

博士論文

色素上皮細胞の無血清培養法の確立と
同細胞種の分化転換性に関する研究

総合研究大学院大学

生命科学研究科

分子生物機構論専攻

小 阪 淳

博士論文

色素上皮細胞の無血清培養法の確立と同細胞種の分化転換性に関する研究

要旨	1
略号	3
序	4
材料と方法	7
結果	10
考察	21
謝辞	28
引用文献	29

要旨

ニワトリ胚網膜色素上皮細胞は、単離され至適な条件で培養されると盛んに増殖を始め、やがて、コンフルエントな状態となって、単層の上皮葉を形成する。上皮葉が形成されると、個々の色素上皮細胞は、メラニン色素顆粒を合成し、生体系で見られるのと全く等価の色素上皮を構築することが知られている。伊藤・江口は、培養条件を人為的に調節することで色素上皮細胞を脱分化させ、さらに水晶体細胞に分化転換させたり、色素上皮細胞に再分化させることのできるユニークな系を開発した。この培養実験系を用いて、細胞分化の安定性と転換性の研究が進められてきた。

しかし、この実験系には、一般の細胞培養法と同じく牛胎児血清を必要としているので、種々の液性因子や、細胞-細胞外基質相互作用が、いかにして色素上皮細胞の分化形質を安定に発現させ、また水晶体細胞に転換させるのかといったことを、分子のレベルで解析していく上で、さまざまな難点があった。したがって仮に、従来困難とされていた無血清条件下での色素上皮細胞から水晶体細胞への分化転換を可能とする様な新しい実験系が確立できれば、研究を格段に進めうると考え、その確立を試みた。

牛胎児血清を添加しない基本培養液中では、色素上皮細胞は増殖することができず、植え継ぎ後4日目前後に培養の維持ができなくなる。培養液中に牛インスリン、ニワトリ・トランスフェリン、大豆トリプシン・インヒビターを添加することによって、細胞を長期間にわたって維持し、さらに増殖させることに成功した。また、培養器の表面に細胞外基質をコートすることで、色素上皮細胞が、生体内と同様な敷石状単層上皮構造を形成することを見いだした。さらに、組織構築の足場として細胞外基質分子が不可欠であることを明らかにすることができた。

上記の結果を踏まえさらに解析を進めた結果、無血清条件下でも、従来から用いられているフェニル・チオ・ウレアと羊精巢由来ヒア

ルロニダーゼを培養液中に添加することにより、水晶体細胞への分化転換を成立させることができた。また、この過程で、これら2つの物質が、細胞—細胞外基質接着に作用していることが推測された。この結果は、色素上皮細胞の分化形質発現の安定化には細胞外基質の作用が不可欠であり、その変化が水晶体細胞への分化転換に深く関わっているという江口らの見解を裏付けるものである。また、この研究によって、無血清培養条件下でも色素上皮細胞の分化形質発現及び水晶体細胞への分化形質転換が可能になったことで、細胞分化の安定性と転換性の分子メカニズム解明の糸口が開かれた。

略号

- MEM; minimum essential medium, 最少必須培地
- CMF-PBS; Ca^{2+} - and Mg^{2+} - free phosphate buffer saline,
- EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt,
エチレン・ジアミン四酢酸二ナトリウム
- sbTI; 大豆トリプシン・インヒビター
- PTU; phenylthiourea, フェニル・チオ・ウレア
- HUase; ovine testicular hyaluronidase,
羊精巢由来ヒアルロニダーゼ
- SDS; sodium dodecyl sulfate, ドデシル硫酸ナトリウム

序

現在、細胞培養には一般に、種々のアミノ酸、ビタミンなどの混合液の他に、10%前後の濃度で血清を添加した培養液が用いられている(1)。ことに、新鮮組織から解離された細胞の初代培養には、多くの場合、牛胎児血清が不可欠な添加物として用いられている。しかしながら、血清中にはさまざまな因子が含まれており、それらが、既知であるか未知であるかを問わず、細胞にどのように作用しているかを検討し、解析するには膨大な作業が必要であった。また、牛胎児血清標品そのものも、その生産工程によって一定しておらず、細胞培養系を用いた系統的な研究を非常に困難なものにしている。これら血清成分を除いた条件でも細胞培養が達成できれば、より単純で均一な条件下での解析が可能になるのみならず、研究の効率を格段に向上させることが可能となる。このような理由により、従来から細胞の無血清培養法開発の努力がなされてきた(2)。

江口らは、イモリ虹彩色素上皮からの水晶体再生の研究を原点として、長年に亘り色素上皮細胞の水晶体細胞への分化転換の研究を進めてきた(3)。これまでに、脊椎動物の色素上皮細胞は普遍的にレンズ細胞への分化転換性を維持することが実証され(4、5、6)、また、色素上皮細胞の分化状態やレンズ細胞への分化転換を完全に人為操作できる細胞培養系が確立されている(7、8)。この系は、フェニル・チオ・ウレア(以下PTUと略する)と、羊精巢由来ヒアルロニダーゼ(以下HUaseと略する)という2つの物質を添加した培養液で培養することによって、色素上皮細胞を特徴的な脱分化細胞の状態を経て、水晶体細胞へ分化転換させるものである。この脱分化細胞は、水晶体細胞へ分化転換することもできるし、色素上皮細胞に再分化することもできるという分化の多能性を有することで特徴付けられる。色素上皮細胞は分化形質である色素顆粒を喪失し、ラフリング膜(ruffling membrane)と呼ばれる突起を伸長する。ラフリング膜とは、最終分化した色素上皮細胞が持つ微絨毛(micro-

villi)とは異なる細胞質の膜状突起で、脱色素化と共に脱分化細胞の形態上の特徴であるとされている(8)。その上、正常上皮細胞が有する増殖の接触阻止性(contact inhibition of growth)を喪失しており、脱分化細胞はコンフルエントな状態に達しても、さらに重層化して増殖を続ける性質を持つ。この他、脱分化細胞にはグルコース要求性が高まり、c-myc oncogeneの転写が増大するなど癌細胞類似の細胞特性が知られている(6)。この細胞培養分化転換系は、培養環境を人為的に操作して、色素上皮細胞の分化状態を任意にコントロールすることができ、さらには、すべての細胞が同調して分化するため細胞分化の安定性と転換性を分子レベルで探求する上で、優れて有用である。しかし、この実験系は一般の細胞培養法と同じく、牛胎児血清を必要とし、培養液に添加される外来因子が単独に作用しているのか、血清中の成分と協調して働いているのかといったことが全く不明であった。また、種々の細胞増殖因子や、細胞-細胞外基質相互作用の面から、分化転換の研究を進めるには、血清中に元来含まれる多数の増殖因子や、フィブロネクチンなどの液性の接着因子の存在が邪魔となって、明瞭な結果が得られにくかった。そこで、未知の部分の多い血清成分を除外した無血清培養を行い、無血清条件下の分化転換システムが確立すれば、血清中の液性因子、細胞外基質、接着因子などの分化転換に対する効果が単独で、より明確に追求できると考えられその意義は大きい。

1984年にOkaらによって報告されている色素上皮細胞の無血清培養法(9)は、植え継ぎ後24時間は、細胞を培養器に接着、伸展させるために、血清存在下で培養を行なうことが必要で、さらに培養液に、EGF(Epidermal Growth Factor)、FSH(Follicle Stimulating Hormone)、RA(Retinoic Acid)などの因子を添加して、無血清培養を行なうものである。この方法を利用して、わずか1週間しか培養色素上皮細胞を維持できない。色素上皮細胞が、水晶体細胞に分化転換するには、少なくとも1週間を越える長期間培養が必要である。

そのような見地から、本研究では第一にニワトリ色素上皮細胞の長期間の無血清培養法を確立し、さらに、無血清条件下でも色素上皮細胞が水晶体細胞に分化転換しうるか否かを明かにしようとした。

材料と方法

1、組織の単離

実験には、養鶏場より入手したふ卵9日目の白色レグホン種の胚を使用した。胚より眼球だけをピンセットで無菌的に取り出し、CMF-PBS (Ca^{2+} - and Mg^{2+} - free phosphate buffer saline) 中で角膜、水晶体、虹彩を含んだ眼球の前面部約半分を切除した。パスツール・ピペットで硝子体と神経性網膜を除去し、網膜色素上皮細胞層を露出させた後、眼球残部を0.1% EDTA 溶液 (エチレン・ジアミン四酢酸二ナトリウム) で、37°C、15分間処理した。この処理によって、色素上皮細胞層を、ピンセットで下層の脈絡膜層と容易に分離することができた。単離した網膜色素上皮細胞のシートを試験管に集め0.1% トリプシン溶液で、37°Cで15分間処理した後、培養系に移した (7、8、10)。

2、培養液

次の3種類の培養液を調製した。培養液はすべて、ろ過滅菌して使用に供された。

- ①、8% MEM: 血清存在下での色素上皮細胞培養の基本培養液とした。イーグルMEM培養液 (日水製薬) に厳密にロット・チェックされた牛胎児血清 (Flow社) を最終濃度8%となるよう添加した (7、8)。
- ②、serum-free MEM: 無血清培養用の基本培養液として、イーグルMEM培養液に、1.0mg/ml (培養液) 大豆トリプシン・インヒビター (以下sbTIと略する) (Sigma社)、0.1mg/ml (培養液) ニワトリ卵白由来トランスフェリン (Sigma社、鉄抱合体) と、牛インシュリン (Sigma社) を最終濃度 0.1unit/ml となるように添加して用いた。
- ③、serum-free EPH: この培養液は、無血清条件下で色素上皮細胞を脱分化させる際に用いた。②の培養液にPTU (和光純薬) 及び、HUase (Boeringer社) をそれぞれ0.5mM及び 0.1mg/ml (培養液) の濃度で添加した (7、8)。

3、細胞培養

ふ卵9日目のニワトリ胚より単離した色素上皮細胞を 2.5×10^5 個/ml (8% MEM) の細胞密度で浮遊させ、35mm径のプラスチック培養器 (Corning社製、25000DISH) に2mlずつ植えた。したがって、培養器あたり 5×10^5 個の色素上皮細胞が2mlの8% MEMで培養されることにした。以降、基質をコートしないこのプラスチック培養器の表面を、プラスチック基質と呼ぶこととする。

色素上皮細胞はプラスチック基質上で伸展し、増殖して初代培養開始後3~4日目には、培養器に完全に敷きつまったコンフルエントの状態に至った。この状態の初代培養を0.1% EDTA 溶液で一度洗浄後、0.1% トリプシン溶液で15分間37℃で処理した。① serum-free MEM でトリプシンを不活化後、再度 serum-free MEM 中で基質 (次項参照) がコートされた35mm培養器1枚あたり 1.0×10^5 個の遊離した色素上皮細胞を、二次培養 (secondary culture) として培養した。上記に述べた細胞培養はすべて37℃、5% CO₂、100%湿度の条件下の培養恒温器にて行なった。また、約24時間毎に培養液の交換を行なった。

4、培養基質

2つの代表的な細胞外基質接着物質であるコラーゲンとフィブロネクチンについて、色素上皮細胞の初期接着と増殖に対する効果を調べた。Konigsberg の報告した方法でラット尾より抽出したコラーゲン溶液を培養器プラスチック面にコートした (11)。これをコラーゲン基質と呼ぶこととする。

培養器をフィブロネクチンでコートするには、牛フィブロネクチン (Sigma社) の粉末をCMF-PBSに $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度で溶解し、その溶液をプラスチック培養器に加え、室温で6時間吸着させた。これを、フィブロネクチン基質と呼ぶこととする。

5、細胞接着アッセイ (Cell Attachment Assay) と細胞数計測

細胞接着アッセイは、培養細胞の細胞外基質接着因子に対する初期接着の程度を見るための方法で(12)、ここでは、プラスチック基質、コラーゲン基質、フィブロネクチン基質のそれぞれに対する色素上皮細胞の初期接着の差を測定した。serum-free MEMで、 2.0×10^5 個/培養器の濃度で色素上皮細胞を基質上に植え、1時間、6時間、24時間後に、細胞数を計測した。細胞数の計測法は、まず、培養液を除去後、0.1% EDTA溶液で一回洗浄し、0.1%トリプシン溶液で30分間、37°Cで処理した。培養基質面より細胞を剥して回収し、細胞数をBurker-Turkの血球計算板を用いて計測した。細胞数の計測は、常に、2枚の培養器について実施し、平均値を求めた。細胞接着アッセイと増殖曲線では、それぞれ3回以上の実験の結果がすべて同じ傾向を示すことを確認している。

6、抗体とウエスタン・ブロッティング

抗ニワトリ α A-クリスタリン及び β -クリスタリン・モノ・クローナル抗体は、当研究室の沢田らにより単離されたもので、それぞれ、ニワトリ水晶体上皮細胞と水晶体繊維に特異的な分化マーカーであることが既に明らかにされている(13、14)。培養液を除去後、培養器上の細胞をそのまま-80°Cで凍結融解した後、SDSサンプル・バッファーで処理し、回収した。5分間煮沸後、Laemmliの方法による12.5%のSDS・ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動にて、展開した(15)。ゲル上のタンパク質を、ニトロセルロース膜上へ、電気泳動により転写し(16)、ハイブリドーマ上清中のモノ・クローナル抗体と一昼夜反応させた。洗浄後、フィルターを1000倍に希釈した西洋ワサビ・パーオキシダーゼ抱合体・抗マウスIgG抗体(Bio-Rad社)と反応させ、4-クロロ-1-ナフトールと H_2O_2 により発色させた(17)。

