

ヒト水晶体上皮細胞における上皮成長因子、 塩基性線維芽細胞成長因子の存在

馬嶋 清如, 高坂 昌志

藤田保健衛生大学医学部眼科学教室

要 約

水晶体は、その多くを房水から栄養されており、水晶体の外部環境として、房水は重要な役割を果たしている。最近、この房水中に上皮成長因子や塩基性線維芽細胞成長因子などの細胞成長因子の存在が確認されて、水晶体上皮の生理にどのように関与しているのか、注目されている。しかし、これら細胞成長因子がその生物作用を発揮するためには、細胞表面のリセプターの存在、また、その内部化が必要である。そこで今回、上皮成長因子、線維芽細胞成長因子のレセプターの存在、また、上皮成長因子、塩基性線維芽細胞成長因子の内部化について、ヒト白内障水晶体の上皮細胞を材料とし、免疫組織化学

的手法を用い調査した。その結果、水晶体の上皮細胞は、上皮成長因子、線維芽細胞成長因子に対するリセプターを細胞表面に有していること、また、上皮成長因子、塩基性線維芽細胞成長因子が細胞内へ内部化されているものと考えられ、水晶体内での上皮細胞の役割から考えて、これは細胞成長因子が水晶体の生理に大きく関与しているものと考えた。(日眼会誌 99:81-86, 1995)

キーワード：上皮成長因子、線維芽細胞成長因子、塩基性線維芽細胞成長因子、免疫組織化学、リセプター、内部化

The Existence of Epidermal Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor in Human Lens Epithelial Cells

Kiyoyuki Majima and Masashi Kousaka

Department of Ophthalmology, Fujita Health University School of Medicine

Abstract

The aqueous humor supplies the lens with nutrition. Recently, the existence of epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (b-FGF) has been confirmed in the human aqueous humor. For this reason, it was thought that the function of these growth factors was related to the physiological condition of the lens epithelial cells (LEC). Therefore, we looked for the existence of receptors for EGF, FGF, and the internalization of EGF and b-FGF using LEC from human cataractous lenses in immunohistochemistry. We confirmed the

existence of receptors for EGF and FGF as well as the internalization of EGF and b-FGF. From these results. We inferred that the function of EGF and b-FGF was strongly related to the physiological condition of LEC (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 81-86, 1995)

Key words: Human lens epithelial cells, Epidermal growth factor, Basic fibroblast growth factor, receptor, Internalization

I 緒 言

Epidermal growth factor (EGF) は、Cohen¹⁾により、1962年、雄マウス顎下腺中から発見され、fibroblast growth factor (FGF) は、Gospodarowicz²⁾により、1974年、ウシ下垂体から発見された。また、この FGF は、1985年に、等電点の違いにより、塩基性の basic FGF (b-

FGF) と、酸性の acidic FGF に分類された³⁾。これら細胞成長因子の生物作用については、これまでにいくつか報告されているが、最近、EGF、また b-FGF がヒト房水中に存在していることが確認され⁴⁾⁻⁶⁾、房水からその多くを栄養されている。角膜また水晶体の生理に、これら細胞成長因子が大きく関与しているものと考えられている。しかし、これら細胞成長因子が細胞に対して生物作

別刷請求先：470-11 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98 藤田保健衛生大学医学部眼科学教室 馬嶋 清如
(平成6年2月10日受付, 平成6年8月10日改訂受理)

Reprint requests to: Kiyoyuki Majima, M.D. Department of Ophthalmology, Fujita Health University, School of Medicine. 1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake-shi Aichi-ken 470-11, Japan

(Received February 10, 1994 and accepted in revised form August 10, 1994)

用を発揮するためには、これら細胞成長因子に対するリセプターの存在とリセプターを介した内部化が必要である⁷⁾。そこで、ヒト白内障の水晶体上皮細胞を材料として、EGF, FGF リセプターの存在、また EGF, b-FGF の内部化について、免疫組織化学的手法を用い調査した。

