

白色マウスの連続光照射網膜変性に対するレチノイン酸 応答性成長因子ミッドカインの効果

鶴木 一彦¹⁾, 大久保明子¹⁾, 有村 仁志¹⁾, 上原 文行¹⁾
松村 寿子²⁾, 門松 健治²⁾, 村松 喬²⁾

¹⁾鹿児島大学医学部眼科学教室, ²⁾名古屋大学医学部第一生化学教室

要 約

連続光照射による実験的網膜症に対する、レチノイン酸応答性成長因子ミッドカインの変性阻止・遅延効果を検討した。白色マウスの左眼の硝子体にミッドカインを、右眼(対照眼)の硝子体にコントロール溶液を注入したあと、7日間、14日間あるいは21日間にわたって連続的に光照射しながら飼養した。連続7日間の光照射では、ミッドカイン注入眼はほぼ正常の網膜を示したが、対照眼は視細胞外節の短縮や外顆粒層の厚さの減少を軽度ながら示した。連続14日間の光照射では、対照眼では視細胞の障害が次第に顕著になった。そして、21日間の連続的光照射では、視細胞の外節と内節は消失し、外顆粒層はわずかに同定できる程度であった。一方、ミッドカイン

で処置した眼では、14日間以上の連側光照射によって視細胞の障害は明らかであったが、対照眼と比較すると障害の程度はきわだって小さかった。外顆粒層の厚さを測定して障害の程度を評価した結果は、上記の観察に一致した。この実験結果は、光網膜障害さらには網膜変性に対して、少なくとも実験的検討の段階では、ミッドカインが有望な保護効果をもつことを示している。(日眼会誌 99:636-641, 1995)

キーワード: マウス, ミッドカイン, 光障害, 網膜変性, 変性遅延

Beneficial Effect of a Retinoic Acid Responsive Gene Product, Midkine, on Constant Light-induced Retinal Damage in Albino Mice

Kazuhiko Unoki¹⁾, Akiko Okubo¹⁾, Hitoshi Arimura¹⁾, Fumiyuki Uehara¹⁾,
Hisako Muramatsu²⁾, Kenji Kadomatsu²⁾ and Takashi Muramatsu²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine

²⁾Department of Biochemistry, Nagoya University School of Medicine

Abstract

We studied the protective effects of midkine, a growth factor produced by a retinoic acid responsive gene, on constant light-induced retinal damage in albino BALB/C adult mice. Two days before exposure to constant light, midkine was injected into the vitreous of the left eye and a phosphate buffer saline into the right eye (control eyes). After 7 days of constant light, control eyes exhibited shortening of the photoreceptor outer segments and decreased thickness of the outer nuclear layer, whereas in midkine-treated eyes photoreceptor cells were virtually intact. Although midkine-treated

eyes also showed photoreceptor damage after longer light exposure of up to 21 days, the damage was significantly less than in control eyes. Measurement of the thickness of the outer nuclear layer showed the protective effect of intravitreal midkine on the constant light-induced retinal damage. These findings suggest that midkine is a potential agent for the prevention of photoreceptor degeneration. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:636-641, 1995)

Key words: Mouse, Midkine, Light damage, Retinal degeneration, Rescue

別刷請求先: 〒890 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘8-35-1 鹿児島大学医学部眼科学教室 鶴木 一彦
(平成6年11月16日受付, 平成7年1月17日改訂受理)

Reprint requests to: Kazuhiko Unoki, M.D. Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima-shi Kagoshima-ken 890, Japan

(Received November 16, 1994 and accepted in revised form January 17, 1995)

I 緒 言

ラットの遺伝性網膜変性や光照射による網膜変性は、硝子体に細胞成長因子を注入しておくことと阻止もしくは遅延される、という知見が蓄積しつつある¹⁾²⁾。細胞成長因子は、細胞や組織の分化・構築・増殖・運動などの生理的過程のみならず、老化・癌化などの病的過程にもかかわる。神経細胞について例示すれば、細胞成長因子が発揮する survival promoting activity によって損傷から守られる³⁾⁴⁾。塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) などの細胞成長因子、脳由来神経栄養因子あるいはサイトカインをラットの硝子体に注入すると、その後の連続光照射による網膜変性の発生が抑止もしくは遅延される。その効果は、因子ごとにかなりさまざまである²⁾。

