

ヒト水晶体上皮細胞の増殖能に対する上皮成長因子の効果

馬嶋 清如, 高坂 昌志

藤田保健衛生大学眼科学教室

要 約

ヒト白内障水晶体の上皮細胞を材料として、上皮成長因子 (EGF) リセプターの存在を免疫組織化学的手法により検索した。さらに遺伝子組み替え型ヒト EGF の、ヒト正常水晶体また白内障水晶体の上皮細胞に対する増殖促進効果を、細胞増殖能に応用可能な迅速比色定量法、MTT アッセイ法 (MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) により調査した。この MTT アッセイ法は、培養細胞に取り込まれた MTT の量を比色値で表し、比色値が高いほど生細胞数も多く、増殖の程度も高いと判定するものである。その結果、ヒト水晶体の上皮細胞は EGF リセプターを発現しており、正常水晶体、白内障水晶体の上皮細胞ともに、EGF を 1 ng/ml の濃度で添加した実験群では、無添加の実験群と比較して MTT の取り込みが高進しており、統計学的に有意に高い比色値を示した。すなわち、EGF はヒト角膜上皮細胞と同様、水晶体上皮細胞に対しても増殖促進効果を有していた。(日眼会誌 97: 1302-1306, 1993)

キーワード: ヒト水晶体上皮細胞, 上皮成長因子, リセプター, 免疫組織化学, MTT アッセイ

The Effect of Epidermal Growth Factor on the Growth Potential of Epithelial Cells from Human Lens

Kiyoyuki Majima and Masashi Kousaka

Department of Ophthalmology, Fujita Health University, School of Medicine

Abstract

The growth promoting effect of epidermal growth factor (EGF) was studied in cultures of epithelial cells from human normal and cataractous lenses. The growth potential of lens epithelial cells was measured by MTT assay. The concentration of EGF in culture medium were classified into 7 groups (0 ng/ml~10³ ng/ml). When the concentration of EGF was 1 ng/ml, EGF induced the highest increase of growth potential epithelial cells compared with an EGF-free group. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 1302-1306, 1993)

Key words: Human lens epithelial cells, Epidermal growth factor, Cell culture, Growth potential, MTT assay

I 緒 言

水晶体上皮細胞は、カプセルの合成、水晶体内への

物質輸送、線維細胞の供給という機能を持ち、水晶体内で最も高い生理活性を有している。この水晶体上皮の生理活性が、その増殖活性に反映され得るという観

別刷請求先: 470-11 豊明市杵掛町田楽ヶ窪 1-98 藤田保健衛生大学眼科学教室 馬嶋 清如

(平成 5 年 2 月 26 日受付, 平成 5 年 6 月 24 日改訂受理)

Reprint requests to: Kiyoyuki Majima, M.D. Department of Ophthalmology, Fujita Health University, School of Medicine. 1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake 470-11, Japan

(Received February 26, 1993 and accepted in revised form June 24, 1993)

点から、これまで、① 加齢に伴う水晶体上皮細胞の増殖活性の低減³⁾、② 正常水晶体と白内障水晶体の上皮細胞増殖活性の比較：白内障水晶体の増殖活性低減²⁾について報告してきた。この上皮細胞の増殖活性は、fibroblast growth factor, またインスリンなどのホルモンの影響を受け促進されることが、ウサギ、ラットなどの実験動物を使用し報告されている³⁾⁴⁾。一方、実験動物、またヒトの角膜上皮細胞、内皮細胞に対し、増殖促進作用を有する上皮成長因子、epidermal growth factor (EGF)の水晶体上皮細胞に対する影響についてはウン、ウサギ水晶体上皮細胞を材料とし、若干の報告がなされているが、一定の見解は得られておらず⁵⁾⁶⁾、特にヒト水晶体上皮細胞を材料とし、その効果を調査した報告はまだない。しかし、角膜上皮細胞と水晶体上皮細胞はともに表層外胚葉由来であり、EGFが角膜上皮細胞だけでなく、水晶体上皮細胞に対しても増殖作用を示すことは十分に考えられる。そこで今回、EGFリセプターの存在、またEGFの水晶体上皮細胞に対する増殖促進作用をヒト正常水晶体、白内障水晶体の上皮細胞を材料として調査し、その増殖促進効果を検討した。

