

Transforming growth factor- β による器官培養角膜上皮の 創傷治癒遅延に関する研究

西田 幸二¹⁾, 大橋 裕一²⁾, 根津 永津³⁾, 山本 修士³⁾, 木下 茂¹⁾, 藤田 和彦⁴⁾

¹⁾京都府立医科大学眼科学教室, ²⁾愛媛大学医学部眼科学教室,

³⁾大阪大学医学部眼科学教室, ⁴⁾アース製薬株式会社生物科学研究所

要 約

Transforming growth factor- β (TGF- β) は、一般に上皮系細胞の増殖を抑制するが、間葉系細胞の増殖を促進するというユニークな生理活性を持つポリペプチド成長因子である。今回、TGF- β が角膜上皮創傷治癒過程に与える効果を *in vitro* の系において検討した。直径 8 mm の上皮欠損を作成した家兎の両眼角膜の一方を TGF- β 添加培養液 (100 pg/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml), 他方を対照液にて 48 時間器官培養した。1 ng/ml と 10 ng/ml の群では、対照群と比べて有意な上皮創傷治癒速度の減少が見られた。また、5-bromo-2'-deoxyuridine を用いた免疫組織化学的検討によって、1 ng/ml の TGF- β 添加群では、その対照群に比し、有意な S 期細胞数の減少が見られた。これらの結果は、TGF- β が角膜上皮創傷治癒過程において、角膜上皮増殖を抑制し、上皮修復を遅延させる作用をもつことを示している。(日眼会誌 97: 899-905, 1993)

キーワード: TGF- β , 角膜上皮, 創傷治癒速度, 5-bromo-2'-deoxyuridine-免疫組織化学, 器官培養

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Inhibits Epithelial Wound Healing of Organ-cultured Rabbit Cornea

Kohji Nishida¹⁾, Yuichi Ohashi²⁾, Etsu Nezu³⁾,
Shuji Yamamoto³⁾, Shigeru Kinoshita¹⁾ and Kazuhiko Fujita⁴⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

²⁾Department of Ophthalmology, Ehime University Medical School

³⁾Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School

⁴⁾Earth Chemical Co. Ltd.

Abstract

Transforming growth factor- β (TGF- β) is a unique polypeptide growth factor which has been found to stimulate mesenchymal cell proliferation and inhibit epithelial cell growth. Whether or not TGF- β inhibits corneal epithelial wound closure remains controversial. This study evaluated the effects of TGF- β on corneal epithelial wound healing *in vitro*. Rabbit corneas with an artificial 8 mm epithelial defect were organ-cultured for 48 hr in TC-199 supplemented with TGF- β (100 pg/ml, 1 ng/ml, or 10 ng/ml). The contralateral eye served as control. TGF- β at 1 ng/ml and 10 ng/ml concentrations showed significant decrease in wound-healing rate compared with the control. 5-bromo-2'-deoxyuridine-immunohistochemistry showed a significant decrease in S-phase cell count in the 1 ng/

別刷請求先: 602 京都市上京区河原町通り広小路上ル梶井町 465 京都府立医科大学眼科学教室 西田 幸二
(平成 5 年 1 月 28 日受付, 平成 5 年 3 月 29 日改訂受理)

Reprint requests to: Kohji Nishida, M.D. Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 Kajji-cho, Hirokoji, Kawaramachi, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan

(Received January 28, 1993 and accepted in revised form March 29, 1993)

ml group compared with the control. These results strongly suggest that TGF- β inhibits corneal epithelial wound healing. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 899-905, 1993)

Key words: Transforming growth factor- β , Corneal epithelium, Wound healing rate, 5-bromo-2'-deoxyuridine-immunohistochemistry, Organ culture

I 緒 言

Transforming growth factor- β (TGF- β) は、線維芽細胞に作用して可逆的に形質転換を引き起こし、軟寒天培地での増殖を可能にする血小板由来増殖因子として発見された¹⁾。さらにその後の研究から、TGF- β が正常組織に偏在して多様な生物学的役割を果たしていることが示唆されている^{2)~4)}。