著者らは、細胞成長因子ミッドカイン (midkine, MK) の網膜変性に対する効果を検討してきた。MK は、胚性腫瘍細胞 (テラトカルシノーマ) で最初に同定されたヘパリン結合性細胞成長因子で、レチノイン酸による分化誘導によって活性が発現する⁵⁾。マウスの胚発生初期には、角膜や網膜とその周囲で遺伝子が発現する⁶⁾。また、線維芽細胞の増殖や神経細胞突起の伸長など神経栄養因子としての作用をもつことも確認されている⁷⁾。このような特性を有する MK をラットの硝子体に注入すると、実験的光網膜変性を阻止・遅延させること、その効果は bFGF に優るとも劣らないこと、などを著者ら⁸⁾は先に報告した。白色マウスにおいても、白色ラットと同様に連続光照射による網膜変性がみられるが、これまでに細胞成長因子がマウスの網膜変性に遅延効果を示した報告はなく、MK の網膜変性遅延効果がラットのみならず、マウスにも見出されるか否かを検討するのは有意義なことであろう。そこで、マウスを対象として検討したところ、ラットにみるのと同様の所見を観察したので報告する。

II 対象および方法

1. 動物

6週齢の白色マウス (BALB/C) を九動株式会社 (熊本市) から購入し、鹿児島大学医学部動物実験施設において飼養した。1週間以上にわたって、通常の光環境 (蛍光灯照明、照度: 20 foot-candle; 12時間: 明/12時間: 暗) で飼養した。「鹿児島大学医学部動物実験に関する規則」に準じて、以下の実験を行った。

2. 実験方法

各動物の左眼の硝子体に MK を、右眼の硝子体に燐酸緩衝液を、それぞれ 0.5 μ l 投与した。MK は、培養 L 細胞に MK のベクターを導入して活性を発現させ、培養液上清から濃度 0.84 μ g/ μ l として得た。これらの薬剤を塩酸ケタミン (ケタラール®)・塩酸塩キシラジン (セラクタール®) による麻酔下で、32 ゲージ針を用いて脈絡膜

一網膜を通して硝子体に注入した。その直後に眼底検査を行って、水晶体損傷・硝子体出血・網膜混濁などを来した場合は対象から除外した。以下の実験の対象となった動物の数は、図3に説明するのとおりである。

上記の前処置を行ったあと、通常の光環境下で2日間飼養した。次に、7日間、14日間、あるいは21日間にわたって、上記の照射条件で連続的に光照射しながら飼養を続けた。このような連続光照射後、炭酸ガス麻酔下で、4%パラフォルムアルデヒド・2.5%グルタルアルデヒド燐酸緩衝液を用いて灌流固定した。そして、両眼の眼球を型のごとく摘出した。

なお、通常の光環境で飼養した動物 (6匹)、および前処置を行わずに連続光照射の環境で飼養した動物 (7日間、14日間あるいは21日間、各6匹) についても、上記と同様の方法で眼球を摘出した。

3. 組織学的検索

摘出した眼球を視神経乳頭を通る子午線方向で半割した。網膜組織をパラフィンに包埋したあと、上方鋸状縁から下方鋸状縁まで連続した5 μ m の切片試料を作成した。標本をヘマトキシ・エオジンで染色し、光学顕微鏡で観察した。

連続光照射による網膜変性に対する MK の効果を評価する尺度として、外顆粒層の厚さを採用した。このために、視神経乳頭から上方700 μ m および下方700 μ m の部分を写真撮影した。そして、画像情報をパーソナルコンピュータに入力し、画像解析ソフト (NIH Image) を用いて、画面上で100 μ m ごとに6か所で外顆粒層の厚さを測定した。MK 投与群 (実験群) と燐酸緩衝液投与群 (対照群) との測定について、paired-t テストを用いて群間比較した。

III 結 果

通常の光環境で飼養した場合 (以下、正常群) と比較して、硝子体への前処置を行わないで連続的光照射下で飼養した場合には、光照射期間に依存した網膜外層の変化をみた。視細胞の変化がきわだって顕著で、網膜色素上皮細胞の変化はほとんどなかった。このような組織学的変化は、硝子体にあらかじめ MK を投与しておいた左眼 (以下、実験群) においては、燐酸緩衝液を投与しておいた右眼 (以下、対照群) と比較すると、みるべき程度に軽度であった。

