

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18844

研究課題名(和文) 網膜に対するメカニカルストレスの分子生物学的機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular biological mechanism of mechanical stress on the retina

研究代表者

塩出 雄亮 (Shiode, Yusuke)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：20711097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素上皮細胞(iPS-RPE)とミュラー細胞(MIO-M1)を用いて、細胞を伸展する刺激を行った。

iPS-RPEでは、特定の伸展刺激により、神経細胞に重要な働きを有するAQP-1の発現減少を認めた。MIO-M1では、細胞伸展と特定のサイトカイン(TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ )による共刺激により、細胞が重なる像(pile up)が認められ、網膜に繊維増殖膜を形成する疾患との関連性が示唆された。また特定の条件での伸展刺激により転写因子の一つであるc-Fosの発現亢進が認められた。この結果は伸展刺激により生じる細胞内のシグナル伝達、活性化される転写因子の解明に寄与するものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

黄斑上膜や増殖硝子体網膜症など、網膜の疾患には網膜が牽引される疾患が多く、メカニカルストレスが病態に関与している。網膜色素上皮細胞、ミュラー細胞への伸展刺激が、細胞形態にどのような変化、発現因子の変化を生じるかを解明していくことは、網膜硝子体疾患の病態解明と新たな治療研究の発展に応用できるものと考えられる。今後は動物実験モデルにおける検討など、引き続き研究を継続することが必要である。

研究成果の概要(英文)：Cell extension stimulation was performed using retinal pigment epithelial cells (iPS-RPE) and Muller cells (MIO-M1).

In iPS-RPE, the expression of AQP-1, which has an important function on nerve cells, was decreased by a specific extension stimulus.

In MIO-M1, cell extension and co-stimulation with cytokines (TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) showed cell pile up, suggesting a relationship with a disease that forms a fibrous proliferative membrane in the retina.

In addition, upregulation of c-Fos, one of the transcription factors, was observed by stimulation of extension under specific conditions. These results are considered to contribute to the elucidation of the transcription factors that are activated and signal transduction generated in Muller cells by the stimulation of extension.

研究分野：網膜

キーワード：網膜 ミュラー細胞 細胞伸展刺激 メカニカルストレス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

黄斑上膜、網膜色素上皮剥離、硝子体黄斑牽引症候群、増殖性硝子体網膜症等の網膜疾患は、網膜に牽引を生じる疾患であり、その病態にはメカニカルストレスの関与は少なくないと考えられる。網膜のメカニカルストレスに対する分子生物学的な機構は十分に解明されていない。網膜を構成する細胞のうち、網膜色素上皮細胞とミュラー細胞は網膜への傷害に反応し、各種増殖因子やサイトカインを発現することが知られている。網膜色素上皮細胞は神経網膜の最外層に存在する単層の立方上皮細胞である。視細胞の生存と維持に重要な役割を果たすだけでなく、神経網膜と色素上皮層との接着力を形成し、網膜の支持にも大きく関与している。ミュラー細胞は網膜の主要なグリア細胞であり、細胞質の突起は内境界膜から外境界膜までに及び、網膜の支柱をなすような形で存在する。そのため、網膜構造の微小な変化を感じ取ることが可能であると考えられている。これらの細胞に対するメカニカルストレスを検討することにより、網膜疾患の病態解明、新たな治療法の開発に結びつく可能性があると考えた。

### 2. 研究の目的

網膜の細胞のうち、網膜色素上皮細胞とミュラー細胞に着目し、メカニカルストレス下での細胞形態の変化、発現されるタンパク質、遺伝子発現の変化について検討する。メカニカルストレスが関与する多くの網膜疾患を分子生物学的に明らかにし、網膜疾患に対する新たな治療法開発の基盤となる研究を行う。

### 3. 研究の方法

#### 1) 網膜細胞へのメカニカルストレスが各種因子の発現に及ぼす影響の解明

細胞 (MIO-M1、iPS-RPE) の培養

細胞伸展刺激：細胞を型コラーゲンでコーティングしたシリコン膜チャンバーに播種する。細胞が増殖した後、STREX社の培養細胞伸展装置を使用し、伸展刺激を行う。

細胞刺激の種類(伸張、圧迫、ずり応力など)や伸展強度、伸展方法(周期的伸展あるいは静的伸展)、刺激持続時間、ストレスをかける機器を変更し、各網膜疾患における機械的伸展を再現できる刺激の方法を確立する。刺激を行った細胞は直接光学顕微鏡で確認し、さらに細胞骨格であるアクチン配列をファロイジン染色により免疫組織学的に評価する。