結果

1、網膜色素上皮細胞の長期間無血清培養法の確立

トリプシンで組織から単離した色素上皮細胞をイーグルMEM培養液のみの、いわゆる完全合成培養液で培養すると、細胞の一部は一度はプラスチック基質に接着したが、その伸展は不十分で増殖ができなかった。そのうえ、細胞は短期間でプラスチック基質からで剥がれ培養の維持が不可能となった。そこで、培養液中の牛胎児血清が担っていると予測される、解離による細胞障害の回復、細胞の基質面への接着の促進および維持、細胞の増殖刺激の3点に留意し色素上皮細胞の無血清培養条件を検討した。

ニワトリ胚網膜より単離した色素上皮細胞を直接、初代培養として無血清にて培養、維持するのは細胞障害が大きく、その後の培養に耐えなかった。そこで、解離色素上皮細胞をまず血清存在下で3~4日間維持した後に、再び解離し無血清条件下に二次培養 (secondary culture) として植え継いだ。これにより、細胞障害が最小限に抑えられた。

次に培養液の工夫として無血清培養にしばしば用いられる牛インシュリンと、鉄抱合体トランスフェリン (ニワトリ) を添加し (1、2)、さらに、培養基質への接着を促進させるためコラーゲンを予めコートした培養器 (コラーゲン基質) の使用を試みた。

この培養液を用いて、初代培養された 1×10^5 個 / 35mm 培養器の色素上皮細胞をコラーゲン基質上へ植え込むと、細胞は24時間以内に培養器に接着伸展した (図1-A)。その後、増殖を開始するが、無血清培養開始4日目前後で、一度伸展した細胞の一部は培養基質との接着を弱め、丸い形となって浮き上がる傾向を示した (図1-B)。またある細胞はその部分だけプロテアーゼで処理された様に融解現象がみられ、これらの細胞は最終的には培養基質面から離脱した。より長期間の無血清培養を達成するためには、この4日目前後に起こる培養器よりの離脱現象と自己融解現象を防ぐことが不可欠と判断さ

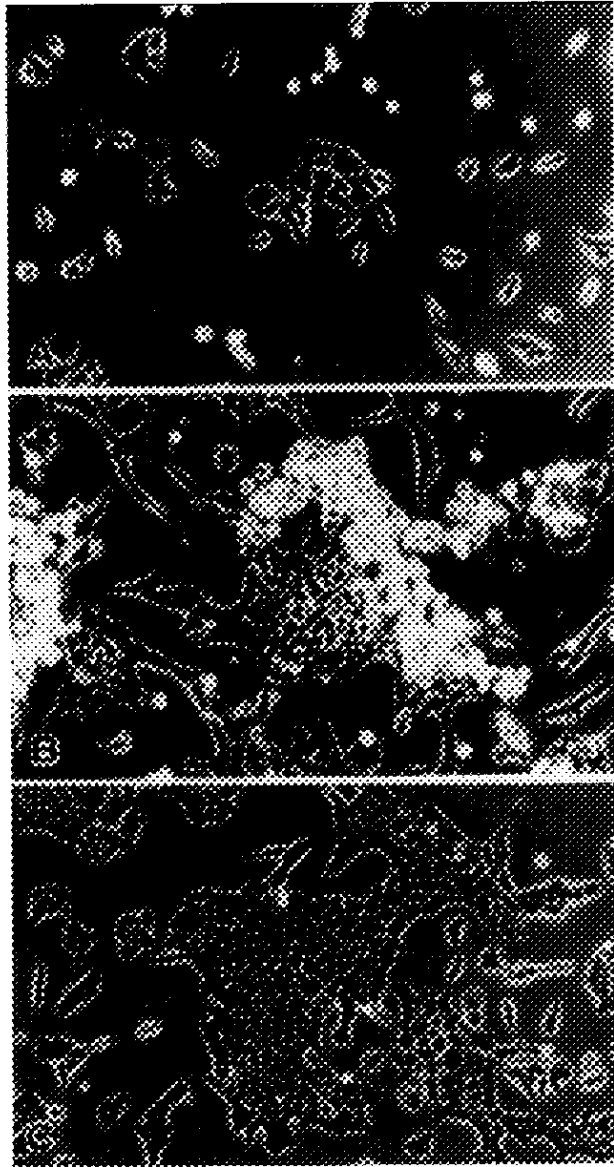


図1、無血清培養条件下コーゲン基質上のニワトリ色素上皮細胞の位相差顕微鏡像

(A) ; 無血清条件 (イーグル MEM、ニワトリ・トランスフェリン、牛インシュリン) で植え継ぎ24時間後の色素上皮細胞。接着、伸展した。

(B) ; sbTI (大豆トリプシン・インヒビター) を含まない (A) と同じ条件下。植え継ぎ5日後の培養基質面からの離脱現象。

(C) ; (A、B) の条件に加えてさらにsbTIを添加した培養液 (serum-free MEM) での5日目の細胞像。細胞は充分伸展し、離脱現象は起こらなかった。(×約90)

れた。そこで、トリプシン・インヒビターを無血清培養液に添加して、離脱、融解現象が抑制されるか否かを検討した。市販の大豆トリプシン・インヒビター (sbTI) を低濃度、 $1\sim 100\ \mu\text{g/ml}$ で培養液に添加してみたが、大きな効果は見られなかった。次に、高濃度 $1.0\ \text{mg/ml}$ (培養液) で sbTI を添加すると、この離脱、自己融解現象は抑えられ、色素上皮細胞は4日間を越えて生存し、培養が維持できることが明らかになった (図1-C)。増殖曲線は培養液中に sbTI を含まない群で、4日目に始まる離脱と自己融解現象に伴う細胞数の低下を示した。それに比較して、sbTI を含む群で細胞数が培養器1枚あたり 1.0×10^6 個に達し、培養器一面コンフルエントに至った (図2)。また、ニワトリ・トランスフェリンの効果を測る増殖曲線のグラフでもトランスフェリンを含まない群では、植え継ぎ後より、ほとんど増殖できないことが明らかになった (図3)。

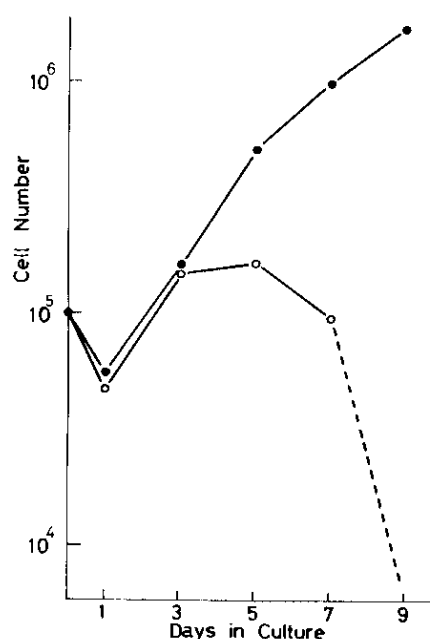


図2、無血清培養 sbTI 存在下、非存在下におけるニワトリ色素上皮細胞の増殖曲線の比較。 1.0×10^5 個/培養器の色素上皮細胞をコラーゲン基質上へ植え継いだ。イーグル MEM、トランスフェリン、インシュリンの他に、sbTI を添加した培養液 (serum-free MEM) で培養した群 (●) と、添加していない培養液で培養した群 (○) を示す。sbTI 非存在下では、9日目には細胞数は測定不能となった。

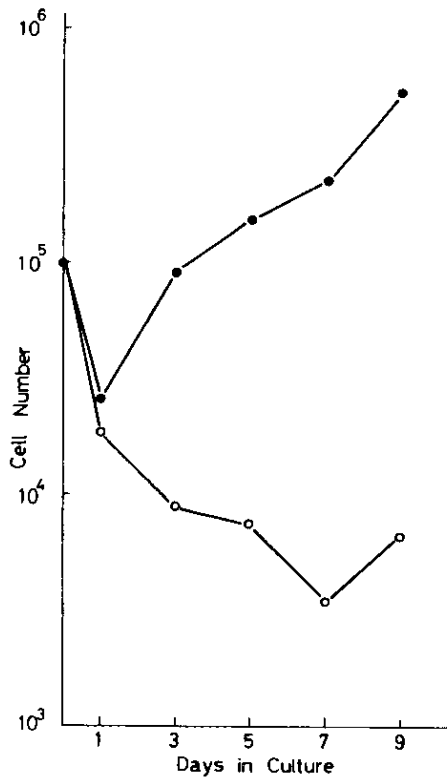


図3、無血清培養トランスフェリン存在下、非存在下におけるニワトリ色素上皮細胞増殖曲線の比較。

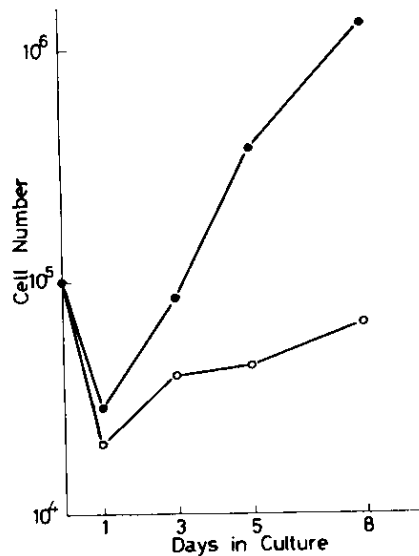
コラーゲン基質上で、トランスフェリンを含む serum-free MEMで培養した群(●)と、トランスフェリンを含まない群(○)を示す。

トランスフェリンを含まない群の5日、7日、9日目の3点に有意差を認め難い。

2、インシュリンによる色素上皮細胞の増殖刺激

増殖曲線(図4)が示すように、無血清培養液中に含まれる牛インシュリンが、色素上皮細胞の増殖を著しく促進することが明らかになった。一方、インシュリンを含まない群では、ほとんど細胞の増殖は見られなかった。無血清条件下に植え継がれた細胞のひとつひとつは、周囲の細胞と密接して細胞の島(cellular islet)を形成し、それらの細胞の島が融合する様式でコンフルエントまで増殖してゆくのが観察された(図1-C)。

図4、牛インシュリンの色素上皮細胞に対する効果を示す増殖曲線。



1.0×10^5 個/培養器の色素上皮細胞をコラーゲン基質上へ植え継いだ。インシュリンを含むserum-free MEMで培養した群(●)と、インシュリンを含まない群(○)を示す。インシュリンを含まない群では、ほとんど増殖は認められなかったが、インシュリンが存在すると、細胞数は 1.0×10^6 個/培養器を越え、コンフルエントに至った。

3、色素上皮細胞のプラスチック基質、コラーゲン基質、フィブロネクチン基質に対する初期接着の比較

細胞接着アッセイ(図5A)により、ニワトリ色素上皮細胞の細胞外基質分子に対する初期接着を比較した。コラーゲン基質とプラスチック基質では細胞の植え込み1時間目、6時間目でプラスチック基質上で細胞数が少なかったが、24時間目ではほとんどその差はなくなった。一般にコラーゲン基質は、細胞の初期接着を促進すると考えられていたが、色素上皮細胞については、著しい効果は見られないことが判明した。一方、フィブロネクチン基質上では、植え込み6時間目より、コラーゲン基質、プラスチック基質に比べて接着細胞数が多くなり、24時間目で蒔き込み数の約80%の細胞が接着した。この値はコラーゲン基質、プラスチック基質上に接着した細胞数の約2倍にあたり、フィブロネクチン基質は色素上皮細胞の初期接着を促進することが明らかになった。