II 実験方法

1. EGF リセプターの検索

57~78 歳の白内障患者 12 例 12 眼を対象として、白内障手術時の前囊切開, continuous curvilinear capsulorhexis (CCC) の際に、水晶体の中央部から得られた上皮

細胞の付着した前囊片を、0.5% glutaraldehyde を使用し、細胞膜を 4°C で 15 分間固定後、Ca²⁺, Mg²⁺-free phosphate buffered saline (PBS) を用い洗浄した。次に、PBS に溶解した 0.1% bovine serum albumin (BSA) を使用し、30 分間ブロッキングを行った後、一次抗体として、TRI 社製、抗 EGF リセプターモノクローナル抗体 (マウス IgG, catalog #1096) を BSA で 100 倍に希釈し、室温で 60 分間反応させた。その後、ストレプトアビジン法を用い、リセプターの免疫組織化学的検索を行った。すなわち、PBS で洗浄後、二次抗体としてビオチン標識ヤギ抗マウス IgG・ラビット IgG を室温で 10

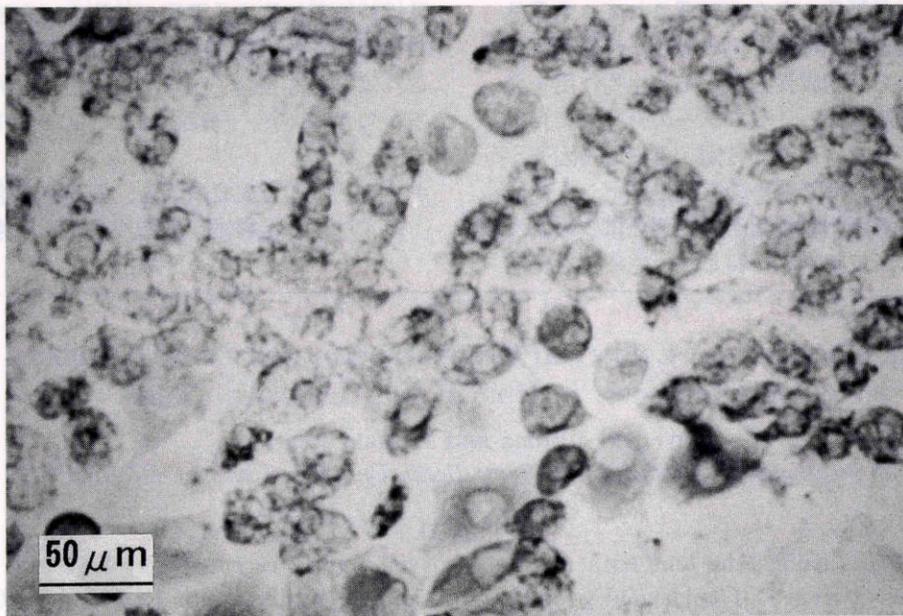


図 1 A Epidermal growth factor (EGF) リセプターの存在部位。
染色部位に EGF リセプターの存在が確認された。