1. 連続7日間光照射

対照群 (MK 非投与眼, n=6) においては、後極部網膜では視細胞の外節が短縮した。外顆粒層は7~9層の核で構成される厚さを示した。すなわち、通常の光環境で飼養した場合 (正常群) では10~12層の核で構成されるのと比較して、わずかながら減少していた。この場合、周辺部網膜での障害は後極部と比較すると軽度で、外顆粒層の厚さは正常眼のそれと同じであった (図1, 3A)。

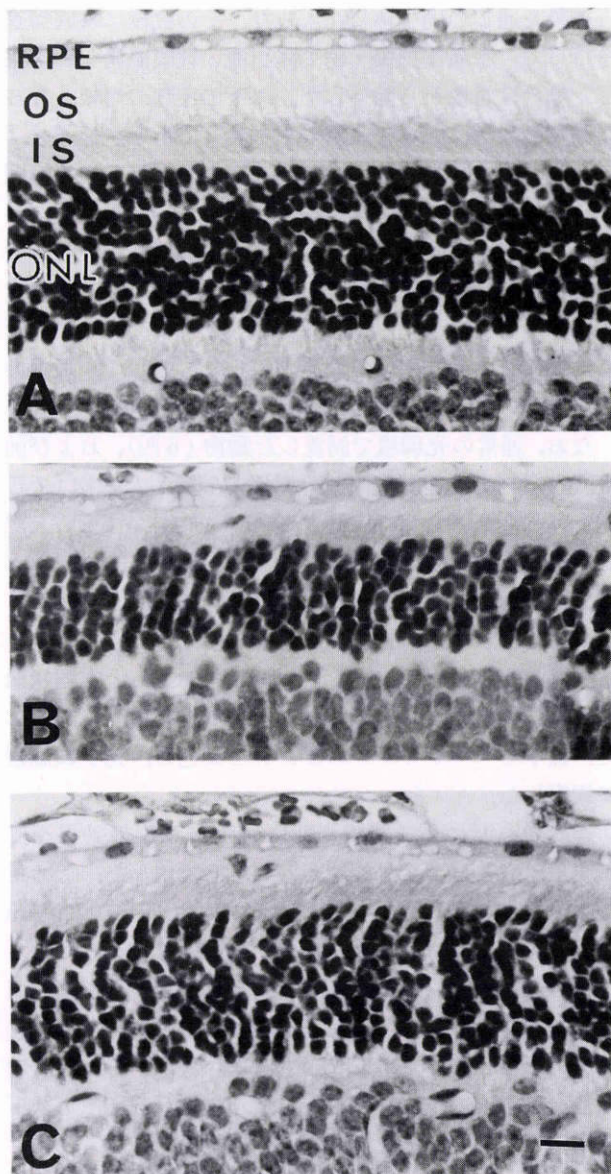


図1 連続7日間の光照射による視細胞変性(Balb/C白色マウス)とミッドカインの硝子体注入による阻止・遅延効果。

A. 正常眼：通常の光環境(明：12時間/暗：12時間)で飼養。外顆粒層は10~12層の核で構成されている。RPE：網膜色素上皮；OS：視細胞外節；IS：視細胞内節；ONL：外顆粒層。B. 対照群(磷酸緩衝液注入)：磷酸緩衝液を硝子体に注入したあと、7日間にわたって連続的に光照射しながら飼養。視細胞外節は短縮し、外顆粒層は7~9層に厚さを減じている。色素上皮細胞に大きな異常はない。C. 実験眼(ミッドカイン注入)：(B)と同じマウスの僚眼の硝子体にはミッドカインを注入したあと、7日間にわたって連続的に光照射しながら飼養。視細胞外節は、正常眼と比較するとやや短縮する傾向をみるが、対照群と比較するときわだてて長い。内節には異常はない。外顆粒層は10層の核で構成され、正常眼とほぼ同様である。バーは20 μm

実験群(MK投与眼, n=6)においては、後極部網膜においても、視細胞外節の短縮は軽度であった。外顆粒層

の厚さは正常群と変わりがなかった(図1, 3A)。

2. 連続14日間光照射

対照群(n=9)においては、視細胞は顕著な変化を示した。すなわち、外節は消失し、内節はかなり残存するものの崩壊が著しかった。外顆粒層は3~5層の核で構成されていた(図2A, 3B)。

