

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20294

研究課題名(和文) ARPE-19におけるuPA/uPAR制御性EMTの検討

研究課題名(英文) Investigation of uPA/uPAR induced EMT in ARPE-19

研究代表者

青松 圭一 (AOMATSU, Keiichi)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：60411633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：網膜組織においては網膜色素上皮がEMT研究の主要な細胞としてよく検討が行われ、知見が集積されてきている。しかしながらuPARなどの線溶系を介した網膜組織でのEMT誘導についてはこれまであまり報告がなく、uPAR強制発現細胞(ARPE-19)を作成して検討を行った。結果、uPAR単独の作用ではARPE-19細胞にEMT様変化は誘導できず、コラーゲンゲルの収縮能についてもゲル収縮促進作用はみられなかった。網膜でEMTは、uPAR発現亢進による単独刺激では誘導できず、TGF- β などの成長因子やインターロイキンなどのサイトカインの関与も、今後検討を加える必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In EMT (epithelial-mesenchymal transition) study, retinal pigment epithelial cells have been the main research subject and findings of EMT on retinal pigment epithelial cells have been accumulated. Contrarily, there are few reports, so far, on EMT induced by uPAR through the fibrinolytic system. Therefore, in this study, uPAR was stably introduced into human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19), and EMT induced by uPAR was investigated. In consequence, EMT-like changes could not be recognized in ARPE-19 by stably introduced uPAR alone, and collagen gel contraction could not be recognized, either. EMT could not be induced in the retina with a single stimulation of increased expression of uPAR. Involvement of growth factors like TGF- β and cytokines like interleukin should also be considered in the future study.

研究分野：眼科領域

キーワード：uPA uPAR ARPE-19 EMT

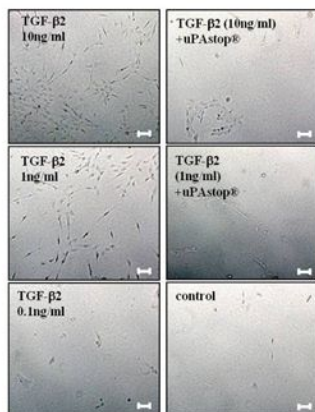
1. 研究開始当初の背景

増殖性硝子体網膜症 (PVR, proliferative vitreoretinopathy) は細胞増殖・細胞遊走・細胞接着・コラーゲン産生、収縮の過程を経る異常な創傷治癒反応である。網膜剥離、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症などさまざまな原因により PVR が惹起され、最終的に網膜組織の線維化を起こし失明に至る重篤な病態である。PVR に対する治療は現在のところ硝子体手術により増殖組織を取り除き、網膜を復位させるしかなく、仮に復位したとしても視力低下や視野異常など視機能障害が残存することも多く、十分に治療できないことが問題となっている。

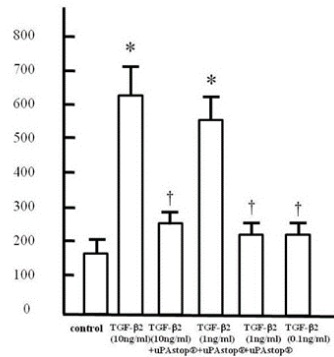
epithelial mesenchymal transition (EMT) は上皮系細胞が間葉系細胞に形質変化する現象をいう。裂孔原性網膜剥離が生じると硝子体が網膜下に侵入すると同時に、血液網膜関門が破綻し血漿成分も網膜下に浸出する。網膜下液には多数のサイトカインや化学走化性物質が含まれる。裂孔原性網膜剥離の長期化や冷凍凝固などの侵襲により、網膜色素上皮 (RPE, retinal pigment epithelium) は Bluch 膜から剥離して眼内へ遊走を開始する。増殖膜形成の主要な細胞は筋線維芽細胞であると考えられており、RPE は筋線維芽細胞に変化する細胞のひとつであると考えられている。RPE は、細胞間接着を失うことで細胞極性を失い、EMT により遊走可能な状態になる。EMT を起こした RPE は炎症細胞とともに硝子体中へと散布され、眼内での増殖性組織の形成を促進する。したがって RPE の EMT は PVR の病態に深く関与していると考えられる。

我々は以前、TGF-β₂ により EMT を起こした ARPE-19 細胞が、uPA/uPAR の発現を亢進させ、細胞性線溶を亢進させることにより 3 次元コラーゲンゲル内への遊走を促進することを報告した。

A



B



眼においては、u-PA は涙液中に存在しており、角膜上皮からも種々の刺激で大量に産生される。u-PA はマルチドメインセリンプロテアーゼであり、N 末端から成長因子(EGF)様ドメイン(アミノ酸 4-43)、クリングル(アミノ酸 47-135)、触媒的プロテアーゼ鎖(アミノ酸 144-411)を有する。u-PAR は u-PA をリガンドとする GPI(glycosylphosphatidylinositol) アンカー蛋白で細胞表面につなぎとめられた特異的な細胞表面レセプターであり、uPA と高い親和性で結合する。Appella らが 1987 年に、レセプター結合活性が EGF 様ドメインに局在すること、とくに 12-32 アミノ残基が結合に重要であることを報告している。uPAR は uPA の基質分解作用を促進させる働きの他に細胞内シグナル伝達に関与し、インテグリンの発現、ビトロネクチンの発現の増強、線維化の促進等、蛋白分解作用以外の働きに関与していることが報告されている。