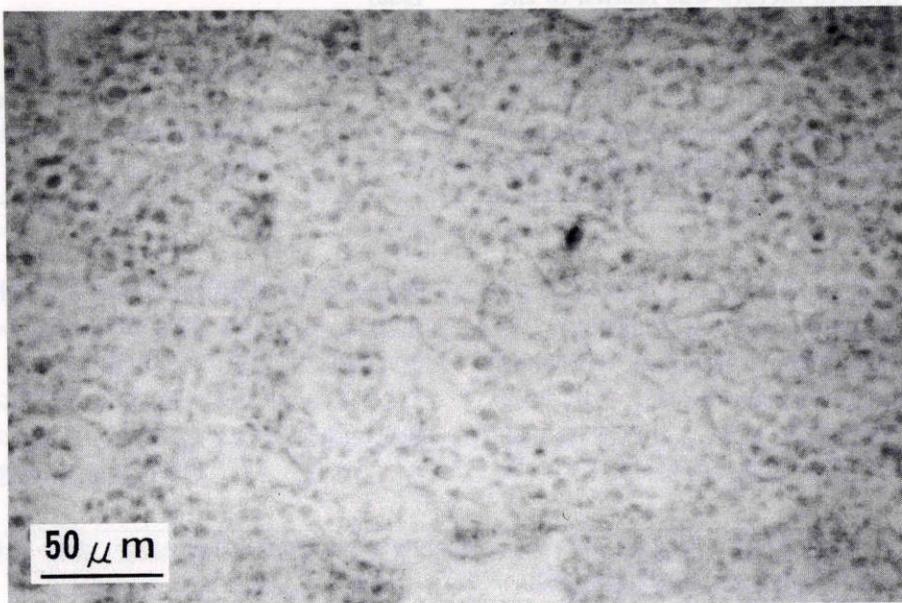


図 1 B EGF リセプターの存在部位。
陰性対照では染色されなかった。

分間反応させ、PBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを室温で5分間反応させる方法である。その後、3 amino-9 ethylcarbazole (AEC) 染色を施行し、EGF リセプターの検索を行った。また、58~80 歳までの白内障患者 10 例 10 眼を対象として、一次抗体に正常マウスの全血清を使用、同様の実験方法を施行し、これを陰性対照とした。

2. EGF の検索

56~84 歳の白内障患者 11 例 11 眼を対象として、EGF リセプターの検索時と同様の方法で入手された上皮細胞の付着した前囊片を、70% エチルアルコールを使用し、

細胞質を室温で 10 分間固定後、PBS を用い洗浄した。次に、BSA を使用し 30 分間ブロッキングを行った後、一次抗体として、湧永製薬の抗ヒト EGF 抗血清（ラビット、ロット番号 006 B）を BSA で 100 倍に希釈して室温で 60 分間反応させた。この後、ストレプトアビジン法、AEC 染色を施行し、EGF の検索を行った。また、56~78 歳の白内障患者 10 例 10 眼を対象として、一次抗体に正常ラビット全血清を使用、同様の実験方法を施行し、これを陰性対照とした。