実験群(n=9)においては、視細胞の外節と内節とは、それぞれ短縮した。しかし、明瞭な形態で残存していた。外顆粒層は7~8層の核で構成されていた(図2B, 3B)。

3. 連続21日間光照射

対照群(n=6)においては、視細胞の外節のみならず内節も消失した。外顆粒層は、きわめて薄くなって、わずかに1~2層の核で構成された(図2C, 3C)。このような高度の変化は、後極部だけでなく周辺部でも同様であった。

実験群(n=6)においては、視細胞外節は消失したが、内節は残存していた。外顆粒層は正常群と比較すると著しく減少したが、なお3~5層の核で構成されていた(図2D, 3C)。

4. 外顆粒層の厚さ

上記のように観察された、連続的光照射による視細胞障害のMKによる阻止・遅延効果を評価するために外顆粒層の厚さを測定した。図3に、正常群、対照群および実験群での測定結果を示す。

連続7日間の光照射では、対照群では正常群の約2/3に減少していた。実験群では正常群と差がなかった(図3A)。

連続14日間の光照射では、対照群では正常群の約1/2に減少していた。実験群では正常群よりもわずかながら減少したが、対照群と比較すると有意に大きな厚さを保っていた(図3B)。

連続21日間の光照射では、対照群では正常群の約1/6に減少していた。実験群では正常群の約1/2と著しく減少したが、対照群と比較すると有意に大きな厚さを保っていた(図3C)。

IV 考 按

上記の結果は、連続光照射による白色マウスの網膜変性に対して、MKが有効な保護効果をもつことを示している。すなわち、ごく日常的な強度の照明光のもとで長時間にわたって生活させると、従前の報告⁹⁾¹⁰⁾で知られているように、照射期間に依存して視細胞は次第に脱落した。このような網膜障害が後極部に強いことも従前の報告に一致した。ところが、MKをあらかじめ硝子体に注入しておくこと、視細胞障害は顕著に軽減した。具体的には、比較的短期間(7日間)の光障害はほとんど抑止し、長期間(21日間)になると視細胞の脱落は明らかにはなるが、それでもなお抑止効果を示した。この所見は、

