

網膜色素上皮細胞の試験管内遊走における  
細胞形態と細胞骨格に関する研究

永井春彦 鈴木純一

札幌医科大学眼科学講座 (主任 中川 喬 教授)

澤田典均

札幌医科大学病理学第2講座 (主任 森 道夫 教授)

Studies on Morphology and Cytoskeletal Organization of  
Retinal Pigment Epithelial Cells in Migration *in vitro*

Haruhiko NAGAI and Jun-Ichi SUZUKI

*Department of Ophthalmology, Sapporo Medical College, Sapporo*

(Chief : Prof. T. NAKAGAWA)

Norimasa SAWADA

*Department of Pathology (Section 2), Sapporo Medical College, Sapporo*

(Chief : Prof. M. MORI)

**ABSTRACT** Earlier studies on proliferative vitreoretinopathy (PVR) have shown that proliferation and migration of retinal pigment epithelial cells (RPE) are responsible for the pathogenesis of PVR. In this study, we examined the cell morphology and migratory activity of cultured RPE with special reference to the cytoskeletal organization. After 7 days in culture, porcine RPE at the center of colonies displayed hexagonal configuration with close cell-cell contact. Confocal laser scanning microscopy (LSM) revealed that these cells were 10-20  $\mu\text{m}$  in height with a hexagonal columnar configuration. They migrated and transformed into spindle shapes at the edges of a linear wound, suggesting that epithelial-mesenchymal transition of RPE takes place in association with *in vitro* wound healing. The RPE in well-differentiated columnar configuration displayed prominent apical circumferential microfilament bundles (CMBs) along the plasma membrane and thick microfilament bundles (stress fibers) at the base. Longitudinal microtubule bundles along the apical-basal axis of the columnar cells were also clearly demonstrated by LSM. On the other hand, the RPE of elongated spindle shape at the edges of the wound and those in the colonies lacked CMBs and longitudinal microtubules, but had prominent stress fibers. Vimentin-containing intermediate filaments were observed at the leading margins of the migrating RPE. These results indicate that RPE turn into mesenchyme-like cells in response to a focal wound *in vitro* and that the cytoskeleton dramatically changes in association with the changes in cell morphology and motility of RPE.

(Received December 14, 1990 and accepted January 8, 1991)

**Key words :** Retinal pigment epithelial cells, Proliferative vitreoretinopathy, Cytoskeleton,  
Wound healing, Cell culture

## 1 緒 言

網膜色素上皮細胞 (retinal pigment epithelial cells; RPE) は網膜の最外層にあって、視細胞外節を貪食し、また、視細胞と脈絡膜との間で物質代謝を行うとともに血液網膜関門の構成要素として機能するなど、重要な生理的役割を果たしている。一方、ある種の網膜剥離眼では、RPEが硝子体腔ないし網膜下腔へ遊走し、他の細胞とともに眼内に膜様の増殖組織を形成し、さらにこの増殖組織が収縮して網膜を牽引し、難治性の網膜剥離を惹起する。この病態は増殖性硝子体網膜症 (proliferative vitreoretinopathy; PVR) と呼ばれ、治療に抵抗する重篤な病態として注目されている。

近年、PVRの発生病理に関する種々の研究から、網膜裂孔の存在や網膜剥離の手術操作に伴う過剰な機械的刺激、さらに種々の原因で生じる血液網膜関門の障害が、PVR発症の重要な原因であることが明らかにされている<sup>1,2)</sup>。一方、増殖組織の構成細胞についての組織学的研究から、PVRの発症にはRPEのほか、グリア細胞、マクロファージ、および線維芽細胞が関与することが知られている<sup>3-6)</sup>。このうちRPEは、最初に硝子体腔ないし網膜下腔に遊走し、他の炎症性細胞の遊走のひきがねとなり、これらの細胞と共に増殖組織を形成すると考えられている<sup>2)</sup>。

我々は、RPEが増殖・遊走する過程で生ずる細胞学的変化を解析する目的で、ブタRPEを培養した。得られた培養RPEについて、細胞の形態維持、増殖、遊走など種々の事象に重要な役割を果たすとされている細胞骨格の3次元構築を、レーザー共焦点走査顕微鏡 (confocal laser scanning microscope; LSM) を用いて、細胞の光学的断層像を得ることにより観察し、細胞の形態、遊走能との関連について検討した。また、培養皿上で人工的に創傷を作製し、創傷治癒にともなう細胞の遊走と形態変化を観察した。

## 2 実験方法

### 2.1 ブタ RPE の分離・培養

培養に用いたRPEは、屠殺直後のブタから可及的速やかに、かつ無菌的に摘出した眼球から採取した。

眼球からのRPEの分離方法は、Flood *et al.*<sup>7)</sup>の方法に若干の改変を加えた。摘出した眼球の表面を70%エタノールにて洗浄し、さらにリン酸緩衝液 (phosphate buffer saline; PBS) にて2回洗浄した。眼球に赤道部で円周状に切開を加え、前部硝子体を含む前眼部を