そのユニークな生理活性の一つとして、*in vitro* で上皮系細胞の増殖やリンパ球、血管内皮細胞の増殖を抑制し、間葉系細胞の増殖を促進する^{5)~9)}ことが知られており、各組織において創傷治癒を制御しているのではないかと考えられている。しかし、角膜の創傷治癒における TGF- β の役割を検討した報告はまだ少数である。Hayashi ら¹⁰⁾はビタミン A 欠乏ラットを用いた実験で、角膜実質創傷部に TGF- β が発現してくることから、TGF- β が角膜創傷治癒においても重要な役割を果たしていることを示唆している。上皮創傷治癒に対する影響に関しては、*in vitro* の創傷治癒モデルで検討した報告がみられるが、これらのうち、Filipec ら¹¹⁾は、TGF- β は角膜上皮創傷治癒遅延を示すとし、Bernatchez ら¹²⁾、Mishima ら¹³⁾は、上皮創傷治癒を遅延させないと相反する結果を報告している。そこで今回、家兎角膜の器官培養系において、TGF- β の角膜上皮創傷治癒への影響を検討し、その作用機序について考察を加えた。

II 実験方法

1. 実験動物

体重 2~3 kg の白色家兎 39 匹を用いた。

2. 薬剤

TGF- β_1 、EGF としては遺伝子操作により作成した recombinant ヒト TGF- β_1 (rhTGF- β_1)、recombinant ヒト epidermal growth factor (rhEGF) (アース製薬から供与)を用いた。

3. 器官培養

それぞれの家兎を致死量のペントバルビタールナトリウムで殺戮し、その直後にトレビンで角膜に 8 mm

径のマーキングをして、その内側の上皮を角膜乱切刀で剝離するという手順で直径 8 mm の角膜上皮欠損を作成した。その後、角膜上皮欠損をフルオレセインで染色して、Medical Nikkor (Nikon) で写真撮影した。引き続き、反対側の眼も同様に処置した。これらの操作が完了した後、すぐに両眼球を摘出し、強角膜片とした。なお、処置に要した時間の影響をなくすため、最初の家兎において、先に処置した眼を実験眼、後に処置した眼を対照眼とした場合は、次の家兎においては先に処置した眼を対照眼、後に処置した眼を実験眼とするようにし、この手順を繰り返した。強角膜片は角膜形状を保持するようにデザインされたアセタール製のデルリン®¹⁴⁾の上に上皮側が上になるように置き、6 ウェルの組織培養皿 (CORNING Laboratory Science) に入れて、炭酸ガス培養器で 37°C で培養した。同一家兎から得られた 2 つの強角膜片の一方には、rhEGF (溶解液としては蒸留水を使用) または rhTGF- β_1 (溶解液としては BSA 2.5/ml (5 mM 塩酸) を使用) を添加した tetracycline TC-199 (阪大微生物病研究会) を培養液として使用し (培養液中の濃度: rhEGF 10 ng/ml を 7 眼, 100 ng/ml を 6 眼, rhTGF- β_1 10 ng/ml を 7 眼, 1 ng/ml を 12 眼, 100 pg/ml を 7 眼に使用)、他方の強角膜片には同量の溶解液のみを加えた TC-199 をその対照液として使用した。培養液は、1 ウェルに 10 ml とし、培養開始 24 時間後に同じ培養液と交換した。培養開始 48 時間後に培養を中止して、強角膜片を培養皿から取り出し、フルオレセインまたは 0.5% メチレンブルーで上皮欠損部位を染色して、Medical Nikkor で写真撮影した。

4. 上皮創傷治癒速度の算出

おのおの角膜毎に、上皮欠損作成時と培養開始 48 時間後に撮影した写真から角膜上皮欠損の面積を画像処理装置 (NEC 9801) で算出し、この両者の面積から上皮創傷治癒速度を求めた。

5. BrdU-免疫組織化学を用いた S 期細胞の同定

培養終了後、rhTGF- β_1 添加群 (1 ng/ml) とその対照群の強角膜片を BrdU を用いた免疫組織化学に供した。その方法は、まず培養皿から取り出した強角膜