II 実験方法

1. EGFリセプターの検索

EGFは、標的細胞の細胞膜に存在する分子量160,000~180,000の糖タンパクである特異的EGFリセプターと結合することにより、その生物作用を発現する。つまりEGFが作用するためには、標的細胞でのEGFリセプターの存在が必要であり、ヒト水晶体上皮細胞がこのリセプターを有しているか否かがまず問題となる。そこで、52~85歳の白内障患者12例12眼の白内障手術時、continuous curvilinear capsulorhexis (CCC)の際に、水晶体の中央部から得られた上皮細胞の付着した前囊片を0.5%のglutaraldehydeにて4℃で15分間固定後、Ca²⁺、Mg²⁺-free phosphate buffered saline (PBS)を使用し洗浄後、0.1% bovine serum albuminを用い30分間ブロッキング、一次抗体として、抗EGFリセプターモノクローナル抗体 (TRI社: CATALOG # 1096)を使用し4℃で2時間反応させた。次に、ビオンチン化二次抗体を室温で1時間反応させた後、3-amino-9-ethyl-carbazole (ACE)染色を施行し、ヒト水晶体上皮細胞のEGFリセプターの存在を免疫組織学的に調査した。また対照実験として、55~88歳の白内障患者7例7眼の白内障手術

時、同様の方法にて水晶体の中央部から得られた上皮細胞の付着した前囊片を同様に固定、洗浄後、一次抗体の代わりにマウス正常血清を使用しネガティブコントロールとした。

2. EGFの増殖促進効果

1) 水晶体上皮細胞の培養

正常水晶体の実験群では、生後16か月の水晶体1例1眼を対象とし、網膜芽細胞腫の診断のもとに摘出された眼球の病理学的検索を施行する際、水晶体から上皮細胞の付着した前囊片を切除し、この前囊片をDispase II (2,000 PU/12% ウシ胎児血清添加 Eagle's MEM)を使用し37℃、60分間処理後、上皮細胞をシート状に剝離した。その後、PBSに溶解した1,000のトリプシンを使用し、37℃の条件下で30分間処理後、細胞を解離、3×10³個の細胞を0.5% ウシ胎児血清添加 Eagle's MEM 培地を用い、ウシ水晶体前囊由来のcollagen type IVでコーティングした96穴シャーレへ静置培養した。

白内障水晶体の実験群では、40~85歳の白内障水晶体10例10眼を対象として、白内障手術時の前囊切開 (CCC)の際に得られた上皮細胞の付着した前囊片を正常水晶体の実験群と同様の方法を使用し、細胞を剝離、処理後、5×10³個の細胞を1% ウシ胎児血清添加 Eagle's MEM 培地を使用し、ウシ水晶体前囊由来のcollagen type IVでコーティングした96穴シャーレへ静置培養した。

正常水晶体、白内障水晶体の実験群ともに、コスモバイオ社製、遺伝子組み替え型ヒトEGF (LOT NUMBER: 904472)を添加した群 (EGF濃度により、10⁻²、10⁻¹、1、10、10²、10³ng/mlの6群に分類)と、EGF無添加群の計7群に分類し、正常水晶体の実験群では白内障水晶体の実験群から、大きく上皮細胞の付着した前囊片を切除できたため採取された細胞数が多く、各群20穴ずつ合計140穴へ、また白内障水晶体の実験群では各群5穴ずつ合計35穴へ、前述した方法で培養した。なお、正常水晶体の実験群では、入手可能であった水晶体が1例1眼であったため、調査は1回しか施行できなかった。また、白内障水晶体の実験群では、1回の調査で各群5穴ずつ合計35穴と症例数が少ないため、40~88歳の白内障患者の水晶体52例52眼を対象として、1回の調査で8例8眼から10例10眼の水晶体中央部から得られた上皮細胞を使用し、1回につき各群5穴、合計35穴、同方法を用い、4回繰り返し施行した。

