

# ウサギ水晶体上皮細胞の継代培養による細胞性質の変化

— $\alpha$ -クリスタリンと水晶体様小体を中心として—

笹部 哲生<sup>1)</sup>, 宇仁 明彦<sup>2)</sup>, 切通 彰<sup>2)</sup>, 岸田 健一<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>大阪府立羽曳野病院眼科, <sup>2)</sup>大阪大学医学部眼科学教室

## 要 約

ウサギ水晶体上皮細胞の長期培養過程における性質の変化について、クリスタリン生成能および水晶体様小体形成能に注目して調べた。培養細胞の増殖は、第24代まで指数関数的に増殖したが、その後60日ほど増殖を停止し、再度指数関数的に増殖を開始した。形態的には、増殖を一次停止していた時期を除き、敷石状で特別な変化を認めなかった。抗 $\alpha$ -クリスタリンモノクローナル抗体を用いた免疫蛍光検査では、初代、20代細胞には細胞質全体に特異蛍光が認められたが、第24代細胞では細胞質の特異蛍光が消失した細胞が出現しており、35代細胞や70代細胞では核周囲のみに特異蛍光は限局していた。水晶体様小体の形成も初代細胞、20代細胞では認められた

が、24代細胞、35代細胞、70代細胞では認められなかった。げっし類の培養細胞は長期培養過程で増殖停止期をむかえ、この間に形質転換が生じるとされているが、今回の研究からウサギ水晶体上皮細胞では、 $\alpha$ -クリスタリン生成や水晶体様小体形成能といった水晶体上皮としての性質も、この増殖停止期に変化することがわかった。(日眼会誌 98:545-550, 1994)

キーワード：ウサギ水晶体上皮細胞, 細胞培養,  $\alpha$ -クリスタリン, 水晶体様小体, モノクローナル抗体

## The Effect of Cultivation on the Differentiated Function of Rabbit Lens Epithelial Cells *In Vitro*

<sup>1)</sup>Tetsuo Sasabe, <sup>2)</sup>Akihiko Uni, <sup>2)</sup>Akira Kiritoshi and <sup>2)</sup>Kenichi Kishida

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Osaka Prefectural Habikino Hospital

<sup>2)</sup>Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School

## Abstract

Changes in the characteristics of rabbit lens epithelial cells during long-term cultivation were examined. From the beginning of cultivation to the 24<sup>th</sup> generation, the cells grew exponentially, and then the growth stopped. This growth-arrested period lasted for 60 days, and then they grew exponentially again. The cells had a cobblestone-like appearance through the whole cultivation period except in the growth-arrested period. In an immunofluorescence examination with a monoclonal antibody against  $\alpha$ -crystallin, all of the primary cells and the cells in the 20<sup>th</sup> generation showed specific fluorescence to  $\alpha$ -crystallin throughout their cytoplasm. However, some of the cells in the 24<sup>th</sup> generation did not show this fluorescence, and

all of the cells in the 35<sup>th</sup> and 70<sup>th</sup> generations showed fluorescence only around the nuclei and none in the cytoplasm. The primary cells and the cells in the 20<sup>th</sup> generation were capable of forming lentoid bodies, but the cells after the 24<sup>th</sup> generation were not. These results indicate that some of the characteristics of the rabbit lens epithelial cells are lost during the growth-arrested period. (J Jpn Ophthalmol Soc 98:545-550, 1994)

Key words: Rabbit lens epithelial cell, Cell culture,  $\alpha$ -crystallin, Lentoid body, Monoclonal antibody

別刷請求先：583 大阪府羽曳野市はびきの3-7-1 大阪府立羽曳野病院眼科 笹部 哲生  
(平成5年12月14日受付, 平成6年2月3日改訂受理)

Reprint requests to: Tetsuo Sasabe, M.D. Department of Ophthalmology, Osaka Prefectural Habikino Hospital, 3-7-1 Habikino, Habikino-shi, Osaka-fu 583, Japan

(Received December 14, 1993 and accepted in revised form February 3, 1994)