片と10 μ Mの5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (Sigma)を含む10%牛胎児血清添加TC-199 5 mlを10 mlのバイアル瓶に入れ、瓶中の気相を95%酸素-5%炭酸ガス(通常生物ガス)に置換した。これに密栓をし、バイアルのゴムパッキンを通じて、シリンジ(27ゲージ針付)で95%酸素-5%炭酸ガス10 mlを押し込んだ(3気圧)。これを37°Cの炭酸ガス培養器にて2時間培養した後、5%酢酸エタノールにて12時間振盪、固定、さらに冷やした70%エタノールにて保存した。この組織を2時間水洗した後、パラフィン包埋し、4 μ mの薄切片を作成した。以後、温キシレン30分×3回で脱パラフィンを行った後、水和し、4 Nの塩酸を37°Cで1時間浸漬させてDNAを変性させ、0.1 Mの四ホウ酸ナトリウムで中和を行った。次に、正常ウマ血清(Nippon Bio-Suppl. center)でブロッキングを20分を行った後、抗BrdUモノクローナル抗体(Becton-Dickinson)を4°Cで一晩反応させた。最後にビオチン標識抗マウスIgG(Becton-Dickinson)と1時間で室温で反応後、vectastain ABC-APキット(Vector laboratory)とアルカリフォスファターゼ基質キット(Vector laboratory)を使用して発色させ、さらにヘマトキシリンで対比染色した後脱水、封入を行った。

一つの強角膜片に対して、角膜中央から300 μ m毎に4つずつの切片を切り出しBrdU染色に供した。各強角膜片の単位長さ当たりのBrdU陽性細胞数は以下のように求めた。

- 1) 各組織切片に見られた全BrdU陽性細胞数。
- 2) その組織切片の角膜上皮部分の長さ(ただし上皮欠損部位は除く)を算出。
- 3) 1)と2)から単位長さ当たりのBrdU陽性細胞数を算出。
- 4) 4切片の単位長さ当たりのBrdU陽性細胞数を平均。

以上から得られた単位長さ当たりのBrdU陽性細胞数をTGF- β 添加群と対照群で比較検討した。

III 結 果

1. 上皮創傷治癒速度

rhEGFの実験結果を図1に、rhTGF- β の実験結果を図2に示した。rhEGF添加群10 ng/mlと100 ng/mlの上皮創傷治癒速度と、それぞれの対照群の上皮創傷治癒速度の間に統計学的に有意な差異は認められなかった。一方、rhTGF- β 添加群のうち、濃度100 pg/ml

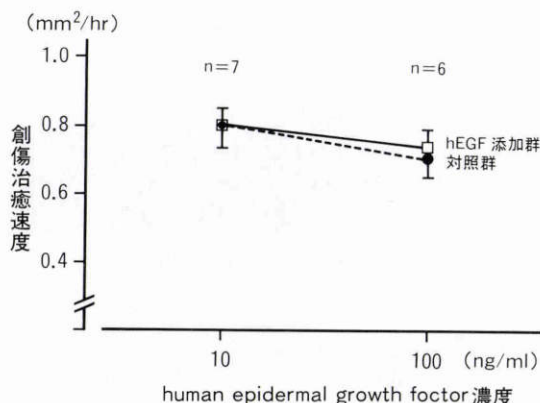


図1 Human epidermal growth factorの角膜上皮創傷治癒速度への影響。

Recombinant human epidermal growth factor添加群では10 ng/mlと100 ng/mlのいずれの濃度でも、対照群と比較して上皮創傷治癒が促進する傾向にあったが、統計学的には有意ではなかった(ベアt検定 $p > 0.05$)。値は平均値±標準偏差。

