

琉球大学学術リポジトリ

[総説] 網膜色素上皮細胞産生物質

メタデータ	言語: 出版者: 琉球医学会 公開日: 2010-07-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山川, 良治, Yamakawa, Ryoji メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016018

網膜色素上皮細胞産生物質

山 川 良 治

琉球大学医学部眼科学講座

The Products of Retinal Pigment Epithelial Cells

Ryoji Yamakawa

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine University of the Ryukyus,
207 Uehara, Nishihara, Okinawa 903-01 Japan

要 約

網膜色素上皮細胞は網膜の最外層に存在するメラニンを多く含む上皮で、多彩な機能を持ち網膜の維持に必須と言われている。同時にこの細胞は網膜疾患ではさまざまな病態をとる。特に最近注目されているのは網膜剥離後におこる増殖性硝子体網膜症proliferative vitreoretinopathy (PVR)での役割である。この病態の研究から近年さまざまな増殖因子、サイトカイン、細胞外基質が網膜色素上皮細胞産生物質として同定された。今まで確認されたものとしては、線維芽細胞増殖因子FGF, 血小板由来成長因子PDGF, トランスフォーミング成長因子TGF- β , 腫瘍壊死因子TNF- α , インターロイキン1 (IL-1), インターロイキン6 (IL-6), インターロイキン8 (IL-8), コロニー刺激因子(M-CSF), コラーゲンtype I, II, IV, VIとラミニン, フィブロネクチンである。フィブロネクチンについて最近の私たちの研究結果を示した。また近年網膜色素上皮細胞の移植実験から網膜色素上皮細胞の産生物質が視細胞のneurotrophic factorとして注目されつつある。今後網膜色素上皮細胞の研究から産生物質の種類はさらに増えると思われ、網膜疾患の病態解明, 治療にますます重要になってゆくと考えられる。

I. 網膜色素上皮細胞 (retinal pigment epithelial cells; RPE) について

網膜色素上皮細胞は網膜の最外層に存在する一層のメラニン色素を豊富に持つ六角形の分化した上皮である(図1)¹⁾。網膜色素上皮細胞と視細胞の間は発生学的には脳室にあたり、網膜色素上皮細胞は豊富な絨毛で視細胞に接している。網膜色素上皮細胞の機能は視

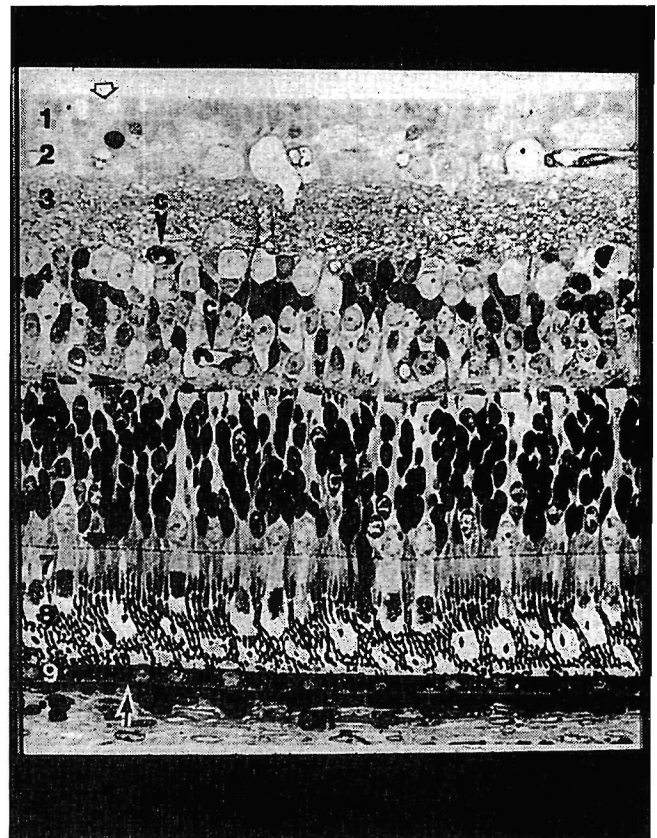


図1 ヒト網膜の組織図

文献1)より改変 (azure II stain, $\times 600$)