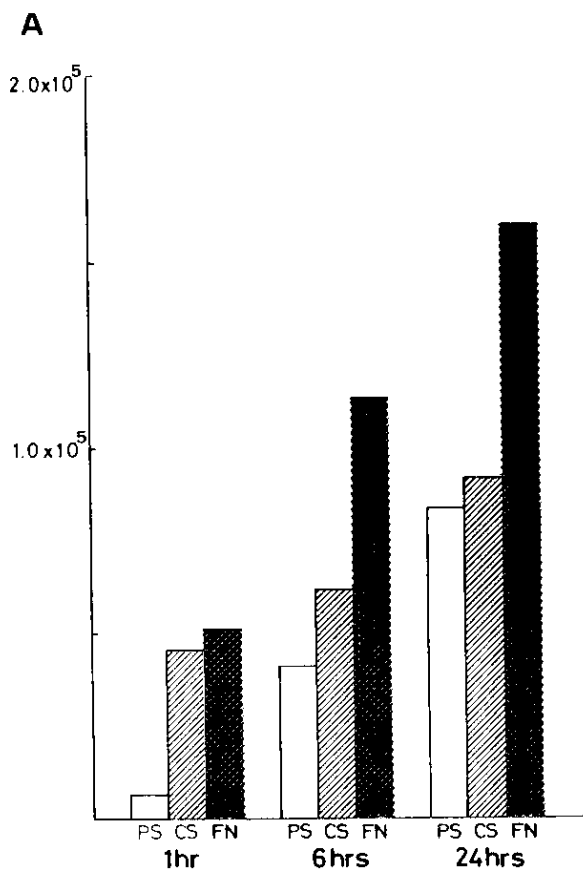
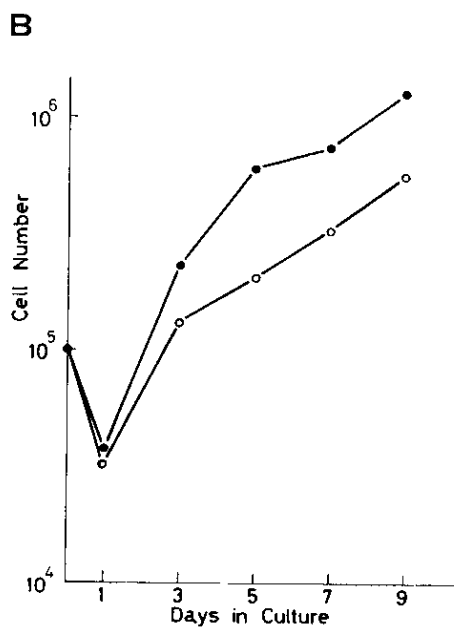


図5、(A) ; 色素上皮細胞の細胞接着アッセイ (Cell Attachment Assay) 。

プラスチック基質、コラーゲン基質、フィブロネクチン基質に対する色素上皮細胞の初期接着の差を表わす。

2.0 × 10⁵ 個 / 培養器の色素上皮細胞をそれぞれの基質上に植え込み、1、6、24時間目に細胞数を計測した。培養液は serum-free MEMを用いたが、短期間の培養のため sbTI は必ずしも必要とせず、sbTI 非存在下でも、同様の結果が得られた。PS: プラスチック基質、CS: コラーゲン基質、FN: フィブロネクチン基質。



(B) ; 色素上皮細胞のコラーゲン基質上における anchorage dependent growth。

色素上皮細胞を 1.0 × 10⁵ 個 / 培養器の濃度でコラーゲン基質上 (●)、プラスチック基質上 (○) へ serum free MEM を用いて植え継いだ。

4、コラーゲン基質上での色素上皮細胞の敷石状単層上皮の構築

ニワトリ色素上皮細胞の基質に対する初期接着を比較してみると、植え込み後24時間の時点で、コラーゲン基質とプラスチック基質で大きな差は見られなかった(図5A、B)。培養が進行し、細胞増殖が活発になると、コラーゲン基質上では、生体内の単層上皮に特徴的な六角形の敷石状の細胞のシートを形成し、培養14日目には、培養器一面コンフルエントの状態に至った(図6B)。一方、プラスチック基質上では、細胞は接着後一度は伸展し、増殖が始まるものの次第に凝集し、単層上皮を形成できなくなった(図6AとBの比較)。増殖曲線は、コラーゲン基質によって色素上皮細胞の増殖がプラスチック基質上に比較して、より大きく刺激されたのを示しており、コラーゲン基質の典型的な anchorage dependent growth の効果が認められた(図5B)(18)。

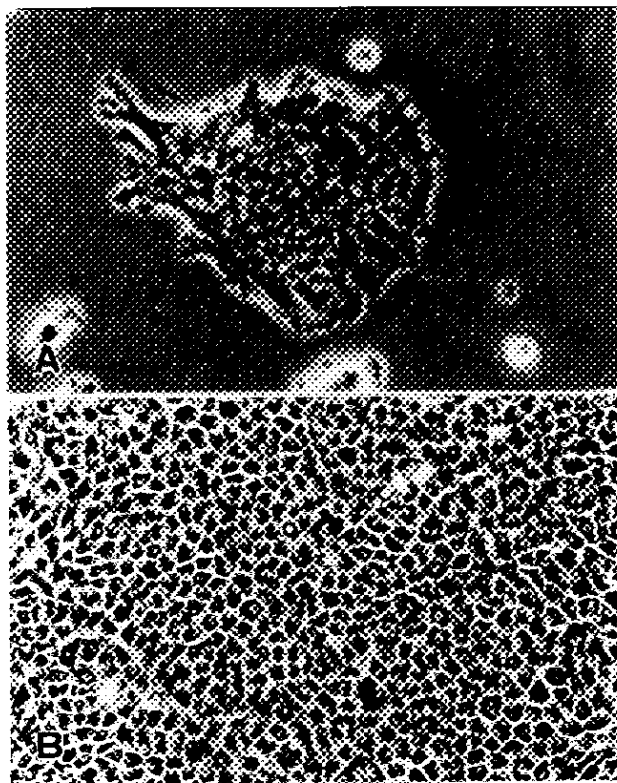


図6、コラーゲン基質上および、プラスチック基質上における色素上皮細胞の組織構築を示す位相差顕微鏡像。

serum-free MEMで植え継ぎ後、14日目。

(A) ; プラスチック基質上。コンフルエントに達せず凝集塊を形成した。(×約210)

(B) ; コラーゲン基質上。生体内と同様な敷石状単層上皮を形成した。色素顆粒も観察できた。(×約170)

5、無血清条件における色素上皮細胞の脱分化形質

血清存在下で初代培養された色素上皮細胞を、まず、PTUとHUaseが持つ細胞障害性を細胞解離時に避けるために、serum-free MEMで、 1.0×10^5 個/培養器の濃度で、コラーゲン基質上または、フィブロネクチン基質上に植え継いだ。その24時間後、培養液をPTUとHUaseを含むserum-free EPHに置換した。コラーゲン基質、フィブロネクチン基質がコートされていない裸のプラスチック基質上では、図7Bに示すように、serum-free EPHに置換すると、直ちに伸展した細胞が培養基質面より剥がれ凝集塊を作り、さらに1~2日以内に完全に剥がれ落ちて培養が維持できなくなった。コラーゲン基質上及び、フィブロネクチン基質上ではserum-free EPH置換後約1週間で、細胞は色素上皮細胞の分化形質である色素顆粒を徐々に失ってゆき、ラフリング膜(ruffling membrane)の形成が観察されるようになった(図8A挿入写真)。無血清条件下では、細胞はコンフルエントの状態を越えて増殖することはなく、ほぼ単層の細胞の島のまま留まっているように観察できた。しかし、細胞の島のいくつかの部分では単層構造が崩れて細胞の重層化がみられた(図8A)。

6、無血清条件での水晶体細胞への分化転換

serum-free EPHに置換し培養を開始してから、約2週間で、重層化した細胞集合が、典型的な、レンズ様体を形成した。レンズ様体形成は、フィブロネクチン基質上でもコラーゲン基質上でも、共に観察できた(図8B、C)。これらレンズ様体の水晶体細胞としての分化形質を確認するために、レンズ様体を形成している培養の抽出物を、ウェスタン・ブロッティングにて調べてみると、ニワトリ水晶体細胞の特異的マーカーである α A-クリスタリン及び β -クリスタリンに対するモノ・クローナル抗体に反応するバンドが検出できた(図9)。以上の結果より、血清存在下と同様に、無血清培養条件でも色素上皮細胞が、水晶体細胞に分化転換できることが示された。

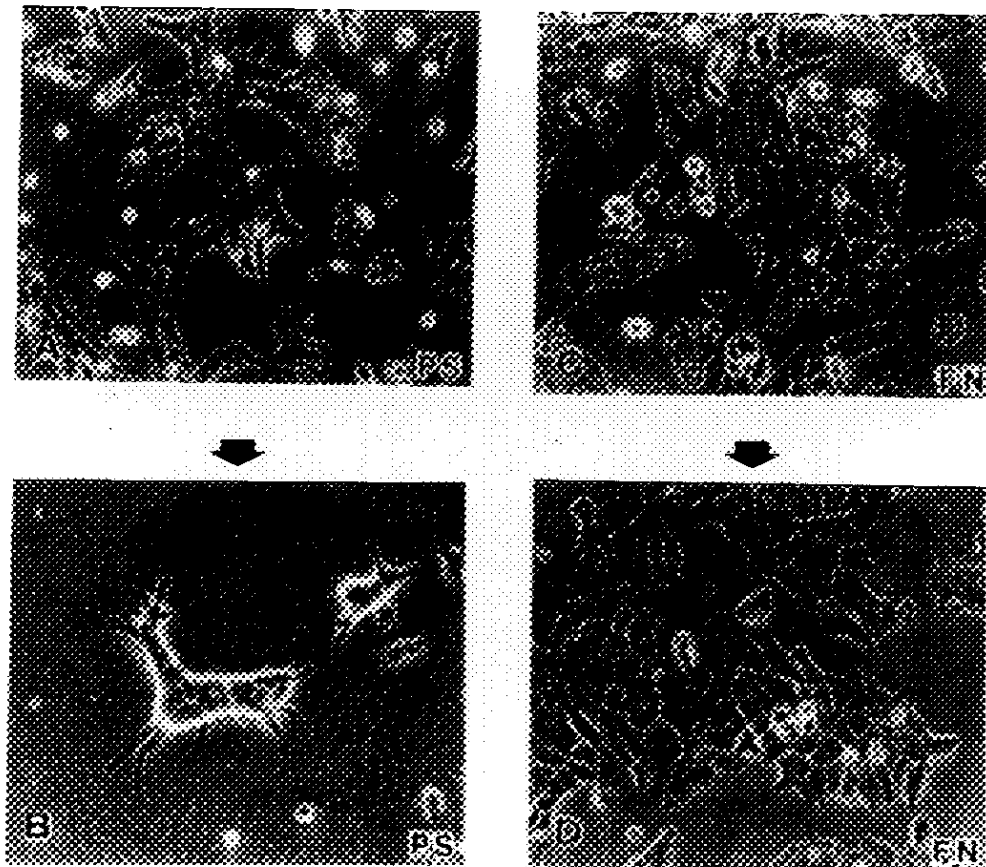


図7、プラスチック基質、フィブロネクチン基質上での無血清条件下分化転換過程の比較を示す位相差顕微鏡像。
 A、Bはプラスチック基質上、C、Dはフィブロネクチン基質上の細胞像を示す。A、Bは植え継ぎ後24時間目でPTU、HUaseを含まないserum-free MEM中での細胞像。この直後にPTU、HUaseを含むserum-free EPHに置換し、さらに24時間後の細胞像をC、Dに示す。
 (×約130) フィブロネクチン基質上では、脱分化培養が順調に進行した(C→D)。プラスチック基質上では、一度接着した細胞(A)がserum-free EPHに置換した直後、直ちに凝集塊を作った(B)。その後3日目までに接着面より剥がれ培養が維持できなくなった。
 PS:プラスチック基質、FN:フィブロネクチン基質。

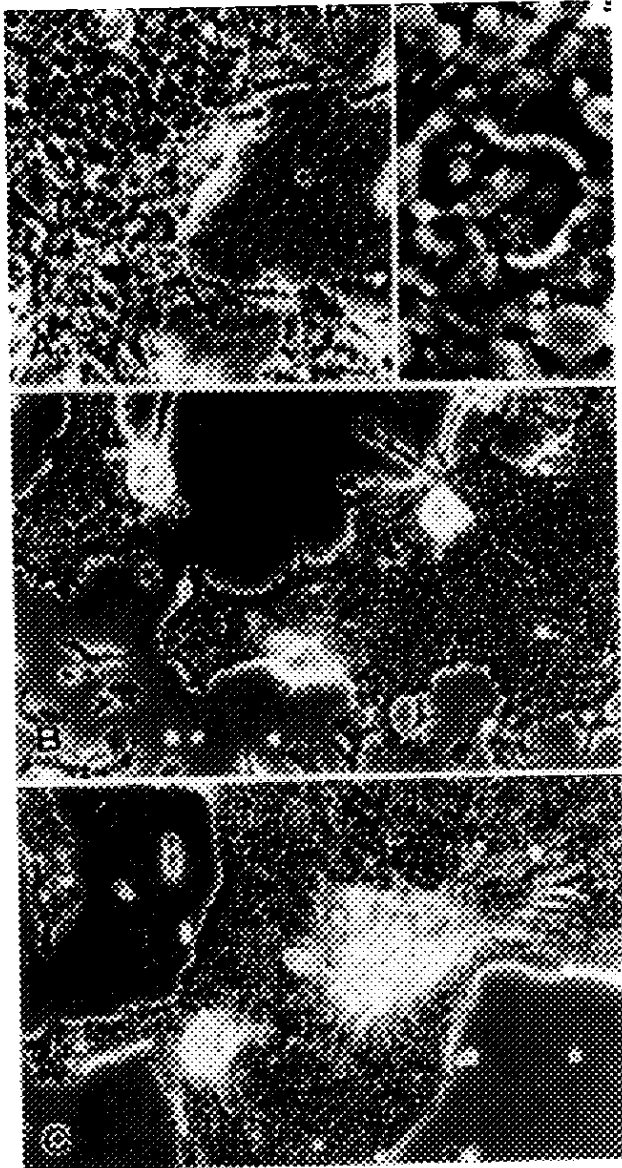


図 8、無血清培養条件下における分化転換過程の位相差顕微鏡像。

(A) ; serum-free EPH で、フィブロネクチン基質上に植え継ぎ後7日目の盛んに増殖し、脱色素化する無血清条件下の脱分化細胞。(×約200) 挿入強拡大写真では矢印でラフリング膜を示す。(×約790)

