

遺伝性盲 (RCS) ラット網膜における S 抗原局在の生後変化と 網膜色素上皮細胞移植による保存

武田 宜之, 山口 克宏, 山田 桂, 玉井 信

東北大学医学部眼科学教室

要 約

網膜色素変性症の動物モデルとして知られている Royal College of Surgeons (RCS) ラットの網膜における S 抗原の局在の経時的変化を免疫組織化学染色法を用いて検討した。対照として、同日齢の Sprague-Dawley (SD) ラットを使用した。また、RCS ラット網膜に黒色家兎の網膜色素上皮細胞を移植し、その組織を同様の方法で検討した。対照として、非移植 RCS ラットおよび擬移植 RCS ラットを使用した。その結果、RCS ラットにおける S 抗原は網膜発育期の生後 2 日～22 日まで正常に発現するが、生後 30 日以降 S 抗原は急速に

減少し、網膜変性期には消失することが示された。家兎網膜色素上皮細胞移植の結果、異種網膜色素上皮細胞が RCS ラット網膜の変性を阻止し得ることがはじめて示された。移植網膜において S 抗原が保存されていることが免疫組織化学的に示され、移植網膜の機能性を示唆する知見であると思われた。(日眼会誌 98:551-557, 1994)

キーワード: S 抗原, Royal College of Surgeons ラット, 網膜変性, 網膜色素上皮細胞, 移植

S antigen in Retinas of Royal College of Surgeons rats: Time Course and Retinal Pigment Epithelium Transplant Study

Yoshiyuki Takeda, Katsuhiko Yamaguchi, Katsura Yamada and Makoto Tamai

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Tohoku University

Abstract

Retinas of Royal College of Surgeons (RCS) rats were investigated immunocytochemically for the distribution of S antigen prior to and during the retinal disease process. RCS retinas onto which retinal pigment epithelium (RPE) had been transplanted were also immunostained with antibody for S antigen. At P2, weak immunostaining for S antigen was seen in the neuroepithelium. At P22, the staining pattern outlined the entire photoreceptor layer. At P30, at the beginning of retinal degeneration, immunostaining for S antigen was considerably reduced in the degenerating photoreceptor outer segment. In the RCS retina at

P90, immunostaining for S antigen was completely lost. However, retinas with transplanted RPE showed preserved immunocytochemical staining for S antigen at this late stage. These results suggest a loss of production of S antigen in degenerated retinal tissue, and that RPE transplantation helps to preserve S antigen in the RCS rat retina. (J Jpn Ophthalmol Soc 98:551-557, 1994)

Key words: S antigen, Royal College of Surgeons rat, Retinal degeneration, Retinal pigment epithelium, Transplantation

I 緒 言

網膜可溶性抗原 (S 抗原) は網膜視細胞に局在する臓器特異性抗原であり、光情報変換機構の抑制蛋白質として

重要な役割を果たしており、網膜色素変性との関連が指摘されている。一方、Royal College of Surgeons (RCS) ラットは、常染色体劣性遺伝の網膜変性を起こし、網膜色素変性の動物モデルとして知られている^{1)~3)}。Li ら⁴⁾は

別刷請求先: 980 宮城県仙台市青葉区星陵町 1-1 東北大学医学部眼科学教室 武田 宜之

(平成4年12月16日受付, 平成6年2月3日改訂受理)

Reprint requests to: Yoshiyuki Takeda, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Tohoku University, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi-ken 980, Japan

(Received December, 1992 and accepted in revised form February 3, 1994)

健常網膜色素上皮 (RPE) 細胞を分離し, RCS ラットに移植すると網膜変性が阻止されることを報告した. Gaur⁵⁾は, 正常 Lons-Evans ラットと RCS ラットのオプシンと S 抗原の mRNA を Northern blotting 法により解析した. その結果, 正常ラットのオプシンおよび S 抗原の存在様式と異なり, 両 mRNA とも RCS ラットでは網膜変性ととともに減衰していくことが示された. 一方, 生後 17~19 日に正常ラットの RPE を移植された群では, 生後 109 日でもオプシンおよび S 抗原の mRNA の存在が確認され, 分子レベルでの RPE 移植の効果が確認された. 今回, 我々は RCS ラット網膜における S 抗原の経時的变化を検討した. さらに, 黒色家兎から採取した異種 RPE 細胞移植を施行し, 移植網膜における S 抗原の局在を免疫組織化学的に検討し, 興味ある知見を得たので報告する.