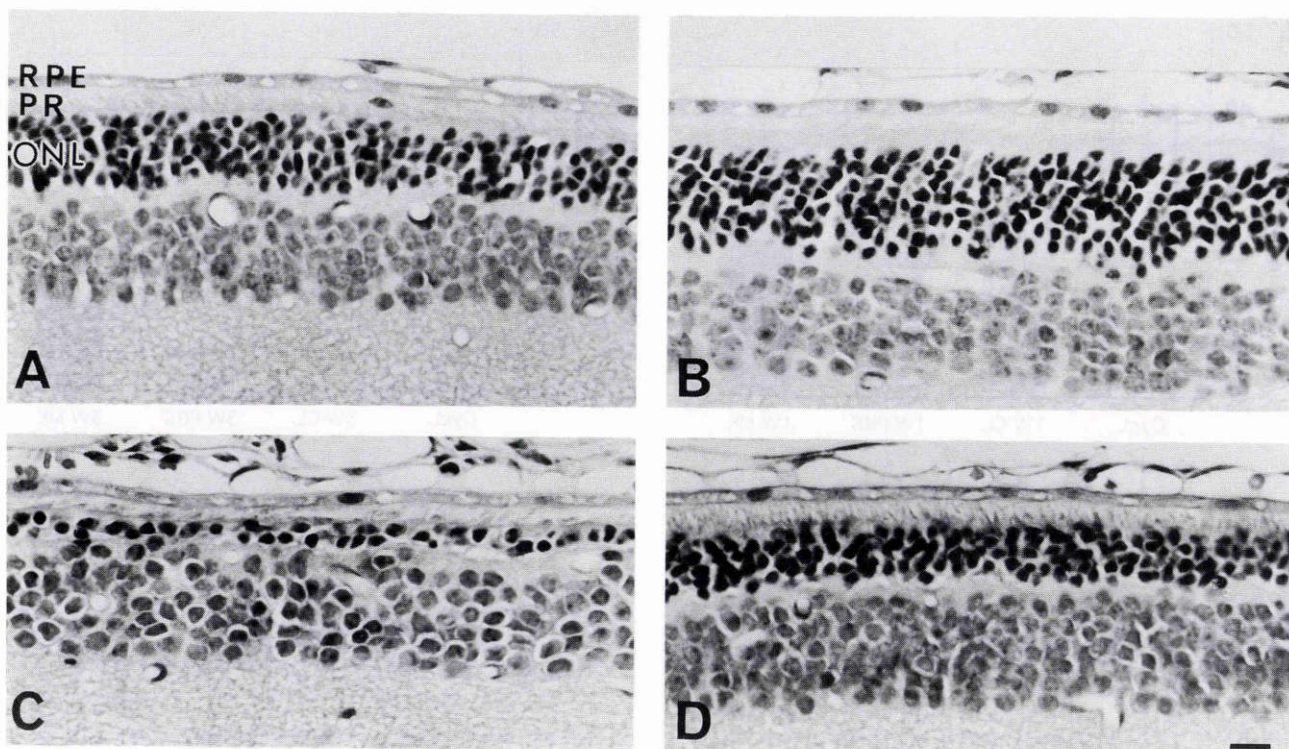


図2 連続14日間または21日間照射による視細胞変性(Balb/C白色マウス)のミッドカインによる阻止・遅延効果

A. 対照眼(磷酸緩衝液注入): 磷酸緩衝液を硝子体に注入したあと, 14日間にわたって連続的に照射しながら飼養. 視細胞外節は消失している. 内節も崩壊が著しい. 外顆粒層は3~5層に減少している. 色素上皮には異常はない. RPE: 網膜色素上皮; OS: 視細胞外節; IS: 視細胞内節; ONL: 外顆粒層. B. 実験眼(ミッドカイン注入): (A)と同じマウスの僚眼の硝子体にミッドカインを注入したあと, 14日間にわたって連続的に照射しながら飼養. 視細胞外節は短縮し, 内節も崩れている. 外顆粒層は厚さを保ち, 7~9層の核で構成されている. 色素上皮細胞層には異常をみない. C. 対照眼(磷酸緩衝液注入): 磷酸緩衝液を硝子体に注入したあと, 21日間にわたって連続的に照射しながら飼養. 視細胞の外節と内節はともに消失している. 外顆粒層は極度に薄くなって, わずかに1~2層の核で構成されている. 色素上皮には異常をみない. D. 実験眼(ミッドカイン注入): (C)と同じマウスの僚眼の硝子体にミッドカインを注入したあと, 21日間にわたって連続的に照射しながら飼養. 視細胞外節は消失しているが, 内節は残存する. 外顆粒層はかなり薄くなっているが, 対照眼と比較すれば厚さを保って3~5層の核で構成されている. 色素上層には異常をみない. バーは20 μ m

Sprague-Dawley ラットを用いて行われた実験の結果⁸⁾と一致した. すなわち, MK は, マウスとラットという二つの動物種に共通して, 光による視細胞障害を阻止あるいは遅延させる効果をもつことが示された.

白色ラットと白色マウスにおける光網膜変性の病像は, おおむね類似するが, 細部でみると明らかな差異がある. すなわち, ラットでは一般に変性の進行がマウスよりも急速である. マウスでは視細胞外節の障害が強い. さらに, それぞれの種にあっても, 系統に依存して変性像や経過がかなり多様である¹¹⁾¹²⁾. 例えば, 今回の実験で対象とした BALB/C マウスでの21日間連続照射によって発生する病像は, Sprague-Dawley ラットの連続7日間連続照射⁸⁾とほぼ同等であった. このように, ラットとマウスとの間で, あるいは同じ種の系統の間で, 光網膜変性の過程や病像にはわずかながらも差異がみられ, 障害の細胞生物学的機序が細部では異なる, とみな

す考えもある¹³⁾. 細胞成長因子やサイトカインはラットの遺伝性や照射による網膜変性に変性遅延を示したが, マウスの網膜変性に対する報告は少ない. MK は, ラットおよびマウスの光網膜変性に有効であったので, 免疫組織学的手法を用いて MK の発現を調べ, 網膜光変性の機序と MK の関連を検討する必要がある.