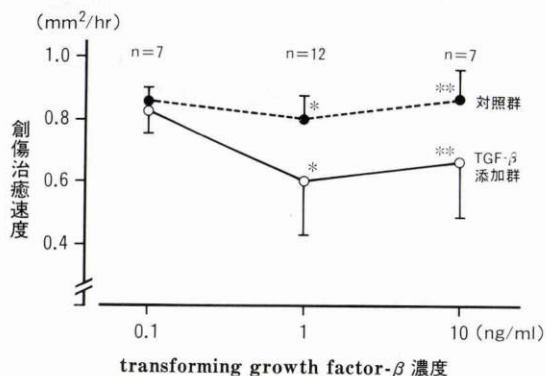
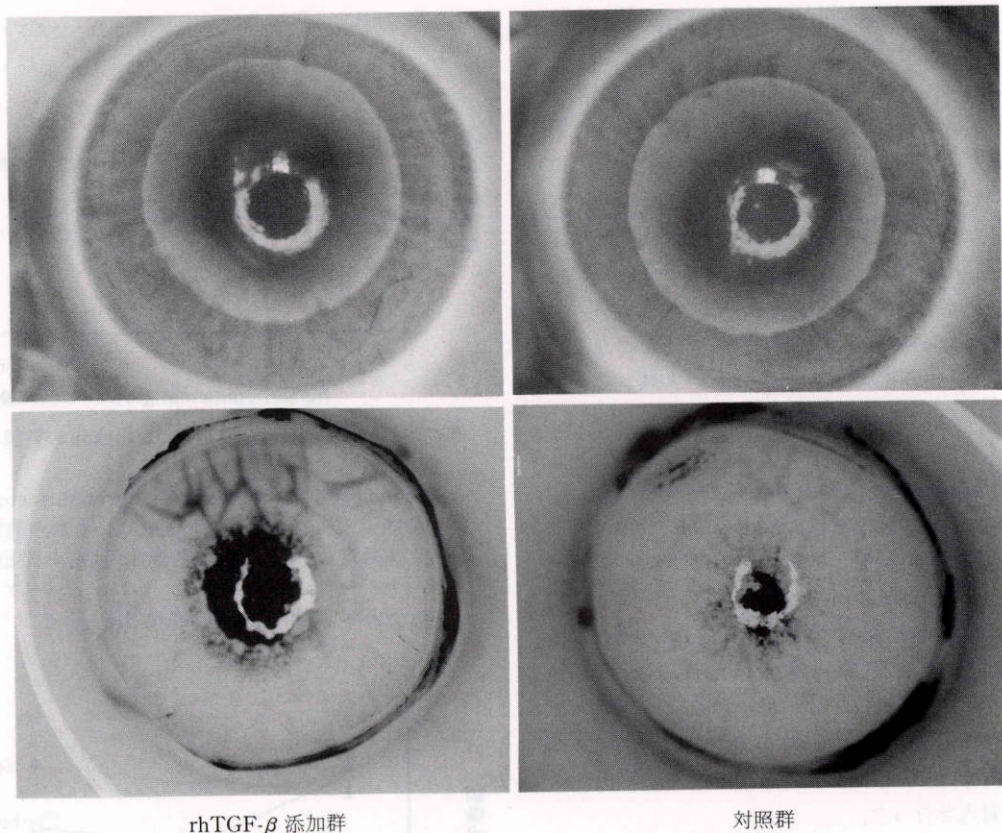


図2 Recombinant transforming growth factor- β の角膜上皮創傷治癒速度への影響。

Recombinant transforming growth factor- β 添加群のうち濃度100 pg/mlの群は、その対照群との間に上皮創傷治癒速度の差異を認めなかった(ベアt検定 $p > 0.05$)。濃度1 ng/mlの群と10 ng/mlの群では対照群と比較して有意に上皮創傷治癒が遅延していた(ベアt検定 $p < 0.01$: 濃度1 ng/ml群 $p < 0.05$; 濃度10 ng/ml群)。値は平均値±標準偏差。

mlの群の上皮創傷治癒速度と、その対照群との間に有意な差異を認めなかったが、濃度1 ng/mlの群(図3)と10 ng/mlの群ではその対照群と比較して、有意な上皮創傷治癒の遅延が認められた(ベアt検定 $p < 0.01$: 濃度1 ng/ml群, $p < 0.05$: 濃度10 ng/ml群)。

