老化網膜に対する幼若網膜色素上皮移植の効果

山口 **慶子**¹⁾²⁾, 山口 克宏¹⁾²⁾, **Vinod P. Gaur**²⁾, **James E. Turner**²⁾
¹⁾東北大学医学部眼科学教室, ²⁾ウェイクフォーレスト大学解剖学教室

要約

老化実験モデルである Fischer-344 ラットの 3 か月齢の網膜下腔に生後 1 週齢の Long Evans ラットの正常幼若な網膜色素上皮(RPE)細胞(1×10^8 個)を移植した。移植群,擬手術群,対照群の 3 群のラットを同一環境下で飼育し,術後 3 か月,6 か月で網膜の老化の程度を比較し,移植の効果を観察した。老化の判定は外顆粒層,内顆粒層,外網状層,内網状層の厚さの実測値(平均値士標準誤差)および外顆粒層,内顆粒層の細胞数カウント(平均値士標準誤差)で行った。RPE 細胞を移植した網膜では,擬手術群,対照群に比べて網膜各層の厚さ,細胞数が有意に保たれていた ($\mathbf{p} < 0.001$)。RPE 細胞の移植により,9 か月までにおこる老化による細胞数の減少は,外顆粒層では約 40%から約 17%に,内顆粒層では約 33%から約 8 %に抑えられた。このことから正常幼若な RPE 細胞の移植が Fischer ラット網膜における視細胞減少を遅らせる可能性があることが初めて示された。(日眼会誌 97:36—42, 1993)

ギーワード:網膜移植,網膜色素上皮細胞,Fischer-344 ラット,老化

Effect of Neonatal Retinal Pigment Cell Transplantation on Aged Retinas

Keiko Yamaguchi¹⁾²⁾, Katsuhiro Yamaguchi¹⁾²⁾, Vinod P. Gaur²⁾ and James E. Turner²⁾

- 1) Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine
- 2) Department of Neurobiology and Anatomy, Wake Forest University

Abstract

The authors performed neonatal healthy retinal pigment epithelium (RPE) transplantation into older eyes to test whether aging changes could be deterred or arrested in an appropriate model. Fischer-344 rats, a model for studying age-related photoreceptor cell death, were used as the recipient and 6-to 8-day-old Long Evans rats were used as the donor of neonatal RPE. Isolated RPE cells were transplanted into the subretinal space in 24, 3-month-old Fischer-344 rats. The presence of healthy neonatal RPE cells significantly maintained the thickness of each layer as compared to the findings in nongrafted and sham operated controls at 3 and 6 months after the transplantation. The transplanted RPE cells saved the reduction of cell population caused by aging from 40% to 17% in the outer nuclear layer and from 33% to 8% in the inner nuclear layer at 6 months after transplantation. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 36—42, 1993)

Key words: Retinal transplantation, Retinal pigment epithelial cell, Fischer-344 rat, Aging

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4年3月31日受付,平成4年7月2日改訂受理)

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

(Received March 31, 1992 and accepted in revised form July 2, 1992)

I 緒 言

老化は、発生、成熱に引き続いて起こる衰退の過程で避けることのできない生理現象である。老化は概念として、機能を有する細胞数の減少、残存する細胞の機能低下、予備能力の減退ととらえられている。網膜が老化すると、視細胞が減少したり、網膜色素上皮(RPE)細胞の機能が低下することが知られている¹¹²¹。臨床的には、老人性黄斑変性²¹や、網膜周辺部の嚢胞様変性、格子状変性などの老人性変化が認められる²¹。今回、我々は分離した健康幼若な RPE を老化網膜に移植して、網膜の老化に対する影響を動物実験で検討した。

II 材料および方法

1. 実験動物

Recipient として老化モデルである Fischer-344 ラット, 雄を用いた. Donor には, 生後6日から8日の Long Evans ラットを用いた. 動物に関する取り扱いはすべて NIH のガイドラインに従って行った.