## I 緒 言

近年、動物愛護の見地から動物個体を犠牲にして行う実験は極力これを避け、できる限り培養細胞で代用することが望ましいとされてきている。白内障を始め水晶体の研究を行うに際しても、同様のことが望まれており、さまざまな動物種で水晶体上皮細胞の培養が試みられている<sup>1)~5)</sup>。なかでも、不死化細胞(無限に増殖することが可能な細胞)は長期培養が可能で、大量に細胞を得ることができる点から研究材料としては理想的とされており、水晶体上皮細胞の不死化株細胞樹立の試みも古くから報告されている。Courtoisら<sup>6)</sup>はウシ水晶体上皮細胞を培養し続けると形質転換が自然に認められ不死化する<sup>6)</sup>と報告し、Russellら<sup>7)</sup>は正常マウスとナカノマウスの水晶体上皮細胞の不死化に成功している。ウサギ水晶体上皮細胞の不死化株細胞も以前著者ら<sup>8)</sup>が樹立している。しかしながら、これらの不死化細胞がその後の水晶体の研究に利用された例は少ない。他施設で樹立された不死化細胞がなかなか用いられない理由は、長期培養された細胞は本来の水晶体上皮細胞の性質を維持している細胞が少なく<sup>9)</sup>、各々の研究に適切であるか否かの判断が困難であることによると思われる。したがって、水晶体の研究に培養細胞を用いるに際して、培養水晶体上皮細胞の特徴であるクリスタリンの生成能や水晶体様小体の形成能の変化などを把握しておくことが重要である。本研究では、長期培養の過程でウサギ水晶体上皮細胞の $\alpha$ -クリスタリン生成能の変化および水晶体様小体の形成能の変化を検討した。

## II 実験方法

### 1. ウサギ水晶体上皮細胞の培養

ベントバルビタールナトリウム(ネプタール<sup>®</sup>)過剰量投与によって屠殺したシロウサギから眼球を摘出し、無菌的に水晶体のみを取り出した。水晶体の赤道部に割面を入れ水晶体上皮細胞を前囊ごと剝離し、細切した後培養皿(3002 Falcon)に静置し、37℃ 5% CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。培養液には15%牛胎児血清(Whitaker MA bioproducts社)を含むEagle's minimum essential medium (EMEM)(日本水産社)を用いた。水晶体上皮細胞はconfluent(培養容器底全体に増殖した状態)になると0.05% EDTA(阪大微研)処理で浮遊させ、倍数の培養皿に分散し継代を続けた。分散1回につき一継代増加したものとみなした。また、分散直後から位相差顕微鏡で観察を行い、confluentになるまでの日数を一世代通過日数とし、初代細胞、2代、3代、10代、20代、24代、25代、35代、70代の各継代細胞の一世代通過日数を計測した。

### 2. 抗ウサギ $\alpha$ -クリスタリンモノクローナル抗体の作成

Mostafapourら<sup>10)</sup>の方法に準じて得たウサギ水晶体蛋白をSephacryl S-300(Pharmacia社)を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行い、分子量の高い方から $\alpha$ 、 $\beta$ および $\gamma$ の各クリスタリン分画を得た。 $\alpha$ -クリスタリン100 $\mu$ gをBALB/cマウス(オリエンタル酵母社)の腹腔内にFreund's complete adjuvant(ナカライテスク社)とともに注射して免疫し、さらに2週間後同量の $\alpha$ -クリスタリンのみで再度免疫した。二度目の免疫から3日後にマウスの脾臓を摘出し、得られた脾細胞10<sup>8</sup>個を2 $\times$ 10<sup>7</sup>個のマウス骨髄腫細胞(SP2/OAg14)(大阪大学微生物病研究所感染病理部からの供与)とポリエチレングリコール4000(ナカライテスク社)で融合させた。融合細胞を15% FCSを含むDulbecco's modified eagle medium (DMEM)に100分の1量のHATサブプリメント( $\times$ 100)(10 mM ヒポキサンチンナトリウム, 40 $\mu$ M アミノプテリン, 1.6 mM チミジン)(Gibco-BRL社)を添加した培養液に浮遊させた(5 $\times$ 10<sup>5</sup> SP2 cell/ml), 200 $\mu$ lの細胞浮遊液を96穴マイクロプレート(Nunc社)の各穴に移し約2週間培養した。得られた融合細胞の抗クリスタリン抗体産生を確かめるために、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の各クリスタリンとの反応性をenzyme-linked-immunosorbent-assays (ELISA)法でスクリーニングし、 $\alpha$ -クリスタリンとのみ反応する抗 $\alpha$ -クリスタリン特異抗体を産生する融合細胞を得た。融合細胞を2回限界希釈法でクローニングし細胞株を樹立した。この細胞の培養上清を用いて、western blotting法により認識する $\alpha$ -クリスタリンのポリペプチドを同定した。