(B) ; フィブロネクチン基質上、植え継ぎ12日目に発生した典型的なレンズ様体(×約90)

(C) ; コラーゲン基質上、植え継ぎ14日目のレンズ様体形成。(×約90)

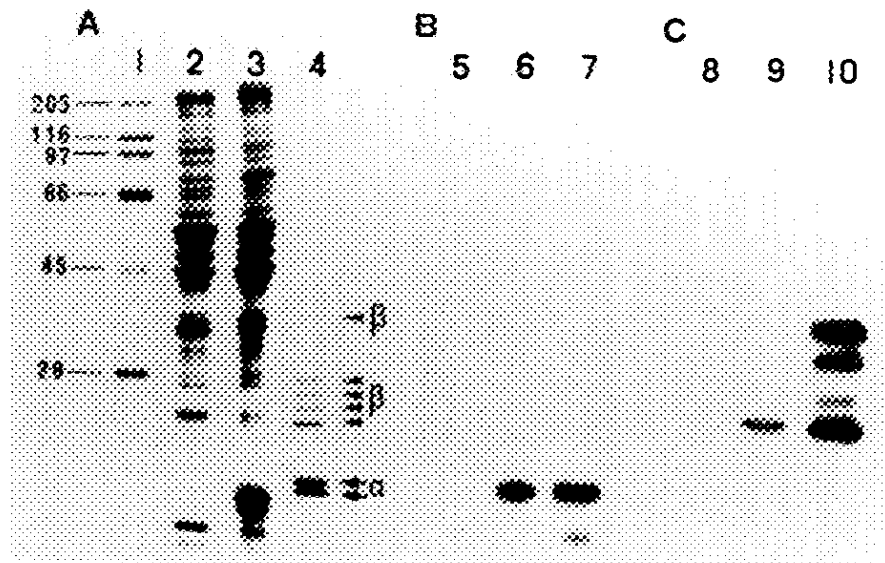


図 9、ウエスタン・ブロッティングによる α A-クリスタリン及び β -クリスタリン・タンパク質の検出。

(A) ; 培養細胞の抽出タンパク質を SDS ポリアクリルアミド電気泳動にて展開しクーマシー・ブリリアント・ブルー (Coomassie Brilliant Blue) にて染色した。(B、C) ; 電気泳動にて展開された細胞の抽出タンパク質をニトロ・セルロース膜に転写しそれぞれ、ニワトリ α A-クリスタリン及び β -クリスタリンに対するモノ・クローナル抗体を用いてウエスタン・ブロッティングを行なった。(lane 2、5、8) : serum-free MEM にて 2 週間培養した色素上皮細胞の抽出タンパク質。(lane 3、6、9) : serum-free EPH で 2 週間培養しレンズ様体が発生した培養の抽出タンパク質。(lane 4、7、10) : 成鳥ニワトリ水晶体の抽出物を高速液体クロマトグラフィーにより δ -クリスタリンを含まない分画を選び電気泳動した。は、 α A-と α B-クリスタリンを示す。は、 β -クリスタリン群を示す。(lane 1) は分子量マーカーで、左に分子量を示す。単位は kDa。

考察

1、無血清条件下での初期接着因子と増殖因子

過去に報告された色素上皮細胞の細胞培養を用いた研究は、ほとんどすべて、血清存在下で行なわれたもので（7、8、19）、唯一、Okaraらがウシとヒトの色素上皮細胞の無血清培養系を報告しているにすぎない（9）。Okaraらの確立した系では、細胞の初期接着と伸展に培養液中の血清の存在が不可欠で、接着伸展後、無血清培養液に置換するものであり、厳密な意味での無血清培養とは言えない。特に色素上皮細胞の水晶体細胞への分化転換機構の解明を目指し、細胞外基質や培養液中に添加される液性因子が、分化転換に、どの様に作用するかを解析しようとする場合、培養の全過程を通じて、未知や既知の増殖因子、接着因子を含んだ血清の影響を排除することが望ましい。そこで本研究では、これまで血清が供給していたと考えられる細胞接着因子のかわりに（1）、コラーゲン基質や、フィブロネクチン基質などの細胞外基質接着分子を予め培養器にコートすることにより、細胞の接着、増殖を促し、この問題を解決した。

血清中には、多数の細胞増殖因子が含まれており、それらが複雑に協調しあい、修飾しあって培養中の細胞の生存と増殖を支えていると一般に考えられている。しかし一方で、血清が培養細胞の増殖を阻害することも報告されている（20、21）。無血清培養の利点のひとつとして、個々の細胞増殖因子や、増殖阻害因子がどのように細胞増殖に関わっているかを明瞭に示すことができる点が挙げられる。インシュリンは、色素上皮細胞の増殖を刺激することを示したが、他の多くの培養細胞に対しても同様の増殖刺激活性を有することが報告されている（1、22）。本研究の結果は、インシュリン単独でも、組織細胞の増殖を促すことを示したものであって非常に意義深い。

2、トリプシン・インヒビターの効果について

トリプシン・インヒビターを含まない培養液では培養開始4日目より、色素上皮細胞は基質面との接着を弱め、伸展した形態を保持できずに丸い形となって、最終的には基質面から離脱した(図1-B、2参照)。これは、あたかも細胞がプロテアーゼで処理されたかの様な現象と考えることができる。培養下の細胞は、細胞外基質を生合成すると同時に、一旦、合成した細胞外基質を再び分解するプロテアーゼと、そのプロテアーゼの活性を阻害するプロテアーゼ・インヒビターを合成していることが明らかにされている(23)。このプロテアーゼとプロテアーゼ・インヒビターの相互作用によって、細胞外基質の分解-再構築を繰り返して、増殖、分化といった種々の生理機能を細胞が発現していると一般に考えられている(23)。

一方で、細胞外基質を分解するプロテアーゼの阻害活性を持つPAI(plasminogen activator inhibitor)を血清存在培養下の色素上皮細胞が、盛んに合成していることが報告されている(24)。また、最近、色素上皮細胞の分化状態で特異的に発現し、脱分化に至る過程でその発現が抑制されてゆく遺伝子が単離された(25、26)。pP344と名付けられたその遺伝子がコードするタンパク質は、2つのKunitz型と呼ばれるトリプシン・インヒビター・ドメインを有しており、大腸菌に産生させた β -ガラクトシダーゼとpP344の融合タンパク質は、実際にトリプシン・インヒビター活性を示した(25、26)。TIMP(tissue inhibitor of metalloproteinase)で報告されているのと同様に、このpP344遺伝子産物が、色素上皮細胞の細胞外基質を分解修飾するプロテアーゼの活性を阻害するのではないかと予想されている(27、28)。そこで、色素上皮細胞の無血清培養系では、このプロテアーゼ活性が異常に高まっているか、あるいは、プロテアーゼ・インヒビターの活性が低下しているために、細胞の基質面からの離脱を引き起こしているのではないかと予想されるので、このプロテアーゼ活性を阻害することを試みた。実際に、ラット肝臓実質細胞の初代培養系では、無血清培養液中に含まれた牛肺由来トリプシン・インヒビターが、細胞膜上のプロテアーゼの活性

を阻害することにより、細胞の融解を防ぎ、細胞の生理状態をより向上させるといふ例が報告されている(29)。以上の事実を参考にし、色素上皮細胞に対する無血清培養液にもトリプシン・インヒビターの添加を試み、良好な結果を得ることができた。

すでに述べたように、色素上皮細胞を長期間無血清で維持するには、結果的には培養液1.0mlあたり1.0mgという高濃度のsbTIを必要とした。このような高濃度が要求される理由として、次の3つの可能性が考えられる。

まず第一の可能性として、sbTIが特異的なプロテアーゼ・インヒビターとして機能している場合を想定する。一般的にsbTIを含むセリン・プロテアーゼ・インヒビター群は、タンパク分子中のP1部位と呼ばれる僅かなアミノ酸が、標的となる相手方のプロテアーゼの特異性を厳密に決定し、そのプロテアーゼと複合体を形成して活性を阻害することが既に報告されている(30)。例えば、 α 1-アンチ・トリプシンでは、P1部位のメチオニンがアルギニンに置換される点突然変異によって、複合体を形成する標的プロテアーゼの親和性をエラスターゼからスロンピンに完全に変えてしまうのである(31、32)。本研究の無血清培養系でも、sbTIは、標的となる未知のプロテアーゼと複合体を形成し、色素上皮細胞の生存と維持に作用していると推察することもできる。そして、この複合体を形成する未知の標的プロテアーゼに対するsbTIの親和性が低いのではないかと考えることができる。それ故に、このプロテアーゼ活性を阻害するには、その低い親和性を補うために、結果的に、sbTIが多量に必要なのではないかと予想できるのである。Montesanoらも、血管内皮細胞の管腔構造形成を誘導するセリン・トリプシン・インヒビター群の中で、sbTIのセリン・プロテアーゼに対する親和性の低さを指摘している(33)。この考えが正しいとすれば、この未知のニワトリのプロテアーゼに対して、sbTIよりも親和性の高いプロテアーゼ・インヒビターの存在が予想できる。そこで、次のプロテアーゼ・インヒビターをsbTIの代わりに無血清培養液に添加することを試

みた。ニワトリ卵白オボムコイド・インヒビター、牛肺由来トリプシン・インヒビター（アポロチニン）、牛膵臓由来トリプシン・インヒビター、及びリマ豆トリプシン・インヒビターは、より低い濃度（ $1.0 \mu\text{g/ml} \sim 100 \mu\text{g/ml}$ ）で効果は認められなかった。現在のところ無血清条件下でより微量で有効な物質は見いだしていない。

第二の可能性として、sbTIの作用は非特異的で広範囲にわたるものであると考えることができる。一般に生理活性物質は、特異的な標的分子が存在する時、極めて低濃度で有効な場合が多い。種々の生理活性が報告されているレチノイン酸はその好例で、 10^{-7}M という低濃度で、特異的なレチノイン酸受容体を介して効果を発揮することが報告されている（34、35）。一方、DMSO（ジメチル・スルフォキシド）は、フレンド白血病細胞の赤芽球への分化を誘導するが、その作用は非特異的で広範囲なものと考えられており、1~2%もの高濃度で培養液中に添加することが必要とされる（36、37）。これらのことより、本研究の無血清培養系でのsbTIは、DMSOの場合と同じく非特異的に多数の標的分子に働いているという可能性が示唆される。

第三の可能性は、購入したsbTI試薬中に含まれるsbTI以外の微量な混在物が、無血清条件下の色素上皮細胞の維持に有効であるのではないかという考えである。本研究で用いられたSigma社製のsbTIは、当然、トリプシン・インヒビター活性で品質が管理統一されているのであるが、その試薬販売のロットにより有効性に差があった。この事実はトリプシン・インヒビター活性が有効であると考えよりも未知の混在物が有効とする考えを支持する。

以上のように、培養液中に添加する高濃度sbTIの効果については現在尚、推察の域を出ず、現時点で明確な回答を得るには至っていない。しかし、ここに報告している無血清培養系で、sbTIは培養基質面からの細胞の離脱を防ぐ作用があり、先に述べたpP344遺伝子産物の代わりに、細胞—細胞外基質間連絡を仲介するプロテアーゼをsbTIが阻害している可能性が示唆される（25、26）。

さらに、網膜色素変性症で見られる色素上皮細胞層の脱色素化、脱落、変性などの変化は、この研究で観察された色素上皮細胞のsbTI1が存在しない無血清培養下での、離脱、融解等と類似の現象であるのかもしれない(38、39)。また、プロテアーゼ・インヒビターは、慢性膵炎などの組織炎症反応の治療に実際に用いられており、変性、組織融解などの症状を鎮静化することが確かめられている(40)。このことから、色素上皮細胞の分化転換系は、プロテアーゼとプロテアーゼ・インヒビターの相互作用が仲介する未知の生理機能を明らかにする上でユニークな分野を切り開いたといえる。

3、色素上皮細胞分化の安定性と転換性に対する細胞外基質の役割
色素上皮細胞の長期間の無血清培養系が確立し、さらに無血清条件下でも色素上皮細胞の水晶体細胞への分化転換が成立したことで、色素上皮細胞の分化状態に対する細胞外基質の重要な役割が明らかになった。

細胞外基質接着因子を何もコートしないプラスチック基質でも、無血清条件下で色素上皮細胞の初期接着を支持できた(図5A、B参照)。しかし接着後、無血清条件下で敷石状の単層上皮構造の構築を支えることはできなかった(図6A参照)。言い換えると、コラーゲン、フィブロネクチンなどの細胞外基質は、色素上皮細胞が、単に初期接着の足場として機能するだけでなく、生体内と同様な上皮構造を再構築する足場として不可欠である。コラーゲンを初めとする細胞外基質物質の機能については多くの報告があるが(18、41)、上記の結果は、色素上皮細胞が安定に上皮構造を形成、維持するのに細胞外基質が重要な役割を果たしていることを明確に示している。これを裏付ける事実として、Turksenらは、ニワトリ胚眼球の発生過程における種々の細胞外基質分子の消長を蛍光抗体法にて調べ、コラーゲン、フィブロネクチンなどの分子が網膜色素上皮細胞の基底膜に、発生過程を通じて存在することを報告している(42)。