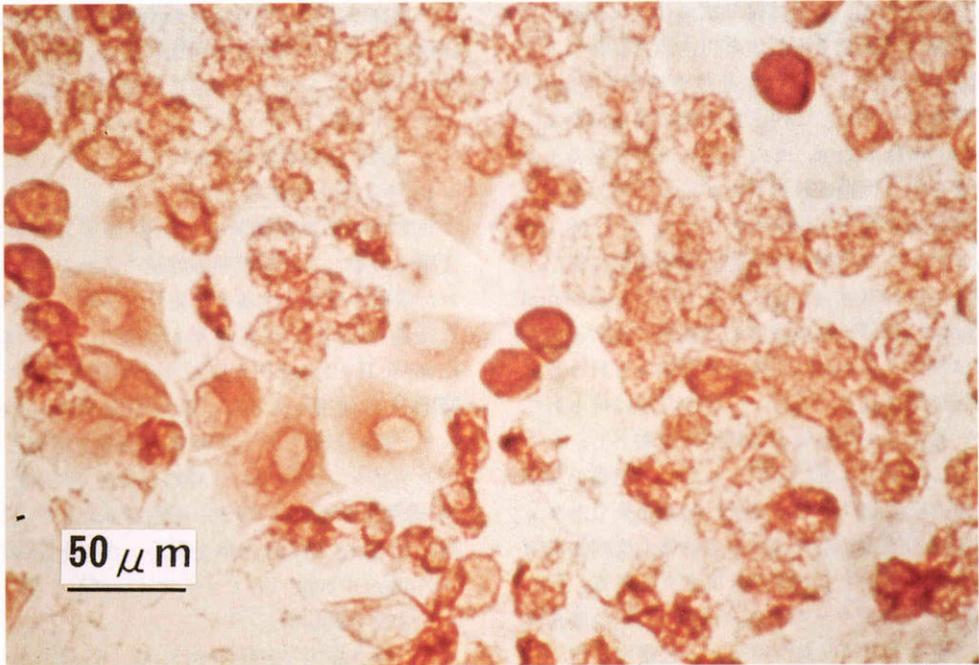


図1A 上皮細胞が赤色に染色され、この部位に上皮成長因子リセプターの存在が確認された。

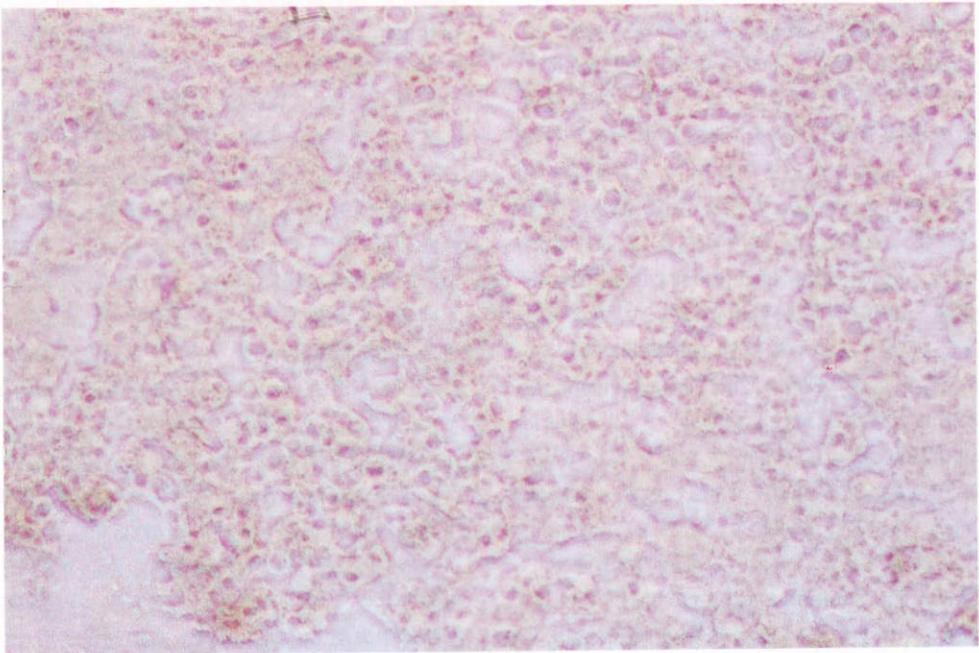


図1B 上皮細胞は染色されなかった。

2) 水晶体上皮細胞の増殖能の判定

培養3日目に、[3-(5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] (MTT)試薬、10 μ lを各培地中へ添加し、6時間後に0.04 Nの塩酸-イソプロパノール液を150 μ l加え、Handysonicにて攪拌後、Micro ELISA Readerを用いて、波長620 nmで比色定量した。このMTTアッセイ法は⁷⁾、生細胞のミトコンドリア内膜中に存在する呼吸系に関する酵素、Cytochrome b/UbiquinoneとCytochrome cにMTTが反応し、MTTが開裂、MTT formazanが生成され、このformazanの量を比色値として表したものである。Formazanはイソプロパノールにより分解され呈色するので、一定波長下(620 nm)で比色定量することにより、比色値(OD)が決定される。そしてODが高いと生細胞数も多いし、増殖の程度も高いと判定する。

