

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11450

研究課題名（和文）アクアポリンを標的とした黄斑浮腫の新規治療戦略

研究課題名（英文）A Novel Therapeutic Strategy for Macular Edema Targeting Aquaporins.

研究代表者

白神 史雄 (Shiraga, Fumio)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50187530

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）：黄斑浮腫は糖尿病網膜症、網膜静脈閉塞症、加齢黄斑変性、黄斑上膜に共通してみられる病態であり、過剰な水や浸透圧の変化は、黄斑を構成する細胞を障害し視力が低下する。本研究では、黄斑の水輸送を担う網膜色素上皮細胞と細胞における水輸送蛋白であるアクアポリンに着目し、黄斑疾患における細胞への様々なストレスが網膜色素上皮細胞のアクアポリンの発現に及ぼす影響を検討した。その結果、細胞に対する伸展ストレスによってアクアポリン1の発現が有意に減少することが明らかになった。一方でその他のアクアポリンの発現に有意な変化はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、現在治療が困難な黄斑浮腫の病態を明らかにする結果であるといえる。黄斑浮腫は生活習慣病や加齢に伴って発症するため、高齢者の視力障害の原因として今後さらに重大な問題となることが予想される。今後さらなる研究を行い、黄斑浮腫の新たな治療法の基盤が明らかにされれば、より効果の高い治療が可能となることが予想され、社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Macular edema is a common condition in diabetic retinopathy, retinal vein occlusion, age-related macular degeneration, and macular epiretinal membranes. Excessive changes in water and osmolality impair the cells that make up the macula, resulting in decreased vision. In this study, we focused on retinal pigment epithelial cells, which are responsible for water transport in the macula, and aquaporins, which are water transport proteins in cells, and investigated the effects of various stresses on cells in macular diseases on the expression of aquaporins in retinal pigment epithelial cells. The results showed that the expression of aquaporin-1 was significantly decreased by extension stress on the cells. On the other hand, there were no significant changes in the expression of other aquaporins.

研究分野：眼科学

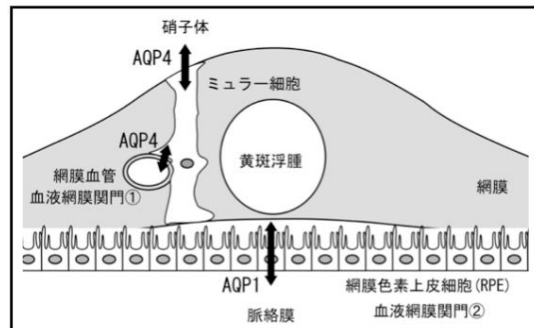
キーワード：黄斑浮腫

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

黄斑浮腫は糖尿病網膜症、網膜静脈閉塞症、加齢黄斑変性、黄斑上膜に共通してみられる病態であり、過剰な水や浸透圧の変化は、黄斑を構成する細胞を障害し視力が低下する。黄斑における細胞間質液量の恒常性は、網膜血管の血管内皮細胞と網膜色素上皮細胞に存在する血液網膜関門によって保たれることがわかっている。しかし、虚血や炎症、機械的ストレス等によってこの関門が障害されると、網膜や脈絡膜の血管から黄斑へと水が流入する。黄斑の水の排出は主に、網膜色素上皮細胞とミュラー細胞を介して行われるので、これらの細胞の排出能を超える水は黄斑に貯留する。

一般に、細胞膜は脂質二重層であるため水の透過性が極めて低い。そのため、網膜色素上皮細胞とミュラー細胞において、水の排出を司っているのは、水分子を選択的に輸送する唯一の膜タンパクであるアクアポリンである。ヒトでは 13 種類のサブタイプが同定されている。黄斑では網膜色素上皮細胞にアクアポリン 1、ミュラー細胞にアクアポリン 4 が主に存在し、網膜血管や脈絡膜、硝子体腔との間で水を輸送する。しかし、これらのサブタイプ以外のアクアポリンの黄斑における機能については不明である。また、黄斑浮腫を引き起こす様々な病態において、アクアポリンの発現や機能がどのように変化するかについても明らかにされていない。



現在の黄斑浮腫の治療は、いずれも網膜血管の透過性亢進を阻害することを目的とした治療である。黄斑浮腫の病態に虚血や炎症が関与する場合は抗血管内皮細胞増殖因子(VEGF)薬やステロイドの投与と網膜光凝固を組み合わせる治療を行う。網膜への機械的ストレスが関与する場合には手術によってストレスを解除する。しかし、黄斑浮腫をこれらの治療法によって改善することは困難で、治療に反応しない症例や、再発を繰り返す症例が多数存在する。そのため、既存の治療法は黄斑浮腫に対する治療法として不十分であるといえる。

### 2. 研究の目的

この目的は、虚血や炎症、機械的ストレスが、網膜血管の透過性を亢進するだけでなく、黄斑における水量調節機構であるアクアポリンの発現や機能を障害するのではないかとという着想に基づくものであり、本研究では、アクアポリンの発現や機能を調節すれば、水の流入と排出のバランスが改善し、黄斑浮腫を軽減できるのではないかとこの仮説を検証する。

