

## 培養鶏胚網膜色素上皮細胞の RNA 量に対する ドーパおよび酸素濃度の影響

神田 貴之, 明尾 潔, 村上 晶, 唐沢 容子, 沖坂 重邦

防衛医科大学校眼科学教室

### 要 約

ドーパによる網膜色素上皮細胞の DNA 合成と RNA 合成への影響を知る目的で, 培養鶏胚網膜色素上皮細胞内 DNA と RNA の定量を行った。250  $\mu\text{M}$  のドーパを投与した培養鶏胚網膜色素上皮細胞の RNA/DNA 比は低下していたが, 酸素濃度を 20~10% に変化させることにより RNA/DNA 比の低下は抑制されていた。一方, 10% 酸素濃度で 100  $\mu\text{M}$  のドーパを投与した場合には, RNA/DNA 比は上昇していた。250  $\mu\text{M}$  のドーパは培養鶏胚網膜色素上皮細胞内の RNA 量を低下させていた

が, 酸素濃度を低くすることによりその低下は改善していた。しかしながら, 100  $\mu\text{M}$  のドーパは 10% 酸素濃度では網膜色素上皮細胞をむしろ刺激し, その結果, RNA 合成を促進すると思われた。(日眼会誌 99 : 1123-1126, 1995)

キーワード: 網膜色素上皮細胞, ドーパ, 酸素, RNA, DNA

### The Effects of Dopa and Oxygen on RNA Concentrations in Cultured Chick Embryonal Retinal Pigment Epithelial Cells

Takayuki Kanda, Kiyoshi Akeo, Akira Murakami,  
Yoko Karasawa and Shigekuni Okisaka

Department of Ophthalmology, National Defense Medical College

### Abstract

We measured RNA and DNA concentrations in cultured chick embryonal retinal pigment epithelial cells to investigate the effects of dopa and oxygen on DNA and RNA synthesis. RNA/DNA ratios were decreased by addition of 250  $\mu\text{M}$  dopa. Decrease of RNA/DNA ratios was suppressed when the oxygen concentrations were reduced from 20% to 10%. Incubation with medium containing 100  $\mu\text{M}$  dopa increased RNA/DNA ratios in 10% oxygen. Exposure of retinal pigment epithelial cells to 250  $\mu\text{M}$

dopa caused the decrease of RNA concentrations in the retinal pigment epithelial cells, which was ameliorated by lowering oxygen concentrations. However, the addition of 100  $\mu\text{M}$  dopa in 10% oxygen stimulated retinal pigment epithelial cells and seemed to increase RNA concentrations. (J Jpn Ophthalmol Soc 99 : 1123-1126, 1995)

Key words: Retinal pigment epithelial cells, Dopa, Oxygen, RNA, DNA

### I 緒 言

網膜内に極く微量含まれ, 神経伝達やメラニン合成に関与しているドーパは, チロシナーゼの存在下で DNA ポリメラーゼ活性の阻害により DNA 合成を障害するとされており<sup>1)</sup>, 皮膚メラノーマ細胞に対して毒性を発揮することが知られている<sup>2)</sup>. その機序として, ドーパから

メラニンが合成される過程において生じるメラニン前駆物質や活性酸素の影響が考えられている<sup>3)</sup>. 最近, 明尾ら<sup>4)</sup>は flow cytometry を用いて細胞内の DNA 量を測定することにより培養ウシ網膜色素上皮細胞の細胞周期を検討し, ドーパが細胞周期の S 期 (DNA 合成期) の早期に影響を与え, DNA 合成を障害することを明らかにした. 今回, 我々はドーパが培養鶏胚網膜色素上皮細胞の

別刷請求先: 359 埼玉県所沢市並木 3-2 防衛医科大学校眼科学教室 神田 貴之  
(平成 6 年 12 月 28 日受付, 平成 7 年 6 月 7 日改訂受理)

Reprint requests to: Takayuki Kanda, M.D. Department of Ophthalmology, National Defense Medical College. 3-2 Namiki, Tokorozawa-shi, Saitama-ken 359, Japan.