II 実験方法

1. 実験材料

網膜 S 抗原の局在を経時的に調べる実験動物として, 12 時間の明暗周期下に飼育された RCS ラットおよび対照として Sprague-Dawley (SD) ラットを使用した. 生後 2, 8, 22, 30, 90 日の SD ラットおよび RCS ラットに致死量のペントバルビタールナトリウムを腹腔内注射して屠殺し, 直ちに眼球を摘出した. Bouin 液で 16 時間固定後, パラフィンに包埋し 4 μm の切片を作成した.

2. RPE 細胞分離と移植手術

今回の研究では異種 RPE 細胞の効果を検討する目的で, donor を黒色家兎とし, そのメラニンを有する RPE 細胞を RCS ラットの網膜下腔に移植した. Donor の眼球を摘出後 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のゲンタマイシンを含む Hank's balanced salt solution (HBSS) 中で, 前眼部・水晶体・硝子体を除き 0.25% トリプシンを含む HBSS 中で約 20 分静置後, 神経網膜を慎重に剝離しピペッティングにより RPE を採取した. この RPE を 20% fetal calf serum を含む minimal essential medium に収集し, 3 分間遠沈 (800 rpm) した後カルシウム・マグネシウム非含有 HBSS 中に保存した.

移植手術は Li⁶⁾の方法を一部改変して応用した. Recipient である生後 24 日の RCS ラットをペントバルビタールナトリウム (ネンブタール[®]) で麻酔 (60 mg/kg), 硫酸アトロピン (0.4 mg/kg) 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, 眼球を下転し手術野を得た. 角膜輪部に近い部位で 2 本の渦状静脈の間に 0.5~1.0 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ハミルトンシリンジに装着した 32 gauge の針を用いて, donor cell suspension を約 2 μl (1×10^4 RPE cells) 移植した. 強膜切開創を 10-0 nylon で縫合し, 手術を終了した. 6 匹の RCS ラットの片眼に移植手術を行い, 片眼

は nongrafted control とした. 移植と全く同じ手術操作を施し, 2 μl の生理食塩水のみを網膜下腔に注入したものを擬手術群 (sham control) とした. 上記の RCS ラットを生後 90 日まで飼育し, 致死量のペントバルビタールナトリウムで屠殺後, 直ちに両眼球を摘出した. Bouin 液で 16 時間固定後パラフィンに包埋し, 4 μm の切片を作成した. 一部の切片はヘマトキシリン-エオジンで染色し観察した.

3. S 抗原に対する免疫組織化学法

免疫組織化学は, S 抗原に対するウサギポリクローナル抗体を用いて行った⁷⁾. はじめに western blotting 法による抗体の検討を行った. ラット眼球を摘出し, 網膜に質重量の 4 倍量の 3% SDS を含む PBS 溶液を加え可溶化し, 3,000 回転で 20 分間遠心した. 上清をサンプルとし, タンパク質濃度を Lowry 法⁸⁾で測定した. サンプルの 10 μg のタンパク質を SDS-ポリアクリドアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分析した (4.5% および 12% ゲル使用). SDS-PAGE で分離した網膜タンパク質は, Towbin⁹⁾の方法に従って電気泳動によりニトロセルロース膜に転写した. この膜を 3% ゼラチンで 60 分間ブロックし, 1/200 ウサギ抗 S 抗原抗体に室温で 60 分間反応させた. 0.05% Tween 20 を含む phosphate buffered saline (TW-PBS) で 10 分間, 3 回洗浄した. 次に 1/50 ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を室温で 60 分間反応させた. ニトロセルロース膜を TW-PBS 溶液で 10 分間ずつ 3 回洗浄後, 3,3'-diaminobenzidine (DAB) を含む発色液で発色させた.