また、細胞外基質をコートしない裸のプラスチック基質上では、

PTUとHUaseによって引き起こされる培養基質面よりの剝離のために、色素上皮細胞の水晶体細胞への分化転換が不可能であったという事実は（図7B参照）、PTUとHUaseの効果が、細胞—細胞外基質接着も標的となっていることを示すと考えられる。これは、細胞外基質の変化が色素上皮細胞の水晶体細胞への分化転換をおこさせるであろうという従来（江口ら）の仮説を強く裏付けるものである（8）。

江口らが、詳細に報告した血清存在下で作成した脱分化細胞は（7、8）、培養下で徐々に色素顆粒を喪失し、盛んに増殖し培養器一杯に細胞が多層化する点が特徴であった。しかし、無血清条件下では図8B、Cに示すように、レンズ様体形成が始まる時まで、培養が培養器にコンフルエントの状態には至らず、培養細胞の島の状態のまま分化転換が起こる点で状況が異なっている。このことは、無血清条件下の脱分化細胞は、増殖の接触阻止性を保持したままで、血清存在下の状態と異なるのではないかという疑点を生む。しかし個々の培養細胞の島を詳細に観察すると、決して島全体でレンズ様体形成が起こるのではなく、島の各部分で細胞の重層化が起こり、重層化した部分に、レンズ様体が形成されていた（図8B、C参照）。このことから、分化転換過程は血清存在下でも、無血清条件下でも、同様に進むが、無血清条件下では血清存在下に比べて細胞の増殖度が多少とも低下するので培養器全体にわたり、コンフルエントになるまでに分化転換が起こると考えるのが妥当であろう（43）。さらに言い換えれば、イモリ眼球内で起こる水晶体再生現象も、培養下で観察できるニワトリ、ヒトの色素上皮細胞から水晶体細胞への分化転換現象も、すべて同じ道筋をたどって成立するのではないかという、従来（江口ら）の予想と一致する（3、4、5、6、7、8）。

4、まとめ

以上の結果より、これまで長年に亘り行なわれてきたニワトリ色素上皮細胞の牛胎児血清を含んだ培養系では、血清は次のような役割を果たしていることが推察された。①組織単離時、植え継ぎ時の細

胞障害性を和らげる、②細胞の培養基質よりの離脱と自己融解を防ぎ、培養を維持する、③細胞増殖因子を供給する、④血清中の液性の細胞接着因子により anchorage dependent growth を支持する。また、色素上皮細胞の水晶体細胞への分化転換現象には、血清の全成分は必要ではなく、無血清条件下でも成立することが判明した。色素上皮細胞の長期間の無血清培養システムが確立し、無血清条件下の分化転換が成功したことは、細胞分化形質の安定性と転換性の分子機構を研究する上で極めて意義深いと考える。

謝 辞

大学院進学に際して、現在の私がこの分野で研究を行なうきっかけとなる貴重な助言をくださり、また、受託大学院生として基礎生物学研究所・形態形成研究部門に在籍する事に多大な御尽力を頂きました福井医科大学・生物学教室の長井幸史教授に心より感謝致します。研究全般にわたって適切に指導、助言をしてくださり、時に厳しく叱咤激励をしてくださった江口吾朗教授、直接の指導と具体的な数多くの助言をいただいた渡辺憲二助教授（現・姫路工業大学・理学部・生命科学科・教授）を始め基礎生物学研究所・発生生物学研究系・形態形成研究部門の皆様深く感謝いたします。

引用文献

1. Mauer, H.R., (1986). Towards chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture. in "Animal Cell Culture, a practical approach" (Ed. Freshney, R. I.), pp13-30, IRI Press, Oxford.
2. Barnes, D., and Sato, G., (1980). Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell*. 22, 649-655.
3. 江口 吾朗、 水晶体の再生、岩波書店 (1980).
4. Eguchi, G., (1979). "Transdifferentiation" in pigmented epithelial cells of vertebrate eyes in vitro. In "Mechanisms of Cell Change" (Eds. Ebert, J. D., and Okada, T. S.), pp273-291, John Wiley and Sons, New York.
5. Eguchi, G., (1986). Instability in cell commitment of vertebrate pigmented epithelial cells and their transdifferentiation into lens cells. In "Instability in Cell Commitment and transdifferentiation" (Eds. Okada, T.S., and Moscona, A. A.), *Current Topics in Developmental Biology*. 20, pp21-37. Academic Press.
6. Eguchi, G., (1988). Cellular and molecular background of Wolffian lens regeneration. in "Regulatory Mechanisms in Developmental Processes" (Eds. Eguchi, G., Okada, T.S., and Saxen, L.), pp147-158. Elsevier Scientific Publishers, Ireland.
7. Itoh, Y., and Eguchi, G., (1986). Enhancement of expression of lens phenotype in cultures of pigmented epithelial cells by hyaluronidase in the presence of phenylthiourea. *Cell Differ.* 18, 173-182.
8. Itoh, Y., and Eguchi, G., (1986). In vitro analysis of

- cellular metaplasia from pigmented epithelial cells to lens phenotypes: a unique model system for studying cellular and molecular mechanisms of "transdifferentiation" Dev. Biol. 115, 353-362.
9. Oka, M.S., Landers, R.A., and Bridges, C.D.B., (1984). A serum-free defined medium for retinal pigmented epithelial cells. Exp. Cell Res. 154. 537-547.
 10. Eguchi, G., and Okada, T. S., (1973). Differentiation of lens tissue from the progeny of chick retinal pigment cells cultured in vitro: A demonstration of a switch of cell types in clonal cell culture. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 70, 1495-1499.
 11. Konigsberg, I. R., (1971). Diffusion-mediated control of myoblast fusion. Dev. Biol. 26, 133-152.
 12. Greenberg, G., and Gospodarowicz, D., (1982). Inactivation of a basement membrane component responsible for cell proliferation but not for cell attachment. Exp. Cell Res. 140, 1-14.
 13. Sawada, K., Agata, K., and Eguchi, G., (1989). Molecular analysis of in vitro lens differentiation. Dev. Growth Differ. 31, 390.
 14. Sawada, K., et. al., in preparation.
 15. Laemmli, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. Nature (London). 227, 680-685.
 16. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., (1979). Electrophoretically transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4350-4354.

17. Burchell, J., Durbin, H., and Taylor-Papadimitriou, J., (1983). Complexity of expression of antigenic determinants, recognized by monoclonal antibodies HMFG-1 and HMFG-2, in normal and malignant human mammary epithelial cells. *J. Immunol.* 131, 508-513.
18. Kleimann, H.K., Klebe, R.J., and Martin, G.R., (1981). Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J. Cell Biol.* 88, 473-485.
19. Opas, M., (1989). Expression of the differentiated phenotype by epithelial cells in vitro is regulated by both biochemically and mechanics of the substratum. *Dev. Biol.* 131, 281-293.
20. Lechner, J. F., and LaVeck, M. A., (1985). A serum-free method for culturing normal human bronchial epithelial cells at clonal density. *J. Tissue Cult. Methods* 9, 43-48.
21. 増井 徹、血清は正常上皮細胞の増殖を阻害する。実験医学、 4, 245-248. (1986).
22. Enat, R., Jefferson, D.M., Ruiz-Opazo, N., Gatmaintan, Z., Leinwand, L.A., and Reid, L.M., (1984). Hepatocyte proliferation in vitro: its dependence on the use of serum-free hormonally defined medium and substrata of extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 1411-1415.
23. Alexander, C. M., and Werb, Z., (1989). Proteinase and extracellular matrix remodeling. *Current Opinion in Cell Biology.* 1, 974-982. Current Science Ltd.
24. Moisseiev, J., Jerdon, J. A., Dyer, K., Moglione, A., and Glaser, B. M., (1990). Retinal pigment epithelium cells can influence endothelial cell plasminogen ac-

- tivators. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 31, 1070-1078.
25. Kobayashi, H., Agata, K., Yamamoto, T. S., Mochii, M., and Eguchi, G., (1988). The product of a pigmented epithelial cell-specific gene (pP344) has a trypsin inhibitor activity. Dev. Growth Differ. 30, 442.
26. Agata, K., et. al., in preparation.
27. Gavrilovic, J., Hembry, R. M., Reynolds, J. J., and Murphy, G., Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) regulates extracellular type I collagen degradation by chondrocytes and endothelial cells. J. Cell Sci. 87, 357-362.
28. Liotta, L.A., Steeg, P.S., and Stetler-Stevenson, W.G., (1991). Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. Cell 64, 327-336.
29. Nakamura, T., Asami, O., Tanaka, K., and Ichihara, A., (1984). Increased survival of rat hepatocyte in serum-free medium by inhibition of a trypsin-like protease associated with their plasma membranes. Exp. Cell Res. 154, 537-547.
30. Barrett, A. J., (1986). An introduction to the proteinases. in Proteinase Inhibitors. (Eds. Barrett, A. J., and Salvesen, G.) pp3-22, Elsevier. Amsterdam.
31. Carrell, R., and Travis, J., (1985). α 1-Antitrypsin and the serpins: variation and countervariation. TIBS. January, pp20-24.
32. Owen, M. C., Brennan, S. O., Lewis, J. H., and Carrell, R. W., (1983). Mutation of Antitrypsin to Antithrombin: α 1-Antitrypsin Pittsburgh (358 Met \rightarrow Arg), a fatal bleeding disorder. N. Engl. J. Med. 309, 694-698.

- 33, Montesano, R., Pepper, M. S., Mohle-Steinlein, U., Risau, W., Wagner, E. F., and Orci, L. (1990). Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenic behavior of the endothelial cells expressing the middle T oncogene. *Cell* 62, 435-445.
- 34, Strickland, S., and Mahdavi, V., (1978). The induction of differentiation in tetradecanoyl acylated stem cells by retinoic acid. *Cell* 15, 393-403.
- 35, de Groot, R. P., Pals, C., and Kruijer, W., (1991). Transcriptional control of c-jun by retinoic acid. *Nucl. Acids Res.* 19, 1585-1591.
- 36, Kondo, K., Watanabe, T., Sasaki, H., Uehara, Y., and Oishi, M., (1989). Induction of in vitro differentiation of mouse embryonal carcinoma (F9) and erythroleukemia (MEL) cells by herbimycin A, an inhibitor of protein phosphorylation. (1989). *J. Cell Biol.* 109, 285-293.
- 37, Watanabe, T., Shiraishi, T., Sasaki, H., and Oishi, M., (1989). Inhibitors for protein-tyrosine kinase, ST638 and genistein, induce differentiation of mouse erythroleukemia cells in a synergic manner. *Exp. Cell Res.* 183, 335-342.
- 38, Lahav, M., Craft, J., Albert, D. M., and Ishii, Y., (1982). Advanced pigmentary retinal degeneration: an ultrastructural study. *Retina.* 2, 65-75.
- 39, Szamier, R.B., and Berson, E.L., (1982). Histopathologic study of an unusual form of retinitis pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22, 559-570.
- 40, Powers, J. C., and Harper, J. W., (1986). Inhibitors of serine proteinase. in *Proteinase Inhibitors* (Eds.

- Barrett, A. J., and Salvesen, G.), pp55-152, Elsevier, Amsterdam.
41. Kidwell, W. R., Bano, M., and Salomon, D. S., (1984). Growth of normal mammary epithelium on collagen in serum-free medium. *Cell Cult. Method Mol. Cell Biol.* 2, 105-125.
 42. Turksen, K., Aubin, J.E., Sodek, J., and Kalmins, V.I. (1985). Localization of laminin, type IV collagen, fibronectin, and heparan sulfate proteoglycan in chick retinal pigmented epithelium basement membrane during embryonic development. *J. Histochem. Cytochem.* 33, 665-671.
 43. Eguchi, G., and Itoh, Y., (1982). Regulation of the lens as a phenotype of cellular transdifferentiation : Regulability of the differentiated state of the vertebrate pigment epithelial cell. *Trans. ophthal. Soc. U.K.* 102, 380-384.

參考論文

Transdifferentiation of Chicken Retinal Pigmented
Epithelial Cells in Serum-free Culture

総合研究大学院大学

生命科学研究科

分子生物機構論専攻

小 阪 淳



UNIFORMED SERVICES UNIVERSITY OF THE HEALTH SCIENCES
F. EDWARD HEBERT SCHOOL OF MEDICINE
 4301 JONES BRIDGE ROAD
 BETHESDA, MARYLAND 20814-4799
 14 November 1991



ANATOMY

TEACHING HOSPITALS
 WALTER REED ARMY MEDICAL CENTER
 NAVAL HOSPITAL, BETHESDA
 MALCOLM GROW AIR FORCE MEDICAL CENTER
 WILFORD HALL AIR FORCE MEDICAL CENTER

FAX COVER SHEET

TO: Dr. Jun Kosaka, Department of Life Science, Faculty of Science

FAX NUMBER: 564 53 7400

NUMBER OF PAGES FOLLOWING: 0

FROM: David C. Beebe, Ph.D.
 Department of Anatomy and Cell Biology
 USUHS
 4301 Jones Bridge Rd.
 Bethesda, MD 20814-4799
 USA

FAX NUMBER: (1) 301 295 1715

TELEPHONE NUMBER: (1) 301 295 3200

Dear Dr. Kosaka,

I am pleased to inform you that your manuscript, "Transdifferentiation of Chicken Retinal Pigmented Epithelial Cells in Serum-free Culture" has been accepted for publication in Experimental Eye Research. As in my FAX to Dr. Eguchi, I sincerely apologize for the great delay in reviewing this paper. Thank you for considering EER for this publication.

