

培養ラット網膜色素上皮細胞の一酸化窒素合成について

古川真理子¹⁾, 岩城 正佳¹⁾, 荻野 誠周¹⁾, 劉 静¹⁾, 西田 祥藏¹⁾, 万代 道子²⁾¹⁾愛知医科大学眼科学教室, ²⁾京都大学医学部眼科学教室

要 約

培養ラット網膜色素上皮細胞 (RPE) を用い、一酸化窒素 (NO) の産生と一酸化窒素合成酵素 (NOS) について調べた。RPE は生後7~10日のラットから採取され、10% ウシ胎児血清を含む DMEM 培養液中で培養した。培養液中の NO₂⁻濃度はグリース反応を用いて調べた。NOS 活性は反応産物である³H シトルリン量で測定した。RPE の mRNA 分画に逆転写酵素を用いたポリメラーゼチェーン反応 (RT-PCR) を用い、遺伝子産物の解析を行った。RPE はサイトカインや細菌内毒素による刺激を加えると培養液中に NO の酸化物 NO₂⁻が蓄積され、NO を産生することが判明した。インターフェロン γ (IFN-γ) とネズミチフス菌内毒素 (LPS) の組み合わせ刺激で NO₂⁻の産生量は最大となり、この産生はデキサメタゾンやニトロアルギニンによって阻害された。ラッ

ト平滑筋誘導型一酸化窒素合成酵素の DNA 配列をプライマーとして、IFN-γ と LPS による刺激を与えた RPE の mRNA 分画の RT-PCR を行うと、相当する大きさの DNA フラグメントが得られた。刺激を与えた RPE 粗抽出液は 270 pmol/min/mg の一酸化窒素合成酵素活性を示した。これらの結果から、培養ラット RPE は誘導型の一酸化窒素合成酵素により NO を産生することが判明した。産生された NO は眼内の炎症過程に何らかの機能を担っている可能性が考えられた。(日眼会誌 99: 541-545, 1995)

キーワード: ラット網膜色素上皮細胞, 誘導型一酸化窒素合成酵素, インターフェロン γ, 細菌内毒素, グリース反応, 遺伝子発現

Induction and Properties of Nitric Oxide Synthase in Rat Retinal Pigment Epithelial Cells in Culture

Mariko Furukawa¹⁾, Masayoshi Iwaki¹⁾, Nobuchika Ogino¹⁾, Jing Liu¹⁾, Shozo Nishida¹⁾ and Michiko Mandai²⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Aichi Medical University²⁾Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyoto University

Abstract

We investigated the production of nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS) by rat retinal pigment epithelial cells (RPE) in culture. Methods: RPE was isolated from the eyes of 7~10 day-old rats and cultured in Dulbecco's modified Eagle medium with 10% fetal calf serum. NO₂⁻ concentration in the culture medium was determined with the Griess reaction. NOS was assayed by measuring ³H citrulline as the reaction product. RT-PCR was performed on the isolated RNA fractions from RPE. Results: Rat RPE produced NOS with the combined stimulation of the bacterial endotoxin and cytokines including interferon gamma. PCR experiments showed that stimulated RPE expressed a gene product corresponding to inducible-type NOS. The

enzyme required arginine, NADPH, and tetrahydrobiopterin for the reaction. The specific activity of the crude RPE extract was approximately 270 pmol/min/mg. Conclusion: Like bovine RPE, rat RPE produced NOS by the immunological stimulation. Induced NOS and the product NO may play important roles in inflammation of the eye. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 541-545, 1995)

Key words: Rat retinal pigment epithelial cells, Inducible nitric oxide synthase, Interferon-gamma, Bacterial endotoxin, Griess reaction, Gene expression

別刷請求先: 480-11 愛知県愛知郡長久手町岩作字雁又 21 愛知医科大学眼科学教室 古川真理子
(平成6年10月24日受付, 平成6年12月10日改訂受理)