(Received December 28, 1994 and accepted in revised form June 7, 1995)

RNA 合成能に対しても影響を及ぼすかどうか、酸素濃度を変化させて細胞内 RNA 量と DNA 量の定量を行い、興味ある知見を得たのでここに報告する。

## II 実験材料および方法

### 1. 鶏胚網膜色素上皮細胞の培養

孵卵後 8～9 日経過した鶏胚眼球の前眼部を切除し、硝子体を摘出後、実体顕微鏡下で神経網膜を剝離した。0.05% EDTA (同仁化学) に 30 分間浸透し、眼杯から網膜色素上皮層を剝離し、0.25% トリプシン (DIFCO Laboratories, Detroit, USA) 処理の後、15% のウシ胎児血清 (FBS) (CSL Limited, Victoria, Australia), 1% の 5,000 U/ml penicillin G-5,000 U/ml Streptomycin 混合液 (PCG-SM), COSTA MESA, UK) を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (GIBCO Co, NY, USA) を加えて、径 60 mm の培養皿 (岩城硝子) に 5% CO<sub>2</sub>, 湿度 100%, 37°C で培養した。培養皿は各系列毎に 3 皿を使用した。コンフルエントとなった 3 代継代培養鶏胚網膜色素上皮細胞を、培養液 (15% FBS と 1% PCG-SM を含む phenol red free DMEM) にドーパ (SIGMA CHEMICAL CO, ST. LOUIS, USA) (100 μM, 250 μM) を加え、窒素ガスを混合することにより培養器の酸素濃度を 10%, 20% と変化させて培養し、以下の実験に用いた。

### 2. 細胞数の計測と RNA および DNA の定量

ドーパ投与後 24 時間経過した培養網膜色素上皮細胞を 0.25% トリプシン処理により採取し、細胞数を Particle counter (ERMA) を用いて測定した。採取した細胞から Schmidt-Thannhauser-Schneider 変法<sup>5)</sup>を用いて、試料を水酸化カリウムで 18 時間アルカリ分解し RNA 分画を抽出、次いで過塩素酸を加え 15 分間過熱分解し DNA 分画を抽出した。抽出した DNA, DNA 分画について分光光度計 (UV-2200, 島津製作所) を用いて紫外部 (λ 260 nm) 吸光度を測定した。得られた吸光度から RNA と DNA 量を RNA 1 μg/ml の λ を 0.022, DNA 1 μg/ml の λ を 0.020<sup>6)</sup> とすることにより算出し、単位 DNA 量当たりの RNA 量 (RNA/DNA 比) を比較した。得られた結果について、2 標本 t 検定および二元分散分析法により有意差検定を行った。

## III 結果

### 1. 細胞数に対するドーパおよび酸素濃度の影響

250 μM のドーパを投与した場合には 20% および 10% 酸素濃度のいずれでも培養網膜色素上皮細胞の細胞数は減少していたが、20% 酸素濃度と比べ 10% 酸素濃度では培養網膜色素上皮細胞の細胞数の減少は有意に抑制されていた (2 標本 t 検定;  $p < 0.05$ ) (図 1)。二元配置分散分析法による検定では、ドーパ濃度の変化は細胞数に有意な影響を示したが ( $p < 0.00001$ )、酸素濃度の変

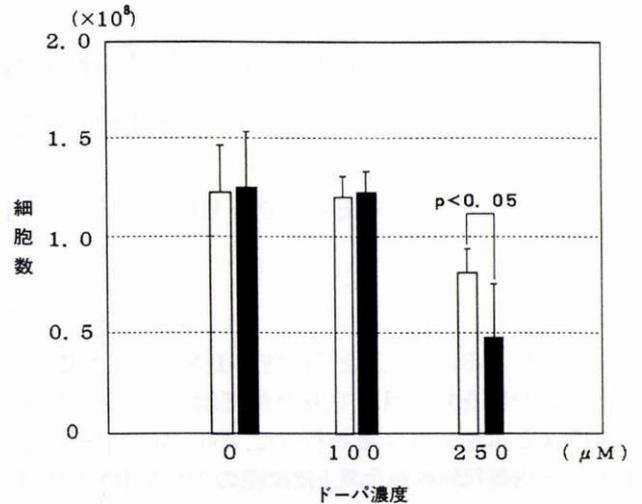


図 1 培養鶏胚網膜色素上皮の細胞数。

250 μM のドーパを 24 時間投与した場合には、酸素濃度にかかわらず細胞数は減少していたが、20% 酸素と比べ 10% 酸素濃度では細胞数の減少は有意に抑制されていた。□: 10% 酸素 ■: 20% 酸素