III 結 果

1. EGF リセプターの検索

12例12眼の白内障水晶体の上皮細胞が赤色に染色され(図1A)、またネガティブコントロールの7例7眼では染色されなかったことから(図1B)、上皮細胞がEGFリセプターを発現していることが確認され、また今回、上皮細胞をglutaraldehydeを使用し固定

していることから、細胞膜に存在しているEGFリセプターに反応したものと考えられた。

2. EGFの増殖促進効果

正常水晶体の実験群において、各群20穴、計140穴の呈色の度合、すなわち比色値平均値±標準偏差で表すと、表1のように、EGFを1 ng/mlの濃度で添加した群では、EGF無添加の群と比較して有意に高い比色値を示した(有意水準:0.5%)。

次に白内障水晶体の実験群においては、各群5穴、計35穴の調査を合計5回施行したが、この各群の5回比色値を平均値±標準偏差で表すと、表2のように、EGFを1 ng/mlの濃度を添加した群では、EGF無添加の群と比較して有意に高い比色値を示した(有意水準:0.5%)。

IV 考 按

EGFは増殖因子の一つとして古くより知られ、その生物作用としては、特異的EGFリセプターと結合した後、EGFリセプター結合体としてエンドサイトーシスにより細胞内部へ取り込まれ、EGFの生物作用が発揮される⁸⁾。眼科領域では、涙腺組織、涙液、および房水中にこのEGFの存在が確認されている⁹⁾¹⁰⁾、EGFの発見後、角膜上皮細胞、実質細胞、内皮細胞に対する増殖促進効果が報告され、すでに角膜疾患への臨床応用も行われている。しかし、EGFの水晶体上皮細胞の増殖能に与える影響については、実験動物を使用し報告されてはいるものの、ヒト水晶体を材料とした報告はまだなく、ヒトでも実験動物を使用した場合と同様な効果が得られるのか否かが問題となる。そこで今回、ヒト正常水晶体と白内障水晶体の上皮細胞を材料として、EGFリセプターの存在を免疫組織学的に検索し、遺伝子組み替え型ヒトEGFの増殖促進効果について培養法を実施し調査した。その結果、ヒト水晶体の上皮細胞はEGFリセプターを有しており、1 ng/mlのEGFが正常水晶体の上皮細胞、白内障水晶体の上皮細胞に対して、最も強い増殖促進作用を示した。このようにEGFはヒト水晶体の上皮細胞に対して増殖促進という生理的作用を発現するが、実際に生体内、つまり水晶体を栄養する房水中に生理的意味をもつ濃度で存在しているのだろうか。この問題について、Parelmanら¹⁰⁾は0.62~1.4 ng/mlとEGFを、また並木ら¹¹⁾は1 ng/ml程度のEGFをヒト房水中に証明している。すなわち、これらの基礎的研究と今回の実験結果から、ヒト房水中のEGF濃度は、水晶体上皮細胞の

表1 正常水晶体における培養上皮細胞の呼吸系酵素量

EGF濃度(ng/ml)	比色値(平均値±標準偏差)
0	0.042±0.002
10 ⁻²	0.042±0.002
10 ⁻¹	0.051±0.002
1	0.056±0.002
10	0.051±0.002
10 ²	0.053±0.002
10 ³	0.051±0.002

表2 白内障水晶体における培養上皮細胞の呼吸系酵素量

EGF濃度(ng/ml)	比色値(平均値±標準偏差)
0	0.050±0.004
10 ⁻²	0.051±0.004
10 ⁻¹	0.052±0.003
1	0.065±0.004
10	0.056±0.004
10 ²	0.054±0.005
10 ³	0.048±0.004

増殖を促進させる濃度であることが明らかになった。また EGF は、細胞増殖の促進の他に、分化の促進、解糖の促進、タンパク合成の促進、 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプ活性化などの生物効果を示すが¹²⁾、ヒト水晶体の上皮細胞が EGF リセプターを有することから、細胞増殖の促進と同様に、これらの生物作用も発揮されていることが十分考えられる。