免疫組織化学にあたり, はじめに切片を脱パラフィン後, 0.3% 過酸化水素溶液で 10 分間反応させ内在性ペルオキシダーゼの阻止処理を行い, さらに非特異的反応を除くために 20% ヤギ血清を 1 時間浸漬させた. 次いで



図1 Western blotting による抗体の検定. 48 kD に 1 本のバンドが認められる.

ン酸緩衝溶液で十分に洗浄し、4℃の湿箱中で一次抗体と16時間浸漬反応させた。この時点で一次抗体を除いたものを対照とした。リン酸緩衝溶液で洗浄後、ビオチン標識ヤギ抗ウサギIgG抗体と1時間浸漬反応させた。リン酸緩衝溶液で洗浄後、アビチン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体と2時間浸漬反応させた。次いで組織切片をトリス塩酸緩衝溶液で洗浄し、0.01% 過酸化水素加

DAB 溶液で5分間発色させた。リン酸緩衝溶液で反応を止め、組織切片をエタノールとキシレンで脱水透徹後、封入し観察した。

III 結 果

Western blottingの結果、48 kDの1本のバンドが検出され、本抗体の特異性が極めて高いことが示された(図

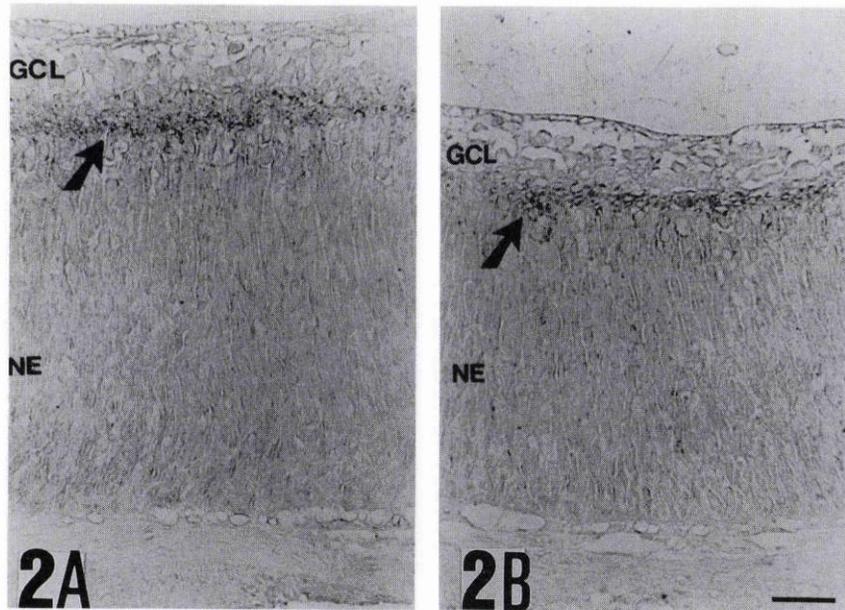


図2 生後2日目の Szrage-Dawley (SD) ラット (A) および Royal College of Surgeons (RCS) ラット網膜 (B)。

網膜の分化が未熟であり、網膜神経節細胞層(GCL)と神経外胚葉(NE)を認めるのみである。形成されつつある内網状層(矢印)にS抗原に対する弱い免疫染色が認められる。GCL: ganglion cell layer, NE: neuroepithelium, バーは30 μ m

