

眼組織における proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) の定量と細胞増殖能の検討

山口 慶子¹⁾, William K. Stell²⁾

¹⁾東北大学医学部眼科学教室, ²⁾カルガリー大学医学部ライオンズ視覚研究センター

要 約

眼組織における細胞分裂, 増殖の程度を核蛋白の一つとして注目される **proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin)** を指標として数値化した。ヒト PCNA の C-terminal の蛋白分画を対象とした **radioimmunoassay (RIA)** を開発した。[Tyr²⁵⁴]-hPCNA (254~261) で白色家兔を免疫し抗血清を得, 二抗体法で assay し, 標準曲線を求めると IC₅₀ が 30~40 f mole/tube, 感度が 0.5~1.0 f mole/tube という, 微量のサンプルでも高感度で測定できる信頼性の高い RIA 系であることが確認された。この系を用いラット眼組織(角膜, 水晶体上皮, 網脈絡膜, 視神経), 皮膚, 骨格筋, 脳, 胸腺, 小腸, 肝臓の組織における PCNA 量を定量し比較検討した。水晶体上皮で他組織の約 15 倍, 皮膚で約 5 倍の高い PCNA 量が検出された。一方, 視神経, 骨格筋ではきわめて低い PCNA 量を示した。角膜は網脈絡膜, 視神経より高値を示した。水晶体上皮での高い細胞増殖能が明らかとなった。(日眼会誌 96: 954-958, 1992)

キーワード: 細胞増殖核抗原, Radioimmunoassay, 眼組織, ラット

Immunochemical Detection of the Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA/cyclin) in Ocular Tissues

Keiko Yamaguchi¹⁾ and William K. Stell²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine

²⁾Lions' Sight Centre, The University of Calgary Faculty of Medicine

Abstract

The authors developed radioimmunoassay (RIA) for proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin), which a protein synthesizes in phase with DNA, as a marker for cell replication. We used it to detect the amounts of PCNA and estimated rates of cell replication in ocular tissues (cornea, lens epithelium, retina-plus-choroid and optic nerve) and in non-ocular tissues (skin, skeletal muscle, brain, thymus, small intestine and liver) in rats. Antisera were raised in rabbits to oligopeptide fragment of human PCNA (hPCNA): the C-terminal fragment [Tyr²⁵⁴]-hPCNA (254~261). For RIA the synthetic peptides were used as standards and radioiodinated [¹²⁵I-Tyr²⁵⁴]-hPCNA (254~261) as radioligands. The IC₅₀ was 30~40 f mole/tube with a sensitivity 0.5~1.0 f mole/tube for this assay. Tissue extracts in 1 M acetic acid were digested with trypsin to release fragment (255~261) from whole PCNA and were assayed by this method. The highest amounts of immunoreactive PCNA were found in lens epithelium and skin, while the lowest amounts were found in optic nerve and muscle. The cornea

別刷請求先: 980 仙台市青葉区星陵町1-1 東北大学医学部眼科学教室 山口 慶子
(平成3年10月31日受付, 平成4年3月16日改訂受理)

Reprint requests to: Keiko Yamaguchi, M.D. Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine, 1-11 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980, Japan

(Received October 31, 1991 and accepted in revised form March 16, 1992)

showed a higher value than retina-plus-choroid or optic nerve. A high cell replication in the lens epithelium was revealed. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96 : 954-958, 1992)

Key words: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin), Radioimmunoassay, Ocular tissue, Rat

I 緒 言

細胞増殖核抗原 [proliferating cell nuclear antigen, (PCNA)]は、以前 cyclin と呼ばれていた物質で、細胞の分裂周期を調節する分子量約 36 kDa の核蛋白であり、正常、異常を問わず増殖する細胞に存在し、細胞分裂の程度を反映する^{1)~3)}。1978年に、全身性エリテマトーデス (SLE) の患者血清中に PCNA に対する抗体が発見されてから、細胞増殖に重要な働きを持つ核蛋白として注目された⁴⁾。PCNA のアミノ酸配列がヒト、ラットで解明されたが⁵⁾⁶⁾、その機能については未だ不明であった。最近、PCNA は DNA 複製のときに働く DNA polymerase- δ の活性化に不可欠な補助蛋白であることが解明され⁷⁾⁸⁾、さらに細胞増殖の信頼できる指標として確認された。我々⁹⁾¹⁰⁾は、組織中の細胞分裂能を定量化することを目的に PCNA に対する radioimmunoassay (RIA) 系の開発を試みてきた。PCNA の定量については flow cytometry による報告がわずかにみられるのみで¹¹⁾、RIA を用いた定量は我々の知る限り未だ報告が無い。本法は微量の PCNA を高感度で検出できるすぐれた方法であると思われる、眼組織の定量に応用した。