MK は, レチノイン酸によって発現が誘導されるという特性をもち, 網膜での活性発現が確認されている細胞成長因子である⁵⁾⁶⁾. レチノイン酸は, ビタミン A の代謝産物で, さまざまな細胞の分化・成長などに関与する¹⁴⁾. レチノイン酸結合蛋白がアマクリン細胞・ミューラー細胞・網膜色素上皮細胞に局在する¹⁵⁾¹⁶⁾. レチノイン酸の網膜での生理作用は明らかになったとはいえないが, 網膜色素上皮細胞の増殖を抑制したり, 増殖性硝子体網膜症の発症に関与することが示唆されている¹⁷⁾¹⁸⁾. レチノイン酸によって誘発される MK がマウスやラットの網

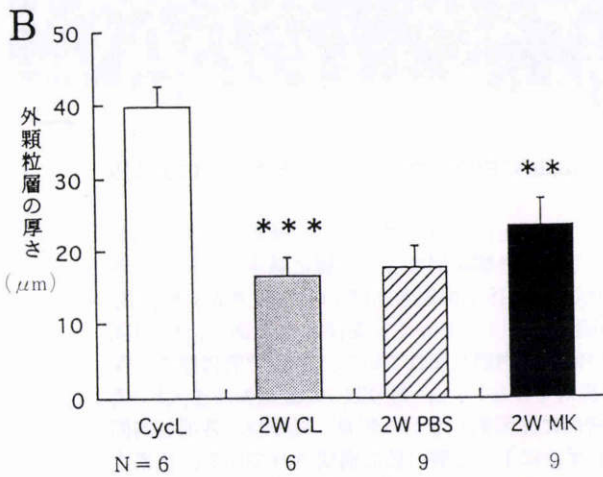
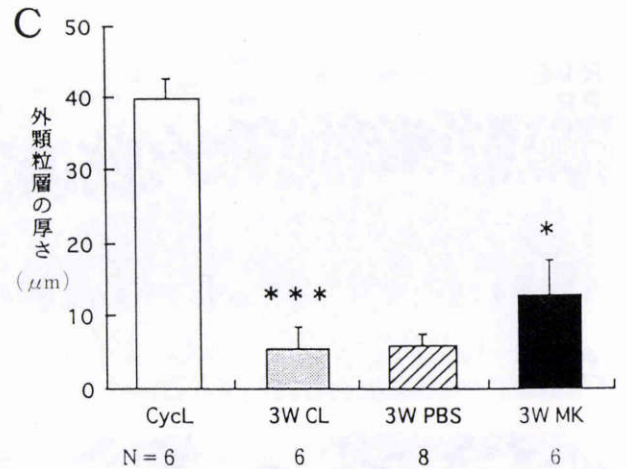
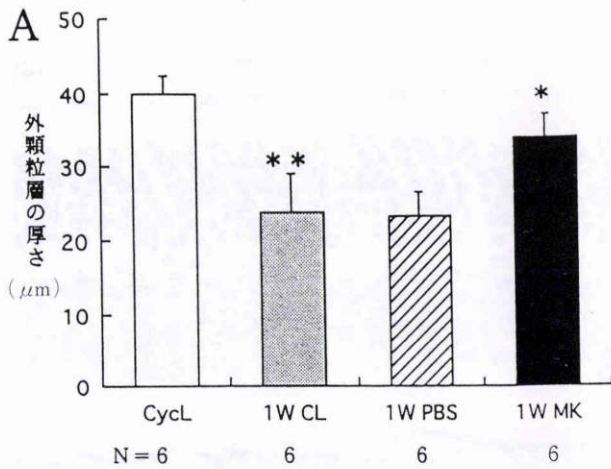


図3 通常光環境, 連続光照射後の対照眼およびミッドカイン (MK) 注入眼における外顆粒層の厚さ。

A. 7日間連続光照射の外顆粒層の厚さ. CycL: 通常の光環境 (12時間明:12時間暗) で飼養; 1W CL: 無処置で7日間連続光照射; 1W PBS: 磷酸緩衝液を硝子体に注入して, 7日間連続光照射; 1W MK: MKを硝子体に注入して, 7日間連続光照射. 棒は平均値を, 誤差線は標準偏差を表す. n: 眼数を示す. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$. B. 14日間連続光照射の外顆粒層の厚さ. CycL: 通常の光環境 (12時間明:12時間暗) で飼養; 2W CL: 無処置で14日間連続光照射; 2W PBS: 磷酸緩衝液を硝子体に注入して, 14日間連続光照射; 2W MK: MKを硝子体に注入して, 14日間連続光照射. 棒は平均値を, 誤差線は標準偏差を表す. n: 眼数を示す. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. C. 21日間連続光照射の外顆粒層の厚さ. CycL: 通常の光環境 (12時間明:12時間暗) で飼養; 3W CL: 無処置で21日間連続光照射; 3W PBS: 磷酸緩衝液を硝子体に注入して, 21日間連続光照射; 3W MK: MKを硝子体に注入して, 21日間連続光照射. 棒は平均値を, 誤差線は標準偏差を表す. n: 眼数を示す. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$.