2. 実験方法

1) Fischer ラットの網膜老化の検討

移植の実験に先立ち、Fischer ラットの網膜を月齢 ごとに比較した。5 foot candles の螢光灯下で, 12 時 間明~12時間暗の光周期で飼育した雄 Fischer ラッ トの3, 6, 12, 18, 24, 27か月のラット各6匹に同 一条件下で致死量の pentobarbital sodium を投与し、 ただちに眼球を摘出した。同一部位で老化の程度を比 較するため、眼球摘出前に上直筋にマークを付け、 Bouin 液で固定しパラフィンに包埋した。角膜頂点, マーク部位, 視神経が確実に通るように切片を作製し, 光学顕微鏡で観察した。網膜の部位によって老化の程 度に差があるかどうかを調べるために網膜上部半周の 視神経から鋸状縁までを後極部,中間周辺部,周辺部 に3等分し、各月齢ごとに網膜の形態を調べた、網膜 の老化変化は各月齢ラットの網膜外顆粒層の厚さを測 定し比較した。測定には Zeiss universal microscope に連結した Video Plan Computer System を用いた. 厚さの測定は、各眼球を一切片につき各5箇所ずつ連 続50切片測定し、平均値(µm)±標準誤差で表したも のを, それぞれの部位で求めた.

移植実験に関する測定は、RPE 細胞移植群、非移植群、擬手術群の 3 グループのラットを 12 時間明~12 時間暗のサイクルで、照明、空調、その他の環境条件

をすべて同一にして飼育した。3群とも、移植手術、 擬手術から3か月後(月齢6か月), 6か月後(月齢9 か月) に同一時間,同一条件下で致死量の pentobarbital sodium を投与して眼球を摘出した。同一部位で 老化の程度を比較するため、眼球摘出前に上直筋に印 を付け、Bouin 液に固定し、パラフィンに包埋した。 角膜頂点, マーク部位, 視神経が確実に通るように切 片を作製した。ヘマトキシリン-エオジンで染色後、光 学顕微鏡で観察し、網膜の老化の状態を比較した。老 化の判定は、網膜外顆粒層、内顆粒層、外網状層、内 網状層の厚さ, 外顆粒層, 内顆粒層の細胞数カウント で行った。厚さの測定は、網膜鋸状縁から200~250 μm の網膜周辺部を一切片上5箇所ずつ,各眼連続50 切片を測定し、平均値 (µm) ±標準誤差で表した。細 胞数カウントは、周辺部網膜の長さ100 μm あたりの 平均細胞数±標準誤差で表した。それぞれの値は Student's t-test で統計学的に解析した.

2) RPE 細胞の分離

RPE 細胞分離は Mayerson ら³)の方法を一部修正 して行った。生後約1週間の Long Evans ラット,約 15 匹に致死量のエーテルを投与しただちに眼球を摘 出した. 眼球は50µg/mlのGaramycin (Sigma), 100 µg/mlの Kanamycin (Sigma) を含む Hank's balanced salt solution (HBSS) (pH 8.0) で洗浄し た. 眼球を 78 U/ml の collagenase (Worthington), 38 U/ml の testicular hyaluronidase (Sigma) を含む 37℃の HBSS (pH 7.0) 中で 40 分間インキュベート した. 次に 0.1%の trypsin (GIBCO, 1:250) を含 む 37℃の HBSS (pH 8.0) 中で 50 分間インキュベー トした. 2回のインキュベーション後, 眼球は20%の fetal calf serum (Sigma) を含む minimal essential medium (MEM) に入れ,実体顕微鏡下で前眼部を鋸 状縁からはずし、レンズ、硝子体を除去した。網膜を 脈絡膜から剝離し、37℃の MEM 中で 60~80 分イン キュベートし、網膜に付着していた RPE をシート状 に分離した (図1). 分離した RPE を 0.1% trypsin (GIBCO, 1:250)を含む 37℃の calcium-magnesium free (CMF)-HBSS 溶液中で 2.5 分間インキュベート した. 次に RPE 細胞を 0.002 g/ml soybean trypsin inhibitor (GIBCO), 0.001 g/ml DNase を含む溶液で 処理し, CMF-HBSS で数回洗浄し, Pasteur pipette による機械的操作で single cell suspension とし、約 $5 \times 10^4/\mu$ l となるように調整して donor cell とした.