1. 神経線維層, 2. 神経節細胞層, 3. 内網状層,
4. 内顆粒層, 5. 外網状層, 6. 外顆粒層, 7. 視細胞内節, 8. 視細胞外節, 9. 網膜色素上皮細胞

細胞の維持に必須と言われている。網膜色素上皮細胞の役割としては列挙すると,

- 1) 視細胞外節末端の貪食を行い視細胞のrenewalに関

与

2) ビタミンAを貯蔵し、ロドプシンの合成分解過程に
関与

3) 視細胞間基質の生成

4) 脈絡膜から網膜への物質輸送とその逆方向への代
謝産物の移動

5) 外側血液網膜関門(脈絡膜・網膜関門)の形成

6) 網膜下腔の水分吸収のポンプ作用

7) 神経網膜と色素上皮層との接着力の形成

8) メラニンの存在によって光吸収をよくする

9) 網膜の支持

10) 脈絡膜循環を制御する

11) 病的反応として遊走、貪食、増生、化生、変性、
消失

と
言われている^{1,2)}。



図2 Macular puckerの眼底写真。黄斑部に増殖膜形成が
おこっている。

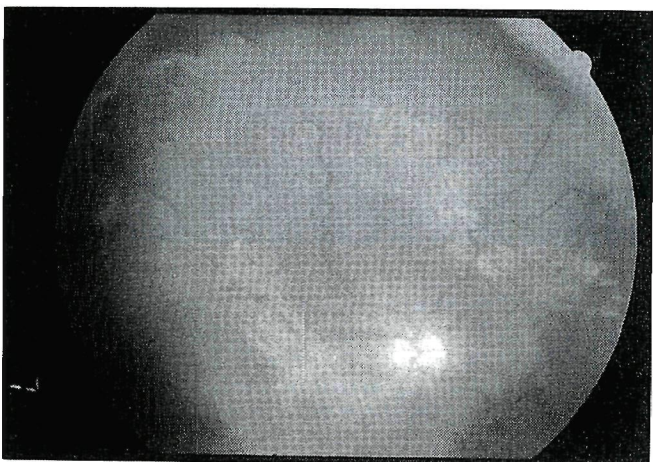


図3 増殖性硝子体網膜症(proliferative vitreoretinopathy,
PVR)の眼底写真。網膜各所に増殖膜ができ網膜は剥離
している

II. 視細胞間基質interphotoreceptor matrix (IPM)

網膜色素上皮細胞の産生物質については3)の視細胞
間基質 interphotoreceptor matrix として glycos-
amionoglycans (GAGs)について研究されている。この
構成物質としてコンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸な
どが挙げられており、種々の網膜変性症ではその構成
が変化していると報告されている^{2,3)}。しかし、これら
は網膜色素上皮細胞で産生されるが、視細胞側からも
産生されている。

III. 網膜色素上皮細胞の関与する網膜疾患

網膜色素上皮細胞の産生物質について研究され始め
たのは、この細胞が11)の病的な状態をきたすためである。
この細胞は正常ではほとんど増殖することなく静止
状態にあるが、ある病的な状態では増殖を開始し、
また化生がおこって線維芽細胞様となり種々の眼内病
変を修飾し、あるいは原因になると言われている。例
えば裂孔原性網膜剥離という神経網膜に裂孔ができ、
網膜下に硝子体液が入り込み網膜が剥離してくる病
がある。最近では手術により約90%以上が治癒するが、
その中に数%は眼内増殖性変化をきたすことがある。
図2の眼底写真に示すが、網膜剥離術後に macular
pucker といって網膜中心部である黄斑部にこのよう
な膜形成がおこり、視力低下の原因となる。さらに網
膜各所に膜形成と牽引が起こり、網膜剥離が再発す
ることがある。この状態は増殖性硝子体網膜症 proli-
ferative vitreoretinopathy, PVR (図3)と呼ばれ、網膜剥
離の治癒を妨げる最も大きな原因と言われている。こ
のような状態を引き起こす成因には1)硝子体の変化、
2)網膜の変化、3)炎症の機転が考えられている^{1,5)}。
そして膜の構成成分としては、線維芽細胞、網膜色素
上皮細胞、神経膠細胞、マクロファージが言われてい
る。これらの細胞が相互に作用しあって膜形成がおこ
るわけであるが、網膜から眼内に遊走した網膜色素上
皮細胞の化生、異常増殖が主たる原因と言われている<sup>1
7)</sup>。このように異常増殖がおこり膜形成がどのように
起こって行くかのメカニズムを調べる際に問題となっ
てきたのが、網膜色素上皮細胞の産生物質とその役割
である。

