-dihydroxyeicosatetraenoic acid, Nordihydroguaiaretic acid

I 緒 言

アラキドン酸の代謝産物としてロイコトリエン(LT)はアレルギー喘息, 即時型アレルギー, 炎症な

どに深い関わりがあることが知られている。リポキシゲナーゼはアラキドン酸に酸素分子を取り込んでペルオキシ酸を生成し, さらにペルオキシ酸は還元, 脱水などの反応によって, 生理活性をもつロイコトリエン

別刷請求先: 553 大阪市福島区福島1-1-50 大阪大学医学部眼科学教室 坂本 信一

(平成3年7月17日受付, 平成3年8月26日改訂受理)

Reprint requests to: Shinichi Sakamoto, M.D. Department of Ophthalmology Osaka University Medical School. 1-1-50 Fukushima, Fukushima-ku, Osaka 553, Japan

(Received July 17, 1991 and accepted in revised form August 26, 1991)

などに合成される. このようにして生合成されたオキシエイコサノイドはさまざまな生物学的活性をもち, LTB_4 は家兎眼において白血球遊走能¹⁾²⁾を, LTC_4 と LTD_4 は猫眼では縮瞳を生じることが知られている²⁾³⁾. 眼では虹彩, 毛様体を含めた前眼部でリポキシゲナーゼ活性が高いことが知られているが^{4)~6)}, その局在等については知られていなかった.

今回, 著者は, 豚毛様体の無色素上皮細胞と色素上皮細胞をプロテアーゼを使わずに分離する方法⁷⁾を用いて, おのおののリポキシゲナーゼ活性を測定したので報告する.

II 実験方法

1. 無色素上皮細胞, 色素上皮細胞の採取

1アッセイに10個の豚眼を用いた. 既報⁷⁾のように豚眼を赤道部で半割し, 前半部を0.02%EDTA液中に3分間インキュベートし, 撮子にて無色素上皮細胞を剥離した. 色素上皮細胞はピペットで吸引し採取した. 無色素上皮細胞はシート状(図1A)で, 色素上皮細胞は単独または塊状(図1B)で得られた. 無色素上

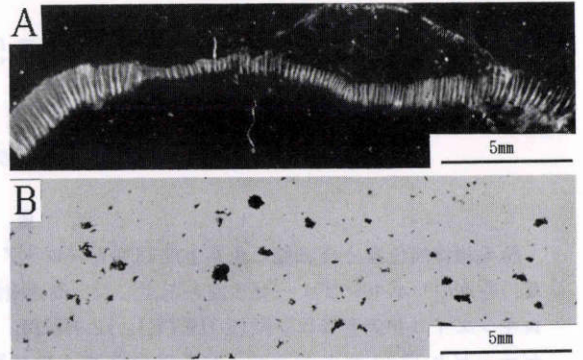


図1 豚毛様体上皮細胞の顕微鏡写真($\times 5.5$). A, 色素上皮細胞から機械的に剥離された無色素上皮細胞. 少量の硝子体を含む. B, ピペットで吸引された色素上皮細胞.

皮細胞の他細胞の混入または色素上皮細胞への他細胞の混入は, 各々2%以下であった.