The manuscript has been sent to the publisher. You will receive further correspondence and galley proofs directly from the publisher.

Sincerely yours,

David C. Beebe, Ph.D.
 Editorial Board



Accepted for publication in "Experimental Eye Research"

Transdifferentiation of Chicken Retinal Pigmented
Epithelial Cells in Serum-free Culture

JUN KOSAKA, KENJI WATANABE* and GORO EGUCHI

Division of Morphogenesis, Department of Developmental Biology, National Institute for Basic Biology and Department of Molecular Biomechanics, School of Life Science, The Graduate University for Advanced Studies, Myodaiji-cho, Okazaki, Aichi 444, Japan; and

* Present address : Department of Life Science, Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigouri 1479-1, Akou, Hyogo 678-12, Japan

All correspondence and reprint requests should be addressed to : Jun Kosaka, Division of Morphogenesis, National Institute for Basic Biology.

Telephone: (Japan)-0564-54-1111, extension 7572,

Fax: (Japan)-0564-53-7400.

Running title: Serum-free Transdifferentiation of PECs

Summary

A serum-free culture of chicken retinal pigmented epithelial cells has been established in order to analyze how cell-substrate interactions or environmental factors affect the process of transdifferentiation into lens cells from pigmented epithelial cells. The serum-free culture medium for chicken pigmented epithelial cells was Eagle's minimum essential medium supplemented with chicken transferrin, soybean trypsin inhibitor and bovine insulin. Pigmented epithelial cells were able to survive and grow in the medium for longer than 2 weeks. Collagen did not promote initial cell attachment, but this material effectively supports pigmented epithelial cells to organize monolayer structure characteristics to pigmented epithelium in situ in comparison with the plastic substrate of culture dishes.

The process of lens transdifferentiation of chicken pigmented epithelial cells in serum-free conditions was also enhanced with the aid of phenylthiourea and testicular hyaluronidase, which had already been known to promote the transdifferentiation of pigmented epithelial cells in the serum-supplemented condition. Typical lentoid bodies were developed after about 2 weeks of the serum-free culture. Thus, we can clearly demonstrate that the chicken embryonic pigmented epithelial cells do not always require a full set of serum factors for their transdifferentiation to lens cells in vitro.

Key words: pigmented epithelial cells; serum-free culture;
soybean trypsin inhibitor; transdifferentiation; phenylthiourea;
hyaluronidase; collagen substrates; fibronectin

Introduction

When cells are dissociated from their original tissue and placed into culture, the medium must be regulated to provide the environmental conditions permissive for the cells to survive as exposed to the in vivo environment. The culture medium which is usually supplemented with about 5-20% of serum from a suitable source must meet the essential requirements for cell survival and growth. Among the biological fluids that prove successful to culturing cells outside the body, serum has the most wide-spread significance (Maurer, 1986). Our original culture media for chicken pigmented epithelial cells (PECs) have also included fetal bovine serum (FBS) (Itoh and Eguchi, 1986a,b).

Chicken PECs can be transdifferentiated into lens cells via dedifferentiated PECs (dePECs) by regulating culture environments (Itoh and Eguchi, 1986b). The dePECs which lose the contact inhibition of growth and exhibit cytoplasmic ruffling are multipotent (at least bipotent) cells, which differentiate into either lens cells or PECs. The efficiency of transdifferentiation was remarkably improved by introducing PTU and ovine testicular HUase into the culture medium. Even in the human eye, where lens regeneration has never been observed from iris pigmented epithelium in vivo, PECs are able to transdifferentiate into lens cells by utilizing this culture system (Eguchi, 1988). A serum-free culture system of chicken PECs excluding one of the crude components in culture is useful in analyzing the molecular mechanisms of transdifferentiation.

Complete synthetic media are unable to support cell prolif-

eration of PECs on a plastic dish. Bovine or human PECs survived only a few days in the absence of FBS, even if some factors such as epidermal growth factor (EGF), follicle stimulating hormone (FSH) and retinoic acid (RA) were added to the medium (Oka et al., 1984).

In this study, we found that chicken PECs attach to collagen substrates (CS) or fibronectin (FN), and their proliferation is stimulated in our serum-free culture medium. We have also found that soybean trypsin inhibitor (sbTI) enhances the survival of PECs enough for them to maintain the whole process of transdifferentiation into lens cells. Lentoid bodies were developed after 2 weeks of the serum-free culture, and they expressed lens specific markers, α A- and β -crystallins. We have concluded that PECs are capable of transdifferentiation into lens cells without serum.

Materials and Methods

Preparation of Cells

Fertilized chicken eggs were obtained from a local hatchery and incubated for 9 days at 38°C. Pigmented epithelial sheets were prepared from posterior parts of eyes according to our previous papers (Itoh and Eguchi, 1986a,b).

After dissection of the anterior one-fourth including cornea, lens and iris, the vitreous and neural retina were removed. The remaining posterior three-fourth of the eye was treated with 0.1% EDTA solution in Ca²⁺- and Mg²⁺- free phosphate-buffered saline (CMF-PBS) for 15 minutes at 37°C. Pigmented epithelial cell sheets were isolated by gentle scraping with forceps and then incubated in 0.1% trypsin in CMF-PBS for 15 minutes at 37°C.

Culture Media

The following culture media were used.

(a) 8% MEM: Eagle's MEM (minimum essential medium, Nissui Co, Tokyo, Japan) supplemented with 8% FBS (Fetal Bovine Serum, Flow Laboratories, Inc. McLean, VA, Lot No.0030483), 2 mM L-glutamine, and 26 mM sodium bicarbonate. This medium was used as the basic culture medium (Itoh and Eguchi, 1986b).

(b) Serum-free MEM: This medium was prepared by supplementing Eagle's MEM (with glutamic acid and NaHCO₃) with 1.0 mg/ml sbTI (soybean trypsin inhibitor, Type I-S, lyophilized chromatographically prepared, T9003, Sigma Co. St.Louis. MO) and 0.1 mg/ml chicken transferrin (iron compound complex from egg white, C0880, Sigma Co.). In some experiments, bovine insulin (I5500, Sigma

Co.) was added to this medium at a final concentration of 0.1 unit/ml.

(c) Serum-free EPH: This medium was used to permit PECs to dedifferentiate in serum-free conditions. The serum-free MEM (b) was additionally supplemented with 0.5 mM PTU (phenylthiourea, Wako Pure Chemical Co. Osaka, Japan), 0.1 mg/ml HUase (Ovine Testicular Hyaluronidase, H6254, Sigma. Co. Lot No. 79F-0098, approximately 2000 units/mg)(Itoh and Eguchi, 1986b).

Procedure for Cell Culture

About 5×10^5 PECs freshly dissociated from 9-day-old chicken embryos were seeded in 2.0 ml of 8% MEM onto the 35 mm plastic dish for tissue culture use (Corning. Iwaki Glass. Tokyo, Japan, 25000DISH.), which was used as a plastic substrate (PS). After 3-4 days, cultures reached semiconfluency.

These primary cultures were washed once with 0.1% EDTA solution and then harvested with 0.1% trypsin solution in CMF-PBS for 15 minutes at 37°C. After deactivation of trypsin with 0.1% sbTI (serum-free MEM), 1.0×10^5 dissociated PECs were seeded with serum-free MEM on one dish coated with substrates. All culture cells were incubated in a CO₂ incubator (95% air- 5% CO₂, 100% humidity) with medium replacement everyday throughout the culture period.

Culture Substrates

Two substrates, collagen and fibronectin (FN), were examined for their ability to support the initial cell attachment and growth of chicken PECs. The plastic surface was coated with collagen according to the procedure described by I. R. Konigsberg (1971). FN-coated dishes were prepared by incubating plastic

dishes (PS) with bovine fibronectin (F4759, Sigma Co.) at the concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$ in CMF-PBS for 6 hours at room temperature on a rotating table.

Cell Counting

At selected time intervals, nonadherent cells were washed off the dishes with a brief rinse of 0.1% EDTA solution in CMF-PBS. The remaining adherent cells were trypsinized and counted on a Burker-Turk hemocytometer to calculate the adherent cell number per 35 mm dish.

Antibodies and Western Blotting

Anti-chicken αA - and β -crystallin monoclonal antibodies have been prepared in our laboratory. A detailed description of these antibodies will be reported elsewhere (Sawada et al. 1989). After removal of culture medium, the cell sheet including lentoid bodies on a culture dish stored at -80°C was directly suspended in 100 μl sample buffer, boiled for 5 minutes, and separated by a 12.5% SDS-PAGE (Laemmli, 1970). The proteins were electrophoretically transferred onto nitrocellulose filters (Towbin et al. 1979). The blotted filters were incubated overnight with the anti-crystallin monoclonal antibodies in hybridoma culture supernatant. After washing, the filters were incubated with 1:1000 diluted GAM-HRP (Bio-Rad Co., Richmond, CA, affinity purified goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugated). HRP was visualized in 4-chloro-1-naphtol and H_2O_2 (Burchell et al. 1983).

Results

Establishment of Serum-free Culture System of Chicken PECs

When freshly isolated PECs were directly inoculated into the serum-free condition, they could not recover sufficiently from damage caused by dissociation to survive in the serum-free conditions. Therefore, PECs were precultured with 8% MEM for 3-4 days. Precultured cells were then dissociated according to Materials and Methods and then placed on culture substrates under the serum-free condition.

The serum-free MEM without sbTI was able to support initial cell attachment of PECs on CS, FN and non coated PS. One day after transfer, they spread onto substrates even under serum-supplemented conditions (Fig.1A). However, after 4-5 days of culture, spread PECs became round in shape and detached from the culture substrates (Fig.1B), and finally they floated away. The number of PECs decreased to an uncountable level as this detachment process proceeded (Fig.2).

Detachment of cells may indicate tryptic activity in our system. Soybean trypsin inhibitor (sbTI) was tested in our system to promote cell survival. The effect of sbTI was not remarkable at the concentration of 1.0 $\mu\text{g/ml}$ - 100 $\mu\text{g/ml}$; the PECs died after 4-5 days. At the concentration of 1.0 mg/ml , sbTI prevented PECs from detaching and degenerating (compare Fig.1B with 1C). PECs were maintained for several weeks and kept their cell morphology.

Growth Stimulation of Chicken PECs by Insulin

In the serum-free medium with bovine insulin at 1.0 $\mu\text{g/ml}$, PECs were able to proliferate on CS, and formed a confluent monolayer (Fig.1C). Without insulin, PECs were unable to proliferate in serum-free culture (Fig.3A). The transferred cells contacted each other and formed cellular islets. These cellular islets grew spread and fused to each other until becoming confluent (Fig.1C).

Formation of Polygonal Structure on CS

Initial attachment of chicken PECs was observed on CS and was usually similar to that on PS. PECs on CS were able to spread well and form the compact polygonal cell sheet characteristic of the monolayer epithelium. PECs attached on PS and transiently spread after transfer, although they were unable to form the confluent monolayer (compare Fig.4A with 4B). Growth curves of PECs indicate slight promotion of growth on CS in the serum-free case (Fig.3B).

Dedifferentiated Phenotypes of PECs under the Serum-free Conditions

PECs were transferred onto CS or FN with serum-free MEM. On the next day, the medium was replaced with the serum-free EPH medium, containing PTU and HUase which was cytotoxic at the time of cell dissociation. About 1 week later, PECs gradually lost their original phenotype and some of cells exhibited ruffling (Fig.5A). Depigmentation and cytoplasmic ruffling that differed

from the microvilli characteristic to well-differentiated PECs, were specific phenotypes of dePECs on cell morphology (Itoh and Eguchi, 1986b). In serum-free EPH, PECs did not reach overconfluency and remained as a monolayer epithelium. However, at some place of cellular islets, piles of cells were observed (Fig.5A, B).

Transdifferentiation into Lens Cells

For about 2 weeks after medium replacement with serum-free EPH, the piles of cell developed into typical lentoid bodies. Lentoidgenesis was observed on both FN and CS (Fig.4B,C). Western blotting of extracts of the cultured cells demonstrated the presence of α A- and β -crystallins, which were specific molecular markers of the chicken lens (Fig.6).

Discussion

Previous cell culture studies of PECs in vitro have been carried out using serum-supplemented media (Itoh and Eguchi, 1986a,b; Opas, 1989). Oka et al.(1984) reported one serum-free culture system of bovine and human PECs. In their case, the initial exposure to the serum-supplemented medium was essential for cell attachment and spreading. CS- or FN-coated dishes were used in our system instead of FBS, which might be the source of soluble cell adhesion molecules (Maurer, 1986).