II 実験材料および方法

1. 実験材料

実験動物は2か月齢で、体重約 150 g の雄あるいは雌 Wistar ラットを用いた。ラットは致死量のエーテル吸入麻酔後、直ちに眼球を摘出した。眼球は実体顕微鏡下で角膜、水晶体、網脈絡膜にそれぞれ分離し、視神経は眼球付着部から視交叉までを採取した。また、水晶体は、後嚢を切開し核を除去した。標本を無染色で光学顕微鏡で観察し、水晶体上皮細胞が前嚢および皮質側に付着していることを確認後、サンプルとして使用した。さらに、皮膚 (耳介)、骨格筋 (大腿直筋)、脳 (大脳灰白質)、胸腺、小腸、肝臓の一部を採取した。眼組織、視神経は5匹 10眼を1検体とし、その他の組織は1匹1検体とし、雌雄それぞれ3検体ずつ合計6検体準備した。採取したすべての組織は速やかに電子

天秤によりその重量を測定し、組織 0.1 g に対し 1 ml の 1 N 酢酸を加え、氷冷下でホモジナイズし可溶性蛋白を溶出した。各溶液を 3,000 回転で 20 分間遠心し、得られた上清を PCNA を含む粗抽出液とした。上清を同量ずつ 2 つの Eppendorf tube に分注し Speed Vac で遠心、乾燥した。乾燥した各組織を 0.02 M の トリスカルシウム緩衝液で再溶解し、100°C で 15 分間煮沸し、組織中の含有酵素を不活性化させた。冷却後、各粗抽出液は、一方をトリプシン (TPCK-treated trypsin, Millipore ; Freehold, NJ) で処理 (20 μ g/ml となるように トリスカルシウム緩衝液に溶解し、37°C で 24 時間インキュベート) した組織サンプル、もう一方を未処理 (トリスカルシウム緩衝液のみを加え 37°C で 24 時間インキュベート) のコントロールとした。両者を 100°C の水槽で 15 分間煮沸し、トリプシンを不活性化した後、使用直前まで -80°C で凍結保存した。

2. 蛋白分画

Assay はヒト PCNA (hPCNA) の C-terminal でトリプシンとカルボキシペプチダーゼ B の処理で whole protein から分解され得る部分を選び、同配列の蛋白分画 [Tyr²⁵⁴]-hPCNA (254~261) : Tyr-Ile-Glu-Asp-Glu-Glu-Gly-Ser を合成し (Bachem, CA)、抗血清の免疫、標準曲線の assay に使用した。

3. 抗血清の作製

上記の PCNA 各分画で、白色家兎 3 匹を免疫した。各合成蛋白はヘモシアニンと conjugate させ、Freund の完全アジュバント (Freund's complete adjuvant ; ICN Biomedicals, CA) を加えたものを背部皮下、大腿部筋肉中に数か所注射した。3 週間毎、Freund の不完全アジュバント (Freund's incomplete adjuvant ; ICN Biomedicals, CA) を加えたもので数回 boost し、3 か月後に耳静脈から採血した。それぞれの血清につき抗体価を測定し、最も高値のものを抗 PCNA (254~261) 血清として用いた。

4. 蛋白分画の標識

各合成蛋白 [Tyr²⁵⁴]-PCNA (254~261) は高速液体クロマトグラフィ [High Performance Liquid

Chromatography(HPLC)]で分離したピークを ^{125}I で標識し、再度 HPLC で精製したものを tracer として用いた。Assay には常に標識後 4 週間以内の tracer を使用した。

5. Assay 法

Assay は二抗体法を用いて行った。Assay buffer (0.02 M phosphate, pH 7.4, 0.01% BSA, 0.9% NaCl, 0.02% NaN_3) で希釈した, $[\text{Tyr}^{254}]$ -PCNA (254~261), 組織サンプルをそれぞれ, 抗血清, tracer で全量 0.3 ml とし, 4°C で 24 時間インキュベートした。3.5% ポリエチレングリコールを含む assay buffer (pH 7.4) で溶解した IgG-Sorb® (heat-killed, formalin-treated *Staphylococcus aureus*; The Enzyme Center Inc, Boston, MA) を第 2 抗体として 1 ml 添加し, 4°C で 1 時間インキュベートした。遠心し上清を吸引, 捨て, 沈澱の放射線量をガンマカウンターで測定した。測定値は B0/B% で表した。各組織サンプルは B0/B% が 80~20% の範囲になるように希釈し, 標準曲線の直線近似部分で PCNA 量 (f mole/mg) を算出した。アッセイはすべて同日に同一条件下で, triplicate で行った。Tissue sample は, トリプシン処理したもの, 未処理 (コントロール) のもの, それぞれ抗血清, tracer で全量 0.3 ml とし, 同様の方法で沈澱の放射線量をガンマカウンターで測定した。各組織の PCNA 含有量を平均値±標準誤差で示し, 統計学的処理を行った。