2. リポキシゲナーゼ活性の測定

図2はアラキドン酸カスケードのうち5-, または12-リポキシゲナーゼ経路を示す. アラキドン酸は, 5-

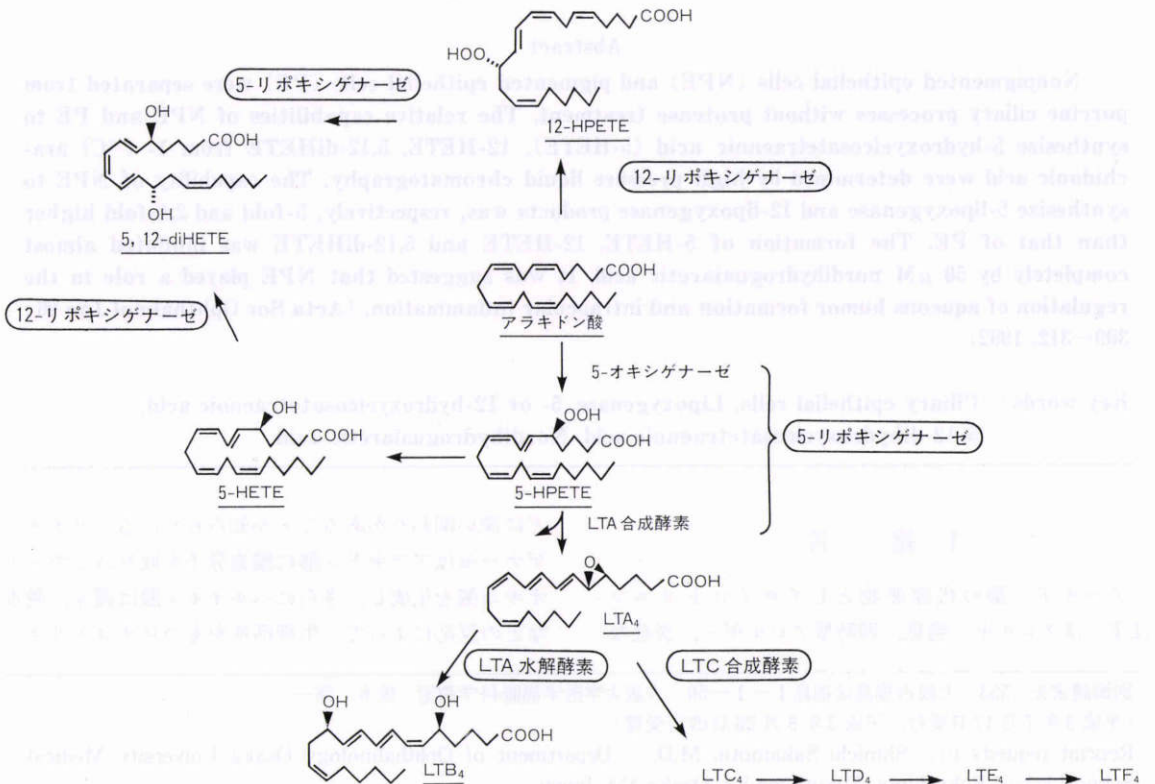


図2 5-および12-リポキシゲナーゼ経路

リポキシゲナーゼにより5-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸(5-HPETE)を経て, さらに安定な5-ヒドロキシエイコサテトラエン酸(5-HETE)やLTA₄を生じる. さらにLTA₄は水解酵素によりLTB₄に代謝される. 12-リポキシゲナーゼではアラキドン酸は12-HETEに代謝される. 又, 5-HPETE, 12-HPETEはそれぞれ12-リポキシゲナーゼ, 5-リポキシゲナーゼにより1部5,12-diHETEを生じる. 5-HETE, 12-HETE, 5,12-diHETEを測定して5-, 及び12-リポキシゲナーゼ活性とすることとした. まず, 得られた各々の細胞をトリス緩衝液でホモジェネートし試料とした. 5-リポキシゲナーゼは活性発現にCaイオンが必要なため2mM CaCl₂を加えた.

この試料に1- [¹⁴C] アラキドン酸 2.0 μl を加え, 37°Cで30分間インキュベートした. 10%酢酸で反応を停止後, 反応産物を酢酸エチルで抽出, 吸引乾燥し60 μlのメタノールを加え, 逆相カラム(ALTEX Ultrasphere ODS column; 5 μ, 4.6 mm × 15 cm) にかへ, 高速液体クロマトグラフ(HPLC: Beckman 110 B solvent delivery system, 163 variable wavelength detector)にて分析した. この時, 試料は2つに分け, 1つは5-HETEと12-HETE用で, 流速1.2 ml/分, 50%アセトニトリルで溶出し, 240 nmで検出した. もう1つは, 5,12-diHETE用で, 流速1.2 ml/分, 26%アセトニトリルで溶出し, 280 nmで検出した. できたHETE化合物をフラクションコレクター(1試験管/24秒)で集め, 各々の試験管の放射能をシンチレーションカウンターで測定した. 生成されるHETEが少ないためにあらかじめ試料には, 内部標準物質として1.2 nmolの5-HETE, 1.5 nmolの12-HETEまたは5 nmolの5,12-diHETEを加えてクロマトグラム上の吸光度のピークを増強し, 位置を同定しやすくした. 生成したHETE量は放射性アラキドン酸の比活性から計算した. 又, ホモジェネートにリポキシゲナーゼの阻害剤である50 μM ノルジヒドロログアイアレチ

ン酸(NDGA)を加えて, HETE産生抑制も測定した.