具体的な目的を以下に記す。

- 1) 網膜色素上皮細胞におけるアクアポリンの発現サブタイプを明らかにする。
- 2) 黄斑浮腫の原因となる細胞障害性ストレスを *in vitro* 系で再現し、網膜色素上皮細胞におけるアクアポリンの発現及び水排出機能の変化を明らかにする。
- 3) 網膜色素上皮細胞におけるアクアポリンの発現や活性を調節し、細胞障害性ストレス下における各細胞の水排出機能に及ぼす影響を *in vivo*, *in vitro* の両面から明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 網膜色素上皮細胞におけるアクアポリンの発現サブタイプを PCR 法、western blotting 法などで明らかにする。

ヒトアクアポリンには 13 種のサブタイプが存在するが、網膜色素上皮細胞におけるアクアポリンの発現サブタイプの詳細はよくわかっていない。そこで、ヒト細胞株 ARPE-19、ヒト初代培養網膜色素上皮細胞、ヒト iPS 由来網膜色素上皮細胞を用いて PCR 法、western blotting 法により発現サブタイプを解析する。この結果をもとに次項目以降の実験において検討すべきサブタイプの候補を絞る。

(2) 黄斑浮腫の原因となる細胞障害性ストレスを *in vitro* で網膜色素上皮細胞に負荷し、アクアポリンの発現及び水排出機能の変化を明らかにする。黄斑浮腫を引き起こす眼疾患(糖尿病網膜症、網膜静脈閉塞症、加齢黄斑変性、黄斑上膜)では以下のような細胞障害性ストレスが生じる。そこで各ストレスを網膜色素上皮細胞に負荷し、アクアポリン発現及び水排出機能に及ぼす影響を検討する。

**高血糖・高浸透圧ストレス:** 糖尿病において高血糖が細胞障害の原因となることが明らかにされている。また、黄斑浮腫では、血管から漏出した水とともにタンパク質や脂質が黄斑に貯留し、組織浸透圧が高くなる。そこで高血糖・高浸透圧に調整した培地を用いて細胞を培養する。

**低酸素ストレス:** 糖尿病網膜症や網膜静脈閉塞症では網膜循環が障害され、黄斑が低酸素状態に陥る。そこで培養機内の酸素濃度を 1-10% に設定し培養を行う。また、CoCl<sub>2</sub> を用いた低酸素培養を行う。

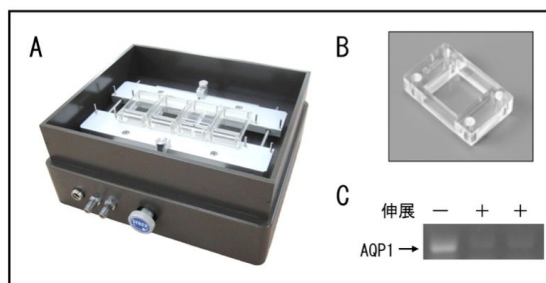
**機械的伸展ストレス:** 黄斑上膜や重症の糖尿病網膜症では網膜上に膜が形成される。そして膜が収縮して黄斑を牽引し、網膜色素上皮細胞を障害し黄斑浮腫を来す。そこで培養細胞伸展システム(STREX 社)を用いて細胞を機械的に伸展する。

上記の各ストレスを負荷した上で、アクアポリンの発現サブタイプを PCR 法、western blotting

法により解析する。

(3) 網膜色素上皮細胞におけるアクアポリンの発現や活性を調節し、細胞障害性ストレス下における各細胞の水排出機能に及ぼす影響を Transwell 法で検討する。

Transwell 法：transwell に細胞を培養し、transwell の上下に浸透圧の異なる培地を入れる。一定時間に片側の well から他方の well に移動した水の体積を測定する。



#### 4. 研究成果

(1) 現在入手できる抗体を用いて、ARPE-19, ヒト初代培養網膜色素上皮細胞, ヒト iPS 由来網膜色素上皮細胞におけるアクアポリンの発現を調べたところ、いずれもアクアポリン 1, 3, 4, 5, 8 の発現を認めた。しかし、アクアポリン 8 の発現はわずかであり、今後の検討はアクアポリン 1, 3, 4, 5 について行うこととした。

(2) 高血糖・高浸透圧ストレス

ヒト iPS 由来網膜色素上皮細胞に対して、NaCl, スクロース、マンニトールを用いて

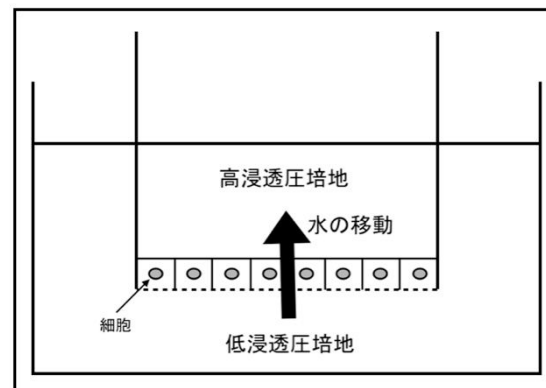
420mOsm の浸透負荷をかけた。また、培養液を希釈し低浸透圧負荷 (160mOSM) をかけた。その結果、スクロースおよびマンニトールによる高浸透圧下でアクアポリン 1 が増加した。低浸透圧下ではアクアポリンの発現がいずれも減少する傾向にあった。