Reprint requests to: Mariko Furukawa, M.D. Department of Ophthalmology, Aichi Medical University, Nagakutecho, Aichi-gun, Aichi-ken 480-11, Japan

(Received October 24, 1994 and accepted in revised form December 10, 1994)

I 緒 言

一酸化窒素(NO)は、ガス状のフリーラジカルである。この低分子物質は血管内皮由来の血管拡張因子の本体であることが判明して以来、細胞内や細胞間の情報伝達や細胞毒性にかかわる物質として種々の生理学的、病理学的機能を有することが判明し興味を集めている。NOは細胞内で一酸化窒素合成酵素(nitric oxide synthase, NOS)によりアミノ酸アルギニンから合成される。NOSには細胞質内に常在する構成型酵素(constitutive NOS, cNOS)と、種々の刺激を受けることで合成される誘導型酵素(inducible NOS, iNOS)の2種類が存在する¹⁾²⁾。cNOSは内皮細胞、ある種の神経細胞、副腎などに存在し、カルシウム依存性であり、血管の拡張や神経伝達に関与する¹⁾。iNOSはマクロファージ、平滑筋、内皮細胞などで細菌内毒素(LPS)や種々のサイトカインにより誘導される¹⁾²⁾。iNOSはカルシウム低依存性であり、炎症や感染に際し、NOを合成して生体防御などの生物学的機能を担うことが知られている³⁾。眼内でのNOやNOSの存在や機能について、最近2,3の報告が行われた。ウシ網膜でcNOSが機能していること⁴⁾、ウシ網膜色素上皮(RPE)でインターフェロン γ (interferon gamma, IFN- γ)とLPSの刺激によりNOの産生が誘導されること⁵⁾、また、我々のグループによりラットのエンドトキシン誘導ぶどう膜炎(EIU)でiNOSが関与することが示された⁶⁾。

今回、我々はラットのRPEを用い、誘導刺激により生産されるNOを測定するとともに、iNOSの遺伝子発現について検討し、RPEでNO, NOSの機能についても考察したので報告する。

II 実験方法

1. 材 料

ラットはLong Evans系の新生仔を用いた。コラゲナーゼはWorthington, ヒアルロニダーゼ, デキサメタゾン(dexamethasone)およびニトロアルギニン(N^G-nitro-L-arginine, NA)はSigma, トリプシンはDifco, Salmonella typhimurium細菌内毒素(lipopolysaccharide, LPS), 牛胎児血清, Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)はGibco, ヒトリコンビナントインターロイキン1 β (IL-1 β)とヒトリコンビナントtumor necrotizing factor α (TNF- α)はGenentech, ラットトリコンビナントIFN- γ はCiba-Geigy, またtetrahydrobiopterine (BH₄)はDr Schircks Laboratory (Jona, スイス)から購入した。L [2,3³H] アルギニン1塩酸塩(1,336 GBq/mmol)はNENから手に入れた。他のすべての試薬は手に入る最高純度のものを用いた。

2. ラットRPEの採取と培養

実験は、すべて「動物の保護及び管理に関する法律」

に従って施行した。ラットRPEはMayersonら⁷⁾の方法に準じて初代培養を行った。生後7~10日のLong Evans新生児ラットから眼球を摘出しpH7.0のbalanced salt solution (BSS)中、0.05%コラゲナーゼ, 0.005%ヒアルロニダーゼ37°C, 60分間処理, 続いてpH8.0のBSS中で0.1%トリプシンで37°C, 60分間消化した。前眼部, 硝子体, 脈絡膜を除去後, RPEを網膜からシート状に剝離し, BSSで洗浄後, さらに0.1%トリプシンで37°C, 2.5分間消化し細胞を単離した。採取した細胞は5×10⁴個/mlの濃度で培養皿にまき, 10%ウシ胎児血清を含むDMEM中で5%CO₂を含む培養器内で37°Cで約10~14日間サブコンフルエント状態になるまで培養した。