IV. 網膜色素上皮細胞の増殖因子、サイトカイン産生

いままでに報告されているのはa)細胞増殖因子、b)
サイトカイン、c)細胞外基質extracellular matrixがあ
る。増殖因子とサイトカインについては分子生物学的
手法を用いて近年精力的に仕事がなされた。同定され
たものとして、線維芽細胞増殖因子FGF⁹⁻¹¹⁾、血小板

表1 網膜色素上皮細胞で産生される増殖因子，サイトカイン一覧表

	mRNA	protein	in situ	文献番号
FGF	○		○	9)10)11)
PDGF	○			12)13)
TGF-β	○			14)15)
TNF-α	○			16)
IL-1	○	○		17)
IL-6	○	○	○	18)19)20)
IL-8	○	○		21)
M-CSF	○	○		22)

○MessengerRNAが確認されたもの，蛋白が同定されたものの，in situで証明されたものを示す。空欄は不明であることを示す。

由来増殖因子PDGF^{12,13)}，トランスフォーミング因子TGF-β^{14,15)}，腫瘍壊死因子TNF-α¹⁶⁾，インターロイキン1(IL-1)¹⁷⁾，インターロイキン6(IL-6)¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾，インターロイキン8(IL-8)²¹⁾，コロニー刺激因子(M-CSF)²²⁾である。遺伝子レベルでのみ確認されたり，蛋白として同定されたり，組織学的に証明されたりしているのをそれらを表に文献とともにまとめる(表1)。これらの局所で産生される物質は網膜色素上皮細胞の増殖，他の細胞の遊走や増殖に関与しており，眼内で複雑なネットワークを作っていると考えられる。今後さらに発見される増殖因子やサイトカインの項目は増えると思われる。

V. 細胞外基質extracellular matrix

細胞外基質については蛍光抗体法によりコラーゲンtype I, II, IV, VI, ラミニン, フィブロネクチンがあげられている²³⁻²⁵⁾。フィブロネクチンは単体分子量が約23万の糖蛋白で，血漿中には2量体として，細胞には多量体として存在し，細胞外基質extracellular matrixの構成要素，接着，遊走，分化に関与していると言われている。フィブロネクチンについては増殖性硝子体網膜症の手術中に採取した硝子体液中に高い濃度で存在し，強力な網膜色素上皮細胞の遊走因子として報告されている²⁶⁾。私たちも眼内増殖膜中のフィブロネクチンの存在を調べて増殖膜形成での役割について検討してみた。

硝子体手術によって得られた15例の増殖膜(macular pucker 5例，増殖性硝子体網膜症10例)を0.1%グルタルアルデヒド及び3%パラホルムアルデヒドを含