rhTGF- β 添加群

対照群

図3 rhTGF- β (1 ng/ml) 添加群と対照群の角膜上皮創傷治癒過程。

左上: rhTGF- β (1 ng/ml) 添加群(培養開始時), 右上: 対照群(培養開始時), 左下: rhTGF- β (1 ng/ml) 添加群(培養48時間後), 右下: 対照群(培養48時間後)。左上と右上の写真はフルオレセイン染色したもので、角膜内の円形の白く見える部分が上皮欠損部位であり、左下と右下の写真はメチレンブルー染色したもので、黒く見える部分が上皮欠損部位である。rhTGF- β 添加群の角膜上皮創傷治癒は対照群より遅延していた。

2. BrdU-免疫組織化学

rhTGF- β_1 の角膜上皮創傷治癒遅延効果が細胞増殖抑制に起因しているかを解明するために、創傷治癒遅延がもっとも顕著にあらわれた濃度1 ng/mlの群とその対照群をBrdUを用いた免疫組織化学に供した。BrdU陽性細胞は、対照群では再生上皮の先端部を中心として角膜周辺部まで広く分布しているのに対して、rhTGF- β_1 添加群では再生上皮の先端部に少数認められるだけであった(図4)。表1にはrhTGF- β_1 添加群8眼とその対照群8眼の各切片にみられた単位長さ当たりのBrdU陽性細胞数を示したが、TGF- β 添加群は 0.78 ± 0.49 個/mmと対照群 2.54 ± 0.94 個/mmに対して、有意にBrdU陽性細胞(S期細胞)が減

少していた(Wilcoxon signed-rank 検定 $p < 0.01$, 値は平均値±標準偏差)。

IV 考 按

今回、家兎角膜の器官培養系において、8 mmの角膜上皮欠損の治癒速度に対するTGF- β の効果は、濃度1 ng/mlと10 ng/mlでは遅延効果を示すが、濃度100 pg/mlでは影響を与えないことが判明した。さらにBrdUを用いた免疫組織化学的手法により、TGF- β 添加群(1 ng/ml)では対照群と比較してS期細胞数の有意な減少が認められた。これらの結果は、TGF- β は上皮細胞の増殖を抑制することにより上皮創傷治癒を遅延させることを示している。TGF- β が器官培養系で角

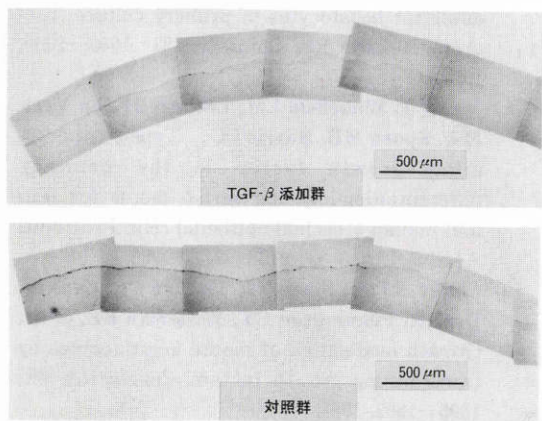


図4 Recombinant human transforming growth factor- β (1 ng/ml) 添加群と対照群の BrdU 陽性細胞.

上: rhTGF- β (1 ng/ml) 添加群, 下: 対照群, BrdU 陽性細胞数は, rhTGF- β (1 ng/ml) 添加群では対照群に比し著しく減少していた.

表1 5-Bromo-2'-deoxyuridine 陽性細胞数

家兎 No.	単位長さ当たりの BrdU 陽性細胞数 (4 切片の平均, 個/mm)	
	TGF- β 添加群	対照群
1	1.00	2.60
2	0.66	1.11
3	0.47	1.46
4	1.80	2.36
5	0.22	3.35
6	0.90	3.99
7	0.79	2.92
8	0.43	2.50
平均値±標準偏差	0.78±0.49*	2.54±0.94*

*Wilcoxon signed-rank 検定: $p < 0.01$

膜上皮細胞の増殖を抑制することを, S 期細胞を同定することにより明確に証明した報告は, 本研究がはじめてである.