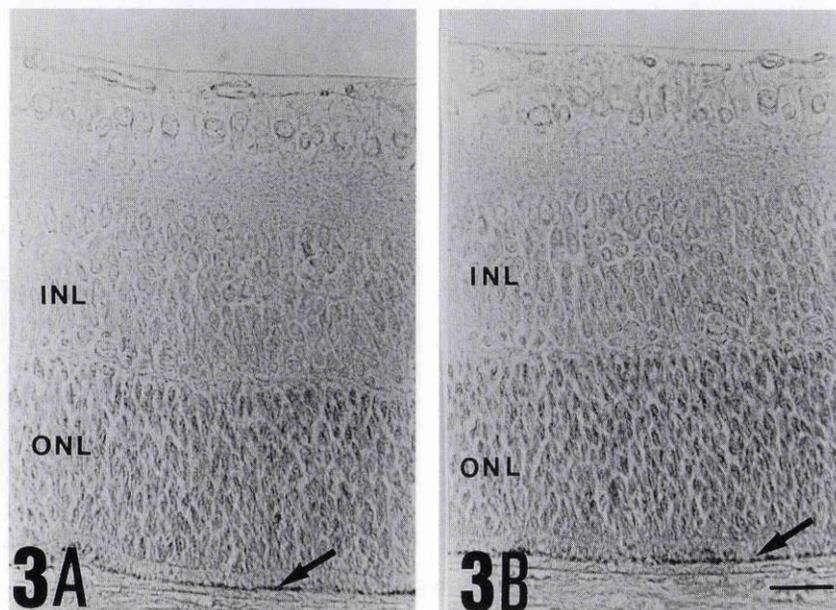


図3 生後8日目のSDラット(A)およびRCSラット網膜(B)。

網膜外顆粒層(ONL)と形成されつつある視細胞外節(矢印)にS抗原に対する免疫染色が認められる。INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer, バーは30 μ m

1).

生後2日目のSDおよびRCSラットでは網膜の分化が未熟であり、網膜神経節細胞層と神経外胚葉を認めるのみであったが、形成されつつある内網状層(矢印)にS抗原に対する弱い免疫染色が認められた(図2A, B). 生後8日目のSDおよびRCSラットでは、網膜外顆粒層に淡い免疫染色が形成されつつある視細胞外節(矢印)

に濃い免疫染色が認められた(図3A, B). 生後22日目のSDおよびRCSラットでは、網膜外顆粒層と完成した視細胞外節にS抗原に対する免疫染色が認められた(図4A, B). この時期までは、SDラットとRCSラットの間に免疫組織化学的な差は認められなかったが、生後30日目では両者に差が出現し、SDラットの網膜では形成された視細胞層に免疫染色が認められたが、RCSラット

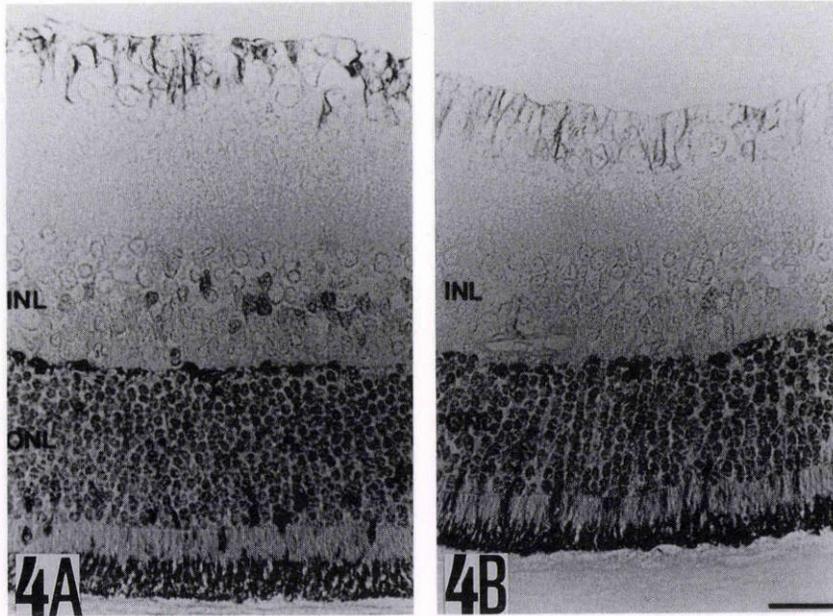


図4 生後22日目のSDラット(A)およびRCSラット網膜(B). 網膜外顆粒層(ONL)と完成した視細胞外節にS抗原に対する免疫染色が認められる. INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer. バーは30 μm