3. RPEの刺激とNO₂⁻の測定

NO産生量はその安定酸化物の亜硝酸イオン(NO₂⁻)として測定した⁸⁾。96穴培養皿で培養したラットRPEに, ラットIFN- γ ヒトIL-1 β , ヒトTNF- α , LPSをいくつかの組み合わせで培養液中に混入することで刺激した。また, ニトロアルギニン, デキサメタゾンのNO₂⁻産生阻害効果を調べた。培養液中のNO₂⁻はグリース反応(Griess reaction, 1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethlenediamine水溶液(1:1)を試料と同量加え, 室温で10分反応させ, 540nmの吸光度を分光光度計で測定)⁹⁾で刺激後168時間まで経時的に定量を行った。定量は培養液に希釈した亜硝酸ナトリウム(NaNO₂)をスタンダードとした。

4. ポリメラーゼチェーン反応(PCR)による研究

サブコンフルエントに達した60mm培養皿3枚分のRPE(約10⁷細胞)をIFN- γ (100 U/ml), LPS(10 μ g/ml)で6時間刺激した。全RNAの調製はグアニジンチオシアネート液を用いた方法¹⁰⁾で行った。細胞を4Mグアニジンチオシアネート(25mMシュウ酸緩衝液pH7.5, 0.5%ザルコシル, 0.1Mメルカプトエタノールを含む)処理, 次いで酸性フェノール処理, エタノールによる沈殿で全RNAを抽出した(収量約30 μ g)。メッセンジャーRNA(mRNA)は全RNAを材料にオリゴdTビーズ(Oligodex, TAKARA)を用いて精製し(収量約200 ng), この抽出したmRNAを鋳型にして逆転写酵素で相補鎖DNA(cDNA)を合成した¹¹⁾。無刺激のRPEを対照とし, PCRはcDNA20ngを鋳型としてマニュアルどおりに行った。サーマルサイクラー(Cetus社)を用いた。プライマーとしては, ラット血管平滑筋のiNOSのcDNA塩基配列¹²⁾をもとに以下の二組を合成した。

プライマー1 F CCGTTCGATGTCCGAAGCAA
 プライマー1 R AGGAAGTAGGTGAGGGCTTG
 (2058-2506 449塩基)
 プライマー2 F CTGCAGCACTTGGATCAATA
 プライマー2 R CTGGCTCTTGAGCTGGAAGA
 (2840-3371 532塩基)

増幅反応の条件は、熱変性 94°C/1 分間、アニーリング 67°C/2 分間、DNA の合成 72°C/2 分間として 40 サイクルの増幅を行った。PCR 産物は 1% アガロースゲル電気泳動で分析した。

5. NOS 活性の測定

60 mm 培養皿でサブコンフルエント状態まで培養した RPE を IFN- γ (100 U/ml) と LPS (10 μ g/ml) で 8 時間刺激し、10 mM, HEPES buffer (pH 7.2) に懸濁、超音波粉碎 (3 秒間, Microson, Heat System) 後に遠沈 (12,000 g, 30 分間, 4°C) し、上清を粗酵素液とした。NOS 活性は Bredt と Synder の方法により酵素反応によるアルギニンのシトルリンへの変換で測定した¹³⁾。アッセイの組成は、HEPES buffer (pH 7.2) 40 mM, NADPH 0.8 mM, EGTA 0.8 mM, CaCl₂ 1 mM, DTT 0.8 mM, Calmodulin 8 μ g, BH₄ 0.08 mM, L-バリン 0.8 mM, L-アルギニン (³H 0.1 μ Ci) 32 μ M, 粗酵素液 0.1~0.5 mg 蛋白, 全量 50 μ l である。25°C, 10~40 分間反応させ、300 μ l の 4 mM EDTA, 40 mM HEPES で反応を停止し、反応液を Dowex 50 \times 4 の小カラムに通過させ、回収される³H シトルリンの放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。蛋白質は Lowry ら¹⁴⁾の方法で測定した。