除去した後、残留硝子体を吸引した。RPEを強膜側に残して神経網膜を剥離し、これを視神経乳頭部で切断し、RPEが露出した状態の“Eye cup”を作製した。Eye cupに0.25%トリプシン (Gibco社, USA) を満たし、5%CO<sub>2</sub>、37℃の培養装置で1時間処理した。トリプシン吸引後、eye cupを血清含有培地で洗浄、パスツールピペットを用い、ブルッフ膜を損傷しないように、実体顕微鏡下でRPEを吸引した。培地はDulbecco's modified Eagle medium (日水) と Ham's F12 (極東) の等量混合液に10%胎児牛血清 (Filtron社, Australia)、100 units/ml Penicillin G、100 μg/ml Streptomycin (以上Gibco社, USA)、1 μg/ml Amphotericin B (Flow laboratory社, UK) を添加したものをを用いた。吸引したRPE浮遊液をさらに上記の培地で洗浄・希釈し、35 mm径のプラスチック培養皿に約5.0×10<sup>4</sup> cells/dishの濃度で播種した。一部の培養皿には予め滅菌した18 mm×24 mmのカバーガラスを設置し、その上に細胞を播種した。5%CO<sub>2</sub>、37℃の培養装置内で5日から7日間静置し、その後1週間に2度の割合で培地交換を行った。

### 2.2 培養ブタ RPE の実験的創傷治癒

初代培養2週ないし3週で多角形の細胞からなる単層のシートが得られる。プラスチック培養皿またはカバーガラス上で、このシートに対し創を作製した。位相差顕微鏡下で幅約5 mmの滅菌した剃刀の刃を細胞のシートに押し付け、そのまま刃の長軸に対し垂直方向に刃を動かして細胞を搔爬することにより、長さ約5 mm、幅約0.5 mmの創を作製した。創作製直後に洗浄を兼ねて培地を2回交換し、2.1と同様の培養条件下で培養をつづけ、創傷治癒の過程を経時的に位相差顕微鏡で観察した。

### 2.3 免疫組織化学

#### 2.3.1 材 料

2.1で得られた初代培養7日から10日のRPEに対し、マイクロフィラメントの主な構成蛋白質であるアクチン、微小管の主な構成蛋白質であるチューブリン、中間径フィラメント (intermediate filament; IF) の構成蛋白質のひとつであるケラチンおよびビメンチンの4種の細胞骨格蛋白質について観察した。またアクチンについては、2.2の過程で創傷作製24時間後に固定した細胞について同様に観察した。

#### 2.3.2 固 定

アクチン、ケラチンおよびビメンチンの観察には、細胞の付着したカバーガラスをPBSで2回洗浄後、-20℃のアセトンで15分間処理した後、蛍光標識を

行った。チューブリンの観察には、固定の段階での脱重合の防止と LSM での観察に適した標本を作成するために、Bacallao and Stelzer<sup>9)</sup>の方法に準じ、pH-shift を利用したパラホルムアルデヒドによる固定法を用いた。細胞の付着したカバーガラスを 5mM EGTA, 2mM MgCl<sub>2</sub> を添加した 3% パラホルムアルデヒド溶液 (pH 6.5) で 37°C, 5 分間処理した後, 100 mM NaB<sub>4</sub>O<sub>7</sub> を添加した 3% パラホルムアルデヒド溶液 (pH 11) で室温にて 10 分間処理した。さらに 1 mg/ml の NaBH<sub>4</sub> を添加した PBS (pH 8) にて 3 分間の洗浄を 3 回繰り返した後, 0.1% Triton-X100 添加 PBS で 1 分間処理し, 以下の反応に供した。

### 2・3・3 反応

2・3・2 により固定した細胞に対し, 各種細胞骨格蛋白の蛍光標識を行った。アクチンの観察には, F-アクチンに特異的に結合するローダミン・ファロイジン (Molecular Probes 社, USA) を, またチューブリン, ケラチン, ビメンチンの観察には 1 次抗体としてそれぞれラット抗チューブリン抗体 YL 1/2 (Sera-lab 社, USA), マウス抗ケラチン抗体 AE1 (ICN 社, USA), ウサギ抗ビメンチン抗体 (Bio-Science Products 社, Switzerland) を, 2 次抗体としてそれぞれ FITC 結合ウサギ抗ラット Ig, 同ウサギ抗マウス Ig, 同ブタ抗ウサギ Ig (以上 DAKO 社, Denmark) を反応させ, 蛍光標識を行った。

### 2・3・4 蛍光顕微鏡および LSM による観察

上記のように標識した標本を, 蛍光顕微鏡 (Nikon FX) で観察した。さらに一部の標本は, LSM (MRC-500/500J, Bio-Rad 社, UK) を用いて上下方向に連続的に光学的断層像を得ることにより, 蛍光標識した細胞骨格の 3 次元構造を観察した。なお, レーザー走査による蛍光色素の褪色を防止するため, 封入剤として 90% グリセロール液に 1 mg/ml のパラフェニレンジアミンを添加したものをを用いた。

以上, 2・1 から 2・3 までの実験操作及び観察は, 原則として最低 3 回以上, それぞれ異なる個体から採取した RPE について同一条件で行い, 共通してみられた所見を有意の観察所見とした。

## 3 結果

### 3・1 ブタ RPE の培養

播種後 5 日目までに大部分の細胞はカバーガラスまたは培養皿に接着し, 7 日から 10 日で十数個から百個程度の RPE からなるコロニーが明瞭となった (Fig. 1a)。多くのコロニーでは, 中央部に 5 角形ないし 6 角形の

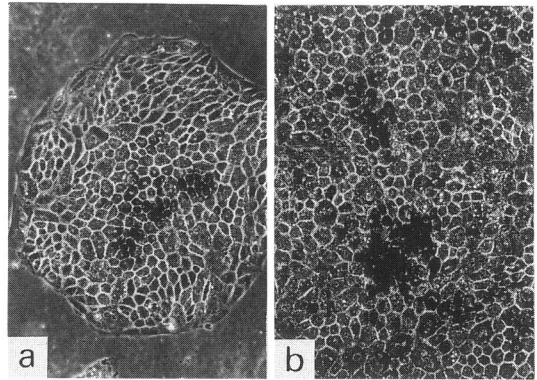


Fig. 1 Phase-contrast micrographs of (a) a colony formed by the porcine RPE 7 days in culture and (b) monolayer of the RPE with a typical epithelial configuration 15 days in culture ( $\times 60$ ).