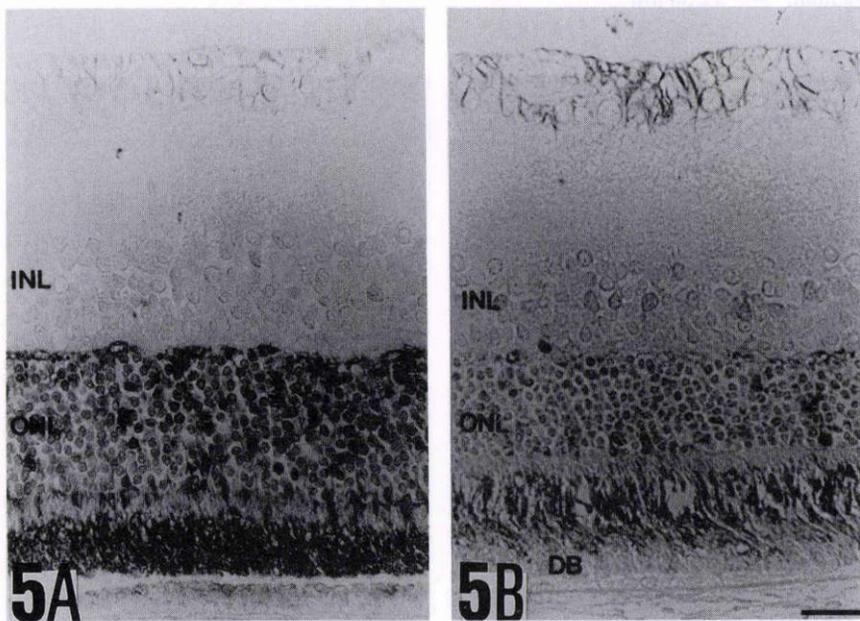


図5 生後30日目のSDラット網膜(A). 視細胞外節全体および網膜外顆粒層(ONL)にS抗原に対する免疫染色が認められる. 生後30日目のRCSラット網膜(B). 短縮した視細胞外節にS抗原に対する免疫染色が减弱して認められる. INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer, DB: debris zone. バーは30 μm

網膜では網膜外顆粒層と粗になった視細胞外節における免疫染色が減弱して認められるのみであった(図5A, B)。生後90日目のSDラットでは、網膜外顆粒層と視細胞外節に免疫染色が認められたが、網膜変性が完成している生後90日目のRCSラットでは免疫染色が完全に

消失していた(図6A, B)。

RPE移植眼のヘマトキシリン-エオジン染色切片では、外顆粒層は6層ほどに保たれており、メラニンを有する細胞が移植部位を中心として網膜下腔に存在していたが、その周囲にはリンパ球やマクロファージなど免疫