III 結 果

1. ラット RPE の培養

5 \times 10⁴個/ml にまいた細胞が培養皿上でコンフルエント状態になるまでには 10~14 日を要した。位相差顕微鏡による観察では採取時培養液中で浮遊していた細胞が培養皿上に固着するのに約 4~5 日を要し、その際に双核の細胞がいくつかみられていたが、時間の経過とともにその数が増加し、コンフルエント状態ではほとんどの RPE は双核で、核周囲の細胞質に色素顆粒を有する均一な単層の細胞となることが確認された。図 1 に培養 14 日目の RPE の顕微鏡写真を示す。

2. RPE による NO の産生

ウシ RPE の報告⁵⁾の NO 産生を刺激する物質と濃度を参考にして、方法に示したサイトカイン類と LPS を培養液に加えた。この刺激条件下で刺激 50 時間後に培養液中に出現した NO₂⁻濃度を図 2 に示す。無刺激の対照では時間経過に伴った NO₂⁻産生は殆ど認められず、また、LPS, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β (それぞれ 1,000 U, 150 U, 100 U/ml) による単独刺激でも NO₂⁻産生は殆ど認められなかった。IFN- γ と LPS, IFN- γ と TNF- α を組み合わせた刺激では、培養液中に NO₂⁻産生 (12~16 μ M/50 時間) を示した。IFN- γ と LPS の組み合わせ刺激による NO₂⁻産生は L-アルギニンの誘導体である NA により約 50%, ステロイドホルモンの一つであるデキサメタゾンにより約 60% 抑制された。図 3 は IFN- γ と LPS の単独刺激、および両者の組み合わせで刺激を行った場合の

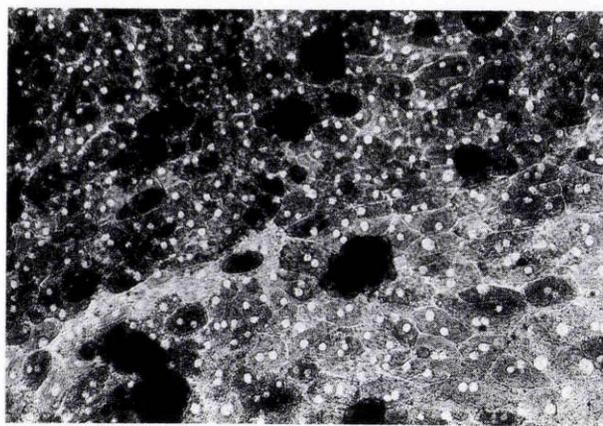


図 1 コンフルエント状態の培養ラット網膜色素上皮細胞 (\times 100)。

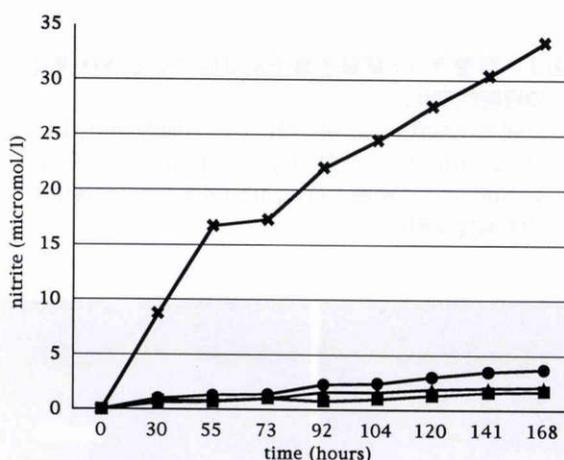


図 2 培養ラット網膜色素上皮細胞による NO₂⁻の産生の刺激条件。

種々のサイトカインと細菌内毒素 (LPS) を単独ないしは組み合わせて培養細胞を刺激し、グリース反応で測定した 50 時間後の NO₂⁻の産生量を示す。インターフェロン γ (IFN- γ , 100 U/ml), tumor necrotizing factor α (TNF α , 150 U/ml), LPS (10 μ g/ml), インターロイキン 1 β (IL-1 β , 100 U/ml), デキサメタゾン (1 μ M), N⁶-nitro-L-arginine (NA, 1 mM) およびその組み合わせで刺激した。対照は無刺激を示す。