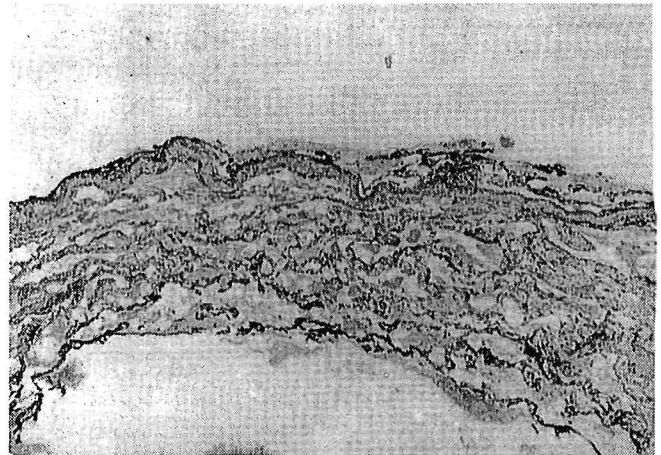


図4 増殖膜のIGSS法による染色(×340)。細胞と細胞外基質が層状に配列し，細胞外基質の層にフィブロネクチン陽性所見がある。



図5 増殖膜の金コロイドを用いた免疫電子顕微鏡写真(×4200)。細胞外のコラーゲン様物質の層にフィブロネクチンを示す金コロイド像が見られる。

むMg⁺⁺，Ca⁺⁺-free Dulbeccoリン酸緩衝液(pH7.2)(PBS)を用いて室温で1時間固定した。PBSで洗浄し，0℃の50%エタノールにて30分間脱水した後，-35℃でエタノール系列の脱水を行いLowicryl K4M(Polaron Equipment Ltd. England)に包埋し，紫外線照射(320nm)で重合した。このブロックを薄切し，IGSS(Immuno-gold silver staining)法と金コロイドを用いた免疫電子顕微鏡法でフィブロネクチンの存在を調べた。増殖性硝子体網膜症の膜組織でのフィブロネクチンの分布を図4，5に示す。図4はIGSS法によるものであるが，細胞と細胞外基質が層状に配列し，細胞外基質の層にフィブロネクチン陽性所見が見られた。図5は電子顕微鏡像であるが，細胞外のコラーゲン様物質の層にフィブロネクチンを示す金コロイドが

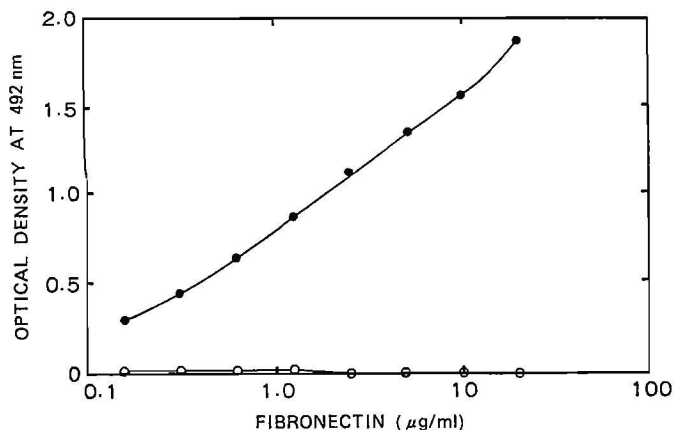


図6 ヒト血漿フィブロネクチンと牛胎児血清由来フィブロネクチンの Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法での標準曲線。●：ヒト血漿フィブロネクチン，○：牛胎児血清由来フィブロネクチン。ヒト血漿フィブロネクチンにのみ標準曲線が得られている。

見られた。すべての試料から陽性所見が得られ、フィブロネクチンは種々の眼内増殖組織中に存在し、細胞と細胞外基質の接着部分に多く観察された。フィブロネクチンは眼内増殖組織を形成する細胞と基質との接着に関与していると考えられた。

VI. ヒト培養網膜色素上皮細胞のフィブロネクチン産生

培養ヒト網膜色素上皮細胞でのフィブロネクチンの産生を検討してみた。培養では牛胎児血清中にフィブロネクチンが存在するので、それと交叉しないヒト血漿フィブロネクチンにのみ反応するモノクローナル抗体 (Hybritech, San Diego, U.S.A.) を用いた。Enzyme-linked immunosorbent assay を用いて検定したところ、図6のようにヒト血漿フィブロネクチンの標準曲線が得られ、牛胎児血清から精製したフィブロネクチンには反応しなかった。この牛胎児血清を用いてヒト網膜色素上皮細胞を培養し、confluent になった状態で24時間の condition medium をとって測定したところ、medium 中に500ng/cell 産生していることがわかった。間接蛍光抗体法を用いたところ図7のような典型的な編み目状パターンが得られた。また、網膜色素上皮細胞が血漿中のフィブロネクチンを取りこむ可能性があるため、 ^{125}I -ヒト血漿フィブロネクチンと網膜色素上皮細胞の反応をみた。 ^{125}I -ヒト血漿フィブロネクチンは細胞外基質に非特異的に結合するが、結合の割合は抽出された細胞外基質への結合と変わらないことから、網膜色素上皮細胞の細胞外成分に取り込まれないことが判明した(図8)。網膜色素上皮細胞はフィブロネクチン産生の場合となっていることが確認でき

