

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10873

研究課題名(和文) ヒト極性網膜色素上皮細胞を使った網脈絡膜疾患の病態制御に関する研究

研究課題名(英文) Analysis on pathological condition control of corio-retinal diseases using human polarized retinal pigment epithelial cells

研究代表者

園田 祥三 (SONODA, Shozo)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師

研究者番号：20325806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ライン化されたヒトRPE細胞を、TranswellITM上で培養することで、極性RPEの安定的な培養手法を確立した。現在臨床で用いられる抗VEGF抗体の薬剤透過性について検討を行い、薬剤の違いより、極性RPEの透過性が異なる事が分かった。TNF $\alpha$ 刺激による反応の違いに関する解析を行い、VEGFの分泌能や細胞内シグナルの動きが極性の有無で異なる事を見いだした。

画像解析では、特に脈絡膜に注目し解析を行った結果、OCT B-scan画像を用いて、2階調化の検討を行うと、疾患毎に動きが異なる事、特にCSCにおいては脈絡膜の構造が病態発生に大きく関与している事を見いだした。

研究成果の概要(英文)：Our group had established a stable culture method of polarized RPE by using the human commercial available RPE cell lines on Transwell. We had investigated drug permeability of anti-VEGF antibody which were currently used clinically with our polarized RPE, and found that the permeability ratio differs depending on the drug. We also analyzed the difference in response by TNF- $\alpha$  stimulation with or without polarity and found the ability of VEGF secretion and the interaction of intracellular signal were different depending on the polarity.

In the image analysis, there are structural changes of the choroid in eyes with CSC, the larger hyperreflective area change in the inner choroid and the larger hyporefective area change in the outer choroid by using binarization methods. Most importantly, the quantification of the structural components of the choroid in the OCT B-scan images has extracted new information which should contribute to the determination of the mechanism of CSC.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜色素上皮細胞 極性RPE細胞 抗VEGF抗体 脈絡膜 イメージング

1. 研究開始当初の背景：RPE (網膜色素上皮細胞) は視細胞と脈絡膜の間に位置し、両者間における物質輸送に関与するのをはじめとして、視細胞外節の貪食、ビタミンA 代謝、視細胞微小循環の維持、脈絡膜毛細血管板の維持など、眼球の恒常性を維持するため様々な重要な役割を担っている。

RPE の機能や病態関与のメカニズムを解明するために、培養細胞を用いた研究が行われているが、本邦ではその大部分はARPE-19 を用いた研究である。ARPE-19 はline 化されたヒトRPE であるが、継代や培地条件によってその性質が変化することが報告されている。また、RPE は細胞間接着装置をもち、血液網膜関門や感覚網膜・脈絡膜間の物質輸送を制御する働きがあるが、従来のRPE 培養法では、その形態や機能的特徴を再現することは不可能であり、*in vivo* のRPE 機能と分離した培養細胞を用いて実験を行ってことを意味している。

昨今、transwell™ を利用した培養によって、細胞極性を示すRPE (polarized RPE) 培養が可能で、我々は、さらに培養法を改良しブタRPE で、細胞極性もち、高い分化した微絨毛をもつRPE 培養に成功した (Sonoda et al. Nature Protocols2009)。Transwell™ を利用した研究の優位点は、wellによって培養チャンパー内が上下2 つのコンパートメントに分けられるため、RPE 上皮面・基底面とを分けて解析が可能なこと、さらにTranswell™ 上での免疫染色等が可能のため、極性を維持した状態で実験ができることが挙げられる。

極性RPE を使ったこれまでの我々の研究で、炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$  を極性ブタRPE に作用させた場合、極性の有無によって細胞間接着に関与する分子や血管内皮増殖因子(VEGF)分泌パターン、細胞内シグナルの反応が異なることを確認している (Shirasawa M, Sonoda S et al, Exp Eye Res. 2013)。すなわち、従来までのARPE-19 を用いた実験で言われている、種々のサイトカイン刺激による反応はより生体に近い特徴を有する極性RPE では異なる可能性があり、これらの極性RPE を用いた研究によってより正確な網膜疾患の病態メカニズムを解析することを目的とする。

一方、ブタ極性RPE を利用する問題点は、RPE の細胞種の違いからくる、抗体・試薬の選択の制限やDNA マイクロアレイ等の実験を行えないといった点である。そこで、ライン化されたヒトRPE を使って極性細胞を作る事が不可欠であり、ヒト極性RPE の培養の確立をもう1 つの目的とする。