無色素上皮細胞の試料は少量の硝子体を含むので, 蛋白量当たりでリポキシゲナーゼ活性を表すと色素上皮細胞の試料に比べ過小評価されてしまう. そこで, 比活性は10⁴個細胞当たりで表すこととした. 実際には, 全蛋白量当たりで活性を表し, その後に10⁴個細胞当たりで換算した. 細胞数測定は, 採取した無色素上皮細胞を0.25%トリプシンで処理し, 血球計算器で細胞数を数えた. 蛋白量測定は, Smithら⁸⁾の方法によった.

III 結 果

今回のリポキシゲナーゼ代謝産物で測定できたのは5-リポキシゲナーゼと12-リポキシゲナーゼの代謝産物である5-HETE, 12-HETEと5,12-diHETEであった.

図3に, HPLCのクロマトグラムを示す. 50%アセ

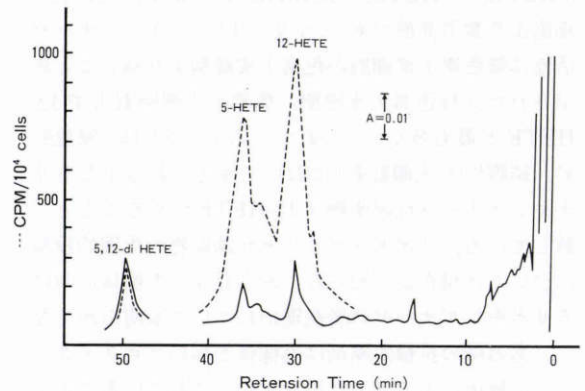


図3 高速液体クロマトグラフィーによる5-HETE, 12-HETE, 5,12-diHETEの分離. 実線は吸光度を, 破線は10⁴個当たりのCPMを示す. 5-HETE, 12-HETEは, 50%アセトニトリルで溶出し, 5,12-diHETEは, 26%アセトニトリルで溶出した. 26%アセトニトリルの溶出曲線の45分以前は示されていない.

表 豚毛様体上皮細胞による5-HETE, 12-HETE, 5,12-diHETEの合成

	5-HETE		12-HETE		5,12-diHETE	
	cpm/10 ⁴ cells	pmol/10 ⁴ cells	cpm/10 ⁴	pmol/10 ⁴	cpm/10 ⁴	pmol/10 ⁴
NPE	809±266	30.1±9.7	1053±392	39.2±14	189±34	7.1±1.7
+NDGA	19	0.7	12	0.4	9	0.4
PE	162±64	6.0±2.4	419±125	15.7±4.4	68±17	2.6±0.6
+NDGA	18	0.6	18	0.6	8	0.3

(pmol/10⁴cells) (n=6)

トニトリル存在下で 12-HETE の保持時間は 30 分、5-HETE は 36 分であった。5,12-diHETE は 26% アセトニトリル存在下で 50 分で溶出した。表に無色素上皮細胞と色素上皮細胞 10^4 個当たりの 5-HETE, 12-HETE, 5,12-diHETE の産生を示す。5-リポキシゲナーゼ、12-リポキシゲナーゼは、無色素上皮細胞で色素上皮細胞よりそれぞれ 5 倍、2.5 倍高値であった。無色素上皮細胞、色素上皮細胞で NDGA により 5-HETE, 12-HETE 産生はほぼ完全に抑制された。ホモジェネートへのインドメタシン添加は HETE 産生に影響を与えなかった。