2. 研究の目的

PVR に対する治療については過去長年にわたり蛋白分解酵素の阻害薬に関する研究が行われてきたがどれも臨床応用に至っていない。上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究は uPAR 誘導性の網膜色素上皮における EMT の役割について、uPAR 遺伝子改変網膜色素上皮細胞を用いた基礎実験により解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 網膜の細胞である ARPE-19 細胞株を親株として uPAR 強制発現細胞株を樹立した。方法の概要は次の通りである。PCR にて uPAR タンパクの cDNA をクローニングした。プラスミドとして pEB multi (Wako) を使用し、このプラスミドベクターに uPAR 遺伝子を乗せた (pEB-uPAR)、control として uPAR 遺伝子を乗せていないプラスミドベクターも用意した (pEB-empty)。pEB-uPAR/pEB-empty をそれぞれ培養 ARPE19 細胞に導入した。

(2) 作成した細胞株において、ウェスタンブロット法で uPAR 発現を確認した。方法の概要は次の通りである。pEB empty, pEB-uPAR

を保持する ARPE をハイグロマイシン B 入りの培地 (OPTI-MEM, serum 無し) でそれぞれ 72 時間培養後、lysate, medium を回収し、5-20% gradient gel で電気泳動後、各抗体で western blot を行い、uPAR 発現を確認した。

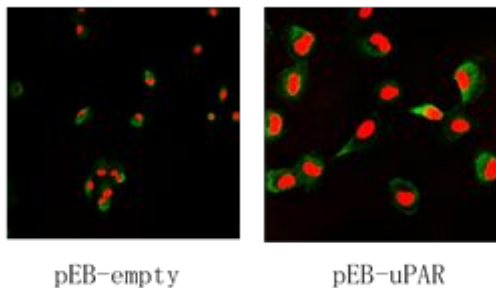
(3) Realtime-PCR 法を用いて EMT 関連マーカー (E-cadherin, N-cadherin, α -SMA) の mRNA 発現変化を、作成した細胞 (pEB-uPAR/pEB-empty) で検討した。mRNA の抽出や realtime-PCR については、実験試薬添付のプロトコールに従って行った。

(4) 3次元培養により ARPE-19 細胞の uPAR 刺激性コラーゲンゲル収縮能を測定した。検討には CELL BIOLABS 社の Cell Contraction Assay キットを用いた。実験は添付の実験プロトコールに従って行った。

(5) アタッチメントアッセイにより ARPE-19 細胞の uPAR 依存性細胞接着能の変化を検討した。条件は作成した細胞を 96well プレートに各 well あたり 1000 個まき、30 分後と 2 時間後における残存接着細胞について検討した。測定には接着している生細胞に MTT 試薬を反応させ、吸光度を計測することにより行った。

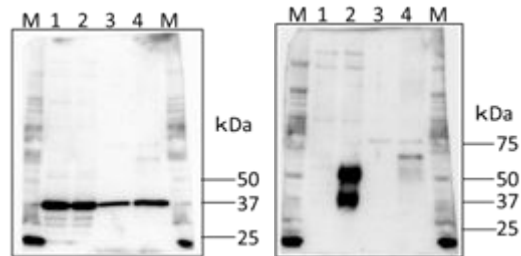
4. 研究成果

(1) uPAR 強制発現 ARPE-19 細胞を樹立作成した細胞の蛍光顕微鏡写真を以下に示す。細胞は玉石状であったが、両細胞間で形態の差異はみられなかった。



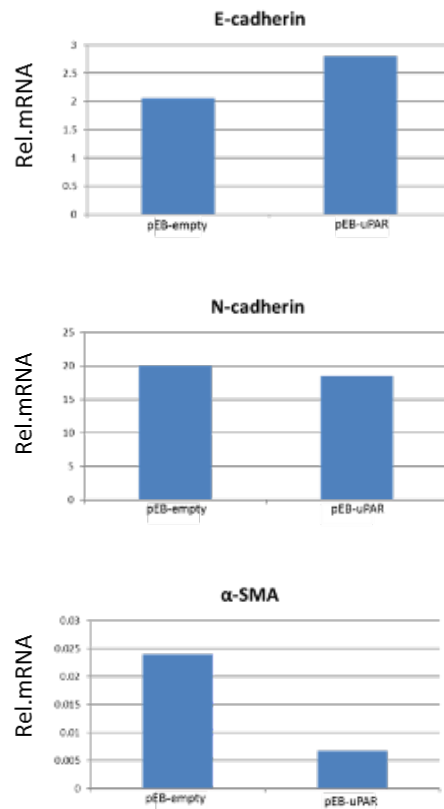
(2) 作成した細胞株で western blot 法による uPAR 発現の確認

western blot の結果を示す。左は抗 GAPDH 抗体で、右は抗 uPAR 抗体でのプロットング結果である。lane1 から、ARPE19 で uPAR を恒常的に発現させると lysate 中に uPAR が著明に発現していることが確認できた。lane4 では、培養上清中にも uPAR が存在していることを示していた。