3. FGF リセプターの検索

67~84 歳の白内障患者 13 例 13 眼を対象として、同様

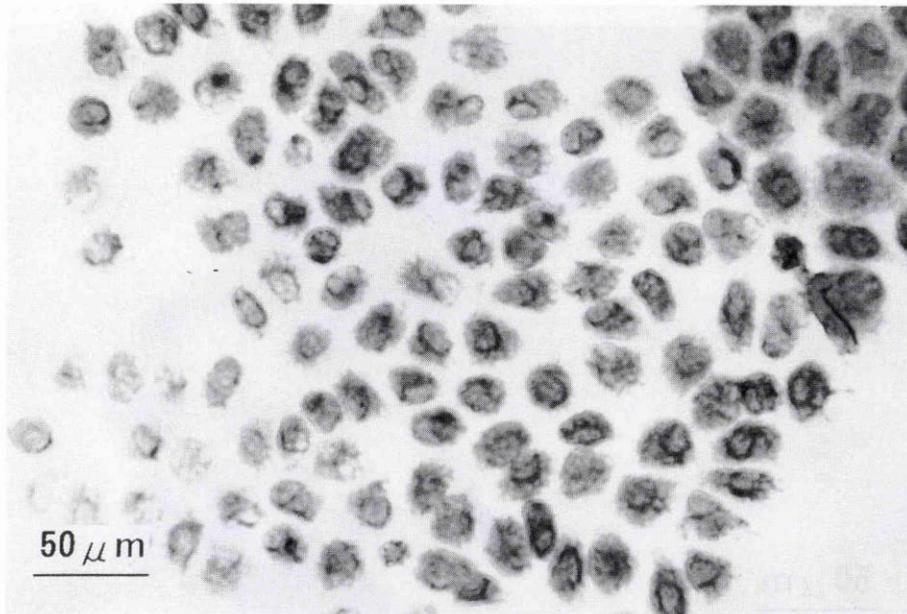


図 2 A EGF の存在部位。
染色部位に EGF の存在が確認された。

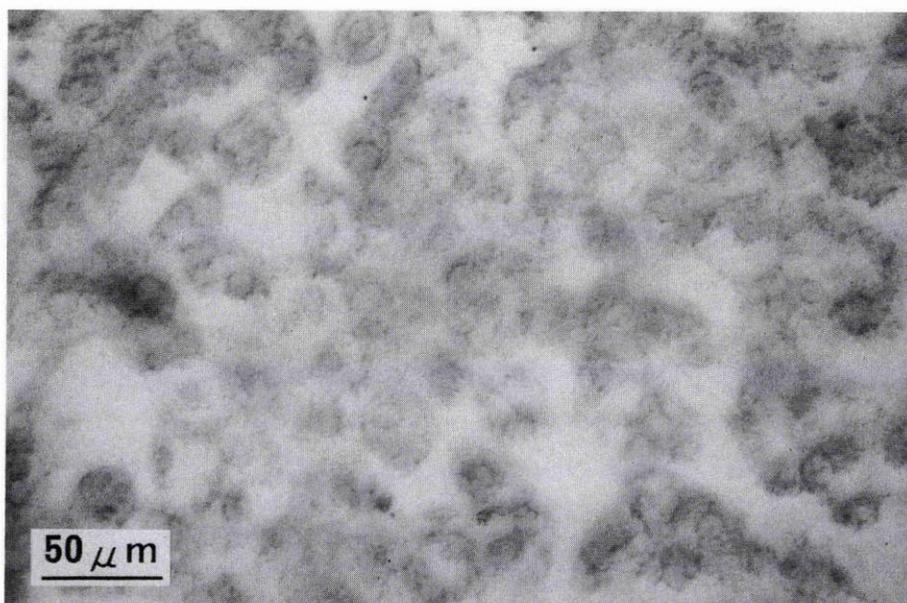


図 2 B EGF の存在部位。
陰性対照では染色されなかった。

の方法で入手された上皮細胞の付着した前囊片を 0.5% glutaraldehyde を使用し、4°C で 15 分間固定後、PBS を用い洗浄した。次に、BSA を使用し 30 分間ブロッキングを行った後、一次抗体として、コスモバイオ社製、抗ヒト FGF リセプターモノクローナル抗体 (マウス IgG I, catalog # 05-149, ロット番号 10986) を BSA で 100 倍に希釈して室温で 60 分間反応させた。この後、ストレプトアビジン法、AEC 染色を施行し、FGF リセプターの検索を行った。また、60~77 歳の白内障患者 9 例 9 眼を対象として、一次抗体に正常マウス全血清を使用、同様の実験方法を施行し、これを陰性対照とした。

4. b-FGF の検索

47~85 歳の白内障患者 12 例 12 眼を対象として、同様の方法で入手された上皮細胞の付着した前囊片を、70% エチルアルコールを使用し、室温で 10 分間固定後、PBS を用い洗浄した。次に、一次抗体として、コスモバイオ社製、抗ヒト basic FGF ポリクローナル抗体 (ラビット IgG, catalog # 40013, ロット番号 904202) を BSA で 100 倍に希釈して室温で 60 分間反応させた。この後、ストレプトアビジン法、AEC 染色を施行し、b-FGF の検索を行った。また、55~72 歳白内障患者 9 例 9 眼を対象として、一次抗体として、正常ラビット全血清を使用し、同