Non coated PS allowed the initial attachment of PECs even in serum-free conditions. However, after attachment, PS did not support their growth and formation of polygonal structure in the serum-free condition. CS and FN were able to provide the scaffold for not only the stable cell attachment but also the morphogenesis of the polygonal monolayer characteristic of PECs in vitro. It has been suggested that the formation of the polygonal monolayer on CS is one of the many physiological functions of extracellular matrix in PECs (Kleinman et al., 1981; Kidwell et al., 1984). It has been reported that some of the extracellular molecules localize in the basement membrane of chicken retinal pigmented epithelium in the early stages of eye development (Turksen et al., 1985). Non coated PS cannot support the lens transdifferentiation of PECs in the serum-free condition because of the detachment of cells associated with PTU and HUase. These observations suggest that PTU and HUase might modify not soluble serum factors but cell-substrate contacts.

The dePECs cultured with FBS gradually condensed to piles,

and eventually formed multicellular layers (Itoh and Eguchi, 1986a,b). By contrast, in the serum-free conditions, presumably owing to selection of cells which are sufficiently viable and active to grow and form cell sheets, cultures never reached confluency by the time lentoidgenesis started. At some places of cellular islets, piles of cells and cytoplasmic ruffling were observed. These findings strongly suggest that the fundamental process itself of transdifferentiation in each cellular islet must be identical to that observed in the culture of serum-supplemented conditions (Eguchi and Itoh, 1982).

It was reported that many kinds of serum factors promoted survival and growth of cells in vitro. In the present studies, bovine insulin, which was effective on various cell types (Enat et al. 1984; Maurer, 1986), was examined for its ability to stimulate growth of PECs. The results have strongly suggested the important role of insulin in the growth of PECs (Fig. 3A). Other investigations showed that iron compound complex transferrin was essential to maintain cells (Barnes and Sato, 1980; Saito et al., 1982). Without chicken transferrin, PECs were also unable to survive and grow in our serum-free culture system of PECs (unpublished data).

A high concentration (1.0 mg/ml) of sbTI was necessary for the long-term culture of chicken PECs. The attractive hypothesis on the effect of sbTI in our serum-free culture system of chicken PECs is that sbTI might form a complex with its specific target proteinase (Barrett, 1986). In the case of rat hepatocyte primary culture, bovine pancreatic trypsin inhibitor in the serum-free medium promoted cell survival after binding specifically to

a membrane-bound proteinase (Nakamura et al., 1984). Generally, in serine proteinase inhibitors, a few amino acids especially at P1 site determine the specificity of target proteinase; for example, the point mutation at P1 site (Met → Arg) in α 1-anti-trypsin alters its target affinity completely (elastase → thrombin) (Carrell and Travis, 1985; Carrell, 1988).

The requirement of a high concentration of sbTI in our serum-free culture system might be due to its low affinity with an unknown target proteinase. Therefore, other proteinase inhibitors were examined for their ability to promote cell survival in our system. Proteinase inhibitors were derived from chicken ovomucoid, bovine lung (aprotinin), bovine pancreatic, lima bean and nonspecific serum inhibitor α 2-macroglobulin. They showed no effects on the survival of PECs in serum-free culture at lower concentrations (1.0 μ g/ml-100 μ g/ml)(unpublished data). There is insufficient information to permit a clear understanding in the effect of sbTI in our system.

Recently, a PECs-specific gene (pP344) was isolated in our laboratory (Kobayashi et al. 1988). This gene encoded a protein containing two Kunitz-type domains which showed trypsin inhibitory activity and was repressed in the process of dedifferentiation. The pP344 gene product might inhibit some unknown proteinases which metabolize the extracellular matrix of PECs similar to the case of TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase) (Gavrilovic et al., 1987; Liotta et al., 1991). It is possible to assume that in this serum-free culture system, sbTI might also inhibit the proteinase which modulates cell-substrate communica-

tion instead of pP344, because it prevented detachment of PECs from substrates. Furthermore, the pathological depigmentation and degeneration in retinitis pigmentosa might be similar to the proteolytic phenomenon observed in the serum-free culture of PECs without sbTI (Lahav et al. 1982; Szamier and Berson, 1982). Serine proteinases are suggested to be therapeutically useful targets of inhibitors, for example in degenerative inflammation (Powers and Harper, 1986). Our transdifferentiation system of PECs in vitro may be unique and useful to clarify unknown functions of proteinases and their inhibitors as a biomodulator.

Finally, from the results obtained in this study, we can assume that PTU and HUase affect the process of transdifferentiation without FBS. It is reasonable to hypothesize that cell-substrate or cell-cell communication modulated by PTU and HUase is one of the necessary conditions for converting the differentiated phenotype of PECs in vitro. With further improvement to make the serum-free conditions sufficiently permissive for much more efficient transdifferentiation of PECs, our serum-free culture system should become a unique and powerful tool for analyzing the molecular mechanisms of cellular transdifferentiation, with a particular focus on cell-substrate and cell-cell interactions.

Acknowledgements

We thank Drs. Y. Nagai (Fukui Medical School), R. Kodama, K. Agata, M. Mochii , K. Sawada and other members in our laboratory for their encouragement and useful discussions, Ms. K. Katou for her excellent technical assistance and Dr. H. Orii (Himeji Institute of Technology) for his critical reading of this manuscript. This work was supported by the following grants: Grants-in-Aid from the Ministry of Education, Science and Culture to G. E. and K. W., Research Funds from the Naito Foundation and the Cataract Institute to G. E..

References

- Barnes, D., and Sato, G., (1980). Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell*. 22, 649-655.
- Barrett, A. J., (1986). An introduction to the proteinases. in *Proteinase Inhibitors*. (Eds. Barrett, A. J., and Salvesen, G.) pp3-22, Elsevier, Amsterdam.
- Burchell, J., Durbin, H., and Taylor-Papadimitriou, J., (1983). Complexity of expression of antigenic determinants, recognized by monoclonal antibodies HMFG-1 and HMFG-2, in normal and malignant human mammary epithelial cells. *J.Immunol.* 131, 508-513.
- Carrell, R., and Travis, J., (1985). α_1 -Antitrypsin and the serpins: variation and countervariation. *TIBS*. January, pp20-24.
- Carrell, R., (1988). Alzheimer's disease: enter a proteinase inhibitor. *Nature (London)*. 331, 478-479.
- Eguchi, G., and Itoh, Y., (1982). Regeneration of the lens as a phenomenon of cellular transdifferentiation: regulability of the differentiated state of the vertebrate pigmented epithelial cell. *Trans. Ophthal. Soc. U.K.* 102, 380-384.
- Eguchi, G., (1988). Cellular and molecular background of Wolffian lens regeneration. in *Regulatory Mechanisms in Developmental Processes*. (Eds. Eguchi,G., Okada,T.S., and Saxen,L.,) pp147-158. Elsevier Scientific Publishers, Ireland.
- Enat, R., Jefferson, D. M., Ruiz-Opazo, N., Gatmantan, Z., Leinwand, L. A., and Reid, L. M., (1984). Hepatocyte proliferation in vitro: its dependence on the use of serum-free hormonally defined medium and substrata of extracellular matrix.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81,1411-1415.
- Gavrilovic, J., Hembry, R. M., Reynolds, J. J. and Murphy, G., (1987). Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) regulates extracellular type I collagen degradation by chondrocytes and endothelial cells. *J. Cell Sci.* 87, 357-362.
- Itoh, Y., and Eguchi, G., (1986a). Enhancement of expression of lens phenotype in cultures of pigmented epithelial cells by Hyaluronidase in the presence of phenylthiourea. *Cell Differ.* 18, 173-182.
- Itoh, Y., and Eguchi, G., (1986b). In vitro analysis of cellular metaplasia from pigmented epithelial cells to lens phenotypes: a unique model system for studying cellular and molecular mechanisms of "transdifferentiation". *Dev. Biol.* 115, 353-362.
- Kidwell, W. R., Bano, M., and Salomon, D. S., (1984). Growth of normal mammary epithelium on collagen in serum-free medium. *Cell Cult. Method Mol. Cell Biol.* 2, 105-125.
- Kleinman, H. K., Klebe, R. J., and Martin, G. R., (1981). Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J. Cell Biol.* 88, 473-485.
- Konigsberg, I. R., (1971). Diffusion-mediated control of myoblast fusion. *Dev. Biol.* 26,133-152.
- Kobayashi, H., Agata, K., Yamamoto, T. S., Mochii, M., and Eguchi, G., (1988). The product of a pigmented epithelial cell-specific gene (pP344) has a trypsin inhibitor activity. *Dev. Growth Differ.* 30, 442.
- Laemmli, U. K., (1970). Cleavage of structural proteins during

- the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London). 227, 680-685.
- Lahav, M., Craft, J., Albert, D. M., and Ishii, Y., (1982). Advanced pigmentary retinal degeneration: an ultrastructural study. *Retina*. 2, 65-75.
- Liotta, L. A., Steeg, P. S., and Stetler-Stevenson, W. G. (1991). Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64, 327-336.
- Maurer, H. R., (1986). Towards chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture. in *Animal Cell Culture, a practical approach* (Ed. Freshney, R.I.), pp13-30, IRL Press Oxford.
- Nakamura, T., Asami, O., Tanaka, K., and Ichihara, A., (1984). Increased survival of rat hepatocytes in serum-free medium by inhibition of a trypsin-like protease associated with their plasma membranes. *Exp. Cell Res.* 154, 81-91.
- Oka, M. S., Landers, R. A., and Bridges, C. D. B., (1984). A serum-free defined medium for retinal pigmented epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 154, 537-547.
- Opas, M., (1989). Expression of the differentiated phenotype by epithelial cells in vitro is regulated by both biochemically and mechanics of the substratum. *Dev. Biol.* 131, 281-293.
- Powers, J. C., and Harper, J. W., (1986). Inhibitors of serine proteinase. in *Proteinase Inhibitors* (Eds. Barrett, A. J., and Salvesen, G.), pp55-152, Elsevier, Amsterdam.
- Saito, K., Hagiwara, Y., Hasegawa, T., and Ozawa, E., (1982). Indispensability of iron the growth of cultured chick cells.

- Dev. Growth Differ. 24, 571-580.
- Sawada, K., Agata, K., and Eguchi, G., (1989). Molecular analysis of in vitro lens differentiation. Dev. Growth Differ. 31, 390.
- Szamier, R. B., and Berson, E. L., (1982). Histopathologic study of an unusual form of retinitis pigmentosa. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 22, 559-570.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4350-4354.
- Turksen, K., Aubin, J. E., Sodek, J., and Kalmins, V. I., (1985). Localization of laminin, type IV collagen, fibronectin, and heparan sulfate proteoglycan in chick retinal pigmented epithelium basement membrane during embryonic development. J. Histochem. Cytochem. 33, 665-671.

Figure Legends

Fig.1 Phase microscopic images of chicken PECs cultured in the serum-free culture. (A) Spreading PECs on CS for 24 hours after transfer. (B) Detachment phenomenon from substrates occurred in the absence of sbTI for 5 days after transfer. (C) PECs cultured for 5 days on CS in the serum-free culture with sbTI. x 86.

Fig.2 Growth of chicken PECs in serum-free culture in the presence or absence of 1.0 mg/ml sbTI. PECs were inoculated at 1.0×10^5 cells / 35 mm dishes CS with serum-free MEM supplemented with 0.1 mg/ml transferrin and 1.0 μ g /ml insulin in the presence (●) or absence (○) of sbTI. On day 9, the cell number of PECs in the absence of sbTI was uncountable.

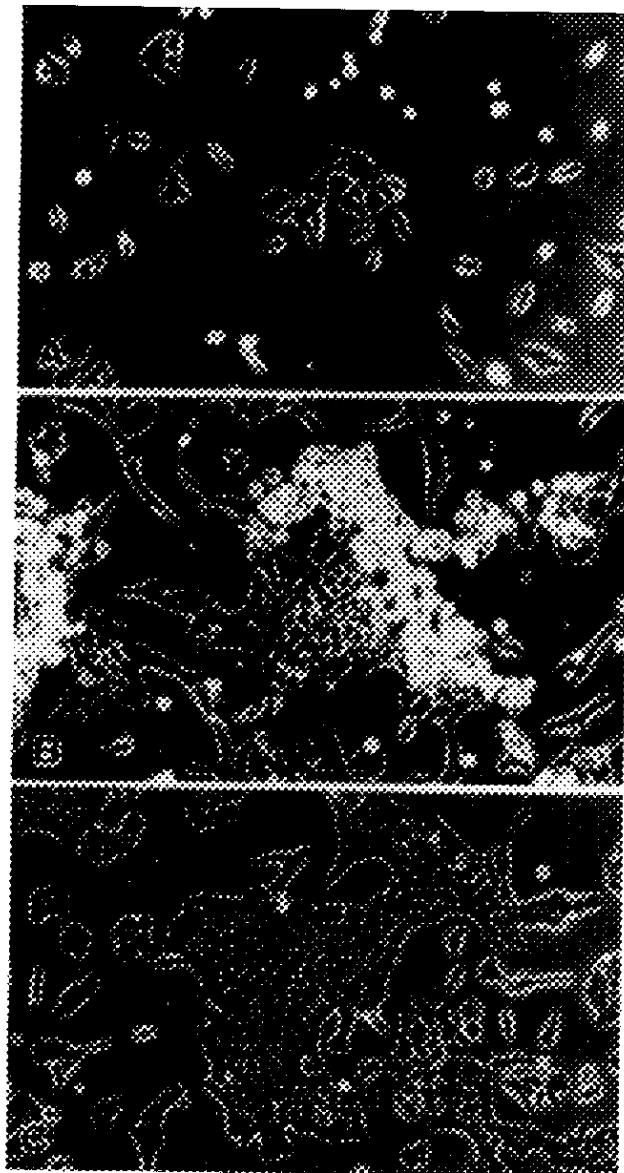
Fig.3 (A) Effect of bovine insulin on the growth of chicken PECs in the serum-free condition. PECs were inoculated at 1.0×10^5 cells / 35 mm dish onto CS with serum-free MEM supplemented with 1.0 mg/ml sbTI and 0.1 mg/ml transferrin in the presence (●) or absence (○) of 1.0 μ g /ml bovine insulin. (B) Anchorage dependence growth of chicken PECs on CS. PECs were inoculated at 1.0×10^5 cells / 35 mm dish onto CS (●) or PS (○).