上皮性形態を呈する細胞の集団がみられた。一方, コロニー辺縁の細胞は紡錘形ないし不整形を呈し外方へ伸展する像がみられた。これらのコロニーの細胞は, すべてメラニン顆粒を有していた。

付着した細胞の中には線維芽細胞がわずかに混入することがあるが, この段階では形態・メラニンの有無から容易に判別可能であり, 明らかに RPE であると判定されるものを観察対象とした。

線維芽細胞の混入の少ない場合には数週で多角形の RPE が密に配列した単層が形成された (Fig. 1b)。

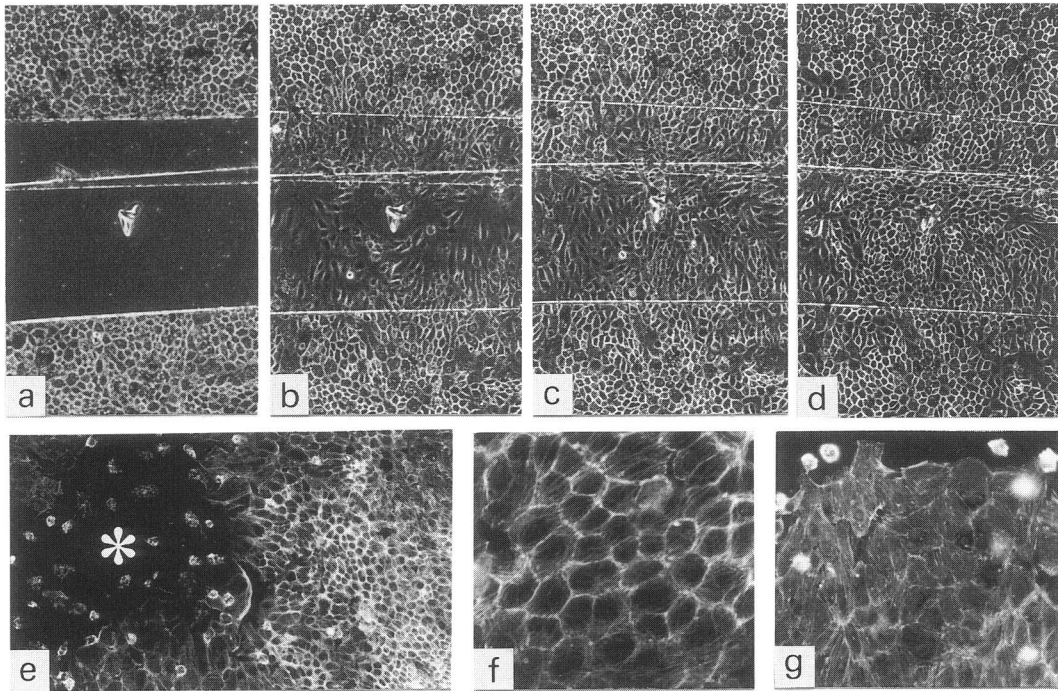
### 3・2 培養ブタ RPE の実験的創傷治癒

創傷作製前には多角形の RPE が単層のシートを形成していたが, 創傷作製後 36 時間までに, 創縁の細胞は多角形柱状の上皮性形態を失い, 両側の創縁から不整形ないし紡錘形を呈して創の領域へ伸展・遊走する所見が認められた。約 60 時間で創の両側から伸展・遊走した紡錘形の細胞が互いに接触し創が細胞で埋められた。約 96 時間で創を埋めた細胞は再びもとの多角形に戻ることが観察された (Fig. 2)。この過程で, 創縁から数個の細胞を隔てた位置にある細胞に注目すると, 創傷治癒の全経過を通じて, 形態, 位置ともに不変であり, また, 創縁付近の細胞に多数の分裂像が見られたことから, 創傷治癒には創縁に接する一部分の細胞のみが増殖・遊走することが示された。

### 3・3 培養ブタ RPE の細胞骨格

#### 3・3・1 アクチン

初代培養 7 日ないし 10 日のコロニーでは, コロニー中央部の上皮性形態に分化した細胞で 5 角形ないし 6 角形の細胞辺縁に沿って強い局在が観察された。これは



**Fig. 2** Process of in vitro wound healing of cultured RPE. a-d; Phase-contrast micrographs of the RPE (a) 0 hr, (b) 36 hrs, (c) 60 hrs, and (d) 96 hrs after wounding ( $\times 40$ ). e-g; Fluorescent micrographs of rhodamine-phalloidin stained RPE 24 hrs after wounding. (e) Cells at the edge of the wound turned into flattend shape and migrate toward the wound (\*) ( $\times 45$ ). (f) Cells located distant from the wound display well-packed columnar configuration and prominent CMBs ( $\times 180$ ). (g) Cells at the edge of the wound exhibit no distinct CMBs, but display many stress fibers running across the cytoplasm ( $\times 90$ ).