### 3. 間接蛍光抗体法

一次抗体の抗ウサギ $\alpha$ -クリスタリンモノクローナル抗体は、前述の融合細胞の培養上清を用いた。二次抗体のfluorescein-isothiocyanate (FITC)標識抗マウスIgG抗体(Organ Technika-Cappel社)は、1%のアルブミン(Sigma社)を含む生理的燐酸緩衝液(PBS)で100倍に希釈したものをを用いた。初代細胞、20代継代細胞、24代継代細胞、35代継代細胞、70代継代細胞をスライドガラス上で培養し、培養開始7日後にPBSで洗浄し、冷エタノールで固定した。これらを抗 $\alpha$ -クリスタリンモノクローナル抗体と37℃の条件下で1時間反応させた。対照の抗体としては、同モノクローナル抗体を $\alpha$ -クリスタリンで吸収したものをを用いた。再度PBSで洗浄後、二次抗体と37℃の条件下で1時間反応させ、PBSで洗浄後蛍光顕微鏡で観察した。同時に以前我々が樹立したウサギ水晶体上皮株細胞(TOTL-86)<sup>8)</sup>を用いて同様の実験を行った。

### III 結 果

#### 1. 細胞の増殖および形態

培養細胞の初代から 2 代までに要した期間は 35 日であった。2 代細胞以後 23 代細胞までは分散後 confluent になるまでの期間（1 世代通過時間）は一定で、約 5 日であった。24 代細胞では 60 日要し、25 代細胞では 10 日要した。その後は、急に増殖速度が早まり、以後現在（約 100 代）までの 1 世代通過時間は約 3.5 日でほぼ均一であった（表 1）。初代、20 代、24 代、35 代、70 代細胞および TOTL-86 細胞の位相差顕微鏡写真を図 1 に示す。24 代細胞を除いて、すべて TOTL-86 細胞と同様に均一な敷石状の形態を示した。しかし、24 代細胞は不規則な

大型の細胞が多く見られた。初代培養細胞や 20 代細胞には、水晶体様小体が認められたが、24 代、35 代、70 代細胞には認められなかった。

#### 2. Western blotting 法

本実験で得られたモノクローナル抗体を用いたウサギのクリスタリンに対する western blotting 法の結果を図 2 に示す。モノクローナル抗体は  $\alpha$ -クリスタリンの分子量 20 kD のポリペプチドとのみ反応し、 $\beta$ -、 $\gamma$ -クリスタリンとの交叉反応は見られなかった。

#### 3. 間接蛍光抗体法

第 20 代の培養水晶体上皮細胞には、初代培養細胞とほぼ同様の  $\alpha$ -クリスタリンに対する特異蛍光が細胞質全体に認められた。第 24 代培養細胞では、特異蛍光が細胞