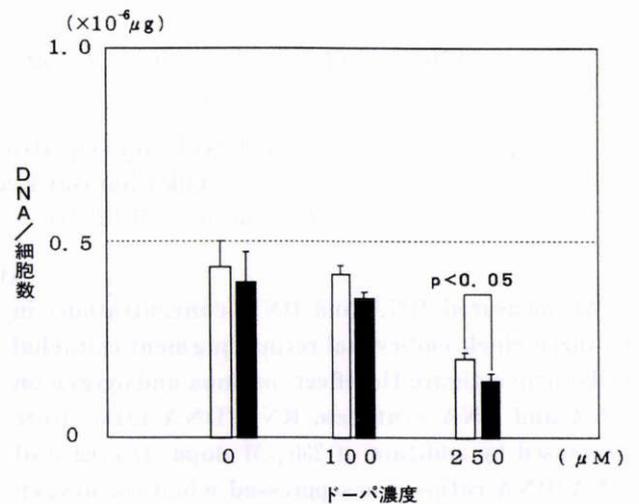


図 2 培養鶏胚網膜色素上皮細胞内の DNA 量。

250 μM のドーパを 24 時間投与した場合には、酸素濃度にかかわらず細胞数当たりの DNA 量は低下していたが、20% 酸素と比べ 10% 酸素濃度では DNA 量の低下は有意に抑制されていた (2 標本 t 検定;  $p < 0.05$ ) (図 2)。100 μM ドーパ投与では 10% 酸素濃度で培養した網膜色素上皮細胞においては、対照群に比べ培養網膜色素上皮細胞数当たりの RNA 量の有意な増加を認めた (2 標本 t 検定;  $p < 0.01$ )。250

化は細胞数に有意な影響を示さなかった。

### 2. RNA/DNA 比に対するドーパおよび酸素濃度の影響

250 μM ドーパ投与では 20% および 10% 酸素濃度でのいずれにおいても培養網膜色素上皮細胞数当たりの DNA 量の低下を認めたが、20% 酸素濃度と比べ 10% 酸素濃度では DNA 量の低下が有意に抑制されていた (2 標本 t 検定;  $p < 0.05$ ) (図 2)。100 μM ドーパ投与では 10% 酸素濃度で培養した網膜色素上皮細胞においては、対照群に比べ培養網膜色素上皮細胞数当たりの RNA 量の有意な増加を認めた (2 標本 t 検定;  $p < 0.01$ )。250

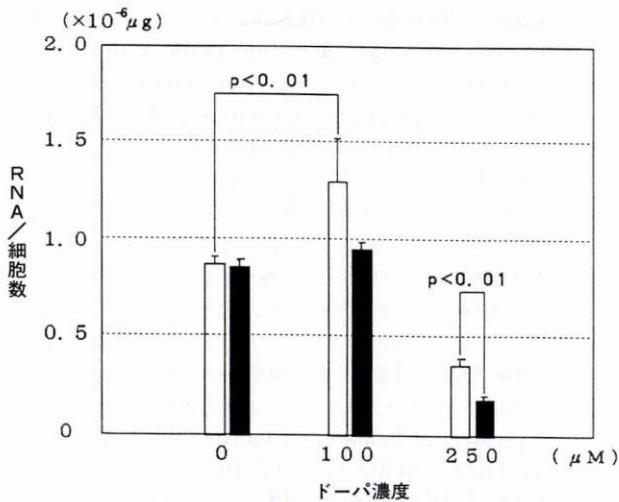


図3 培養鶏胚網膜色素上皮細胞内の RNA 量.

100 μM ドーパを 24 時間投与した場合には酸素濃度にかかわらず細胞数当たりの RNA 量は対照群に比べ増加を認め、10% 酸素濃度下で培養したものは 20% 酸素濃度に比べ RNA 量が有意に増加していた。250 μM ドーパ投与では酸素濃度にかかわらず RNA 量の低下を認めたが、20% 酸素に比べ 10% 酸素濃度では RNA 量の低下が有意に抑制されていた。□：10% 酸素 ■：20% 酸素

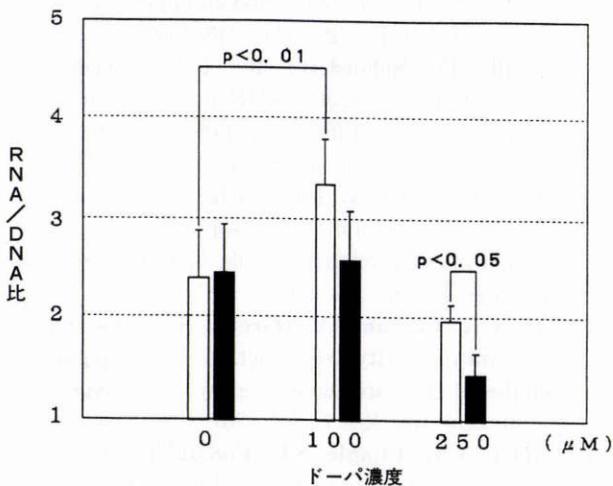


図4 培養鶏胚網膜色素上皮細胞の RNA/DNA 比.