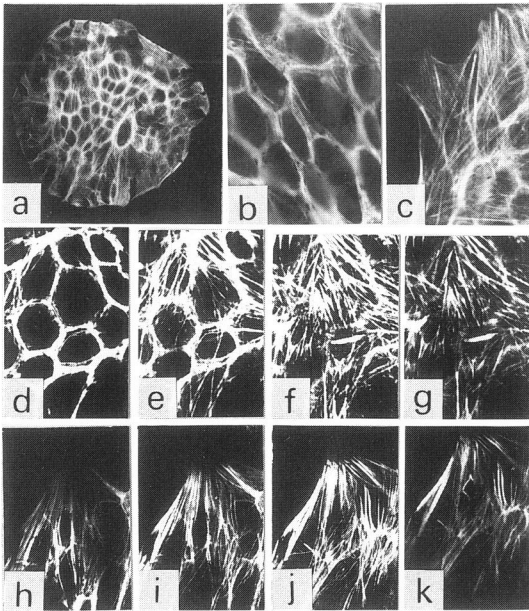
RPEの持つ circumferential microfilament bundles (CMB)に相当するものと考えられた。また、これらの細胞は細胞質内に交錯するストレスファイバーを有していた。一方、コロニー辺縁の不整形ないし紡錘形の細胞では、細胞辺縁の局在は不明瞭となり、多くのストレスファイバーが相対的に明瞭に認められた(Fig. 3a-c)。また、実験的創傷治癒の過程で、創傷作製後24時間目における細胞内F-アクチンの分布を観察すると、創縁から離れた細胞では、上記のコロニー中央部の細胞にみられた所見と同様に、CMBが明瞭にみられるほか、ストレスファイバーが認められた。一方、創部に遊走している細胞では、上記のコロニー辺縁の細胞と同様、細胞辺縁の局在はなくなり、多くのストレスファイバーが交錯する所見を呈した(Fig. 2 e-g)。

LSMを用い、細胞のbasal側からapical側に共焦点面を上下方向に移動させつつ走査すると、コロニー中央部で細胞の高さはおよそ $10\mu\text{m}$ から $20\mu\text{m}$ で、これに対しコロニー辺縁の細胞の高さはこれより数 $\mu\text{m}$ 低く、辺縁に向かうにしたがって低くなり、最辺縁部で

は $1\mu\text{m}$ 以下の厚さで硝子面に付着していることが明らかとなった。コロニー中央部の細胞ではCMBは細胞のapical側に偏在し、隣接細胞との接着面のapical側先端部付近に最も局在が強く、これより下方数 $\mu\text{m}$ にわたり局在の程度を減じつつ連続した構造が認められた。これより下方、すなわち細胞のbasal側数 $\mu\text{m}$ の高さには、CMBに相当する構造は認められなかった。またこれらの細胞では、ストレスファイバーは細胞のbasal側数 $\mu\text{m}$ までの高さに限局して認められた(Fig. 3d-g)。一方、コロニー辺縁の不整形の細胞では、細胞辺縁の局在が不明瞭になるとともに、ストレスファイバーが細胞質内全体にわたりほぼ均等に走行している所見がみられた(Fig. 3h-k)。

### 3・3・2 チューブリン

蛍光顕微鏡による観察では、コロニー全体の細胞にほぼ均等に細胞内の網目状構造として蛍光が認められた。細胞分裂中の細胞では紡錘糸が明瞭に標識された(Fig. 4 a)。しかし、蛍光顕微鏡で観察した限りではコロニー中央部の細胞と辺縁の細胞との間でチューブリン

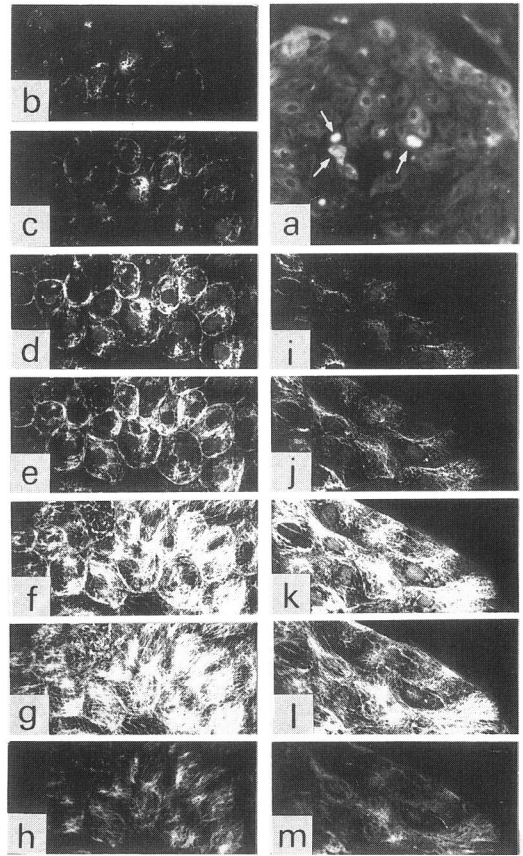


**Fig. 3** Fluorescent micrographs of rhodamine-phalloidin stained RPE 7 days in culture. a-c; Images obtained by conventional epifluorescence microscopy. (a) Low magnification ( $\times 70$ ), and (b) high magnification at the center and (c) the edge of the colony ( $\times 150$ ). Cells at the center of the colony exhibit prominent CMBs and stress fibers. In contrast, cells at the edge of the colony exhibit no CMBs, but many stress fibers. d-g; Images of serial optical sections by LSM at  $2\mu\text{m}$  intervals from (d) the apical to (g) the basal region of the cells at the center of the colony ( $\times 150$ ). CMBs and stress fibers are localized to the apical and the basal regions, respectively. h-k; Images of serial optical sections by LSM at  $1\mu\text{m}$  intervals from (h) the apical to (k) the basal region of the cells at the edge of the colony ( $\times 150$ ).