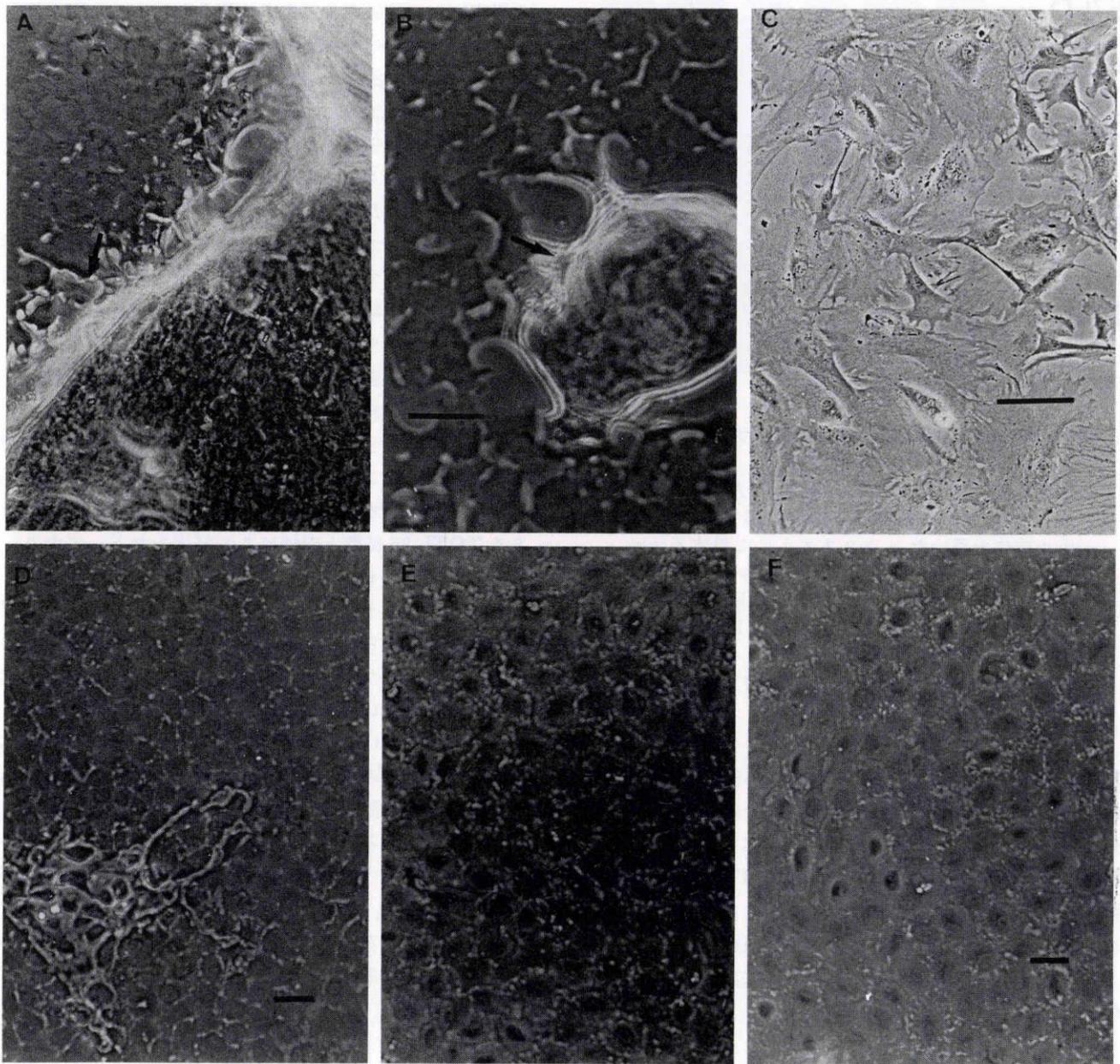


図 1 ウサギ培養水晶体上皮細胞の位相差顕微鏡写真。

A: 初代細胞, B: 第 20 代細胞, C: 第 24 代細胞, D: 第 35 代細胞, E: 第 70 代細胞, F: TOTL-86 細胞。  
矢印は水晶体様小体を示す。バーは 10  $\mu$ m