100 μM ドーパを 24 時間投与した場合には 10% 酸素濃度下で培養した網膜色素上皮細胞においては、対照群に比べ細胞内 RNA/DNA 比の有意な増加を認めた。250 μM ドーパ投与では酸素濃度にかかわらず RNA/DNA 比の低下を認めたが、20% 酸素に比べ 10% 酸素濃度では RNA/DNA 比の低下が有意に抑制されていた。□：10% 酸素 ■：20% 酸素

μM ドーパ投与では 20% および 10% 酸素濃度でのいずれにおいても培養網膜色素上皮細胞の RNA 量の低下を認めたが、20% 酸素濃度に比べ 10% 酸素濃度では RNA 量の低下は有意に抑制されていた(2 標本 t 検定;  $p < 0.01$ ) (図 3)。また、100 μM ドーパ投与では 10% 酸素濃

度で培養した網膜色素上皮細胞において、対照群に比べ細胞内 RNA/DNA 比の有意な増加を認めた(2 標本 t 検定;  $p < 0.01$ )。250 μM ドーパ投与では 20% および 10% 酸素濃度でのいずれにおいても培養網膜色素上皮細胞の RNA/DNA 比の低下を認めたが、20% 酸素濃度に比べ 10% 酸素濃度では培養網膜色素上皮細胞の RNA/DNA 比の低下が有意に抑制されていた(2 標本 t 検定;  $p < 0.05$ ) (図 4)。二元配置分散分析法による検定では、ドーパ濃度の変化は RNA/DNA 比に有意な影響を示したが( $p < 0.001$ )、酸素濃度の変化は RNA/DNA 比に有意な影響を示さなかった。

#### IV 考 按

ドーパによる DNA 合成の阻害は 1979 年にラットリンパ球細胞で、初めて Wick<sup>7)</sup>により報告され、0.5 mM のドーパが G<sub>1</sub>期(DNA 合成準備期)で細胞周期を停止させることが示された。その後、1989 年に Kable<sup>8)</sup>は HeLa 細胞と皮膚メラノーマ細胞を用いた flow cytometry による研究で、高濃度(5 mM)のドーパを投与した場合は G<sub>1</sub>期、低濃度(1 mM)のドーパを投与した場合は S 期で細胞周期を停止させることを報告している。今回、細胞周期、すなわち細胞分裂をコントロールする DNA へのドーパの影響に対して、蛋白合成を司る RNA にはドーパはどのような影響を与えるか生化学的に検討した。

高濃度の 250 μM ドーパ投与では RNA/DNA 比の低下が著明であり、ドーパは 250 μM の濃度では DNA のみならず、細胞内の RNA にも影響を与えることが観察された。三島<sup>9)</sup>は鶏胚の腹腔内に注入されたドーパは、網膜色素上皮細胞の Golgi 装置に取り込まれた後、tubular channel を通ってメラニン合成の場である premelanosome や melanosome に運ばれることを観察しており、ドーパがメラニン合成に関与していることをすでに報告している。本研究においてもドーパは酸素濃度によらず細胞活動を抑制する方向に働いているが、RNA/DNA 比が低下していることから、細胞分裂を司る DNA の障害に先行して蛋白合成を司る RNA の障害が生じている可能性が強く、ドーパによる RNA 量減少の本態としては RNA 自体の直接破壊、もしくは DNA からの RNA 転写過程に対するドーパの影響などが考えられる。

一方、100 μM のドーパは RNA/DNA 比を対照群に比べ高くしており、10% 酸素濃度では有意な差となっていた。低濃度のドーパが細胞の代謝を刺激する可能性のあることを示した報告としては、明尾<sup>10)</sup>が培養ブタ網膜色素上皮細胞に 50 μM のドーパを 20% 酸素で投与したところ、対照群に比べ細胞増殖が増強することを認めている。また、Sovilla<sup>11)</sup>は器官培養された家兎網膜で cyclic AMP の濃度がドーパを投与することにより濃度