これまでラット水晶体を材料として、ホルモン、また細胞成長因子の水晶体上皮細胞に対する生物作用が調査されており、インスリン、酸性、塩基性の線維芽細胞成長因子 (aFGF, bFGF) が増殖促進、分化促進の作用を有していると報告されており¹³⁾、またヒトの水晶体を材料とした TGF- β 、インターロイキン I の上皮細胞に対する増殖促進効果も若干報告されている¹⁴⁾。今回、EGF のヒト水晶体上皮細胞に対する増殖促進効果を報告し、その生物学的作用について考察してきたが、カプセルの合成、水晶体内への物質輸送、増殖部位における線維細胞の供給という上皮細胞の水晶体内での役割を考えると、EGF が水晶体の生物学的特性維持、すなわち水晶体の透明性維持に大きく関与していることが示唆され、EGF をはじめ、各細胞成長因子と上皮細胞との関係を詳細に調査することが白内障の原因の検索、また白内障の予防、阻止への解決策の一つにもなるのではないかと考えた。また近年、残存水晶体上皮細胞に起因する白内障手術後の合併症がいくつか報告されているが、白内障手術という侵襲を受けた場合、前房、後房、および硝子体中の細胞成長因子の濃度が変化する可能性が十分あり、こうした観点から、白内障手術後の後囊上、また後房レンズ上での上皮細胞の挙動にも、EGF をはじめとする細胞成長因子の生物学的作用が大きく関与しているのではないかと考えた。

稿を終えるにあたり、ご指導いただいた藤田保健衛生大学総合医科学研究所、応用細胞学教室丸野内様教授に感謝いたします。

文 献

- 1) 馬嶋清如：ヒト白内障水晶体の細胞生物学的検討：加齢に伴う水晶体上皮細胞の増殖能低減。あたらしい眼科 6: 1229-1234, 1989.

- 2) 馬嶋清如, 高坂昌志：ヒト水晶体の上皮細胞増殖能の検討, 正常水晶体と白内障水晶体との比較. 第45回日本臨床眼科学会, 広島, 10月, 1991.
- 3) **Hollenberg M**: Receptors for insulin and epidermal growth factor: Relation to synthesis of DNA in cultured rabbit lens epithelium. Arch Biochem Biophys 171: 371-377, 1975.
- 4) **Mcavoy JW, Chamberlain CG**: Fibroblast growth factor (FGF) induces different responses in lens epithelial cells depending on its concentration. Development 107: 221-228, 1989.
- 5) **Gospodarowicz D, Mescher AL, Brown KD, Birdwell CR**: The role of fibroblast growth factor and epidermal growth factor in the proliferative response of the corneal and lens epithelium. Exp Eye Res 25: 631-649, 1977.
- 6) **Reddan JR**: Control of cell division in the ocular lens, retina, and vitreous humor. In: Mcdevitt, DS (Ed): Cell Biology of the Eye. Academic Press, New York, 300, 1982.
- 7) 菅原 勇, 石坂重昭, 辻井 正: MTT アッセイ—細胞増殖能および細胞障害に応用可能な迅速比色定量法. 医学のあゆみ 128: 733-735, 1984.
- 8) 日本組織培養学会: 細胞成長因子. 朝倉書店, 東京, 26-27, 1990.
- 9) **Van Setten GB, Viinikka L, Tervo T, Pesonen A**: Epidermal growth factor is a component, of normal human tear fluid. Grafe's Arch Clin Exp Ophthalmol 227: 184-187, 1989.
- 10) **Parelman JJ, Nicolson M, Pepose JS**: Epidermal growth factor in human aqueous humor. Am J Ophthalmol 109: 603-604, 1990.
- 11) 並木真理, 田上勇作, 山本 節, 山中昭夫, 伊藤美樹, 嘉納雅文: ヒト房水中ヒト上皮細胞成長因子 (hEGF), 塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) の存在. 日眼会誌 96: 652-656, 1992.
- 12) 日本組織培養学会: 細胞成長因子. 朝倉書店, 東京, 20-23, 1990.
- 13) **Chamberlain CG, McAvoy JK, Richardson NA**: The effects of insulin and basic fibroblast growth factor on fiber differentiation in rat lens epithelial explant. Growth Factors 4: 183-188, 1991.
- 14) 西 佳代, 西 興史: ヒト水晶体上皮細胞の組織培養. その1. あたらしい眼科 7: 1213-1223, 1990.