表1 培養水晶体上皮細胞の一世代通過日数の変化

細胞世代	n	一世代通過日数(日±標準偏差)
初代	1	34.0
2代	2	5.0
3代	2	5.0
10代	6	4.7±0.5
20代	6	4.7±0.5
24代	1	60
25代	2	10
35代	6	3.5±0.5
70代	6	3.5±0.5

n:サンプル数

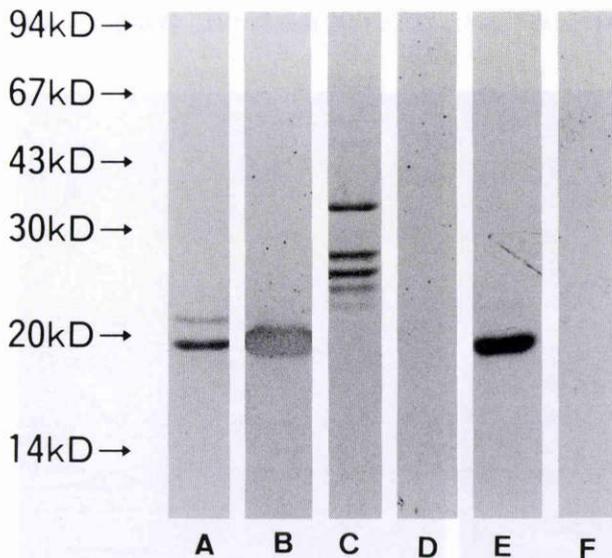


図2 Western blotting 法による抗ウサギ  $\alpha$ -クリスタリンモノクローナル抗体の分析。左端の数字はタンパクの分子量, lane A:ウサギ  $\alpha$ -クリスタリンの SDS 電気泳動, lane B:モノクローナル抗体を用いた  $\alpha$ -クリスタリンに対する western blotting, lane C: $\beta$ -クリスタリンの SDS 電気泳動, lane D:モノクローナル抗体を用いた  $\beta$ -クリスタリンに対する western blotting, lane E: $\gamma$ -クリスタリンの SDS 電気泳動, lane F:モノクローナル抗体を用いた  $\gamma$ -クリスタリンに対する western blotting.

質には存在せず、核周囲にのみ見られる細胞が出現してきた。第 35 代細胞や第 70 代細胞では、細胞質に特異蛍光が見られる細胞は消失しており、すべての細胞の核周囲にのみ特異蛍光は見られた。これは、TOTL-86 細胞の特徴に極めて類似していた(図 3)。 $\alpha$ -クリスタリンで予め吸収したモノクローナル抗体を一次抗体として用いたとき、すべての実験で細胞に特異蛍光は認められなかった。

#### IV 考 按

水晶体上皮細胞の初代培養細胞の特徴的な性質は、水晶体の構造タンパクであるクリスタリン生成能と水晶体

上皮細胞から分化して水晶体線維細胞群と考えられている水晶体様小体の形成である<sup>7)</sup>。水晶体上皮細胞の培養の過程で、これらの性質が消失することはよく経験することである。クリスタリン生成能に関しては、Venrooij ら<sup>11)</sup>は子牛水晶体上皮細胞は数週間の培養でクリスタリン生成能が停止したと報告している。また、水晶体様小体の消失は、Weistein ら<sup>11)</sup>が報告した自然形質転換で得られたウシ水晶体上皮細胞の株化細胞や SV<sub>40</sub> ウイルスで形質転換させたウシ水晶体上皮細胞で観察している。しかし、これら水晶体上皮細胞としての性質の変化が、培養のどの時期に生じたかを明確にした報告は我々の知る限りない。今回我々が培養したウサギ水晶体上皮細胞でも、培養初期には  $\alpha$ -クリスタリンに対する特異蛍光は細胞質全体で認められたが、継代を重ねると核周囲にのみ限定されて認められるように変化した。この理由は、 $\alpha$ -クリスタリンの生成が核周囲に限定されるようになったためか、 $\alpha$ -クリスタリンと親和性のあるタンパクが核表面に発現し  $\alpha$ -クリスタリンが引き寄せられた結果によると考えられるが、 $\alpha$ -クリスタリンの産生が停止し、核周囲に  $\alpha$ -クリスタリンと交叉性のある異なるタンパクが発現された可能性も否定できない。また、もう一つの分化の目安である水晶体様小体も継代培養により形成されなくなっており、本実験で培養したウサギ水晶体上皮細胞も継代培養とともにその性質が大きく変化していることが認められた。