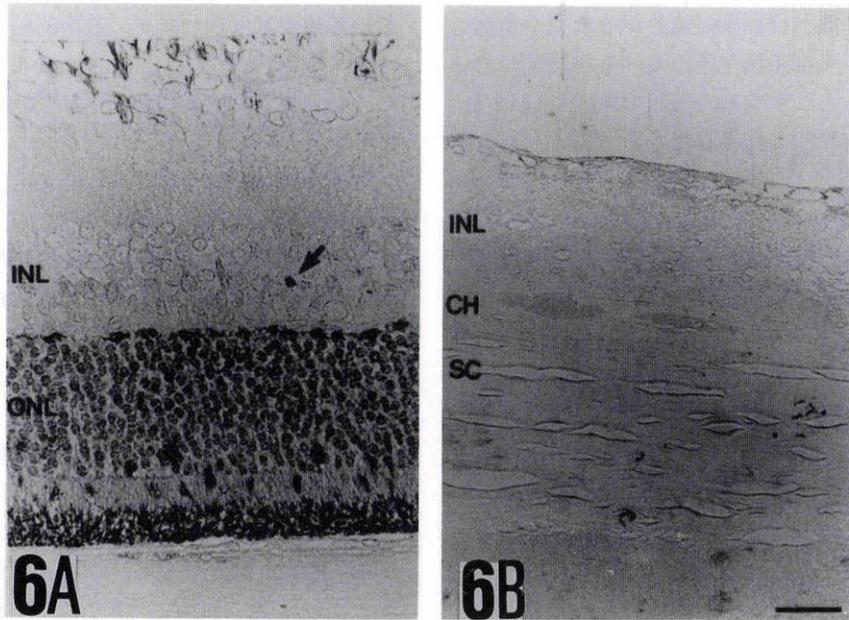


図6 生後90日目のSDラット網膜(A)。

網膜外顆粒層(ONL)と視細胞外節にS抗原に対する免疫染色が認められる。異所性視細胞(ectopic photoreceptor cell)が示されている(矢印)。

生後90日目のRCSラット網膜(B)。

網膜変性が完成しておりS抗原に対する免疫染色は完全に消失している。INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer, CH: choroid, SC: sclera。バーは30 μ m

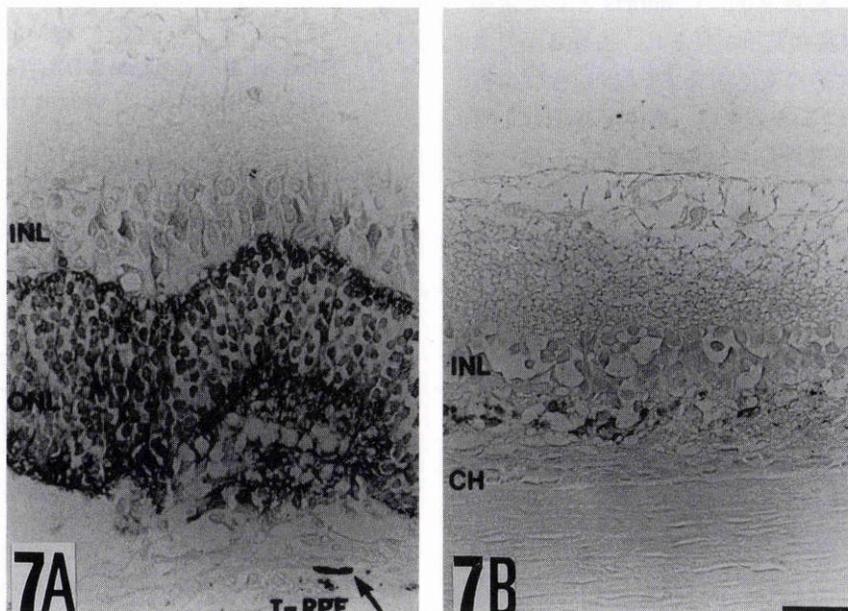


図7 黒色家兎の網膜色素上皮(T-RPE)を移植した生後90日のRCSラット網膜(A)。

網膜色素上皮細胞移植により変性が阻止された部分にS抗原の染色が認められる。

生理食塩水を注入した生後90日のRCSラット網膜(B)。

S抗原組織の染色は見られない。T-RPE: transplanted retinal pigment epithelium, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer, CH: choroid。バーは30 μ m