ンの細胞内分布に明らかな差異は認められなかった。LSMを用いて観察すると、コロニー中央部の細胞では、細胞の basal 側に微小管の網目構造があり、それより apical 側では隣接細胞との接着面に沿って局在がみられた。その他、核の周囲およびこれから細胞周辺に向かった放射状の局在も認められた(Fig. 4 b-h)。一方、コロニー辺縁の細胞では、細胞質内の網目構造は同様に認められたが、細胞辺縁の局在はみられなかった(Fig. 4i-m)。

**3・3・3 ケラチンおよびビメンチン**

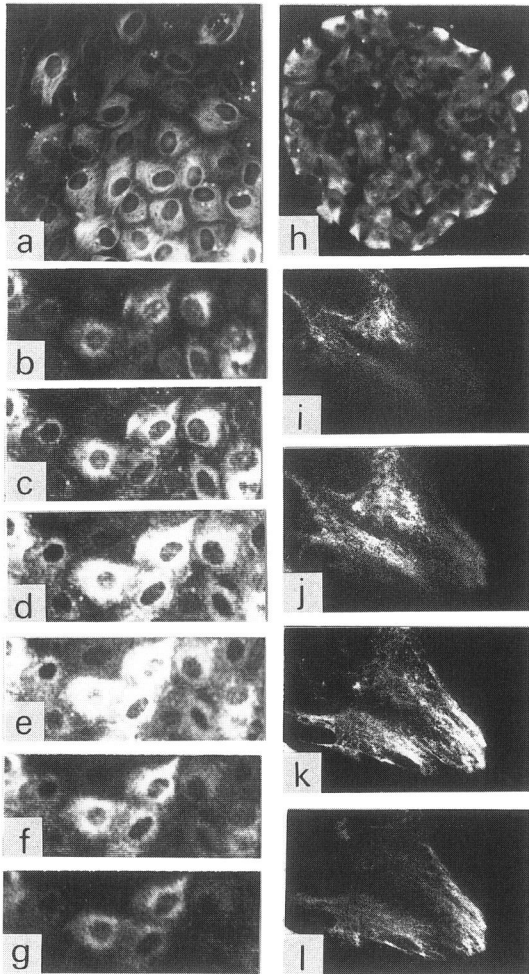
ケラチンは、コロニーのほぼ全体にわたり、ほとんどの細胞に証明されたが、部位により蛍光に強弱がみられた (Fig. 5a)。LSMによる観察では、ケラチンは



**Fig. 4** Immunofluorescent micrographs of the RPE 7 days in culture labeled with the anti-tubulin antibody to show the distribution of microtubules. a; An image obtained by conventional epifluorescence microscopy ( $\times 70$ ). A network of microtubules throughout the cytoplasm is seen in all cells except the dividing ones (arrows) in which mitotic spindles are labeled. b-m; Images of serial optical sections by LSM of RPE located at the central (b-h) and peripheral (i-m) portions of a colony at  $1\mu\text{m}$  intervals from (b, i) the apical to (h, m) the basal region ( $\times 150$ ). Bright polygons made of many dot-like structures are seen clearly between the apical and the basal levels of the nucleus in the cells at the center of the colony (c-f), suggesting that the bundles of microtubules running perpendicular to the image plane.

核をとりまくように分布するように認められた(Fig. 5b-g)。しかし蛍光の強弱とコロニー内の相対的な位置や細胞の形態との間に明かな関連はなく、また、細胞形態によるケラチンの細胞内分布の差異も認められなかった。

ビメンチンはコロニーの辺縁にある細胞に強い発現



**Fig. 5** Immunofluorescent micrographs of the RPE 7 days in culture labeled with the anti-keratin (a-g) and the anti-vimentin (h-l) antibodies. a; An image obtained by conventional epifluorescence microscopy ( $\times 150$ ). b-g; Images of serial optical sections by LSM at  $1\mu\text{m}$  intervals from (b) the apical to (g) the basal region of the cells at the center of the colony ( $\times 150$ ). The networks of the keratin are found. h; An image obtained by conventional epifluorescence microscopy ( $\times 70$ ). The vimentin is present distinctly in cells at the edge of the colony. i-l; Images of serial optical sections by LSM at  $1\mu\text{m}$  intervals from (i) the apical to (l) the basal region of the cells at the edge of the colony ( $\times 225$ ). The vimentin-containing intermediate filaments running slantwise from perinuclear region to the basal plane of the leading edge of the migrating RPE cells are seen.

が認められ、コロニー中央部では蛍光はきわめて微弱であった(Fig. 5h)。コロニー辺縁の細胞を詳細に観察すると、細胞が高さを減じて外方に伸展しつつある部

分に特に強く、外方に向かって放射状に走行するフィラメントとして認められた。これをLSMで観察すると、このフィラメントは細胞の最辺縁部でガラス面に付着し、ここから核の方向に向かって斜め上方に走行する構造が明らかになった(Fig. 5i-l)。

## 4 考 察

### 4-1 培養ブタ RPE の有用性

RPE の分離・培養はヒト、サル、ウシ、ブタ、ウサギ、ラット、ニワトリ胚等種々の動物種から様々な方法で行われている<sup>7,9-17)</sup>。しかし、初代培養で多角形柱状の上皮性細胞形態を再現する例は必ずしも多くはない。RPE が上皮としての属性を失って増殖・遊走する過程を観察する際、形態変化を細胞の状態を示す指標とすることが最も確実な方法と考えられるが、そのためには上皮性形態を容易に再現できる培養系が必要となる。今回我々が用いた方法は、初代培養で多角形柱状の上皮性形態を有する RPE が比較的容易に得られ、形態観察を行うには非常に有用な培養系であると考えられる。