膜光変性を阻止・遅延する機序を理解するためには, このような関連事象を参照しつつ, 網膜におけるレチノイン酸の生理的機能の検討を進めることが必要であろう. 併せて, 遺伝性の網膜変性動物などで, MKがどのような効果を示すか, という課題についても検討する意義があるだろう.

研究の企画から資料の取りまとめまで, 多くの過程で助言いただいた大庭紀雄教授に感謝します.

本研究は文部省科学研究費 (一般研究 B 06454499, 一般研究 C 06671770) および厚生省特定疾患網膜脈絡膜萎縮症調査研究班による補助を得て行われた.

文 献

1) 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, 1989.

2) LaVail MM, Unoki K, Yasumura D, Matthes MT, Yancopoulos GD, Steinberg RH: Multiple growth factors, cytokines and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11249-11253, 1992.

3) Otto D, Frotsher M, Unsicker K: Basic fibroblast growth factor and nerve growth factor administered in gel foam rescue medial septal neurons after fimbria fornix transection. *J Neurosci Res* 22: 83-91, 1989.

4) Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squint SP, et al: BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 350: 230-232, 1991.

5) Kadomatsu K, Tomomura M, Muramatsu T: cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-

- gestation period of mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 151: 1312—1318, 1988.
- 6) **Kadomatsu K, Huang RP, Suganuma T, Murata F, Muramatsu T**: A retinoic acid responsive gene MK found in the teratocarcinoma system is expressed in spatially and temporally controlled manner during mouse embryogenesis. *J Cell Biol* 110: 607—616, 1990.
 - 7) **Muramatsu H, Muramatsu T**: Purification of recombinant midkine and examination of its biological activities: Functional comparison of new heparin binding factors. *Biochem Biophys Res Commun* 177: 652—658, 1991.
 - 8) **Unoki K, Ohba N, Arimura H, Muramatsu H, Muramatsu T**: Rescue of photoreceptors from the damaging effects of constant light by midkine, a retinoic acid-responsive gene product. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 4063—4068, 1994.
 - 9) **Noell WK, Walker VS, Kang BS, Berman S**: Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol* 5: 450—473, 1966.
 - 10) **Kuwabara T, Gorn RA**: Retinal damage by visible light. *Arch Ophthalmol* 79: 69—78, 1968.
 - 11) **LaVail MM, Gorrin GM, Repaci MA, Yasumura D**: Light-induced retinal degeneration in albino mice and rat: Strain and species differences. In: La Vail MM, et al (Eds): *Degenerative Retinal Disorders: Clinical and Laboratory Investigations*. Alan R Liss, New York, 439—454, 1987.
 - 12) **LaVail MM, Gorrin GM, Repaci MA**: Strain differences in sensitivity to light induced photoreceptor degeneration in albino mice. *Cur Eye Res* 6: 825—834, 1987.
 - 13) **Noell WK**: Possible mechanisms of photoreceptor damage by light in mammalian eyes. *Vision Res* 20: 1163—1170, 1980.
 - 14) **Dowling JE, Wald G**: The biological function of vitamin A acid. *Proc Natl Acad of Sci USA* 46: 587—608, 1960.
 - 15) **Gaur VP, De Leeuw AM, Milam AH, Saari JC**: Localization of cellular retinoic acid-binding protein to amacrine cells of rat retina. *Exp Eye Res* 50: 505—511, 1990.
 - 16) **Edwards RB, Adler AJ, Dev S, Claycomb RC**: Synthesis of retinoic acid from retinol by cultured rabbit Muller cells. *Exp Eye Res* 54: 481—490, 1992.
 - 17) **Doyle JW, Dowgiert RK, Buzney SM**: Factors modulating the effect of retinoids on cultures retina pigment epithelial cell proliferation. *Curr Eye Res* 11: 753—765, 1992.
 - 18) **Araiz JJ, Refojo MF, Arroyo MH, Feong FL, Albert DM, Tolentino FI**: Antiproliferative effect of retinoic acid in intravitreal silicone oil in an animal model of proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 522—530, 1993.