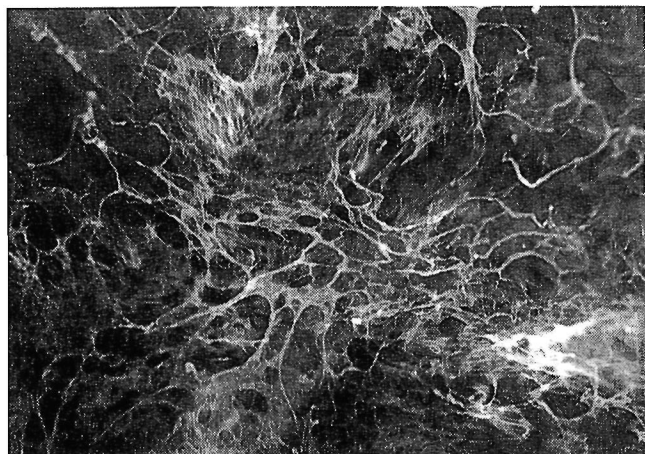


図7 ヒト培養網膜色素上皮細胞の間接蛍光抗体法によるフィブロネクチン染色像(×210)。典型的な編み目状像が見られる。

た。最近 TGF- β が網膜色素上皮細胞でのフィブロネクチン、type I, IV コラーゲンの degradation を抑制していると報告されている²⁷⁾。また細胞外基質については、硝子体中の成分がその産生を制御しており、特に type I コラーゲンを増加させるとの報告がある²⁸⁾。細胞外基質については産生の詳しい情報とともに、各種増殖因子、サイトカインとの関係について今後検討していく課題であると思われる。

VII. その他

その他に産生物質として、PGD₂²⁹⁾、LTC₄³⁰⁾ などのエイコサノイドが挙げられているが、その役割については不明である²⁹⁻³¹⁾。

VIII. 今後の研究の展望

近年網膜変性疾患の治療として、網膜色素上皮細胞の移植実験が行われるようになった。その実験から網膜色素上皮細胞の産生物質が視細胞の neurotrophic factor として働いているのではないかと注目されている^{32,33)}。増殖性硝子体網膜症に関する研究だけでなく、この方面の研究からも今後網膜色素上皮細胞産生物質は重要なものと考えられる。

IX. まとめ

最近までに同定された網膜色素上皮細胞産生物質について述べるとともに、そのひとつであるフィブロネクチンについてのデータを示した。今後網膜色素上皮細胞産生物質の項目はさらに増加するものと考えられ

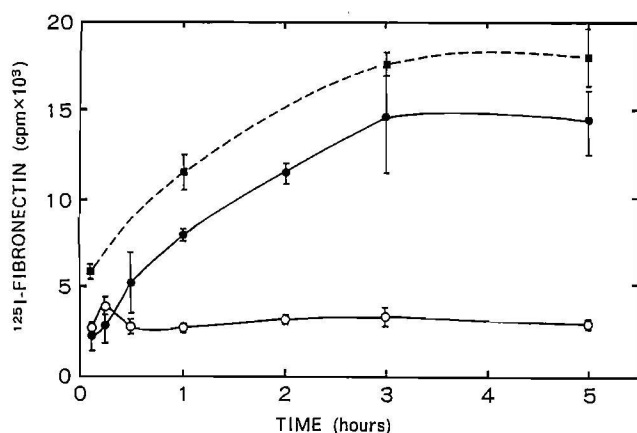


図8 ^{125}I -ヒト血漿フィブロネクチンと培養ヒト網膜色素上皮細胞の反応。Confluentのヒト培養網膜色素上皮細胞を ^{125}I -ヒト血漿フィブロネクチン(400,000 cpm)と血清を含まない培養液中で反応させた。反応させた後の○：細胞のTriton-soluble分画(細胞外基質にあたる), ●：Triton-insoluble分画(細胞を前もってTriton処理して得た細胞外基質(抽出された細胞外基質)と ^{125}I -ヒト血漿フィブロネクチンを同様に反応させて細胞外基質に非特異的に結合するフィブロネクチンを調べた分画。生細胞の細胞外基質への結合と抽出された細胞外基質への結合が同じ割合であることから結合は非特異的であるとわかる。生細胞の細胞外基質に ^{125}I -ヒト血漿フィブロネクチンが取り込まれていないことが確認される。