### 4-2 培養ブタ RPE の増殖・遊走における形態変化

実験的創傷治癒の過程で、創縁の細胞は、RPE 本来の多角形柱状の細胞形態を失い、扁平な不正形の細胞となって創部に伸展し、さらに、ある細胞は紡錘形を呈して創部に遊走した。このような形態変化は、細胞の増殖能、遊走能の亢進にともなう変化と考えられ、同様の形態変化が初代培養約 7 日目のコロニー辺縁にみられることから、この部位の細胞も、実験的創傷の創縁の細胞と同様、高い増殖能、遊走能を有するものと考えられる。前述のように、PVR の発症は、一種の創傷が網膜に加わり、過剰な創傷治癒反応の結果として膜状増殖組織が形成されることであると考えられる。したがって、PVR 発症時に硝子体腔ないし網膜下腔に遊走する RPE には、今回の実験で観察したコロニー辺縁の細胞や、実験的創傷の創縁の細胞と、基本的に類似の細胞学的変化が生じているものと推測される。

今回の創傷治癒実験では、創部に遊走した不正形ないし紡錘形に変化した RPE、すなわち上皮細胞としての属性を失い間葉系細胞の性格を得た RPE が、再び多角形柱状の上皮性細胞に戻ることが観察された。これは、RPE が上皮性細胞から間葉系細胞に可逆的に変化しうることを示唆している。Boyer *et al.*<sup>18)</sup>は、このような上皮-間葉系間の可逆的变化を epithelial-mesenchymal transition (EMT) と呼んでいるが、我々の実

験結果も RPE の創傷治癒にともなう EMT であると考えられる。EMT は、上皮性細胞の分化の過程をはじめとする種々の細胞学的特性を研究する上で、きわめて興味深い事象であり、我々の RPE を用いた創傷治癒の実験系は、今後様々な角度から EMT という事象を検索する上で大きな価値を持つと考えられる。

#### 4.3 培養ブタ RPE の増殖・遊走と細胞骨格

##### 4.3.1 アクチン

アクチンは RPE の細胞骨格の主な構成要素であり、*in vivo* および *in vitro* でその細胞内分布について多くの報告がある<sup>19-22)</sup>。これらの報告によれば、培養細胞においても *in vivo* の場合にきわめて類似したアクチン分布の再構成がみられ、六角形の CMB とストレスファイバーが主な特徴的所見である。今回の我々の観察でも、ほぼこれと同様の所見が得られた。Truksen *et al.*<sup>22)</sup>、および Matsumoto *et al.*<sup>12)</sup> は、培養下で、RPE が上皮性に分化が進むにしたがって、CMB が明瞭になりストレスファイバーは消失に向かうと報告している。我々の観察結果では、明瞭な CMB を認める細胞でも basal 側に局限してストレスファイバーがみられた。この所見は、これらの細胞が上皮性分化を示しているものの、*in vitro* で完全に分化するためにはさらに何らかの因子が必要であることを示すものと考えられる。しかし、コロニー辺縁や創傷の創縁に伸展・遊走した細胞との比較において、F-アクチンの細胞内局在に明らかな差がみられ、F-アクチン分布の変化は培養 RPE の上皮としての分化度を評価する指標として有用と思われる。

LSM による 3 次元観察では、CMB が細胞の apical 側にあること、ストレスファイバーが basal 側に局在することが確認された。この所見は従来光学顕微鏡的に焦点面を移動させることにより観察されていたが、厚みのある標本で一つの焦点面のみを明瞭に観察することは困難であった。今回 LSM を用いたことにより、アクチンをはじめとする RPE の細胞骨格をはじめ 3 次元的に分割して明瞭に観察・記録することができた。今後、細胞骨格のさらに微細な変化を追求する上で、LSM は有用な手段になるものと思われる。

##### 4.3.2 チューブリン

培養 RPE の微小管の細胞内分布については Owaribe<sup>19)</sup> および Truksen *et al.*<sup>20)</sup> の報告がある。それによれば、上皮性形態を呈した細胞も、コロニー辺縁の伸展した細胞も、基本的には核の近傍にある微小管形成中心 (microtubules organizing center; MTOC) から細胞周辺部に向かい細胞質内を放射状に

走行する構造をもち、細胞形態による大きな差異は報告されていない。しかし、今回我々が LSM で観察した結果からは、多角形の細胞では多角形の細胞辺縁に沿う局在がみられ、細胞形態がくずれるにしたがいこの局在は失われた。この細胞辺縁の蛍光は画像上点状に近いことから、この部位での微小管は細胞の basal 側から apical 側にかけて縦方向に配列しているものと推察され、この構造は細胞の形態維持になんらかの関与を持つと考えられる。これと同様の構造は、Bacallao *et al.*<sup>23)</sup> により、分化度の高い上皮細胞の細胞株である Mardin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞で報告されている。彼らは培養条件下で、MDCK 細胞が多角形柱状の上皮性形態を再現する過程における微小管の細胞内分布を LSM を用いて観察し、分化の進んだ柱状細胞に、細胞側壁に沿い縦方向に配列する微小管の存在を認めている。我々の観察所見は、RPE においてこの微小管の配列を初めて指摘したものであるが、従来の光学顕微鏡的観察では原理的・手技的に明瞭に観察できなかったものが、LSM によって検出できたものと考えている。