M, standard marker
1, pEB-empty lysate
2, pEB-uPAR lysate
3, pEB-empty medium
4, pEB-uPAR medium

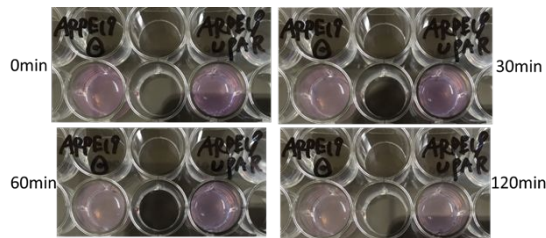
(3) uPAR 強制発現 ARPE-19 細胞における EMT 関連マーカーの mRNA 発現変化
Realtime-PCR での EMT 関連マーカーの発現変化の結果を示す。



結果、uPAR 強制発現 ARPE-19 細胞では、E-cadherin の発現は減少し、N-cadherin の発現は上昇、間葉系マーカーである α -SMA の発現は抑制されていた。このようにカドヘリンスイッチを確認できず、mRNA レベルでは EMT 誘導を確認できなかった。

(4) uPAR 強制発現 ARPE-19 細胞の uPAR 刺激性コラーゲンゲル収縮能
Collagen-Based Cell Contraction Assay Kit を用いて、uPAR 強制発現株のコラーゲンゲル

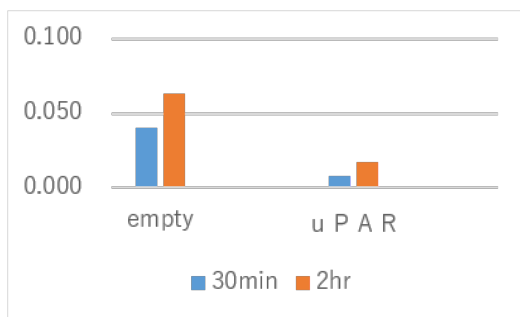
収縮能を検討した。ウェルの壁面からコラーゲンゲルを引き離して 0、30、60、120 分後のゲル収縮能を検討した。



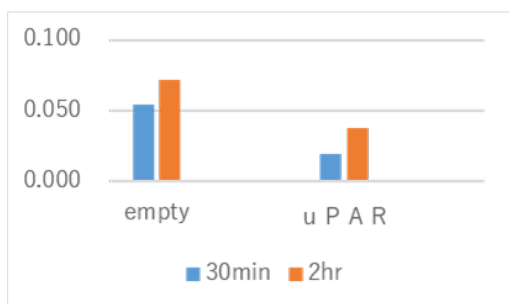
いずれの時間においてもコントロールと uPAR 強制発現細胞において、明らかなコラーゲンゲル収縮能促進を確認できなかった。

(5) uPAR 強制発現 ARPE-19 細胞の uPAR 刺激性細胞接着能の検討

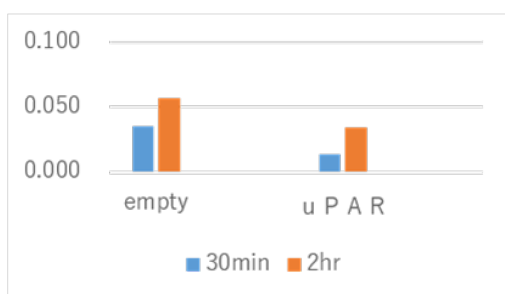
ARPE-19 のコントロール細胞と uPAR 強制発現細胞にて、アタッチメントアッセイを行った。細胞はコーティングなしのプラスチック上と、fibronectin および vitronectin 上に播種し、細胞接着の変化について検討を行った。結果のグラフを示す。縦軸は吸光度を表す。



non-coat plastic



fibronectin



vitronectin

このように uPAR 強制発現細胞ではコントロールに比べ plastic、fibronectin、vitronectin 上のいずれの場合においても細胞接着能は低下していた。

これらのことから ARPE-19 細胞において uPAR の発現亢進のみでは EMT 誘導を確認できなかった。網膜組織での EMT 誘導による細胞表現型の変化は、我々および他の施設から報告様々があり、uPA/uPAR などの線溶系そのものと EMT との関与についても癌細胞などで研究が行われている。今回は uPAR 強制発現細胞の表現型について in vitro での検討を行ったにとどまったが、今後の展望としては EMT 誘導における重要因子である TGF- β などの成長因子の刺激を追加したり、インターロイキンなどのサイトカインの関与についても、検討を加える必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青松 圭一 (AOMATSU, Keiichi)
近畿大学・医学部・医学部講師
研究者番号：60411633

(2) 研究協力者

杉岡 孝二 (SUGIOKA, Koji)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：50399119

吉田 浩二 (YOSHIDA, Koji)
近畿大学・生物理工学部・教授
研究者番号：60230736