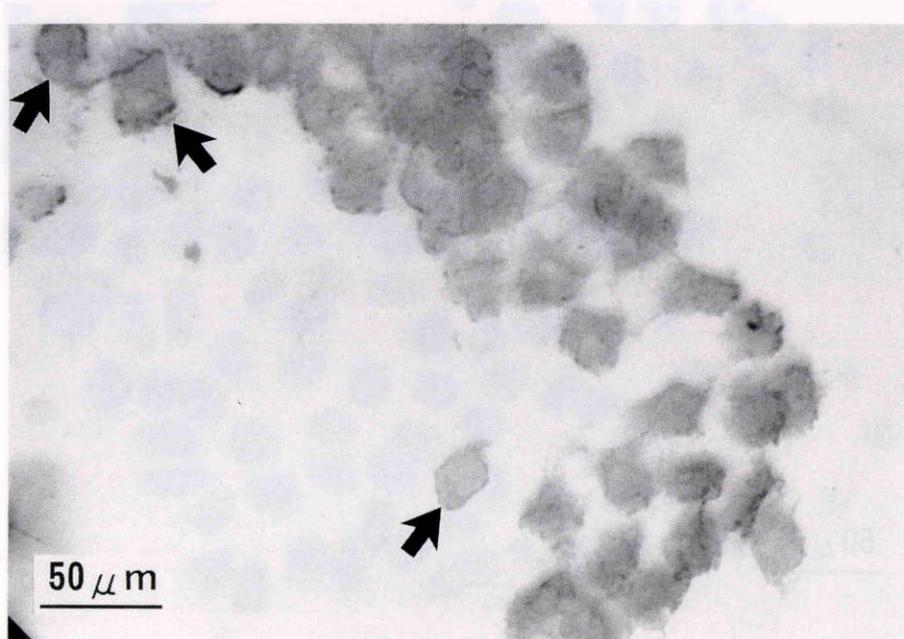


図 3 A EGF リセプターの存在部位。
染色部位に FGF リセプターの存在が確認された。

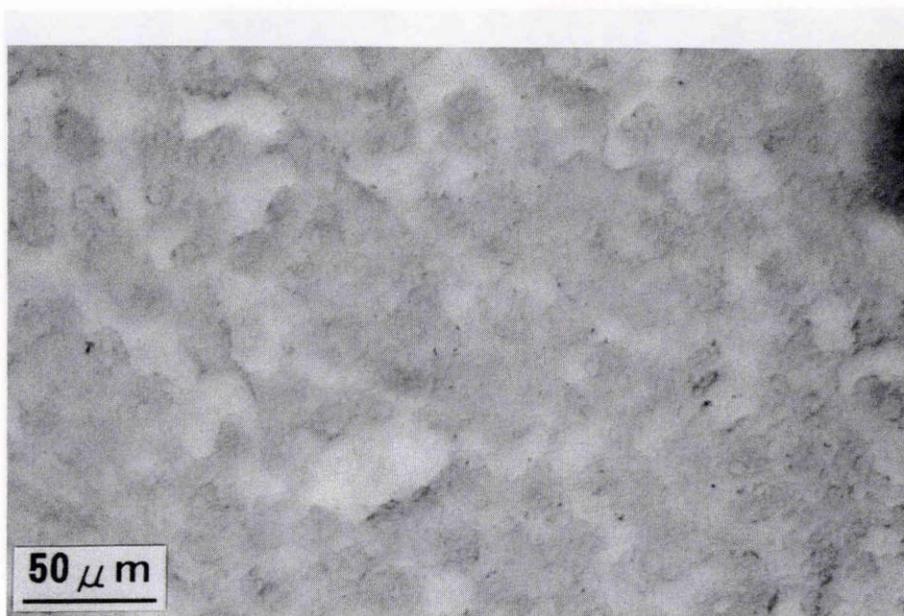


図 3 B FGF リセプターの存在部位。
陰性対照では染色されなかった。

様の実験方法を施行し、これを陰性対照とした。

III 結 果

1. EGF リセプターの検索

全例、上皮細胞が染色された(図1A)。その染色部位については、細胞膜、細胞質、核の染色が考えられるものの、今回の調査からだけでは、細胞膜なのか、細胞質なのか、核なのか、あるいはそのすべてが染色されているのかについては明確ではない。しかし、細胞膜に存在しているリセプターはEGFと結合し細胞内へ内部化された後、ライソゾームで分解されてしまうため⁷⁾、今回の染色部位は細胞質ではなく、細胞膜に存在するリセプ