一定時間の伸展刺激後に細胞から発現される因子の変動を評価する。候補因子としては、血管内皮増殖因子(VEGF)、線維芽細胞増殖因子(bFGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )、インターロイキン(IL-1, IL-6, IL-8)、コロニー刺激因子(G-CSF, GM-CSF)、マトロプロテアーゼ(MMP-2, MMP-9)、接着因子(integrin, occluding, ZO-1)を予定している。方法は、遺伝子レベルでRNAを単離し上記因子の遺伝子発現の変動をマイクロアレイにより網羅的に検索しrealtime PCRで確認する。Western blot、ELISA、免疫細胞染色によりタンパク質レベルでの発現変動も確認する。

#### 2) 発現亢進した因子のメカノトランスダクションの解明

機械的刺激を知覚することをメカノセンシングといい、生化学的、遺伝的反応へと変換する過程をメカノトランスダクションという。これまでのところミュラー細胞、RPE細胞におけるメカノセンシング、メカノトランスダクションの詳細は解明されていない。

メカノトランスダクションの解明

##### 1) で亢進が認められた因子に関するシグナル伝達経路を同定する。

代表的なメカノトランスダクションである、MAPK signaling pathway、ErbB signaling pathway、Jak-STAT signaling pathway、Wnt signaling pathway、YAP signaling pathwayなどを候補としている。Western-blot、ELISAにより、活性化が生じる代謝産物を同定し、伝達経路を解明していく。更に、シグナル伝達経路を阻害する薬剤を用いることにより、において発現が確認された因子、サイトカインの発現が抑制されることを確認する。

メカノセンシングの解明

で推測した経路の上流分子(低分子Gタンパク質等)を同定することにより、メカノセンシングを同定していく。一般的には、物理的刺激によるイオンチャンネルの開閉、酵素活性の制御、タンパク質との結合などが知られている。

#### 3) モデル動物眼に対する実験

ラット眼を用いて、網膜への強い牽引により網膜剥離に至る増殖硝子体網膜症(PVR)のモデルを作成する。培養実験でみられた細胞の形態、因子の発現が生体モデル眼においても同様に見えるかどうかを組織学的に確認する。

### 4. 研究成果

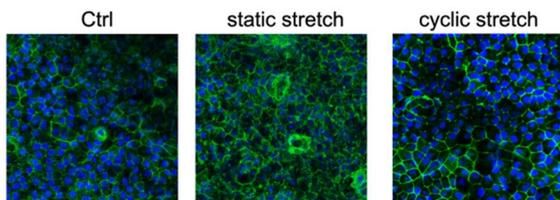
#### 1) 網膜色素上皮細胞に対するメカニカルストレス

iPS-RPEを用いて培養を行い、安定して使用することが可能となった。メニコン製のストレッ

チチャンバーを用いて、通常細胞伸展刺激を行うこととした。細胞形態の変化を観察したところ、細胞の形態変化は明らかなものではなかった(図1)。

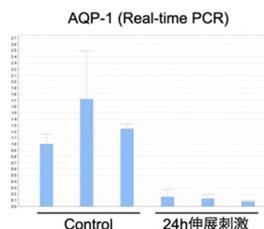
特定の伸展刺激により Western blot にて AQP-1 の発現減少を認めた。Real-time PCR にて AQP1 の遺伝子レベルでの発現減少も確認できた(図2)。近年、神経変性疾患における AQP-1 の発現変化とその病態意義について様々な検討が進められている。網膜領域における AQP-1 の解明は、重要な知見が得られるものと期待していた。しかし、iPS-RPE の培養が困難であること、また細胞接着が強固なため細胞採取、mRNA の回収が困難であることから、検討を一旦中断している。他の細胞 (pRPE など) を用いて実験継続中である。

<図1：伸展刺激を行ったiPS-RPE>



iPS-RPEに伸展刺激を行ったところ、細胞形態の変化は明らかではなかった。

<図2：伸展刺激によるAQP-1の変化>



24時間の細胞伸展刺激によりAQP-1の遺伝子発現が減少した。

## 2) ミュラー細胞に対するメカニカルストレス

### メカニカルストレスによる細胞形態変化

ミュラー細胞株 MIO-M0 を用いた。1)と同様、メニコン製のストレッチチャンバーを用いて、ストレッチの方法(動的/静的、伸展量、刺激時間、コーティングの有無、最適な細胞播種濃度)を検討した。また各種刺激方法による細胞形態および細胞接着の変化について比較した。その結果、20%動的細胞伸展と特定のサイトカイン (TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等) による共刺激により、細胞の pile up が認められた(図3)。これは細胞の上皮間葉転換を示す所見と考えられた。