III 結 果

標準曲線を求めると, IC_{50} が 30~40 f mole/tube, 感度が 0.5~1.0 f mole/tube という微量のサンプルでも高感度で測定できる信頼性の高い RIA 系であることが確認された。この RIA 系を用いて得られた各組織の PCNA 量を雌雄別に平均値±標準誤差で表した (表 1)。すべての組織で雌雄間に有意差は認められなかった。雌雄間で差がなかったため, まとめて個体数 6 とし, 平均値 (f mole/tube) ±標準誤差で表した (図 1)。水晶体上皮で他組織の約 15 倍, 皮膚で約 5 倍の高い PCNA 量が検出された。一方, 視神経, 骨格筋ではきわめて低い PCNA 量を示した。統計処理は Kruskal-Wallis's test で C-terminal に対する値 ($H=$

表 1 C-terminal に対するラジオイムノアッセイで得られた各組織の PCNA 量

	雄	雌
水晶体上皮	606.9±44.1	595.5±44.8
皮膚	173.6±19.8	198.8±27.7
胸腺	85.1±3.3	84.5±6.7
小腸	57.9±5.6	64.2±3.7
角膜	43.6±3.8	38.7±6.0
網膜+脈絡膜	34.2±1.3	33.0±2.6
脳	25.8±3.0	33.3±2.5
肝臓	24.8±2.8	30.7±2.8
視神経	29.8±1.0	24.9±2.6
骨格筋	4.3±0.2	4.1±0.2

平均値 (f mole/tube) ±標準誤差, n=3

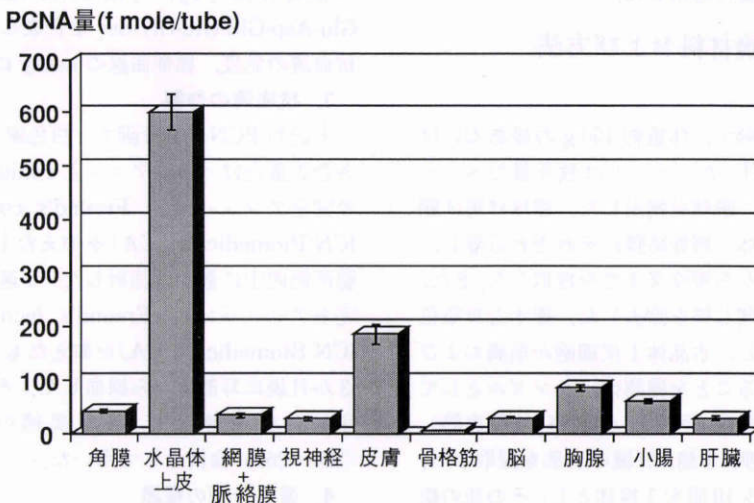


図 1 各組織の PCNA 量。
平均値 (f mole/tube) ±標準誤差, n=6.

55.840, Df=9, $p < 0.001$)を得たので, Mann-Whitney U-test を行った. PCNA の C-terminal に対するアッセイでは水晶体上皮+皮質で他のすべての組織より統計学的に有意な高値が認められた ($p < 0.05$). 次に高値を示したのは角膜で, 水晶体上皮+皮質を除く他のすべての組織より統計学的に有意な高値が認められた ($p < 0.05$). 角膜は網脈絡膜, 視神経より高値を示した. 骨格筋は最も低値を示した.

IV 考 按

今回開発した PCNA に対する RIA 系⁹⁾¹⁰⁾は微量でも正確に定量でき, 組織における細胞増殖の程度, 細胞の renewal の速度を信頼しうる数値として比較できる点で有用と思われた. PCNA は DNA 合成開始直前の late G 1 期に急速に核内に認められるようになり, DNA 合成が開始された S 期に最大に増加することが報告されている¹¹⁾²⁾. さらに PCNA は DNA 複製の過程で働く DNA polymerase- δ の補蛋白であることが報告されており⁷⁾⁸⁾, DNA 複製に不可欠な物質であることがわかっていることから, PCNA 量が高いことは, 細胞周期が速いものと考えた.