る。網膜色素上皮細胞産生物質に関する研究は、網膜疾患の病態解明、治療にますます貢献すると思われる。

文 献

- 1) Sigelman, J., and Ozanics, V.: Retina. Biomedical Foundations of Ophthalmology, Chapter 19, Harper & Row, New York, 1986.
- 2) 塚原 勇：網膜色素上皮細胞の機能 日眼 88: 1-21, 1984.
- 3) Edwards, R. B.: Glycosaminoglycan synthesis by cultured human retinal pigmented epithelium from normal postmortem donors and a postmortem donor with retinitis pigmentosa. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 23: 435-446, 1982.
- 4) Macherer, R.: Pathogenesis and classification of massive periretinal proliferation. Br. J. Ophthalmol. 62: 737-747, 1978.
- 5) 吉村長久：増殖性硝子体網膜症—成因と治療—臨眼 46: 797-800, 1992.
- 6) Newsome, D. A., Rodrigues, M. M., and Macherer, R.: Human massive periretinal proliferation. In vitro characterization of cellular components.

- Arch. Ophthalmol. 99: 873-880, 1981.
- 7) Shirakawa, H., Yoshimura, N., Yamakawa, R., Matsumura, M., Okada M., and Ogino, N.: Cell component in proliferative vitreoretinopathy: Immunofluorescent double staining of cultured cells from proliferative tissues. Ophthalmologica 194: 56-62, 1987.
- 8) 松村美代, 岡田守生, 山川良治, 吉村長久, 白川弘泰, 荻野誠周：Epiretinal membraneの構成要素 臨眼 40: 715-720, 1986.
- 9) Noji, S., Matsumoto, T., Koyama, E., Yamaai, T., Matsuo, N., and Taniguchi, S.: Expression pattern of acidic and basic fibroblast growth factor genes in adult rat eyes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 168: 343-349, 1990.
- 10) Schweigerer, L., Malerstein, B., Neufeld, G., and Gospodarowicz, D.: Basic fibroblast growth factor is synthesized in cultured retinal pigment epithelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 143: 934-940, 1987.
- 11) Stenfeld, M. D., Robertson, J. E., Sahipley, G. D., Tsai, J., and Rosenbaum, J. T.: Cultured human retinal pigment epithelial cells express fibroblast growth factors and its receptors. Curr. Eye Res. 8: 1029-1034, 1989.
- 12) Yoshida, H., Tanihara, H., and Yoshimura, N.: Platelet-derived growth facotr gene expression in cultured human retinal pigment epithelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 189: 66-71, 1992.
- 13) Campochiaro, P. A., Sugg, R., Grotendorst, G., and Hjelmeland, L. M.: Retinal pigment epithelial cells produce PDGF-like proteins and secrete them into their media. Exp. Eye Res. 49: 217-227, 1989.
- 14) Tanihara, H., Yoshida, M., Matsumoto, M., and Yoshimura, N.: Identification of transforming growth factor- β expressed in cultured human retinal pigment epithelial cells. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 34: 413-419, 1993.
- 15) Connor, T. B., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Danielpour, D., Dart, L. L., Michels, R. G., de-Bustros, S., Enger, C., Kato, H., Lansing, M., Hayashi, H., and Glaser, B. M.: Correlation of fibrosis and transforming growth factor-beta type 2 level in the eye. J. Clin. Invest. 83: 1661-1666, 1989.
- 16) Tanihara, H., Yoshida, M., and Yoshimura, N.: Tumor necrosis factor- α gene is expressed in