MIO-M1 において最大の pile up が生じる刺激方法を検討し、pile up が生じた細胞のタンパクを回収した。これまでのところ、細胞の線維化に関与することが知られている fibronectin、 $\alpha$ -SMA、Cyclophilin B の発現については、明確な差異は認められなかった。

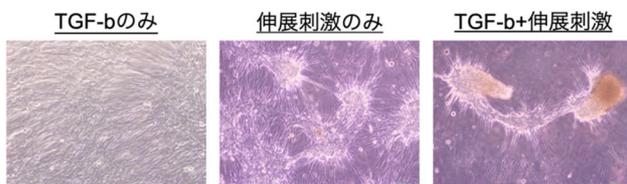
網膜疾患である黄斑上膜や増殖硝子体網膜症は、網膜に繊維増殖膜が生じた状態であり、その形成に網膜細胞の上皮間葉転換が関与することが知られている。繊維増殖膜を生じる網膜疾患の解明のため、pile up にどのようなシグナル経路と転写因子が活性化するかを検討していく方向である。

### メカニカルストレスにより発現亢進する因子

MIO-M1 に特定のストレッチ方法を行うことで、c-Fos の発現が遺伝子レベルで亢進した。これまでの報告(Lindqvist et al. 2010 IOVS)では、伸展刺激を負荷したラット網膜でミュラー細胞の p-ERK 亢進が発現することが報告されている。pERK が誘導された後に c-Fos が誘導されることが知られている。MIO-M1 においても伸展後 30 分および 60 分において pERK が亢進することが Western blot にて確認され、本モデルがミュラー細胞の伸展刺激モデルとして妥当であることを裏付ける結果であった。

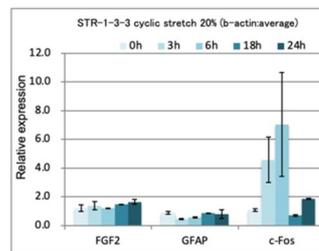
今後、c-Fos および p-ERK を介した網膜細胞の転写制御機構について検討を行う方向である。