黒四角：対照，黒丸：インターフェロン，黒三角：リポ多糖類，罰印：インターフェロン+リポ多糖類

NO₂⁻産生の経時的变化を示す。NO₂⁻濃度は 160 時間以上まで蓄積が認められ、30 μ M 以上まで増加した。

3. PCR の実験

IFN- γ と LPS により刺激した RPE から抽出した mRNA を、鋳型として行った PCR の産物をアガロース電気泳動した (図 4)。ラット平滑筋 iNOS の cDNA 塩基配列をもとにしたプライマー 1 と 2 でそれぞれ予想される 499 塩基対、532 塩基対の分子量に一致した DNA のシングルバンドが確認された。また、無刺激の対照ではバンドが確認されなかった。

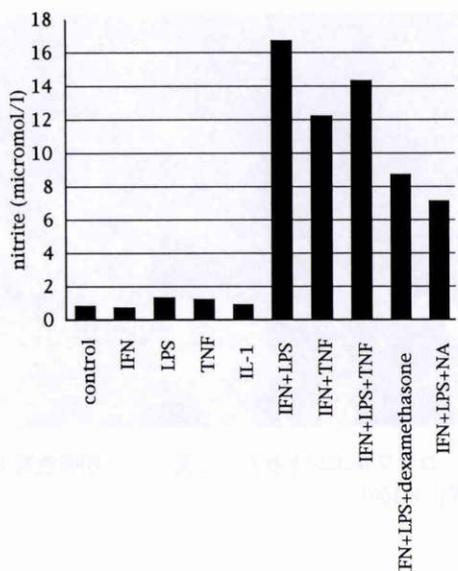


図3 培養ラット網膜色素上皮細胞によるNO₂産生の経時的变化。

無刺激の対照 (control), IFN- γ (100 U/ml), LPS (10 μ g/ml) および IFN- γ (100 U/ml)+LPS (10 μ g/ml) による刺激を行い, 165 時間まで培養液中の NO₂濃度を測定した。

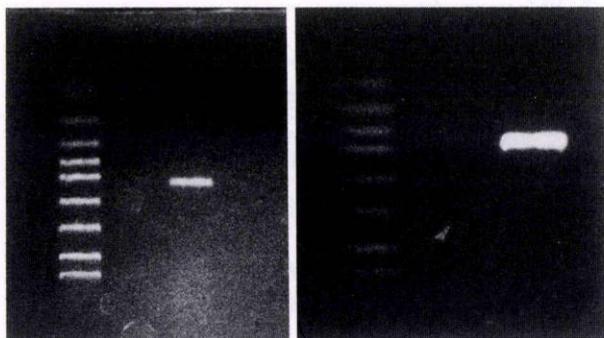


図4 ポリメラーゼチェーン反応 (PCR) 産物のアガロース・ゲルを用いた電気泳動。

プライマー1およびプライマー2を用いたPCRの結果, 449塩基対, 532塩基対の位置にシングルバンドが検出された。それぞれの右側は分子量マーカー(上から2,000, 1,500, 1,000, 700, 500, 400, 300, 200塩基対数)を泳動したもの。

4. NOS 酵素活性

刺激した RPE の粗抽出液は, アッセイ条件下 ³H アルギニンのシトルリンへの変換を触媒した。反応は 20 分間程度直線的な活性を示した(図5)。粗酵素液の比活性は 270 pmol/min/mg 蛋白であった。アッセイ系から NADPH を除いたものは殆ど活性を示さず, 無刺激の RPE の抽出液にも NOS 活性が検出できなかった。