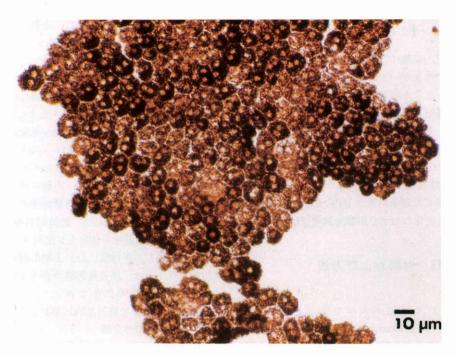


図1 シート上に分離した網膜色素上皮細胞の光顕写真. (×528)

3) 移植手術

移植手術はLi ら^{4/5/}の方法を一部改変して応用した。Recipient である 3 か月の Fischer ラットを

pentobarbital sodium で麻酔(60 mg/kg)し、atropine (0.4 mg/kg)を投与後、上眼瞼に切開を入れ、上部強膜を露出した。角膜輪部に制御糸をかけ、眼球を下転

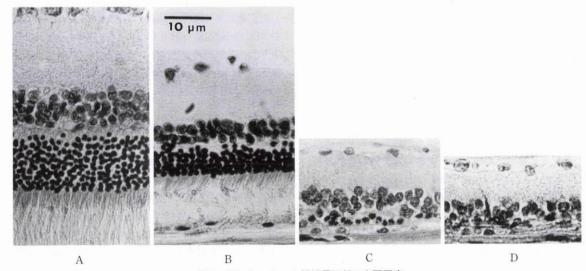


図 2 Fischer ラット網膜周辺部の光顕写真.

A:3 か月、B:9 か月、C:18 か月、D:27 か月。月齢とともに視細胞が減少し、網膜の厚さが菲薄化する。(×390)

し、手術野を得た。角膜輪部に近い部位で2本の渦静脈の間に $0.5\sim1.0$ mm の穿孔創を作った。この穿孔創を通して上部網膜周辺部の網膜下腔に Hamilton syringe に装着した 32 gage の針を用いて donor cell suspension を約 2μ l (約 1×10^5 RPE cell) 移植した。 創を10-0ナイロン糸で縫合し、手術を終了した。生後3か月の24 匹の Fischer ラットの片眼に移植手術をし、片眼は非移植群とした。24 匹のラットに、移植と全く同じ手術操作を施行し、 2μ l の CMF-HBSS のみを網膜下腔に注入したものを擬手術群とした。

III 結 果

1. 老化による網膜形態の変化

Fischer ラットでは月齢が進むにつれて視細胞が減少し網膜が菲薄化し、構造が乱れていた(図2A~D)。網膜の老化性変化を外顆粒層の実測値で比較したところ、網膜周辺部での老化変化が後極部、中間周辺部に比較し最も顕著であることがわかった(図3)。網膜周

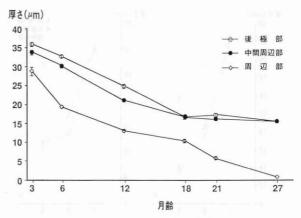


図3 Fischer ラット網膜外顆粒層の厚さの実測値. 月齢とともに厚さが減少するが、特に網膜周辺部で 菲薄化が顕著である.

辺部の外顆粒層は $28.7\pm1.0\,\mu\mathrm{m}$ (3 か月) から $0.85\pm0.01\,\mu\mathrm{m}$ (27 か月) と変化し、約 90%厚さが減少して

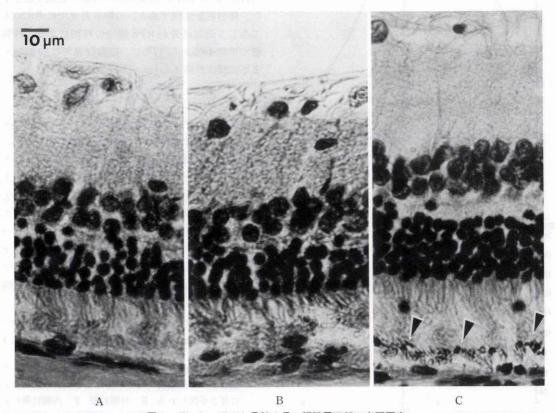
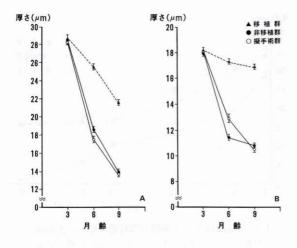
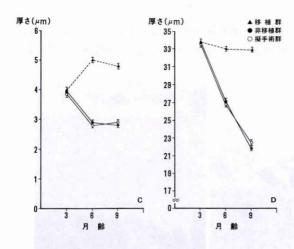
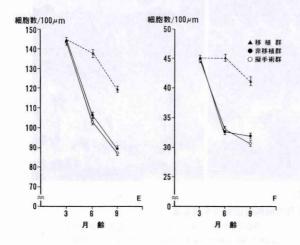