細胞増殖能を調べる方法としては, 古くから³H-thymidine を投与して実験動物を屠殺し, 組織内摂取量をオートラジオグラフィで測定する方法が用いられてきた. しかし, ³H-thymidine が細胞内に取り込まれる際に環境, 条件などの外因性の影響を受けやすいこと, また, 人体組織の検索には使用できない等の欠点から, PCNA の方が細胞増殖能を表わす内因性マーカーとして優れていると思われた.

水晶体上皮細胞は一層からなり, 終生増殖を続け, 老化した上皮細胞はしだいに空胞化し水晶体核の中心に向かって圧縮, 蓄積されることはよく知られている¹²⁾¹³⁾. 今回の実験で, 水晶体上皮+皮質で高い PCNA 量が検出され, 水晶体上皮の細胞周期が速いことが明らかとなった. このことから, 水晶体全体の水分や蛋白, 電解質の調節, 代謝に深くかかわる水晶体上皮細胞が, かなり速い細胞周期でその透明性の保持に関係しているものと考えられた. また, 角膜でも網脈絡膜, 視神経より高い PCNA 量が検出され, 細胞周期が網脈絡膜, 視神経より速いことが確認された. 今回の実験では角膜実質を除いていないが, 角膜の再生が主に角膜上皮細胞の basal cell で行われていることを考えると, 角膜上皮細胞はさらに高い PCNA を含むものと推察された. また, 皮膚の各部位における

mitotic index (細胞数 1,000 に対する分裂細胞数) の報告¹⁴⁾により, 採取部位による細胞増殖能にほぼ差はないものと判断し, 今回の実験では, 採取が容易で, ホモジナイズし易い耳介皮膚を用いた. 上皮, 真皮の分離が困難であったため分離しなかったが, 皮膚上皮ではより高い PCNA を含む可能性があると思われた.

PCNA が DNA 複製の調節や, 複製過程での修復機能に密接に関係していると推察されるが⁷⁾⁸⁾, 詳細な生物学的機能, 特性についてはまだ不明のままである. しかし, PCNA は細胞増殖能を表わす優れた指標として, 将来, 老化や癌化の分野の研究や, 生検した腫瘍の補助的診断などに応用されうると考えられる.

御校閲をいただきました玉井 信教授に深謝致します.

文 献

- 1) Celis JE, Bravo R, Larsen PM, et al: Cyclin/a nuclear protein whose level correlates directly with the proliferative state of normal as well as transformed cells. *Leukemia Res* 8: 143-157, 1984.
- 2) Prelich G, Kostura M, Marshak DR, et al: The cell-cycle regulated proliferating cell nuclear antigen is required for SV40 DNA replication in vitro. *Nature* 326: 471-475, 1987.
- 3) Takasaki Y, Deng J-S, Tan EM: A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. Its distribution in synchronized cells. *J Exp Med* 154: 1899-1909, 1981.
- 4) Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121: 2228-2234, 1978.
- 5) Almendral JM, Huebsch D, Blundell PA, et al: Cloning and sequence of the human nuclear protein cyclin: Homology with DNA binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 1575-1579, 1987.
- 6) Matsumoto K, Moriuchi T, Koji T, et al: Molecular cloning of cDNA coding for rat proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. *Eur Mol Biol Organ J* 6: 637-642, 1987.
- 7) Bravo R, Frank R, Blundell PA, et al: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature* 326: 515-517, 1987.
- 8) Prelich G, Tan CK, Kostura M, et al: Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary protein. *Nature* 326: 517-520, 1987.
- 9) Yamaguchi K, Magnus TH, Ogata K, et al:

- Assessment of growth in ocular tissues by RIA for proliferating cell nuclear antigen. Proc Canada Fed Biol Soc 23 (Suppl): 152, 1989.
- 10) **Stell WK, Yamaguchi K, Karkhanis A, et al:** Quantifying cell proliferation in rat ocular tissues by radioimmunoassay for proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Invest Ophthalmol Vis Sci 31 (Suppl): 204, 1990.
 - 11) **Kurki P, Ogata K, Tan EM:** Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. J Immunol Methods 109: 49—59, 1988.
 - 12) **Hogan MJ, Alvarado JA, Weddel JE:** Lens, In Histology of the Human eye. Philadelphia, WB Saunders Co, Chapter 12, 638—677, 1971.
 - 13) **McAvoy JW:** Cell division, cell elongation and distribution of α -, β - and γ -crystallins in the rat lens. J Embryol Exp Morphol 44: 149—165, 1978.
 - 14) **Pinkus H:** Biology of Epidermal cells, In Physiology and Biology of the Skin, Chicago, University of Chicago Press, 584—600, 1954.