げっし類の培養細胞は培養を継代する過程で増殖が一次停止し、その後、指数関数的に増殖が再開し不死化する<sup>12)13)</sup>ことが知られており、その増殖が停止している間に形質転換が起こると考えられている。本実験で我々が培養したウサギ水晶体上皮細胞も以前樹立した株細胞である TOTL-86 細胞と同様にこの経過をたどっており、その意味で今回も不死化に成功したものと思われる。この細胞のクリスタリン生成能の変化は、正に増殖停止期に一致して認められ、水晶体様小体の形成能の消失も同時期に認められた。したがって、ウサギ水晶体上皮細胞は形質転換に伴い本来の性質も変化することを示唆するものである。いい換えれば、クリスタリン生成や水晶体様小体形成などの、水晶体上皮細胞として特異性に関わる研究を培養細胞を用いて行うときは、形質転換する以前の細胞を用いる必要があることを示唆する。本研究から類推するならば、培養 20 代以前の細胞を用いることが妥当と思われる。今回の我々の結果からも、水晶体上皮細胞の培養細胞を研究材料として用いるとき、培養細胞の継代時期を明確に把握する必要があることが再認識された。

本論文の要旨は、第 96 回日本眼科学会総会(1992 年、横浜)で発表した。

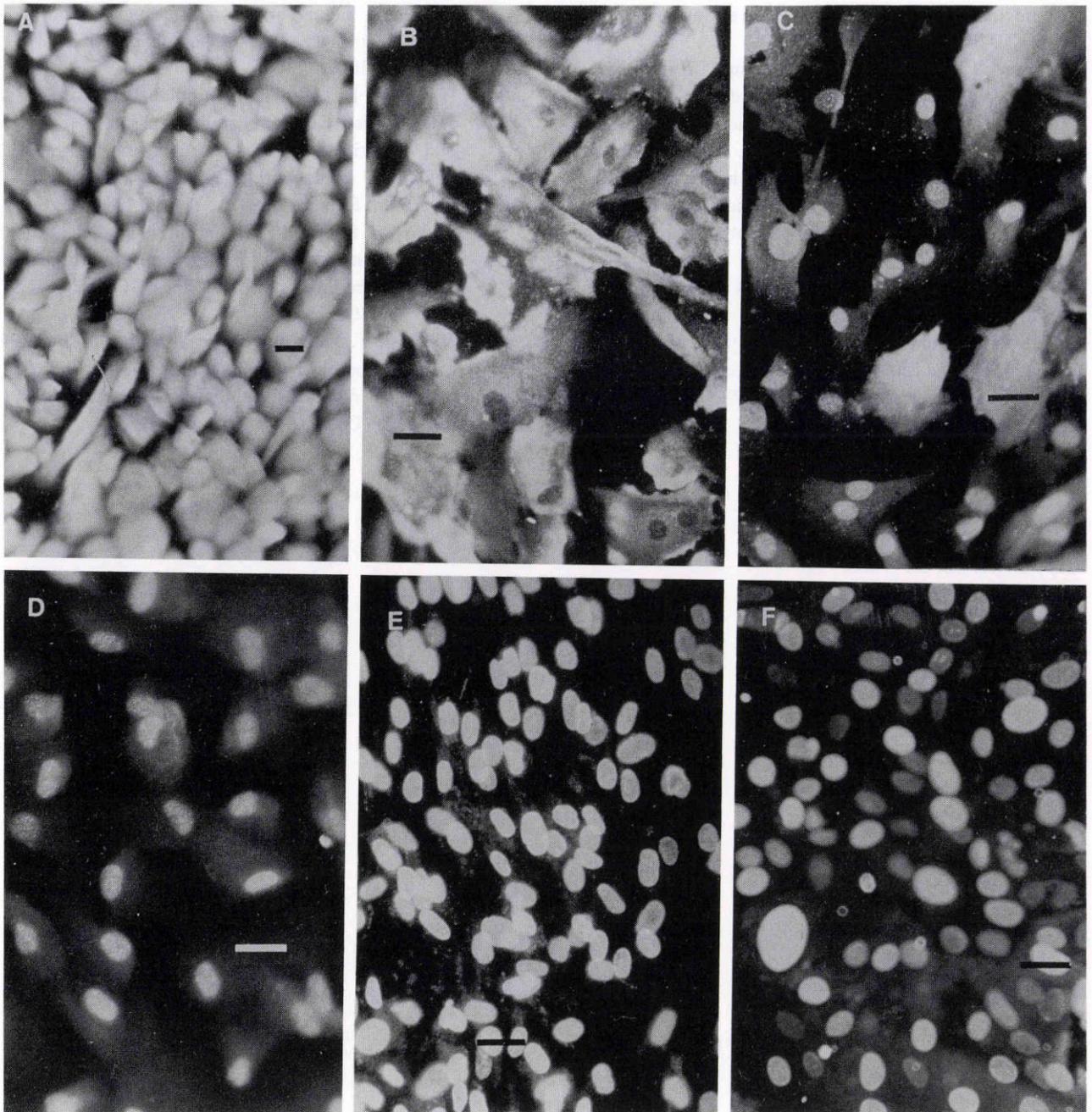


図3 抗ウサギ  $\alpha$ -クリスタリンモノクローナル抗体を用いた、水晶体上皮細胞に対する免疫蛍光写真。  
A: 初代細胞, B: 第20代細胞, C: 第24代細胞, D: 第35代細胞, E: 第70代細胞, F: TOTL-86細胞。  
バーは10  $\mu$ m

#### 文 献

- 1) Venrooij WJ, Groeneveld AA, Bloemendal H: Cultured calf lens epithelium. I. Methods of cultivation and characteristics of the cultures. *Exp Eye Res* 18: 517-526, 1974.
- 2) Reddan JR, Friedman TB, Mostafapour MK, Bondy RL, Surerland SH, McGee SJ, et al: Donor age influences the growth of rabbit lens epithelial cells *in vitro*. *Vision Res* 21: 11-23, 1981.
- 3) FitzGerald PG, Goodenough DA: Rat lens culture: MIP expression and domains of intercellular coupling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 755-771, 1986.
- 4) Cammarata PR, Smith JY: Colocalization of laminin and fibronectin in bovine lens epithelial cells *in vitro*. *In Vitro Cell Develop Biol* 23: 611-620, 1987.
- 5) Reddy VN, Lin LR, Arita T, Zigler JS, Huang QL: Crystallins and their synthesis in human lens epithelial cells in tissue culture. *Exp Eye Res* 47: 465-478, 1988.