図 4 Fischer ラット月齢 9 月の網膜周辺部の光顕写真.

A:非移植群,B:擬手術群,C:移植群,有色ラットの網膜色素上皮細胞(矢じり)。網膜色素上皮細胞を移植した網膜では非移植群,擬手術群に比べて網膜各層の厚さ,構造が保たれている。(×780)







いた(図3)。この結果から RPE 細胞を移植して老化 に対する効果を調べるには網膜周辺部が最も適当と思 われ、以下の移植実験は網膜周辺部で検討した。

2. RPE 細胞移植実験

24 匹の Fischer ラットに RPE 細胞を移植し、網膜 下腔のみに有色 RPE 細胞の存在が確認されたものを 成功と判断し、移植成功率は92%であった。また、移 植成功眼では全例で donor cell が recipient 側のブ ルッフ膜, 視細胞外節と直接に接しており, 拒絶反応 を示した例はなかった。有色ラットの RPE 細胞を白 色ラットに移植したので、移植部位を容易に確認する ことができた (図4C). 移植手術をした網膜では、非 移植群、擬手術群に比べて網膜各層の厚さ、構造が保 たれていた (図4A~C)、実測すると、月齢6月、9 月では外顆粒層, 内顆粒層, 外網状層, 内網状層とも に移植網膜では対照に比し、統計学的に有意に厚さが 保たれていた[p<0.001(図5A~D)], 非移植群, 擬 手術群では網膜各層の厚さに統計学的に有意差は認め られず(p<0.001), 両者はほぼ同様の老化変化を示し た。細胞数を比較すると、月齢9月までに老化によっ て生じる細胞消失が RPE 細胞の移植により、外顆粒 層では約40%から17%に、内顆粒層では約33%から 8%に減少が抑えられた (図5E, F).

IV 考 按

老化動物モデルである Fischer ラットの網膜の変化は、RPE 細胞の機能低下、視細胞の減少ととらえられている 6^{10-8} が、網膜の厚さを実測値で検討することにより、老化とともに網膜各層の厚さも減少することが確認された。老化の進行により、RPE の形態的変化が報告されている 5^{10} 「Fischer ラットの RPE ではlipofuscinの集積、basal infolding の拡大、ブルッフ膜の肥厚などの変化が認められている 10^{10} 一今回,Fischer ラットでは網膜周辺部に老化の変化が顕著であることが示された。これは、ラットの網膜には黄斑部

図 5 **Fischer** ラット網膜周辺部の厚さの実測値(A ~D)。

A:外顆粒層, B:内顆粒層, C:外網状層, D:内網状層。移植網膜では対照群に比し統計学的に有意に厚さが保たれる。E:外顆粒層, F:内顆粒層の細胞数カウント。視細胞消失が網膜色素上皮細胞の移植により有意に抑えられる。バーは平均値±標準誤差(n=6)を示す。