Fig.4 Phase microscopic images of chicken PECs inoculated onto PS and CS. (A) PECs on PS 14 days after transfer. They were unable to spread and form confluent monolayer. x 214. (B) The polygonal structure of PECs on CS 14 days after transfer. x 165.

Fig.5 Phase microscopic images of dedifferentiated and transdifferentiated stages of chicken PECs cultured in the serum-free medium. (A) Actively growing dePECs with serum-free EPH on FN for 7 days after transfer. Ruffling (arrows in an inset) and depigmented phenotype. x 196, inset: x 792. (B) Typical lentoid bodies developed from transdifferentiated PECs on day 12 in the serum-free culture on FN. x 86. (C) Lentoidgenesis on CS on day 14. x 86.

Fig.6 SDS-PAGE and Western blotting analysis of lentoidgenesis in serum-free culture. (A) Proteins of cells were electrophoresed and stained with Coomassie brilliant blue. (lane 2) Proteins of PECs cultured with serum-free MEM for 2 weeks. (lane 3) Proteins of lentoid bodies transdifferentiated from PECs for 2 weeks with serum-free EPH medium. (lane 4) Chicken lens extract prepared by HPLC (high performance liquid chromatography) to reduce δ -crystallin fraction. Arrows indicate α A- and α B-crystallins. Arrowheads indicate group of β -crystallins. Lane 1 contains molecular weight markers, the sizes of which are shown at the left ($M_r \times 10^{-3}$). (B,C) Proteins of cells were blotted onto nitrocellulose membrane and probed with anti-chicken α A- and β -crystallin monoclonal antibodies, respectively. (lane 5,8) Proteins of PECs. (lane 6,9) Proteins of lentoid bodies. (lane 7,10) Lens extract as a positive control.

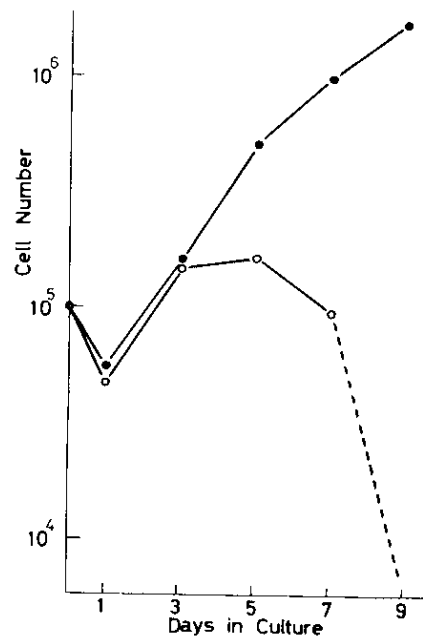
FIG. 1



Jun Kosaka, Kenji Watanabe and Goro Eguchi.

Transdifferentiation of Chicken Retinal Pigmented Epithelial
Cells in Serum-free Culture.

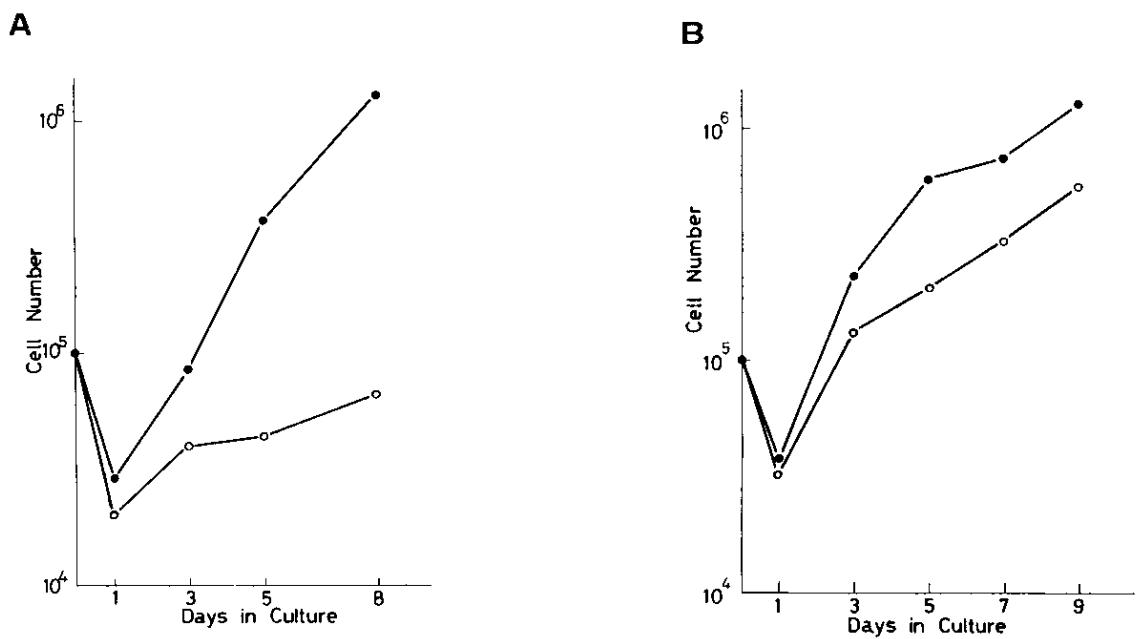
FIG. 2



Jun Kosaka, Kenji Watanabe and Goro Eguchi.

Transdifferentiation of Chicken Retinal Pigmented Epithelial Cells in Serum-free Culture.

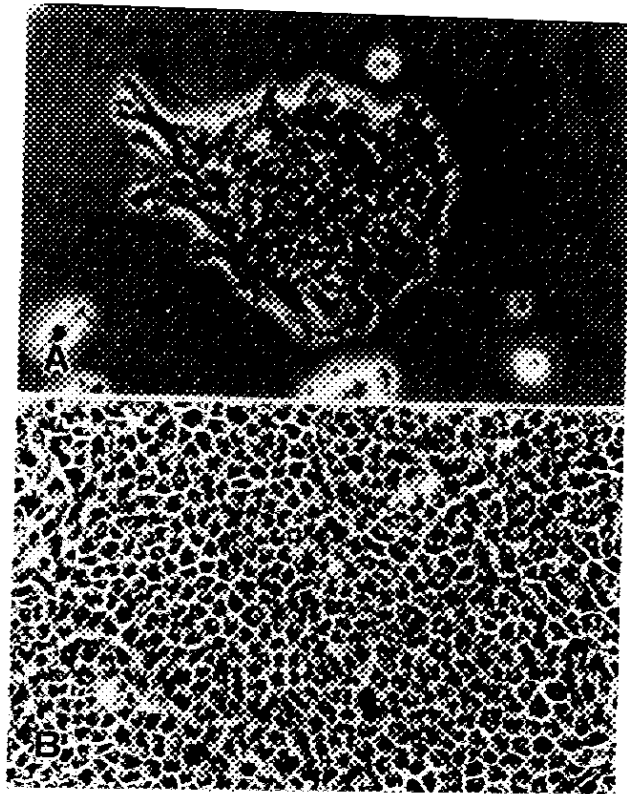
FIG. 3



Jun Kosaka, Kenji Watanabe and Goro Eguchi.

Transdifferentiation of Chicken Retinal Pigmented Epithelial Cells in Serum-free Culture.

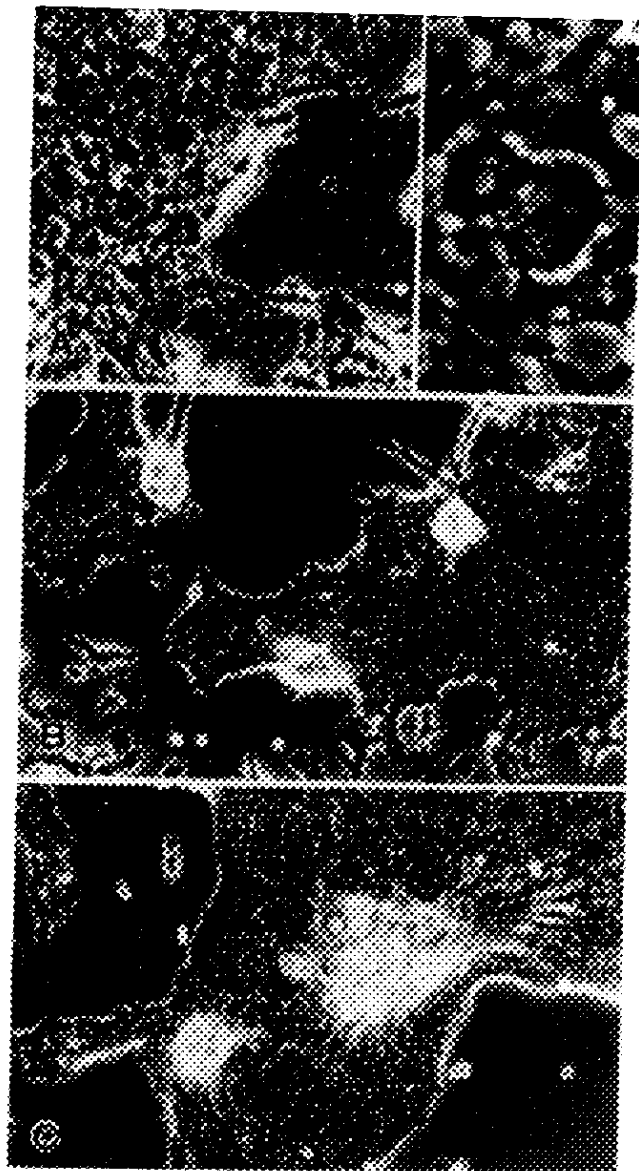
FIG. 4



Jun Kosaka, Kenji Watanabe and Goro Eguchi.

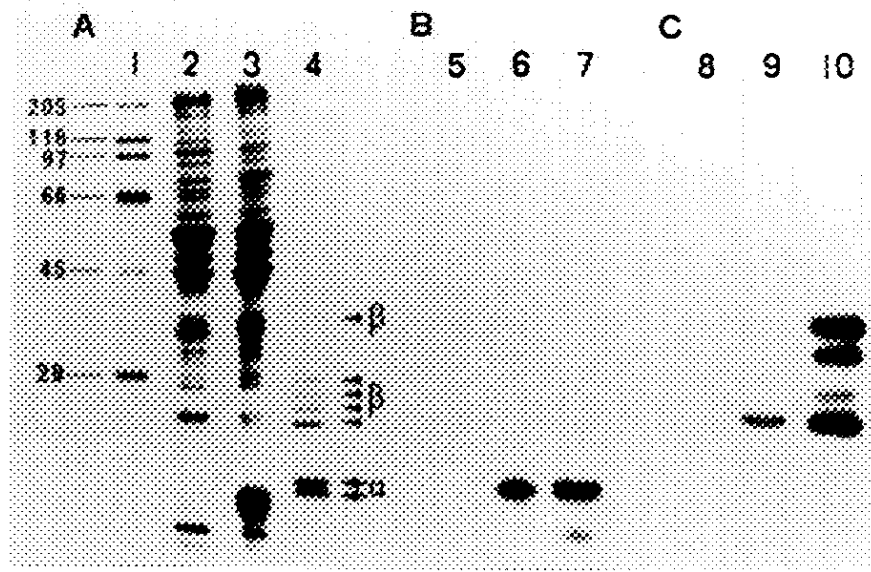
Transdifferentiation of Chicken Retinal Pigmented Epithelial
Cells in Serum-free Culture.

FIG.5



Jun Kosaka, Kenji Watanabe and Goro Eguchi.
Transdifferentiation of Chicken Retinal Pigmented Epithelial
Cells in Serum-free Culture.

FIG. 6



Jun Kosaka, Kenji Watanabe and Goro Eguchi.
Transdifferentiation of Chicken Retinal Pigmented Epithelial
Cells in Serum-free Culture.