ターに反応した結果ではないかと推察された。一方、陰性対照群では、全例染色されなかった(図1B)。

2. EGF の検索

全例、上皮細胞が染色された(図2A)。しかし、EGFは細胞膜辺縁に均一に分散し、凝集、集合を行い、リセプターと結合した後、細胞内へ内部化され、一部は直接核のクロマチンと特異的に結合するものの、その多くはライソゾームで分解されるという様式を示すため⁷⁾、EGFは細胞膜、細胞質、核のどの部位にも存在している可能性があり、今回の結果からだけでは、細胞膜が染色されているのか、細胞質が染色されているのか、核が染色されているのか、あるいはそのすべてが染色されてい

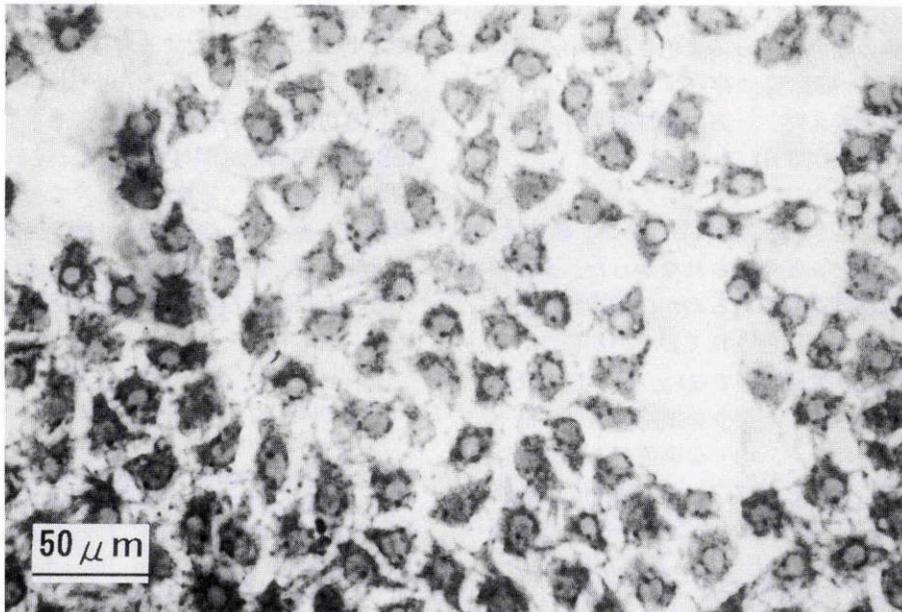


図4A b-FGFの存在部位。
染色部位にb-FGFの存在が確認された。



図4B b-FGFの存在部位。
陰性対照では染色されなかった。

るのかについては明確ではなかった。しかし、組織の固定にエタノールを使用し、EGF抗体を細胞内へ通過させやすくしていること、また細胞の輪郭に沿って染色がみられないことから、細胞膜が染色されたものではないと考えた。そして今回の結果では、細胞質と核膜の染色が考えられ、これらの部位にEGFが存在しているものと推察した。一方、陰性対照群では全例染色されなかった(図2B)。

3. EGFリセプターの検索

全例、上皮細胞が染色された(図3A)。しかし、この場合もEGFリセプターを検索した時と同様、細胞膜が染色されているのか、細胞質が染色されているのか、核が染色されているのか、あるいはそのすべてが染色されているのか、今回の調査からだけでは明確ではないが、矢印のように、細胞の輪郭に沿って染色されている所見がみられることから、細胞膜に存在するFGFリセプターに反応したものと考えた。一方、陰性対照群では、全例染色されなかった(図3B)。