反応にかかわる細胞は認められなかった。非手術眼および擬手術眼では、外顆粒層は0～1層でほぼ完全な変性に陥っていた。抗S抗原抗体を用いた免疫組織化学の結果、RPE(矢印)移植を行った網膜ではS抗原に対する免疫染色が生後90日目でも保存されており、移植PRE細胞周囲を中心とした広い範囲に認められた(図7A)。非手術眼および擬手術眼では組織の染色がほぼ完全に消失していた(図7B)。免疫組織化学における対照切片では染色が見られなかったことから、上記の染色部位はS抗原に対する抗体が特異的に結合したものと判定した。

IV 考 按

S抗原は、免疫学的分野で実験的自己免疫疾患惹起物質として研究されており、視覚生理学分野で暗順応した網膜外節から分離されたアレステンと呼ばれる48 kDの蛋白質と同一であることが証明されている。すなわち、S抗原は光情報変換機構の抑制蛋白質であることが解明され、近年その機能が注目されている。ロドプシンは光活性化されたのち、ロドプシンキナーゼにより数分以内にリン酸化ロドプシンに変化するが、S抗原はこのリン酸化ロドプシンと結合することにより、トランスジェンシンとロドプシンの結合を阻害する働きがあると考えられている¹⁰⁾。以上のことから、S抗原は網膜色素変性との関係も示唆されており、網膜色素変性患者の血清においてS抗原の抗体価が上昇しているという報告もある¹¹⁾。

我々はS抗原の局在の変化をRCSラットで検討した。RCSラットは生後約20日まで正常に発育するが、この時点から網膜下腔に組織学的にはdebrisとして認められる視細胞外節の異常な蓄積が見られ、生後2か月までに網膜視細胞が二次的に変性消失する^{1)~3)}。今回の検討でRCSラットにおけるS抗原は、網膜発育期は正常に発現するものの網膜変性期には消失することが示され、Gaurら⁵⁾の報告に従うものであった。

次に、今回我々は家兎のRPEをRCSラットの網膜に移植することで、網膜の変性が阻止されるという結果を得た。この所見は、Liら⁶⁾の同種RPE移植の報告と相関するものであった。移植によって変性が阻止されるメカニズムの詳細は現在のところ不明であるが、これまでの報告によれば、移植したRPEが視細胞外節を取り込んでいる所見が認められRPEとしての機能を行うこと、移植されたRPEがgrowth factorを分泌し、視細胞の生存を賦活化することなどがそのメカニズムとして推察される⁴⁾¹²⁾¹³⁾。今回得られた組織では移植したRPEに対する明らかな拒絶反応は組織学的には認められなかった。異種間のRPE移植では拒絶反応が起きにくく^{14)~16)}、その理由として網膜下腔に血管が存在しないことやBruch膜損傷の軽度なことなどが考えられる。実験的網膜移植に関する研究が本格的に始められたのは最近のこ

とであり、現在はRPE細胞移植^{14)~16)}、幼若網膜全層移植^{17)~20)}、網膜視細胞移植²¹⁾などのアプローチで研究が発展しつつある。これらのモデルは、網膜の分化・成長およびその再生や神経回路網の再構築などの基礎医学的興味の解析に有用であると考えられる。このうち、RPE移植に関しては、現在までサル、家兎およびminature pigでの移植が試みられたが、技術的困難が強調されて報告されていた。しかし、Yamaguchiら²²⁾は硝子体手術システムを応用したRPE移植の方法を確立し良好な結果を得ている。

RPE細胞は、眼杯の外板から発生しBruch膜上に一層に配列する細胞層を形成する。この細胞は、感覚網膜とくに視細胞にとってきわめて重要な役割を担っている。RPE細胞に異常が存在すると、視細胞をはじめとする感覚網膜に機能障害が生じることはよく知られており、異常な網膜色素上皮を正常なRPEに置換することが可能であれば、神経網膜の機能が回復することが期待される。これまでRCSラットの網膜変性の原因はRPEの視細胞外節の貪食能に異常があることが知られており^{23)~25)}、RCSラットにおける網膜変性が健常RPE移植により阻止されることは、この仮説を裏付ける知見であると思われる。今回の実験では、移植網膜においてS抗原が保存されていたが、これは移植網膜の機能性を示唆する知見であると考えられる。今後、種々視細胞関連物質を同様に検討する意義があると思われる。