<図3：伸展刺激+TGF- $\beta$ の共刺激を行ったMIO-M1>



TGF- $\beta$ と20%動的刺激の共刺激により、細胞のpile upが認められた。

<図4：伸展刺激を行ったMIO-M1からの各種因子の発現>



動的伸展刺激により、c-Fosの発現亢進が認められた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Noda Hiroshi, Kimura Shuhei, Hosokawa Mio, Morizane, Shiode Yusuke, Doi Shinichiro, Takahashi Kosuke, Matoba Ryo, Kanzaki Yuki, Fujiwara Atsushi, Morizane Yuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Effect of rhegmatogenous retinal detachment on preoperative and postoperative retinal sensitivities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-78693-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hirano Masayuki, Morizane Yuki, Kanzaki Yuki, Kimura Shuhei, Hosokawa Mio, Shiode Yusuke, Doi Shinichiro, Toshima Shinji, Takahashi Kosuke, Hosogi Mika, Fujiwara Atsushi, Takasu Ippei, Shiraga Fumio	4. 巻 40
2. 論文標題 EN FACE IMAGE-BASED ANALYSIS OF RETINAL TRACTION CAUSED BY EPIRETINAL MEMBRANE AND ITS RELATIONSHIP WITH VISUAL FUNCTIONS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Retina	6. 最初と最後の頁 1262 ~ 1271
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/IAE.0000000000002569	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kanzaki Sayumi, Kanzaki Yuki, Doi Shinichiro, Matoba Ryo, Kimura Shuhei, Hosokawa Mio, Shiode Yusuke, Takahashi Kosuke, Fujiwara Atsushi, Takasu Ippei, Morizane Yuki	4. 巻 -
2. 論文標題 En Face Image-Based Analysis of Epiretinal Membrane Formation after Surgery for Idiopathic Epiretinal Membrane	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ophthalmology Retina	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.oret.2020.10.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Doi Shinichiro, Kimura Shuhei, Morizane Yuki, Hosokawa Mio M., Shiode Yusuke, Hirano Masayuki, Toshima Shinji, Takahashi Kosuke, Hosogi Mika, Fujiwara Atsushi, Okanouchi Toshio, Inoue Yasushi, Shiraga Fumio	4. 巻 40
2. 論文標題 ADVERSE EFFECT OF MACULAR INTRARETINAL HEMORRHAGE ON THE PROGNOSIS OF SUBMACULAR HEMORRHAGE DUE TO RETINAL ARTERIAL MACROANEURYSM RUPTURE	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Retina	6. 最初と最後の頁 989 ~ 997
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/IAE.0000000000002460	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Kosuke, Kimura Shuhei, Hosokawa Mio Morizane, Shiode Yusuke, Doi Shinichiro, Matoba Ryo, Kanzaki Yuki, Yonekawa Yoshihiro, Morizane Yuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Release and extraction of retained subfoveal perfluorocarbon liquid facilitated by subretinal BSS, vibration, and gravity: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12886-020-01698-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Liu Mengxuan, Fujiwara Atsushi, Morizane Yuki, Kawasaki Ryo, Kimura Shuhei, Morizane-Hosokawa Mio, Shiode Yusuke, Hirano Masayuki, Doi Shinichiro, Toshima Shinji, Takahashi Kosuke, Hosogi Mika, Ma Xiang, Shiraga Fumio	4. 巻 64
2. 論文標題 Interocular symmetry of the foveal avascular zone area in healthy eyes: a swept-source optical coherence tomography angiography study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 171 ~ 179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-020-00719-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matoba Ryo, Kanzaki Yuki, Doi Shinichiro, Kanzaki Sayumi, Kimura Shuhei, Hosokawa Mio Morizane, Shiode Yusuke, Takahashi Kosuke, Morizane Yuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Assessment of epiretinal membrane formation using en face optical coherence tomography after rhegmatogenous retinal detachment repair	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-021-05118-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Atsushi, Kanzaki Yuki, Kimura Shuhei, Hosokawa Mio, Shiode Yusuke, Doi Shinichiro, Takahashi Kosuke, Matoba Ryo, Morizane Yuki	4. 巻 11
2. 論文標題 En face image-based classification of diabetic macular edema using swept source optical coherence tomography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-87440-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Liu M, Fujiwara A, Morizane Y, Kawasaki R, Kimura S, Morizane-Hosokawa M, Shiode Y, Hirano M, Doi S, Toshima S, Takahashi K, Hosogi M, Ma X, Shiraga F.	4. 巻 2
2. 論文標題 Interocular symmetry of the foveal avascular zone area in healthy eyes: a swept-source optical coherence tomography angiography study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Jpn J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 171-179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-020-00719-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hosogi M, Shiode Y, Morizane Y, Kimura S, Hosokawa M, Doi S, Toshima S, Takahashi K, Fujiwara A, Shiraga F.	4. 巻 6
2. 論文標題 Two-year Results of Intravitreal Ranibizumab Injections Using a Treat-and-extend Regimen for Macular Edema due to Branch Retinal Vein Occlusion.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Med Okayama.	6. 最初と最後の頁 517-522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18926/AMO/57716	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Noda H, Kimura S, Morizane Y, Toshima S, Hosokawa MM, Shiode Y, Doi S, Takahashi K, Hosogi M, Fujiwara A, Shiraga F.	4. 巻 -
2. 論文標題 RELATIONSHIP BETWEEN PREOPERATIVE FOVEAL MICROSTRUCTURE AND VISUAL ACUITY IN MACULA-OFF RHEGMATOGENOUS RETINAL DETACHMENT: Imaging Analysis by Swept Source Optical Coherence Tomography.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Retina	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IAE.00000000000002687	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi K, Morizane Y, Kimura S, Shiode Y, Doi S, Okanouchi T, Takasu I, Inoue Y, Shiraga F.	4. 巻 10
2. 論文標題 Results of lamellar macular hole-associated epiretinal proliferation embedding technique for the treatment of degenerative lamellar macular hole.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 2147-2154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-019-04425-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura S, Morizane Y, Hosokawa MM, Shiode Y, Doi S, Hosogi M, Fujiwara A, Okanouchi T, Inoue Y, Shiraga F.	4. 巻 5
2. 論文標題 Outcomes of vitrectomy combined with subretinal tissue plasminogen activator injection for submacular hemorrhage associated with polypoidal choroidal vasculopathy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Jpn J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 382-388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-019-00679-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Shiode Y, Morizane Y, Kimura S, Hosokawa MM, Doi S, Takahashi K, Matoba R, Kanzaki Y, Fujiwara A, Shiraga F
2. 発表標題 Effect of persistent subretinal fluid after successful rhegmatogenous retinal detachment surgery on visual acuity - en face image based analysis with swept-source OCT -
3. 学会等名 The 4th Japan-Taiwan Vitreoretinal Joint Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------