IV 考 按

Mayerson ら⁷⁾, Edwards¹⁵⁾は, ラット RPE は *in vivo*, *in vitro* とも生後 2 週間までに双核細胞となる特徴を有

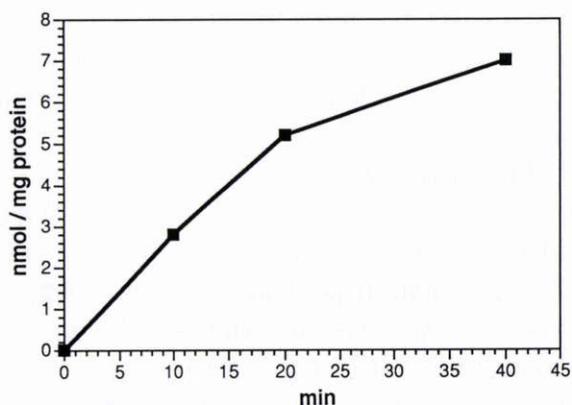


図5 一酸化窒素合成酵素 (NOS) 活性測定。

酵素反応は約 20 分直線的に進行し, 粗酵素液の比活性は約 270 pmol/min/mg 蛋白であった。

すると報告している。図1のように, 我々の初代培養ラット RPE は双核で色素顆粒を含んだ均一な単層の細胞としてみられ, 他細胞の混入のない純粋な RPE であったと考えられる。Mayerson ら⁷⁾はラット RPE の倍加時間は 3.5 日を要し, 他の細胞の倍加時間が 1 日か 2 日以内であるのと比べると倍の時間を必要とし, 継代培養では色素顆粒の減少, 細胞の平坦化などの形態的变化が現れるのみならず, 細胞増加率も減少するとしている。ラット RPE の初代培養したものを継代培養を試みたが, 発育が不良であり, 形態的にも色素顆粒の消失など初代培養と異なる像が観察された。したがって, 実験にはすべて初代培養細胞を用いた。

近年, マクロファージ以外の多くの組織や細胞でも NO の誘導的産生が報告されている。例えば, ラットグリア細胞は LPS による刺激で¹⁶⁾, ラット腎メセンギウム細胞は IL-1 β あるいは TNF- α で¹⁷⁾, ヒト肝細胞は IL-1 β , TNF- α , IFN- γ および LPS の複合刺激で¹⁸⁾NO の産生, および NOS の誘導が報告された。また, RPE では, ウシ RPE (IFN- γ +LPS)⁵⁾, ヒト RPE (IFN- γ +IL-1 β)¹⁹⁾で NO の誘導的産生が報告された。我々は, ラット RPE で IFN- γ と LPS の組み合わせにより NO 産生が誘導されることを見出し, この点ではウシ RPE に類似した性質を示すことがわかった。

NO の産生が NA とデキサメタゾンにより阻害されるという結果は, RPE でも NO はアルギニン経路を通じて iNOS により合成されることを示している。実際に iNOS が細胞内で合成されていることを示すため, PCR の実験および NOS 酵素活性の測定を行った。2 種類のプライマーを用いた PCR の結果は, それぞれ予想される単一の DNA フラグメントを得た。このことは, ラット平滑筋細胞 iNOS と同一ないしは非常に近似した酵素が RPE においても誘導されることを示している。ラット RPE の超音波破碎上清は NADPH 依存性にアルギニンのシトルリンへの変換を触媒し, 比活性 270 pmol/