が存在せず、light damage の影響が黄斑部に集中しないことが理由として考えられた。

網膜移植に関する研究が本格的に始められたのはご く最近のことである。網膜の移植には3種類のアプ ローチがある.1. donor の網膜全層を分離して移植す 5 whole retinal graft transplantation¹⁵⁾, 2. donor から分離した網膜をビブラトームで薄切し、視細胞層 だけの分離を試みて移植する photoreceptor cell transplantation¹⁶⁾, 3. donor から RPE cell だけを分 離して移植する RPE cell transplantation4)5)17)-22)の 3つである. Whole retinal graft transplantation は, donor から分離した網膜を乳化し、網膜に作製した人 為的裂傷部に移植する方法であり、移植された細胞は 移植部位でロゼットを形成するような構造を成す15). また, photoreceptor cell transplantation は Müller cell など他の細胞の contamination が避けられず細 胞分離法14)の確実性が乏しいとされている。RPE cell transplantation は細胞の分離が明確であり3)~5)、網膜 下腔への移植方法も解剖学的に理にかなっている点な どから、前記の3種の移植方法の中では最も確立され た方法と思われる. Fischer ラットの網膜の老化は RPE 細胞の老化変化に伴う二次的な要素と, 視細胞自 体のcell death との両方によるものと思われる が6)~8), 今回は細胞の分離が確実である RPE 細胞移植 を試み, 前者に対する影響を動物実験で検討した.

Li らがは RPE 細胞を分離し遺伝性網膜変性症のモ デルである Royal College of Surgeons (RCS) ラッ トに移植して、網膜変性が阻止されたことを報告した が、網膜の老化に対して移植を試みた報告は我々の知 る限り無い。今回,正常幼若な RPE 細胞を Fischer ラットの網膜下腔に移植することで、網膜の視細胞減 少が抑えられるという結果を得た. 移植群の網膜で各 層の厚さが有意に保たれていただけではなく, 外顆粒 層, 内顆粒層の細胞数が保たれていたことから, 厚さ の保持は個々の細胞の浮腫ではなく移植効果によるも のと考えられた. 移植した RPE 細胞は recipient のブ ルッフ膜, 視細胞外節と直接接触していた。これは, donor cell を移植する時の針先からの小噴流により、 recipient 側移植部位の RPE 細胞が剝離されたものと 考えられ,この所見はLiら4)5)の報告で,移植した RPE 細胞が recipient のブルッフ膜上に生着していた 所見と相関するものであった. 拒絶反応を起こした例 は認められなかったが、同種間での RPE 細胞移植で は拒絶反応が起きにくく4)5)17)~22), donor 細胞および recipient 移植部位ともに血管を持たない組織である ことが理由と考えられた。

Fischer ラットの網膜の老化を速める因子として光照射が、ストレス²³⁾²⁴⁾などの報告があるが、今回の実験で擬手術群と非移植群では、網膜各層の厚さおよび視細胞減少の程度がともに同様の経過をたどったことから、手術操作自体は網膜視細胞の消失に影響がないものと考えられた。移植によってFischer ラットの視細胞減少が遅くなるメカニズムの詳細は不明であるが、移植された細胞が老化する recipient 側の RPE 細胞の機能をある程度代償すること、また、移植されたRPE 細胞が growth factor²⁵⁾²⁶⁾を分泌し、視細胞を賦活化する可能性があることなどが推察された。Faktrovich ら²⁷⁾は RCS ラットの硝子体中に b-FGF を注入し、網膜の変性が一時的に救われることを報告している。老化網膜に対する RPE 細胞移植の効果のメカニズムを解明することが今後の課題であると思われる。

御校閲いただきました東北大学眼科学教室玉井 信教授 に深謝いたします。

文 献

- Marmor MF: Aging and the retina. In: Sekuler R, et al (Eds): Aging and Human Visual Function: Modern Aging Research. Vol 2, Alan R. Liss, New York, 59—78, 1982.
- Kornzweig AL, Fieldstein M, Schneider J: The eye in old age. Am J Ophthalmol 44: 29

 —37, 1957.
- 3) Mayerson PL, Hall MO, Clark V, Abrams T: An improved method of isolation and culture of rat retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 26: 1599—1609, 1985.
- 4) Li L, Turner JE: Transplantation of retinal pigment epithelial cells to immature and adult rat hosts: Short and long term survival characteristics. Exp Eye Res 47: 771—785, 1988.
- 5) Li L, Turner JE: Inherited retinal dystrophy in the RCS rat: Prevention of photoreceptor degeneration by pigmented epithelial cell transplantation. Exp Eye Res 47: 911—917, 1988.
- Lai YL, Jacoby RO, Joans AM: Age related and light-associated retinal changes in Fischer rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 17: 634—638, 1978.
- 7) Shinowara NL, London ED, Rapoport SI: Changes in retinal morphology and glucose utilization in aging albino rats. Exp Eye Res 34: 517—530, 1982.
- 8) Lai YL, Lug R, Masuda K, Liu YP: Mecha-