最後に、極性RPE の研究からこれまであまり注目されていなかったRPE 基底側の脈絡膜の働きの重要性についても注目している。臨床

ではOCT によって、脈絡膜観察が可能となりOCT の解析からも脈絡膜の網膜疾患の病態形成への関与が検討され始めている。我々も臨床的には、加齢黄斑変性(AMD)、中心性漿液性脈絡網膜症や糖尿病黄斑浮腫(DME)疾患における、脈絡膜の解析をすすめ、極性RPE モデルによる基礎研究からのアプローチをヒト臨床と融合的に研究を行う。

2. 研究の目的：RPEは眼内、特に網膜の恒常性を保つために重要な役割を担っている。網膜疾患の病態を解明すべく、RPE 培養細胞を用いた研究が盛んに行われているが、従来の培養法では、生体RPE がもつバリア機能、細胞間接着装置、物質輸送能を持たない細胞 (細胞極性を持たない細胞)を用いた実験が行われている。極性を持たない細胞を使った研究では生体の環境を厳密に反映しているとはいえない。我々ののは、ブタ細胞をtranswell™ 上に培養し、安定的に極性を持つRPE培養法を確立し実験を行っている。さらに極性をもつ細胞はある種のサイトカインに対する反応が異なることを見いだしている。RPE は生体内において血液網膜関門を形成しており、そのバリア機能の破綻が病態形成に関与していることが予想される。しかし、これまではブタ細胞では、研究試薬等の選択に制限があり、詳細なメカニズムの解明には至っていない。そこで本研究において、極性ヒトRPE の培養を確立し、より正確な病態解明につなげることを目的とする。対象疾患は、加齢黄斑変性(AMD)、中心性漿液性脈絡網膜症 (CSC) や糖尿病黄斑浮腫(DME)などである。

さらに、臨床的には上記疾患の硝子体サンプルを回収し、BioFlex を用いて網羅的なサイトカイン解析や網膜光干渉断層計 (OCT) で得られる画像を2 階調化する新たな網膜・脈絡膜画像解析を行い、基礎研究・臨床研究の結果を融合し、RPE からみた網膜疾患の病態制御のメカニズムの解析を進める。

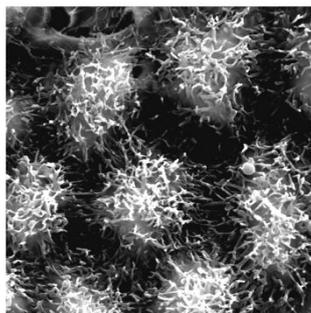
3. 研究の方法：生体RPE はバリア機能や各種増殖因子分泌などを行い網膜の恒常性を維持する機能を有しているが、その特性を*in vitro* でも示すヒト極性RPE の安定的な培養法を確立し実験をすすめる。極性RPEの培養に用いるtranswell™ は、培養チャンパーを2 つのコンパートメント(感覚網膜・脈絡膜側)に分割する。これは、生体の外血液網膜関門を再現してと言い換えることができるため、ヒト極性RPE を用いて、薬剤透過性モデル等の確立を目指す。また、TNF- $\alpha$  を初めとする各種刺激を加え、その際に変化する因子の網羅的解析をDNA マイクロアレイ法で行い、候補となる因子を特定し、網膜疾患における病態形成のメカニズムの解明につなげる。また、

培養課程でRPEは極性を獲得してくる事に注目し、極性の有無による各種刺激の反応性の違いにも注目し実験を行う。

並行して臨床研究を行い、疾患眼における、RPE および脈絡膜の観察から病態形成に関わる因子を、OCT 画像をイメージング処理による解析を行う。

4 . 研究成果：ヒトのライン化された、RPE 細胞を Transwell™ 上で培養することで、極性を持つ細胞の

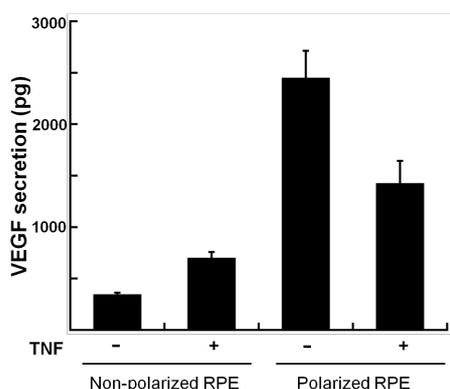
安定的な培養方法を確立した(右図)。この細胞を使用して、現在臨床で用いられる、抗 VEGF 抗体の薬剤透過性について検