min/mg 蛋白を得た。これは、ラット RPE でも他の細胞の iNOS と同レベルの酵素活性が誘導されることを示していた。

最近、我々のグループによりラットのエンドトキシン誘発眼内炎 (EIU) に iNOS が関与すること、しかも、NOS 阻害剤 NA により炎症そのものの程度がおさえられたことが示された⁶⁾。このことは、NO が眼内炎のような特殊な炎症にも重要な役割を持つことを示唆している。これらのこと、また他の細胞での NO の役割、さらに RPE の特殊な機能をふまえて RPE の iNOS と産生する NO の機能の可能性を以下のように考察した。マクロファージなどにみられるように、侵入した病原体の刺激により直接、あるいは免疫・炎症反応により RPE から NO が産生され、これが病原体を攻撃する機能がある可能性がある。これは IFN- γ の抗ウイルス作用とも合致する。さらに、産生された NO は炎症のカスケード因子の一つとして他の細胞への情報伝達機能に関連している可能性がある。また、オートクラインあるいはヘテロクラインに細胞増殖を調節する、細胞毒として働いている可能性があり、いわゆるアポトーシスとも関係する。RPE の特殊な作用として貪食作用に関与する可能性が考えられる。しかし、これらの検証には誘導や阻害剤などの *in vitro*, *in vivo* の詳細な実験を必要とするのはいうまでもない。眼内の病変を考える場合、NO は既に無視できない因子となっていると考えられる。

文 献

- 1) **Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA**: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109–142, 1991.
- 2) **Moncada S, Higgs EA**: Endogenous nitric oxide: Physiology, pathology, and clinical relevance. *European J Clinical Invest* 21: 361–374, 1991.
- 3) **Iida S, Ohshima S, Oguchi S**: Identification of inducible calmodulin-dependent nitric oxide synthase in the liver of rats. *J Biol Chem* 267: 25383–25388, 1992.
- 4) **Venturini CM, Knowles RG, Palmer RMJ, Moncada S**: Synthesis of nitric oxide in the bovine retina. *Biochem Biophys Res Commun* 80: 920–925, 1991.
- 5) **Goureau O, Lepoivre M, Courtois Y**: Lipopolysaccharide and cytokines induce a macrophage-type of nitric oxide synthase in bovine retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 186: 854–859, 1992.
- 6) **Mandai M, Yoshimura N, Yoshida M, Iwaki M, Honda Y**: The role of nitric oxide synthase in endotoxin-induced uveitis: Effects of N^o-nitro L-arginine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3673–3680, 1994.
- 7) **Mayerson PL, Hall MO, Clark V, Abrams T**: An improved method for isolation and culture of rat retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 591–609, 1985.
- 8) **一守康史, 深堀正美, 山下 拓, 中澤博江**: 活性酸素と NO の相互作用. *Journal of Active Oxygen and Free Radical* 4: 478–485, 1993.
- 9) **Green LC, Wagner DA, Glagowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR**: Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochem* 126: 131–138, 1982.
- 10) *Current Protocols in Molecular Biology* Ausbel FM, et al (Eds) unit 4.2 John Wiley, Sons Inc, New York, 1992.
- 11) **Moriyama T, Murphy HR, Martin BM, Perez AG**: Detection of specific mRNA in single nephron segments by use of the polymerase chain reaction. *Am J Physiol* 258: 1470–1474, 1990.
- 12) **Nunokawa Y, Ishida N, Tanaka S**: Cloning of inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 191: 89–94, 1993.
- 13) **Bredt DS, Snyder SH**: Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci* 86: 9030–9033, 1989.
- 14) **Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ**: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275, 1951.
- 15) **Edwards RB**: Culture of rat retinal pigment epithelium. *In Vitro* 13: 301–304, 1977.
- 16) **Galea E, Feinstein DL, Reis DJL**: Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10945–10949, 1992.
- 17) **Pfeilschifter J, Schwarzenbach H**: Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate cGMP formation in rat renal mesangial cells. *FEBS Lett* 273: 185–187, 1990.
- 18) **Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, Di-Silvio M, Wang SC, Nakayama DJ, et al**: Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3941–3945, 1993.
- 19) **Gaureau O, Hicks D, Courtois Y**: Human retinal pigmented epithelial cells produce oxide in response to cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 198: 120–126, 1994.