- nism and significance of photoreceptor cell loss in the Fischer rat retina. In: Hollyfield JG (Ed): The Structure of the Eye. Elsevier North Holland, New York, 133—139, 1982.
- Feeney L: Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 17: 583—600, 1978.
- Friedman E, Ts'o MOM: The retinal pigment epithelium, II. Histologic changes associated with age. Arch Ophthalmol 79: 315—320, 1968.
- Mishima H, Hasebe H: Some observations in the fine structure of age changes of the mouse retinal pigment epithelium. Albrecht von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol 209: 1—9, 1978.
- 12) Mishima H, Kondo K: Ultrastructure of age changes in the basal infoldings of aged mouse retinal pigment epithelium. Exp Eye Res 33:75 —84, 1981.
- 13) Wing GL, Blanchard GC, Weiter JJ: The topography and relationship of lipofuscin concentration in the retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 17: 601—607, 1978.
- 14) 山口慶子, 山口克宏, Turner JE, 玉井 信:老 化網膜における blood-retinal barrier の評価。眼 紀 42:2363-2366, 1991.
- 15) Blair JR, Turner JE: Optimum conditions for successful transplantation of immature rat retina to the lesioned adult retina. Dev Brain Res 36: 257—270, 1987.
- 16) Silverman MS, Hughes SE: Transplantation of photoreceptors to light-damaged retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 30: 1684—1690, 1989.
- 17) Gouras P, Flood MT, Kjeldbye MK, Bilek MK, Eggers H: Transplantation of cultured human retinal epithelium to Bruch's membrane of the owl monkey's eye. Curr Eye Res 4: 253 -265, 1985.
- 18) Lopez R, Gouras P, Brittis M, Kjeldbye H: Transplantation of cultured retinal pigment epithelium to rabbit retina using a closed eye method. Invest Ophthalmol Vis Sci 28: 1131 -1137, 1987.
- 19) 山口克宏, 山口慶子, 玉井 信, Young RW, Gaur

- **VP, Turner JE**: 家兎における硝子体手術を応用 した網膜色素上皮移植。眼科手術 4: 305-308, 1991
- 20) Yamaguchi K, Yamaguchi K, Young RW, Gaur VP, Turner JE: Transplantation of retinal pigment epithelial cells on Bruch's membrane in the rabbit. In: Anderson RE, et al (Eds): Retinal Degenerations. CRC Press, Boca Raton, 349—357, 1991.
- 21) Yamaguchi K, Yamaguchi K, Young RW, Gaur VP, Greven CG, Slusher MM, et al: Vitreoretinal surgical technique for transplanting retinal pigment epithelium in rabbit retina. Jpn J Ophthalmol 36: 142—150, 1992.
- 22) Blair JR, Gaur VP, Laedtke TW, Li L, Yamaguchi K, Yamaguchi K, et al: Oculo transplantation studies involving the neural retina and its pigment epithelium. In: Osborne N, et al (Eds), Progress in Retinal Research. Vol 10, Pergamon Press, Oxford, 69—88, 1990.
- 23) O'steen WK, Sweatt AJ, Brodish A: Effects of acute and chronic stress on the neural retina of young and mid-aged and aged Fischer-344 rats. Brain Res 426: 37—46, 1987.
- 24) O'steen WK, Sweatt AJ, Eldrodge JC, Brodish A: Gender and chronic stress effects on the neural retina of young and mid-aged Fischer-344 rat. Neurobiol of Aging 8: 449—455, 1987.
- 25) Sternfeld MD, Robertson JE, Shipley GD, Tsai J, Rosenbaum JT: Cultured human retinal pigment epithelial cells express basic fibroblast growth factor and its receptor. Curr Eye Res 8: 1029—1037, 1989.
- 26) Campachiaro PA, Sugg R, Grotendorst G, Hjelmeland LM: Retinal pigment epithelial cells produce PDGF-like proteins and secrete them into their media. Exp Eye Res 49:17—227, 1989.
- 27) Faktrovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM: Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. Nature 347: 83-86, 1990.