討を行い、薬剤の違いによって、極性 RPE の透過性の違いを見いだした。

また、極性の有無による、TNF $\alpha$  刺激による反応の違いについても解析を行い。極性の有無によって、VEGF の分泌能や細胞内シグナルの動きが異なる事を見いだした(下図)。

さらに、画像解析においては特に脈絡膜に注目した検討が最も成果として得ることが出来た。OCT B-scan 画像を用いて、2 階調化の検討を行うと、疾患毎に動きが異なる事、特に CSC においては脈絡膜の構造が病態発生に大きく関与している事を見いだした。現在はさらに研究を進め、OCT en-face 画像を用いた解析を進めている。



#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 19 件)

1, Comparison of Choroidal Vascularity Markers on Optical Coherence Tomography Using Two-Image Binarization Techniques. Wei X, Sonoda S, Mishra C, Khandelwal N, Kim R, Sakamoto T, Agrawal R. Invest

Ophthalmol Vis Sci. 2018 Mar 1;59(3):1206-1211. 査読有

2, Relations Among Foveal Blood Flow, Retinal-Choroidal Structure, and Visual Function in Retinitis Pigmentosa. Murakami Y, Funatsu J, Nakatake S, Fujiwara K, Tachibana T, Koyanagi Y, Hisatomi T, Yoshida S, Sonoda S, Sakamoto T, Sonoda KH, Ikeda Y. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2018 Feb 1;59(2):1134-1143. 査読有

3, Benefits of aflibercept treatment for age-related macular degeneration patients with good best-corrected visual acuity at baseline. Minami S, Nagai N, Suzuki M, Kurihara T, Sonobe H, Kamoshita M, Uchida A, Shinoda H, Takagi H, Sonoda S, Sakamoto T, Tsubota K, Ozawa Y. 査読有  
Sci Rep. 2018 Jan 8;8(1):58.

4, Semi-automated software to measure luminal and stromal areas of choroid in optical coherence tomographic images. Sonoda S, Sakamoto T, Kakiuchi N, Shiihara H, Sakoguchi T, Tomita M, Yamashita T, Uchino E. Jpn J Ophthalmol. 2018 Mar;62(2):179-185. 査読有

5, Reproducibility and differences in area of foveal avascular zone measured by three different optical coherence tomographic angiography instruments. Shiihara H, Sakamoto T, Yamashita T, Kakiuchi N, Otsuka H, Terasaki H, Sonoda S. Sci Rep. 2017 Aug 29;7(1):9853. 査読有

6, One-Year Outcomes following Intravitreal Aflibercept for Polypoidal Choroidal Vasculopathy in Japanese Patients: The APOLLO Study. Oshima Y, Kimoto K, Yoshida N, Fujisawa K, Sonoda S, Kubota T, Murata T, Sakamoto T, Yoshida S, Sonoda KH, Ishibashi T. Ophthalmologica. 2017;238(3):163-171. 査読有

7, Effect of fluid-air exchange on reducing residual silicone oil after silicone oil removal. Shiihara H, Sakamoto T, Terasaki H, Yamashita T, Yoshihara N, Okamoto F, Ogata N, Yamashita T, Sonoda S, Mitamura Y. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2017 Sep;55(9):1697-1704. 査読有

8, CHOROIDAL STRUCTURE ALTERED BY DEGENERATION OF RETINA IN EYES WITH RETINITIS PIGMENTOSA. Kawano H, Sonoda S, Saito S, Terasaki H, Sakamoto T. Retina. 2017 Nov;37(11):2175-2182. 査読有

9, PERMEABILITY AND ANTI-VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR EFFECTS OF