低酸素ストレス

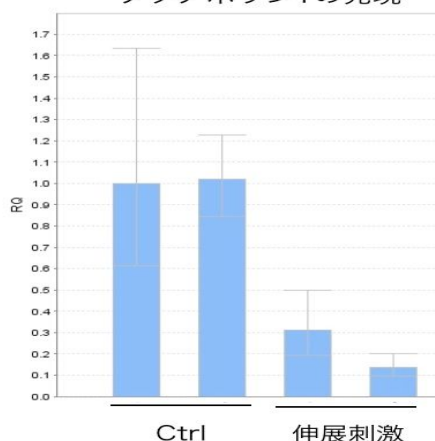
培養器内の酸素濃度を下げた検討では、いずれの細胞においてもアクアポリンの発現量に変化はみられなかった。一方で、CoCl<sub>2</sub> を用いた検討では、ヒト細胞株 ARPE-19 とヒト初代培養網膜色素上皮細胞ではアクアポリン 1 の発現が増加した。しかし、ヒト iPS 由来網膜色素上皮細胞ではアクアポリン 1 の発現が減少した。

機械的伸展ストレス

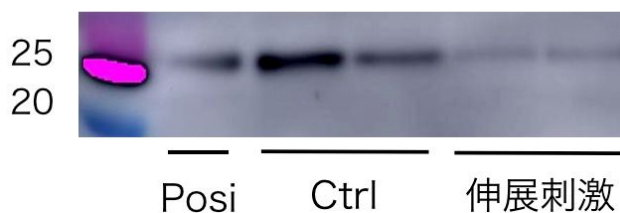
機械的伸展ストレスとしては、水平方向への 20% の伸展率で静的な伸展、同じ伸展率で周期的な伸展、下方から上方への垂直方向の静的伸展の三種類を用いた。その結果、アクアポリン 1 の発現が mRNA レベルでも蛋白レベルでも有意に低下した。一方でアクアポリン 3, 4, 5 については有意な変化はみられなかった。



アクアポリン1の発現



アクアポリン1の発現



(3) Transwell 法を用いて、対照となる網膜色素上皮細胞の水輸送能を測定した結果、浸透圧依存性に水の輸送量が増加した (30 - 60  $\mu\text{l/hr/cm}^2$ )。伸展ストレスを加えた網膜色素上皮細胞を用いて同様の検討を行ったが、対照群と比べて水輸送量に有意な変化はみられなかった。

三種類の網膜色素上皮細胞を用いた本研究の結果から、数あるアクアポリンの中でもアクアポリン 1 が網膜色素上皮細胞の水輸送の中心的な役割を果たしていることが示唆された。この結果は、既報と同様の結果であった。なお、今回の結果は、ヒト細胞株 ARPE-19, ヒト初代培養網膜色素上皮細胞, ヒト iPS 由来網膜色素上皮細胞の三種類の細胞で共通して得られたことから、確度の高い結果であるといえる。高血糖・高浸透圧ストレス、低酸素ストレス、機械的伸展ストレスのうち、網膜色素上皮細胞におけるアクアポリンの発現に最も大きな影響を及ぼしたストレスは、機械的伸展ストレスであった。この結果は、硝子体や黄斑上膜による黄斑牽引が関与している場合に黄斑浮腫が難治である臨床所見と一致する結果であると言える。本研究ではアクアポリンの発現の変化が細胞の水輸送能に及ぼす影響を確認することができなかつ

た。Transwell 法の課題として、ストレスを加えた細胞を実験に使用する際に、細胞間のタイトジャンクションが形成される期間を待たなくてはならず、タイムラグが生じるため、ストレスによるアクアポリンの発現が変化してしまう可能性がある点が挙げられる。今後、実験方法の改良や、Transwell 法に代わる検討方法を用いるなどの対策が必要である。なお、本研究では、アクアポリンの発現や機能を分子生物学的に調節して検討することができなかった。細胞実験で得られた結果を、アクアポリンの過剰発現や siRNA、ドミナントネガティブ変異体を用いて検証する必要がある。

黄斑浮腫の主要な原因疾患である糖尿病網膜症は、現在本邦で約 140 万人が罹患しており、その内約 30%が黄斑浮腫を来している。また、その他の原因疾患も加齢や生活習慣病を背景に発症するため、黄斑浮腫は高齢者の視力障害の原因として今後さらに重大な問題となることが予想される。今後さらなる研究を行い、黄斑浮腫の新たな治療法の基盤が明らかにされれば、より効果の高い治療が可能となることが予想され、社会的意義は極めて大きい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	且原 真木  (Katsuhara Maki)  (00211847)	岡山大学・資源植物科学研究所・教授    (15301)	
研究分担者	森實 祐基  (Morizane Yuki)  (50432646)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授    (15301)	