TGF- β の上皮創傷治癒の遅延が単に TGF- β の細胞毒性によるのではないかという可能性は以下の事実から否定的である. すなわち, 光学顕微鏡レベルでは細胞形態に異常を認めなかったこと, BrdU を用いた免疫組織化学的手法により, TGF- β 添加群では S 期細胞数の有意な減少が認められたこと, hEGF 添加した群において上皮創傷治癒遅延はみられなかったこと, 肝細胞⁷⁾や気管支上皮細胞⁸⁾, 皮膚表皮細胞⁹⁾など正

常上皮細胞の培養系において, TGF- β の細胞増殖抑制効果や DNA 合成抑制効果は 1 ng/ml 以上で顕著に見られるが, 本研究で上皮修復遅延を起こした TGF- β の濃度がこれら過去の報告と類似していること, などである.

これまでに, 細胞培養系や器官培養系において, TGF- β の角膜上皮創傷治癒に与える影響が検討されてきた. Filipec ら¹¹⁾は, 血清無添加の培養液を用いた家兎角膜の器官培養系で, keratectomy によって作成した直径 8.5 mm の上皮欠損の修復に, 100 pg/ml と 1 ng/ml の TGF- β 添加は影響を与えないが, 10 ng/ml では遅延効果をもたらすと報告している. 一方, Bernatchez ら¹²⁾は, 細胞培養された家兎角膜上皮層の中に作成した直径 6 mm 上皮欠損の修復速度は, TGF- β 添加群 (~1 ng/ml) と対照群間で差異を認めなかったとしており, 1 ng/ml 以下の TGF- β は角膜上皮の増殖を抑制しないことを示している. しかし, Bernatchez ら¹²⁾が実験で使用した培養液には 5% 胎児牛血清が含まれており, 血清中に含まれる TGF- β が影響を与えるとも考えられる. 一方で, 彼らは, 血清無添加の培養液を用いた条件下で, 機械的剝離によって作成した直径 6 mm のモルモット角膜の上皮欠損の修復には 1 ng/ml 以下の TGF- β 添加は影響を与えないと報告している. さらに Mishima ら¹³⁾は, 家兎角膜ブロックの組織培養系にて, 角膜上皮の伸展に TGF- β は影響を与えないと報告している. これらの結果が本実験結果と相反する原因として, 一つは上記の実験系間では細胞が伸展する基質がそれぞれ異なっている点がある. Rollins ら¹⁶⁾は *in vitro* で TGF- β を扱う場合, プラスチック面上に活性型の TGF- β が容易に吸着するため, 培養上皮細胞は培養液中の TGF- β よりもはるかに強く TGF- β の影響を受けることを示唆している. この結果から推察すると, TGF- β の培養液中の濃度よりも, むしろ細胞が伸展していく基質にどのくらい TGF- β が吸着しやすいかが TGF- β の作用発現により重要な条件となっている可能性がある. TGF- β が角膜上皮創傷治癒に影響を与えないとする報告では, TGF- β が基質に吸着しにくい, 容器の壁などに吸着されるため培養液中の TGF- β が減少するために, 上皮増殖抑制を生じるに十分な量の TGF- β が供給されていなかった可能性も考えられる. また, TGF- β を取り扱う実験では, TGF- β は容器の壁などに容易に吸着するため, 保存に際して BSA などの蛋白を混合させる必要があるし, また recombinant

TGF- β は不活性型であるため、使用前に酸などの化学的処置による活性化が必要とされる。このような操作を怠ると、活性型の TGF- β が培養液中に存在しないのと同じことになってしまう。本研究では、これらの点にも十分に留意した。

最近, *in vitro* の正常ヒト角膜上皮細胞が TGF- β の mRNA を発現していることが報告された¹⁷⁾。さらに本研究により, TGF- β が *in vitro* の角膜上皮の創傷治癒過程において, 角膜上皮細胞の増殖を抑制することが示された。これらの事実から, TGF- β が *in vivo* の角膜上皮の創傷治癒過程において, 皮膚表皮細胞⁵⁾¹⁸⁾と同様に, オートクリンの調節を行っているのではないかと考えられる。