抗S抗原抗体を御提供下さいました東京医科大学眼科学教室臼井正彦教授に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Bourne MC, Campbell DA, Tansley K: Hereditary degeneration of the rat retina. *Br J Ophthalmol* 22: 613-623, 1938.
- 2) Dowling JE, Sidman RL: Inherited retinal dystrophy in the rat. *J Cell Biol* 14: 73-109, 1962.
- 3) LaVail MM, Sidman RL, Gerhardt CO: Congenic strains of RCS rats with inherited retinal dystrophy. *J Hered* 66: 242-244, 1975.
- 4) Li L, Turner JE: Inherited retinal dystrophy in the RCS rat: Prevention of photoreceptor degeneration by pigment epithelial cell transplantation. *Exp Eye Res* 47: 911-917, 1988.
- 5) Gaur V, Agawal N, Li L, Turner JE: Maintenance of opsin and S antigen gene expression in RCS dystrophic rats following RPE transplantation. *Exp Eye Res* 54: 91-101, 1992.
- 6) 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.
- 7) 坂井潤一, 高野 繁, 高村健太郎, 臼井正彦: 免疫酵素抗体法(ELISA)による微量抗S抗体の測定について. *眼紀* 34: 1350-1356, 1983.

- 8) **Lowley OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Pandall RJ**: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
- 9) **Towbin H, Staehelin T, Gordon J**: Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide to nitrocellulose sheets: Procedure and applications. *Proc Natl Acad Sci* 76: 4350-4365, 1970.
- 10) 篠原利道, 津田正彦, 山本邦比古: 情報交換に關与する諸蛋白質のクローニングと予想構造. *蛋白質 核酸 酵素* 34: 537-545, 1989.
- 11) **Garcia CDH, Calderon PAG**: Evolution time and longitudinal studies of the anti S antigen antibody titers in retinitis pigmentosa. *Retina* 9: 237-241, 1989.
- 12) **Faktorovich 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.
- 13) **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.
- 14) **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.
- 15) **Gouras P, Flood MT, Kjeldbye H, 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.
- 16) **Yamaguchi K, Yamaguchi K, Richard WY, 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 Inc, Boca Raton, 349-357, 1991.
- 17) **Del Cerro M, Gash DM, Rao GN, Notter MF, Wiegand SJ, Sathi S, et al**: Retinal transplants into the anterior chamber of the rat eye. *Neurosci* 21: 707-723, 1987.
- 18) **Aramant R, Seiler M, Turner JE**: Donor age influences on the success of retinal transplants to adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 498-503, 1987.
- 19) **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.
- 20) **Turner JE, Seiler M, Aramant R, Blair JR**: Embryonic retinal grafts transplanted into the lesioned adult retina. *Prog Brain Res* 78: 131-140, 1988.
- 21) **Silverman MS, Hughes SE**: Transplantation of photoreceptors to light-damaged retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 1684-1690, 1989.
- 22) **Yamaguchi K, Yamaguchi K, Young RW, Gaur VP, Turner JE**: Viteroretinal surgical technique for transplanting retinal pigment epithelium in rabbit retina. *Jpn J Ophthalmol* 36: 142-150, 1992.
- 23) **Mullen RJ, Lavail MM**: Inherited retinal dystrophy: Primary defect in pigment epithelium determined with experimental rat chimeras. *Science* 192: 799-801, 1976.
- 24) **Bok D, Hall MO**: The role of the pigment epithelium in the etiology of inherited retinal dystrophy in the rat. *J Cell Biol* 49: 664-682, 1971.
- 25) **Tamai M, O'Brien PJ**: Retinal dystrophy in the RCS rat: *In vivo* and *in vitro* studies of phagocytic action of the pigment epithelium on the shed rod outer segments. *Exp Eye Res* 28: 399-411, 1979.