##### 4.3.3 IF

IF は十数種類の蛋白から構成されており、上皮細胞ではケラチン、間葉系細胞ではビメンチン、筋細胞ではデスミンというように、細胞の種類と IF 構成蛋白の間に一定の関係があることが知られている。このことを利用して、IF 蛋白の免疫組織学的検索が、細胞分化の研究や、腫瘍の病理診断などに応用されている。

ケラチンは上皮細胞に認められる IF 蛋白であり、今回の実験で培養ブタ RPE にケラチンが陽性であったことは、この細胞が真の上皮細胞であることを示している。RPE におけるケラチンの細胞内分布については、Truksen *et al.*<sup>21)</sup> がヒト培養 RPE で、細胞質内の広範囲にみられる網状構造を報告している。我々の LSM による観察所見でも、核をとりまくように分布するフィラメントの網状構造として認められた。

ビメンチンは多くの間葉系細胞と大部分の培養細胞にみられるとされている。また、発生過程での未分化細胞では胚葉起源によらず発現がみられる。Kasper *et al.*<sup>24)</sup> はヒト RPE はビメンチンを持たないと報告している。また、Owaribe *et al.*<sup>25)</sup> はニワトリ胚の RPE を培養し、RPE の発生・分化の過程でビメンチンが発現するが分化が完了すると消失することを観察している。

今回の観察結果では、培養ブタ RPE にはビメンチンの発現がみられ、特にコロニー辺縁の伸展した細胞に著明であった。培養条件下であることがビメンチン発

現の一つの原因であることを考慮しなければならないが、上皮性形態を維持した細胞では蛍光が微弱で、遊走過程にある細胞に、しかもそれらの細胞の現に伸展しつつある部分にビメンチンが強く発現している所見は興味深い。Boyer *et al.*<sup>18)</sup>はラット膀胱癌由来の細胞株を用いて EMT の系を作製し、間葉系細胞様形態への transition に並行して、ケラチンの発現の減少とビメンチンの発現の増加が生じることを観察している。我々の観察所見も、上皮性形態が崩れて間葉系細胞様形態を示す細胞にビメンチンが強く発現しており、RPE においても上皮から間葉系様への transition にともないビメンチンの発現が増加するものと考えられる。白川ら<sup>20)</sup>は、ヒト PVR の手術例から得られた増殖組織について IF 蛋白を免疫組織学的に検索し、ケラチンとビメンチンの両方を持つ細胞の存在を報告し、この細胞は RPE 由来であると推察している。このことは今回の実験結果とあわせて、PVR に関与している RPE は間葉系様に変化した細胞であることを示すものと考えられる。

Hergott *et al.*<sup>27)</sup>は、ニワトリ胚の RPE および脈絡膜の組織培養の系で我々と類似の実験的創傷を RPE に作製し、遊走する RPE の細胞骨格を観察している。この中で、創縁の不正形に伸展した RPE の先端部に特徴的にみられる IF の存在を電子顕微鏡で観察しているが、これは今回の LSM による観察で得られたビメンチンの走行にはほぼ一致している。RPE の伸展・遊走にビメンチンが深く関与していることが示唆される。

今回は創傷治癒にともなう EMT については IF の消長を実際に検討することはできなかったが、今後は、この実験系を用いて、IF と深い関係を持つデスモゾームをはじめとする細胞間結合装置の変化をふくめ、さらに検討を進めることにより、細胞の増殖・遊走についての知見が得られるものと考えられる。

## 5 要 約

1) PVR の発症過程において RPE にみられる細胞学的変化を検討するためにブタ RPE を分離・培養し、上皮性形態をよく再現する培養法を確立した。

2) コロニー伸展および実験的創傷治癒の過程で、RPE の遊走にともなう著しい形態変化が観察された。

3) LSM を用いた細胞骨格の 3 次元の観察から、細胞側壁を縦方向に走行する微小管の存在が明らかとなり、RPE の上皮性細胞形態維持には細胞膜に沿ったマイクロフィラメントの他に、微小管が関与している可能性が示唆された。

4) 遊走にともない RPE の細胞骨格には、アクチンの CMB の消失、縦方向の微小管の消失、これらの 3 次元の局在の乱れ、および細胞伸展部位でのビメンチンの発現増強が認められた。

5) 培養ブタ RPE の実験的創傷治癒は、EMT を惹起し、EMT の細胞学的特性を検討する実験系として利用しうることが示唆された。

6) LSM は培養細胞の細胞骨格など細胞内微細構造の観察に、有用性を持つことが確認された。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導・御校閲を賜った中川喬教授、森道夫教授に深謝いたします。また、種々のご協力をいただいた札幌医科大学眼科学講座、同病理学第 2 講座、同病理学第 1 講座の諸氏、実験施設の使用につきご協力いただいた北海道大学医学部解剖学第 3 講座阿部和厚教授、並びに同中央研究部の諸氏に深く感謝いたします。

尚、本研究は、文部省科学研究費（鈴木）の補助を受けた。

## 文 献

1. Claes, C., Freeman, H. M. and Tolentino, F. I.: PVR: an overview, In: Freeman, H. M. and Tolentino, F. I.: Proliferative Vitreoretinopathy. 12-21, Springer-Verlag, New York (1988).
2. Glaser, B. M. and Lemor, M.: Pathobiology of proliferative vitreoretinopathy, In: Ryan, S. J.: Retina III. 369-383, Mosby, St Louis, (1989).
3. Clarkson, J. G., Green, W. R. and Massof, D.: A histopathologic review of 168 cases of preretinal membrane. *Am. J. Ophthalmol.* **84**, 1-17 (1977).
4. Kampik, A., Kenyon, K. R., Michels, R. G., Green, W. R. and Cruz, Z. C.: Epiretinal and vitreous membranes — comparative study of 56 cases —. *Arch. Ophthalmol.* **99**, 1445-1454 (1981).
5. Hiscott, P. S., Grierson, I. and McLeod, D.: Retinal pigment epithelial cells in epiretinal membranes: an immunohistochemical study. *Br. J. Ophthalmol.* **68**, 708-715 (1984).
6. Hiscott, P. S., Grierson, I., Trombetta, C. J. Rahi, A. H. S., Marshall, J. and McLeod, D.: Retinal and epiretinal glia — an immunohistochemical study. *Br. J. Ophthalmol.* **68**, 698-707 (1984).
7. Flood, M. T., Gouras, P. and Kjeldbye, H.: Growth characteristics and ultrastructure of human retinal pigment epithelium *in vitro*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **19**, 1309-1320