本研究は文部省科学研究費補助金(一般研究B 04454442)と京都府医学振興会研究助成金の補助によって行われた。

文 献

- 1) De Larco JE, Todaro GJ: Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. Proc Natl Acad Sci USA 75: 4001—4005, 1978.
- 2) Sporn MB, Robert AB, Wakefield LM, Crombrugghe B: Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. J Cell Biol 105: 1039—1045, 1987.
- 3) Deryck R, Jarret JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, et al: Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. Nature 316: 701—705, 1985.
- 4) Sporn MB, Robert AB, Wakefield LM, Assoian RK: Transforming growth factor- β : biological function and chemical structure. Science 233: 532—534, 1986.
- 5) Moses HL, Tucker RF, Leof EB, Coffey RJ Jr, Halper J, Shipley GD: Type- β transforming growth factor is a growth stimulator and a growth inhibitor. In "Cancer cells" Vol 3. In: J Feramisco, et al (Eds): Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 65—71, 1985.
- 6) Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB: Type- β transforming growth factor: A bifunctional regulator of cellular growth. Proc Natl Acad Sci USA 82: 119—123, 1985.
- 7) Nakamura T, Tomita Y, Hirai R, Yamaoka K, Kaji K, Ichihara A: Inhibitory effect of transforming growth factor- β on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture. Biochem Biophys Res Commun 133: 1042—1050, 1985.
- 8) Masui T, Wakefield LM, Lechner JF, La Veck MA, Sporn MB, Harris CC: Type β transforming growth factor is the primary differentiation-inducing serum factor for normal human bronchial epithelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 83: 2438—2442, 1986.
- 9) Coffey RJ Jr, Sipes NJ, Bascom CC, Graves-Deal R, Pennington CY, Weissman BE, et al: Growth modulation of mouse keratinocytes by transforming growth factors. Cancer Res 48: 1596—1602, 1988.
- 10) Hayashi K, Frangieh G, Wolf G, Kenyon KR: Expression of transforming growth factor- β in wound healing of vitamin A-deficient rat corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci 30: 239—247, 1990.
- 11) Filipec M, Phan TM, Colvin RB, Lui G, Foster CS: Effect of EGF, basic FGF, TGF- α and TGF- β on corneal epithelial wound healing in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci 31(Suppl): 55, 1990.
- 12) Bernatchez SF, Boisjoly HM, Laplante C, Giasson M: The effect of interleukin-1 β (IL-1 β), transforming growth factor- β (TGF- β) and insulin on in vitro corneal epithelial wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci 31(Suppl): 54, 1990.
- 13) Mishima H, Nishida T, Nakamura M, Otori T: Modulation of the stimulatory actions on the corneal epithelial cells by TGF- β . Invest Ophthalmol Vis Sci 31(Suppl): 53, 1990.
- 14) Cameron JD, Waterfield RR, Steffes MW, Furcht LT: Quantification of corneal organ culture migration: central and peripheral epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 30: 2407—2413, 1989.
- 15) Lawrence DA, Pircher R, Jullien P: Conversion of a high molecular weight latent β -TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active β -TGF under acidic conditions. Biochem Biophys Res Commun 133: 1026—1034, 1985.
- 16) Rollins BJ, O'connell TM, Bennett G, Burton LE, Stiles CD, Rheinwald JG: Environment-dependent growth inhibition of human epidermal keratinocytes by recombinant human transforming growth factor-beta. J Cell Physiol 139: 455—462, 1989.

- 17) **Wilson SE, He Y, Lloyd SA** : EGF, EGF receptor, basic FGF, TGF beta-1, IL-1 alpha mRNA in human corneal epithelial cells and stromal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33 : 1756—1765, 1992.

- 18) **Barnard JA, Bascom CC, Lyons RM, Sipes NJ, Moses HL** : Transforming growth factor β in the control of epidermal proliferation. *Am J Med Sci* 296 : 159—163, 1988.
-