IV 考 按

前部ぶどう膜で 5-HETE, 12-HETE, 5,12-diHETE が産生されることは報告されている^{4)~6)}。今回、我々は、毛様体無色素、色素上皮細胞に注目し各々のリポキシゲナーゼ活性を測定した。無色素上皮細胞による 5-HETE, 12-HETE, 5,12-diHETE の産生は色素上皮細胞より数倍高値であり、5-及び 12-リポキシゲナーゼ活性は無色素上皮細胞が色素上皮細胞より高いことが示された。無色素上皮細胞、色素上皮細胞双方で 12-HETE が最も多くつくられているが、これは、家兎虹彩、結膜⁴⁾⁵⁾や人眼虹彩⁶⁾において産生される主たるリポキシゲナーゼ代謝産物は 12-HETE であることと一致している。リポキシゲナーゼ代謝産物の生理的役割については現在よく知られておられず、毛様体におけるリポキシゲナーゼの局在理由についても明らかでない。ある種の抗緑内障剤は毛様体からのプロスタグランジン放出による降圧作用をもつとされていることから¹⁰⁾¹¹⁾、無色素上皮細胞におけるエイコサイノドが房水産生の調節に関係していることが考えられる。

又、無色素上皮細胞は 5-リポキシゲナーゼ活性が高く、LTB₄に次ぐ強い白血球遊走能を持つ 5-HETE 合成能をもつこと¹²⁾、リポキシゲナーゼ阻害剤は、水晶体蛋白起因性ぶどう膜炎を軽減することから¹³⁾、眼内炎症において無色素上皮細胞がある種の役割をしていることが考えられる。

本論文の要旨は第 95 回日本眼科学会総会で講演した。

文 献

- 1) **Bhattacharjee P, Eakins KE**: Lipoxigenase Products, Mediation of Inflammatory Responses and Inhibition of Their Formation. The Leukotrienes. New York, Academic Press, Inc, 195—214, 1984.
- 2) **Stjernschantz J, Sherk T, Borgeat P, et al**: Intraocular effects of lipoxigenase pathway products in arachidonic acid metabolism. Acta Ophthalmol 62: 104—111, 1983.
- 3) **Stjernschantz J, Sherk T, Sears M**: Ocular responses to leukotriene C₄ and D₄ in the cat. Prostaglandins 27: 5—15, 1984.
- 4) **Williams R, Bhattacharjee P, Eakins K**: Biosynthesis of lipoxigenase products by ocular tissues. Exp Eye Res 36: 397—402, 1983.
- 5) **Kulkarni P, Srinivasan BD**: Synthesis of slow reacting substance-like activity in rabbit conjunctiva and anterior uvea. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 1079—1085, 1983.
- 6) **Kulkarni P, Rodriguez AV, Srinivasan BD**: Human anterior uvea synthesizes lipoxigenase products from arachidonic acid. Invest Ophthalmol Vis Sci 25: 221—223, 1984.
- 7) **Sakamoto S, Shichi H**: Distribution and induction of alkoxyresorufin O-dealkylases and gamma-glutamyl transpeptidase in porcine ciliary epithelium. J Ocular Pharmacol 6: 211—217, 1990.
- 8) **Smith PK, Krohn RI, Hermanson RI, et al**: Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150: 76—85, 1985.
- 9) **Kulkarni P**: Eicosanoids in ocular inflammation, in Bazan NG (ed): Lipid Mediators in Eye Inflammation, New Trends in Lipids Mediators Reserch, S Karger, Basel, 5: 12—28, 1990.
- 10) **Waltzman MB, Woods WD, Cheek WV**: Effects of prostaglandins and norepinephrine on ocular pressure and pupil size in rabbits following bilateral cervical ganglionectomy. Invest Ophthalmol Vis Sci 18: 52—60, 1979.
- 11) **Bhattacharjee P, Hammond BR**: Effect of indomethacin on the ocular hypertensive action of adrenaline in the rabbit. Exp Eye Res 24: 307—313, 1977.
- 12) **Palmer RMJ, Stepney GA, Eakins KE**: Chemokinetic activity of arachidonic acid lipoxigenase products on leukocytes of different species. Prostaglandins 20: 411—418, 1980.
- 13) **Chang MS, Chiou GCY**: Prevention of lens protein-induced ocular inflammation with cyclooxygenase and lipoxigenase inhibitors. J Ocular Pharmacol 5: 353—360, 1989.