- BEVACIZUMAB, RANIBIZUMAB, AND AFLIBERCEPT IN POLARIZED RETINAL PIGMENT EPITHELIAL LAYER IN VITRO. Yoshihara N, Terasaki H, Shirasawa M, Kawano H, Sonoda S, Yamaguchi M, Hashiguchi T, Hisatomi T, Ishibashi T, Sakamoto T. *Retina*. 2017 Jan;37(1):179-190. 査読有
- 10, Correction: Choroidal Structure in Children with Anisohypermetropic Amblyopia Determined by Binarization of Optical Coherence Tomographic Images. Nishi T, Ueda T, Mizusawa Y, Shinomiya K, Semba K, Mitamura Y, Sonoda S, Uchino E, Sakamoto T, Ogata N. 査読有
- 11, PLoS One. 2016 Dec 15;11(12):e0168826. Changes of choroidal structure after intravitreal aflibercept therapy for polypoidal choroidal vasculopathy. Daizumoto E, Mitamura Y, Sano H, Akaiwa K, Niki M, Yamanaka C, Kinoshita T, Egawa M, Sonoda S, Sakamoto T. *Br J Ophthalmol*. 2017 Jan;101(1):56-61. 査読有
- 12, Effects of Exercise on the Structure and Circulation of Choroid in Normal Eyes. Kinoshita T, Mori J, Okuda N, Imaizumi H, Iwasaki M, Shimizu M, Miyamoto H, Akaiwa K, Semba K, Sonoda S, Sakamoto T, Mitamura Y. *PLoS One*. 2016 Dec 14;11(12):e0168336. 査読有
- 13, Choroidal Structure in Children with Anisohypermetropic Amblyopia Determined by Binarization of Optical Coherence Tomographic Images. Nishi T, Ueda T, Mizusawa Y, Shinomiya K, Semba K, Mitamura Y, Sonoda S, Uchino E, Sakamoto T, Ogata N. *PLoS One*. 2016 Oct 13;11(10):e0164672. 査読有
- 14, Changes in Choroidal Structures in Eyes with Chronic Central Serous Chorioretinopathy after Half-Dose Photodynamic Therapy. Kinoshita T, Mitamura Y, Mori T, Akaiwa K, Semba K, Egawa M, Mori J, Sonoda S, Sakamoto T. *PLoS One*. 2016 Sep 16;11(9):e0163104. 査読有
- 15, Structural analyses of choroid after half-dose verteporfin photodynamic therapy for central serous chorioretinopathy. Izumi T, Koizumi H, Maruko I, Takahashi Y, Sonoda S, Sakamoto T, Iida T. *Br J Ophthalmol*. 2017 Apr;101(4):433-437. 査読有
- 16, Structural Changes of Inner and Outer Choroid in Central Serous Chorioretinopathy Determined by Optical Coherence Tomography. Sonoda S, Sakamoto T, Kuroiwa N, Arimura N, Kawano H, Yoshihara N, Yamashita T, Uchino E, Kinoshita T, Mitamura Y. *PLoS One*. 2016 Jun 15;11(6):e0157190. 査読有
- 17, Diurnal variations in luminal and stromal areas of choroid in normal eyes. Kinoshita T, Mitamura Y, Shinomiya K, Egawa M, Iwata A, Fujihara A, Ogushi Y, Semba K, Akaiwa K, Uchino E, Sonoda S, Sakamoto T. *Br J Ophthalmol*. 2017 Mar;101(3):360-364. 査読有
- 18, Changes of choroidal structure after corticosteroid treatment in eyes with Vogt-Koyanagi-Harada disease. Egawa M, Mitamura Y, Akaiwa K, Semba K, Kinoshita T, Uchino E, Sonoda S, Sakamoto T. *Br J Ophthalmol*. 2016 Dec;100(12):1646-1650. 査読有
- 19, Relative changes in luminal and stromal areas of choroid determined by binarization of EDI-OCT images in eyes with Vogt-Koyanagi-Harada disease after treatment. Kawano H, Sonoda S, Yamashita T, Maruko I, Iida T, Sakamoto T. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2016 Mar;254(3):421-6. 査読有
- 〔学会発表〕(計 15 件)  
園田祥三：講演「中心性漿液性脈絡網膜症・Vogt 小柳 原田病における脈絡膜変化」第 70 回日本臨床眼科学会 シンポジウム 12 脈絡膜から網膜疾患を考える (国立京都国際会館・京都市) 2016 年 11 月
- 他
- 〔図書〕(計 3 件)  
園田祥三：【特集 脈絡膜から考える網膜疾患】企画にあたって．臨床眼科 70 巻 13 号 Page1825(2016.12)
- 他
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 1 件)  
名称：画像処理装置、画像処理方法、診断システム及びプログラム  
発明者：園田祥三、坂本泰二  
権利者：鹿児島大学  
種類：公開特許公報(A)  
番号：特開 2017-74273(P2017-74273A)  
出願年月日：2015 年 10 月 16 日  
国内外の別：国際特許
- 取得状況 (計 0 件)
- 〔その他〕  
ホームページ等：該当無し

6 . 研究組織

(1)研究代表者

園田 祥三 (SONODA Shozo)  
鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師  
研究者番号：20325806

(2)研究分担者

大塚 寛樹 (OTSUKA Hiroki)  
鹿児島大学・附属病院・医員  
研究者番号：20611817