- stimulated retinal pigment epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 1029-1034, 1992.
- 17) Jaffe, G. J., Van Le, L., Valea, F., Haskill, S., Roberts, W., Arend, W. P., Stuart, A., and Peters, W. P.: Expression of interleukin-1 α , interleukin-1 β , and interleukin-1 receptor antagonist in human retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 55: 325-335, 1992.
 - 18) Elner, V. M., Scales, W., Elner, S. G., Danfort, J., Kunkel, S. L., and Strieter, R. M.: Interleukin-6 (IL-6) gene expression and secretion by cytokine-stimulated human retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 54: 361-368, 1992.
 - 19) Planck, S. R., Dang, T. T., Graves, D., Tata, D., Ansel, J. C., and Rosenbaum, J. T.: Retinal pigment epithelial cells secrete interleukin-6 in response to interleukin-1. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33: 78-82, 1992.
 - 20) 千葉可芽里, 稲田捷也, 坂本真栄: ヒト培養網膜色素上皮細胞はインターロイキン6を産生する 日眼 97: 29-35, 1993.
 - 21) Elner, V. M., Strieter, R. M., Elner, S. G., Baggiolini, M., Lindley, I., and Kunkel, S. L.: Neutrophil chemotactic factor (IL-8) gene expression by cytokine-treated retinal pigment epithelial cells. *Am. J. Pathol.* 136: 745-750, 1990.
 - 22) Jaffe, G. J., Peters, W. P., Roberts, W., Kurtsberg, J., Stuart, A., Wang, M. A., and Soudemire, J. B.: Modulation of macrophage colony stimulating factor in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 54: 595-603, 1992.
 - 23) Campochiaro, P. A., Jerdan, J. A., and Galser, B. M.: The extracellular matrix of human retinal pigment epithelial cells in vivo and its synthesis in vitro. *Invest. ophthalmol. Vis. Sci.* 27: 1615-1621, 1986.
 - 24) Yamakawa, R., Shirakawa, H., Okada, M., Yoshimura, N., Matsumura, M., and Ogino, N.: Retinal pigment epithelial cells produce fibronectin. *Ophthalmic Res.* 19: 338-343, 1987.
 - 25) Yamakawa, R., Shirakawa, H., Yoshimura, N., Okada, M., Asayama, K., Matsumura, M., and Ogino, N.: Involvement of fibronectin in in vitro regeneration of retinal pigment epithelium. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 226: 11-14, 1988.
 - 26) Campochiaro, P. A., Jerdan, J. A., Glaser, B. M., Cardin, A., and Michels, R. G.: Vitreous aspirates from patients with proliferative vitreoretinopathy stimulate retinal pigment epithelial cell migration. *Arch. Ophthalmol.* 103: 1403-1405, 1985.
 - 27) Yoshimura, N., Tanihara, H., Yoshida, M., and Honda, Y.: Transforming growth factor-beta-induced response of retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (suppl)* 34: 1019, 1993.
 - 28) Martini, B., Pandey, R., Ogden, T. E., and Ryan, S. J.: Cultures of human retinal pigment epithelium-modulation of extracellular matrix. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33: 516-521, 1992.
 - 29) Yamakawa, R., and Ogino, N.: Chick retinal pigment epithelium exhibits glutathione requiring prostaglandin D₂ synthetase activity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 27: 1058-1062, 1986.
 - 30) Bazan, N. G., Bazan, H. E. P., Birkle, D. L., and Rossowska, M.: Synthesis of leukotrienes in frog retina and retinal pigment epithelium. *J. Neurosci. Res.* 18: 591-596, 1987.
 - 31) Bazan, N. G.: Metabolism of arachidonic acid in the retina and retinal pigment epithelium: biological effects of oxygenated metabolites of arachidonic acid. *Prog. Clin. Biol. Res.* 312: 15-37, 1989.
 - 32) Gouras, P., Lopez, R., DU, J., Gelanze, M., Kwun, R., Brittis, M., and Kjeldbye, H.: Transplantation of retinal cells. *Neuro-Ophthalmol.* 10: 165-176, 1990.
 - 33) Bok, D.: Retinal transplantation and gene therapy-recent realities and future possibilities. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34: 473-476, 1993.