- (1980).
8. Bacallao, R. and Stelzer, E. H. K.: Preservation of biological specimens for observation in a confocal fluorescence microscope and operational principles of confocal fluorescence microscopy. **Methods Cell Biol.** **31**, 437-452 (1989).
  9. Albert, D. M. and Buyukmihci, N.: Tissue culture of the retinal pigment epithelium, In: Zinn, K. M. and Marmor, M. F.: *The Retinal Pigment Epithelium*. 277-292, Harvard University Press, Cambridge (1979).
  10. Mannagh, J., Arya, D. V. and Irvine, A. R., Jr.: Tissue culture of human retinal pigment epithelium. **Invest. Ophthalmol.** **12**, 52-64 (1973).
  11. Albert, D. M., Tso, M. O. M. and Rabson, A. S.: In vitro growth of pure cultures of retinal pigment epithelium. **Arch. Ophthalmol.** **88**, 63-69 (1972).
  12. Matsumoto, B., Guerin, C. J. and Anderson, D. H.: Cytoskeletal redifferentiation of feline, monkey, and human RPE cells in culture. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** **31**, 879-889 (1990).
  13. Basu, P. K., Sarkar, P., Menon, I., Carre, F. and Persad, S.: Bovine retinal pigment epithelial cells cultured in vitro: growth characteristics, morphology, chromosomes, phagocytosis ability, tyrosinase activity and effect of freezing. **Exp. Eye Res.** **36**, 671-683 (1983).
  14. Lane, C. M., Boulton, M., Marshall, J. and Bird, A. C.: Growth of pure cultures of retinal pigment epithelial cells using chorioretinal biopsies from the pig. **Exp. Eye Res.** **46**, 813-817 (1988).
  15. Del Priore, L. V., Glaser, B. M., Quigley, H. A., Dorman, M. E. and Green, W. R.: Morphology of pig retinal pigment epithelium maintained in organ culture. **Arch. Ophthalmol.** **106**, 1286-1290 (1988).
  16. Mueller-Jensen, K., Macherer, R. and Azarnia, R.: Autotransplantation of retinal pigment epithelium in intravitreal diffusion chamber. **Am. J. Ophthalmol.** **80**, 530-537 (1975).
  17. Mayerson, P. L., Hall, M. O., Clark, V. and Abrams, T.: An improved method for isolation and culture of rat retinal pigment epithelial cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** **26**, 1599-1609 (1985).
  18. Boyer, B., Tucker, G. C., Valles, A. M., Franke, W. W. and Thiery, J. P.: Rearrangements of desmosomal and cytoskeletal proteins during the transition from epithelial to fibroblastoid organization in cultured rat bladder carcinoma cells. **J. Cell Biol.** **109**, 1495-1509 (1989).
  19. Owaribe, K.: The cytoskeleton of retinal pigment epithelial cells, **Prog. Retinal Res.** **8**, 23-49 (1989).
  20. Turksen, K., Opas, M., Aubin, J. E. and Kalnins, V. I.: Microtubules, microfilaments and adhesion patterns in differentiating chick retinal pigment epithelial (RPE) cells *in vitro*. **Exp. Cell Res.** **147**, 379-391 (1983).
  21. Turksen, K., Opas, M. and Kalnins, V. I.: Cytoskeleton, adhesion, and extracellular matrix of fetal human retinal pigmented epithelial cells in culture. **Ophthalmic Res.** **21**, 56-66 (1989).
  22. Turksen, K. and Kalnins, V. I.: The cytoskeleton of chick retinal pigment epithelial cells in situ. **Cell Tissue Res.** **248**, 95-101 (1987).
  23. Bacallao, R., Antony, C., Dotti, C., Karsenti, E., Stelzer, E. H. K. and Simons, K.: The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. **J. Cell Biol.** **109**, 2817-2832 (1989).
  24. Kasper, M., Moll, R., Stosiek, P. and Karsten, U.: Patterns of cytokeratin and vimentin expression in the human eye. **Histochemistry** **89**, 369-377 (1988).
  25. Owaribe, K., Sugino, H. and Masuda, H.: Characterization of intermediate filaments and their structural organization during epithelium formation in pigmented epithelial cells of the retina *in vitro*. **Cell Tissue Res.** **244**, 87-93 (1986).
  26. 白川弘泰, 山川良治, 吉村長久, 岡田守生, 松村美代, 荻野誠周: 増殖性硝子体網膜症の1症例. **日本眼科学会雑誌** **90**, 550-555 (1986).
  27. Hergott, G. J., Sandig, M. and Kalnins, V. I.: Cytoskeletal organization of migrating retinal pigment epithelial cells during wound healing in organ culture. **Cell Motil. Cytoskeleton** **13**, 83-93 (1989).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学眼科学講座 永井春彦