- 6) Courtois Y, Simonneau L, Tassin J, Laurent MV, Malaise E: Spontaneous transformation of

- bovine lens epithelial cells. *Differentiation* 10 : 23—30, 1978.
- 7) **Russell P, Fukui HN, Tsunematsu Y, Huang FL, Kinoshita JH** : Tissue culture of lens epithelial cells from normal and Nakano mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16 : 243—246, 1977.
  - 8) **Sasabe T, Kishida K, Kiritoshi A, Uni A, Manabe R** : A newly established cell line of rabbit lens epithelium. *Jpn J Ophthalmol* 30 : 367—375, 1986.
  - 9) **Ramaekers FCS, Bloemendal H** : Cytoskeletal and Contractile structures in lens cell differentiation. In : Bloemendal H (Ed) : *Molecular and Cellular Biology of the Eye Lens*. John Wiley and Sons, New York, 85—136, 1981.
  - 10) **Mostafapour MK, Reddy VN** : Study on lens proteins. I. Subunit structure of beta crystallins of rabbit lens cortex. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17 : 660—666, 1978.
  - 11) **Weisntein BI, Schwartz J, Lonial H, Dominguez MO, Gordon GG, Hochstadt J, et al** : Normal and conditionally transformed bovine lens epithelial cell lines containing alpha- and gamma-crystallin. *Exp Eye Res* 34 : 71—81, 1982.
  - 12) **Todaro G, Green H** : Quantitative studies of the growth of mouse embryocells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 17 : 299—313, 1963.
  - 13) **Matsuya Y, Yamane I** : Serial culture of Syrian hamster fibroblasts in albumin fertilified medium and their regular development into established lines. *Exp Cell Res* 50 : 652—654, 1968.