依存性に増強されることを示し、50  $\mu$ M で最大になるとしている。今回の実験結果でも、ドーパが細胞の代謝を刺激する可能性を示唆していると思われる。

ドーパがメラニンへと変化する際にどのような機序で網膜色素上皮細胞に影響を与えるかという点については、明尾らが培養ブタ網膜色素上皮細胞<sup>10)</sup>や培養ウシ網膜色素上皮細胞<sup>12)</sup>を用いて明らかにしている。明尾ら<sup>10)12)</sup>はスーパーオキシド・ディスムターゼやカタラーゼあるいは低酸素状態により、培養網膜色素上皮細胞の細胞増殖に対するドーパの毒性が抑制されたことから、ドーパからのメラニン合成過程において生じた活性酸素やメラニン前駆物質がその毒性の原因であるとした。また、低酸素状態ではスーパーオキシド・ディスムターゼ活性も上昇することも報告<sup>13)</sup>している。網膜色素上皮細胞は脈絡膜血管から支配を受けているため、酸素濃度の変化により影響を受けやすい環境下であり、生体内網膜色素上皮細胞における酸素濃度は10%とされている<sup>14)</sup>。今回の実験の結果、ドーパ投与により低下したRNA/DNA比は、酸素濃度を低くすることにより改善したことから、網膜色素上皮細胞におけるリボゾームによる蛋白合成も、高濃度の酸素でドーパが自動酸化されることによって障害される可能性があることが判明した。

本論文の要旨は平成5年6月17日、第97回日本眼科学会総会(札幌市)および平成6年4月21日、第98回日本眼科学会総会(横浜市)で講演を行った。

#### 文 献

- 1) Wick MM: Levodopa and dopamine analogs: As DNA polymerase inhibitors and antitumor agents in human melanoma. *Cancer Res* 40: 1414—1418, 1980.
- 2) Wick MM, Byers L, Frei E III: L-dopa; Selective toxicity for melanoma cells *in vitro*. *Science* 197: 468, 1977.
- 3) Hochstein P: Futile redox cycling: Implications for oxygen radical toxicity. *Fundamental Applied Toxicology* 3: 215—217, 1983.
- 4) Akeo K, Tanaka Y, Okisaka S: A comparison between melanotic and amelanotic retinal pigment epithelial cells *in vitro* concerning the effects of L-dopa and oxygen on cell cycle. *Pigment Cell Res* 7: 145—151, 1994.
- 5) 水野重樹: 核酸の一般的分離・定量法。初版, 瓜谷郁三, 他(編): 生物学実験法2. 学会出版センター, 東京, 19—56, 1969.
- 6) 水野重樹: 核酸の一般的分離・定量法。初版, 瓜谷郁三, 他(編): 生物学実験法2. 学会出版センター, 東京, 67—78, 1969.
- 7) Wick MM: Levodopa and dopamine analogs: Melanoma precursors as antitumor agents in experimental human and murine leukemia. *Cancer Treat Rep* 63: 991—997, 1979.
- 8) Kable EPW, Parsons PG: Melanin synthesis and the action of L-dopa and 3,4-dihydroxybenzylamine in human melanoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 23: 1—7, 1989.
- 9) Mishima H, Hasebe H, Fujita H: Melanogenesis in the retinal pigment epithelial cells of the chick embryo. Dopa-reaction and electron microscopic autoradiography of <sup>3</sup>H-dopa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 403—411, 1978.
- 10) Akeo K, Ebenstein DB, Dorey CK: Dopa and oxygen inhibit proliferation of retinal pigment epithelial cells, fibroblasts and endothelial cells *in vitro*. *Exp Eye Res* 49: 335—346, 1989.
- 11) Sovilla JY, Schorderet M: L-dopa mediated accumulation of cyclic AMP in isolated rabbit retina *in vitro*. Effects of light and/or pharmacological factors. *Life Sic* 31: 2081—2092, 1982.
- 12) Akeo K, Ueno N, Dorey CK: The effect of oxygen on melanin precursors released from retinal pigment epithelial cells *in vitro*. *Pigment Cell Res* 5: 379—386, 1992.
- 13) Akeo K, Curran SA, Dorey CK: Superoxide dismutase activity and growth of retinal pigment epithelial cells are suppressed by 20% oxygen *in vitro*. *Curr Eye Res* 7: 961—967, 1988.
- 14) Alder VA, Clingle SJ, Constable IJ: The retinal oxygen profile in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 30—36, 1983.