4. b-FGFの検索

全例、上皮細胞が染色された(図4A)。しかし核では、核小体を除いては、ほとんど染色されなかった。また核以外では、染色部位が細胞膜であるのか、細胞質であるのか、あるいはその両者が染色されているのかについては、今回の調査からだけでは明確でない。しかし、FGFリセプターの検索時にみられたような細胞の輪郭に沿って染色されている所見はなく、均一な染色であり、またEGFの検索時と同様、固定にエタノールを使用し、細胞内へb-FGF抗体を取り込ませていることから、今回の調査では、細胞質のb-FGFに反応しているものと考えた。一方、陰性対照群では、全例染色されなかった(図4B)。

IV 考 按

Avascular organである水晶体は、その多くを房水から栄養されており、水晶体の代謝を維持している。ヒト房水中に、Parelmanら⁴⁾は平均0.88 ng/ml、並木ら⁵⁾は1 ng/ml程度のEGFを報告し、また、Tripathiら⁶⁾は1 ng/ml程度のb-FGFを報告している。このように房水中にはEGF、b-FGFが存在しており、これら細胞成長因子が角膜、また、水晶体の生理になんらかの関与をしていることは十分に考えられることである。しかし、その生理作用を調査するにあたって、細胞成長因子がその生物作用を発揮するためには、標的となる細胞にリセプターが存在し、このリセプターを介して実際に細胞内へ内部化されるという条件が必要となる。そこで今回、ヒト白内障水晶体の上皮細胞を材料として、EGFリセプター、EGFの存在を、また、FGFリセプター、b-FGFの存在を免疫組織化学的手法を用い調査した。この調査で、FGFリセプターに対する抗体はacidic, basicの両FGFリセプターに反応するため、本来であればbasic FGFリ

セプターに対する抗体を使用すべきであるが、現在市販されている抗体はFGFリセプター抗体のみであるため、今回はこの抗体を使用し調査を行った。

免疫染色の結果、ヒト白内障水晶体の上皮細胞は、EGF、FGFのリセプターを有しており、またEGF、b-FGFは細胞内へ内部化されているものと考えた。今回は、材料としてヒト白内障水晶体の上皮細胞を使用した。ヒト正常水晶体の上皮細胞を使用した場合でも、同様な結果を得ることができるか否かが重要な問題となる。しかし、ヒトの細胞を材料とする限り、正常水晶体の上皮細胞を用い、こうした調査を行うことはほとんど不可能であることから、今回の結果は有意義と考えた。

水晶体内において、最も活発なエネルギー代謝を行い、高い生理活性を示す部位は上皮細胞である。この上皮細胞にEGF、FGFに対するリセプターが存在し、これらリセプターを介して、EGF、b-FGFが細胞内へ内部化されている可能性を今回示唆した。そして、細胞成長因子が細胞の生理機能に関与することから、水晶体上皮細胞の増殖、分化という細胞挙動だけでなく、水晶体内への物質輸送、カプセル合成などの機能にも影響を与えることが推測され、細胞成長因子の水晶体に及ぼす作用を調査することは、今後の白内障研究に非常に重要であると考えた。

文 献

- 1) Cohen S: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237: 1555-1562, 1962.
- 2) Gospodarowicz D: Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 249: 123-127, 1974.
- 3) Esch F, Baird A, Ling N, Ueno N, Hill F, Guillemin R: Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc Natl Acad Sci* 82: 6507-6511, 1985.
- 4) Parelman J, Nicolson M, Pepose S: Epidermal growth factor in human aqueous humor. *American journal of Ophthalmology* 109: 603-604, 1990.
- 5) 並木真理, 田上勇作, 山本 節, 中山昭夫, 伊藤美樹, 嘉納雅文: ヒト房水中のヒト上皮細胞成長因子(hEGF). 塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)の存在. *日眼会誌* 96: 652-656, 1992.
- 6) Ramesh CT, Navaneet SCB, Brenda JT: Detection, quantification, and significance of basic fibroblast growth factor in the aqueous humor of man, cat, dog and pig. *Exp Eye Res* 54: 447-454, 1992.
- 7) 日本組織培養学会: 細胞成長因子. 朝倉書店, 東京, 26-27, 1990.