

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20791269
 研究課題名 (和文) SOD1 欠損マウスの加齢黄斑変性病態における網膜色素上皮細胞の上皮間葉移行
 研究課題名 (英文) Epithelial-Mesenchymal Transition of Retinal Pigment Epithelium in Age-related Macular Degeneration in SOD1 deficient mice.
 研究代表者
 平沢 学 (HIRASAWA MANABU)
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：80365345

研究成果の概要 (和文)：

加齢黄斑変性病態における網膜色素上皮細胞 (RPE) の上皮間葉移行 (EMT) 様変化に着目し、その変化に関わる転写因子を解析した。酸化ストレス亢進モデルである SOD1 ノックアウトを用いたところ、加齢にともなう網膜変性および RPE の接着障害と形態変化を認めた。しかし、EMT 転写因子の局在は明らかではなかった。一方、ヒト加齢黄斑変性での解析を試みたところ、RPE における転写因子 Snail の発現亢進が加齢黄斑変性病態に関わる事を発見した。

研究成果の概要 (英文)：

We focused on epithelial-mesenchymal transition(EMT)-like changes of retinal pigment epithelium cells(RPE) in age-related macular degeneration(AMD) and observed transcriptional factors relate to EMT. We analyzed age-related changes of retina from SOD1 deficient mice, recognized as oxidative stress model mice, and found out about retinal degeneration with aging and disruption of cell-cell contact of RPE, however, transcriptional factors relate to EMT were not detected in RPE. Otherwise we observed nuclear localization of Snail about RPE from surgically excised choroidal neovascularization membrane secondary to AMD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：加齢黄斑変性, 上皮間葉移行, 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (以下 AMD) は、高齢化社会の進む先進国において中途失明原因の主

な原因となっている。わが国でも、50歳以上で0.67%という高い割合でみられており、社会的な問題になりつつある。患者の生活の質

の低下、社会的損失、医療経済的な面からも AMD の発症・進行を予防することは極めて重要であり、新たな疾患概念の提唱と、疾病予防・治療方法の確立が望まれている。

近年、老化には酸化ストレスが関与する可能性が指摘されている。網膜は光を受容する過程で、多くの酸化された代謝産物を産生している。すなわち、網膜は慢性的に酸化ストレスに曝露されている。特に光軸の焦点である黄斑部には、光が大量に集光する為に最も強く酸化ストレスが加わる。黄斑部にはルテインやゼアキサンチン等の抗酸化物質が多く含まれているが、それらは加齢とともに減少する。このことから、抗酸化能の低下が加齢性の黄斑疾患の進行に寄与しているものと推測されている。

2. 研究の目的

我々は、眼内で発生する酸化ストレスによる RPE の機能障害が AMD の発症に寄与する可能性があるものと仮説をたて、体内で発生する、スーパーオキシドを除去する酵素である、superoxide dismutase 1 (以下 SOD1) をノックアウトしたマウスに着目し、その加齢性変化について検討を試みた。

また、ヒト脈絡膜新生血管摘出検体における過去の報告から、AMD において、RPE の重層化や形態的な変化が見られることが明らかになっている。このことから、RPE が上皮間葉移行 (EMT) 様の変化を来している可能性を疑い、SOD1 ノックアウトマウスにおける RPE の形態変化と、EMT に関与する転写因子についての検討を試みた。

RPE 細胞の酸化ストレスによる EMT 様変化が、AMD をはじめとする加齢性の網膜疾患に及ぼす影響について明らかにし、その分子メカニズムを深く理解することで、予防・治療につながるものと考えられた。

3. 研究の方法

SOD1 ノックアウトマウスを用いて、加齢にともなう網膜および RPE の形態的・機能的な変化を野生型マウスと比較し、解析した。また、同マウスにおいて、RPE における Snail family を代表とする EMT 関連転写因子の発現・核内移行に着目し、マイクロアレイ・免疫染色などによる解析を試みた。研究に先立って、SOD1 ノックアウトマウスを用いた予備実験を行ったところ、RPE の、網膜内への浸潤が認められた (図 1)。

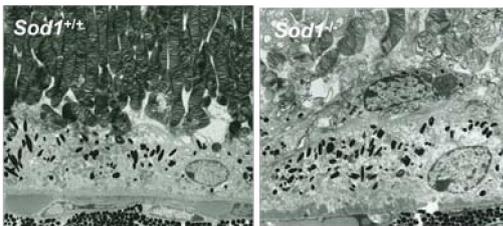


図 1 SOD1 ノックアウトマウスにおいて、RPE が遊離、形態変化をおこなっている像が観られた。

このことから、SOD1 ノックアウトマウスの RPE では、EMT 様変化が起こっている可能性が示唆された。

また、それらで得られた結果を基に、ヒト培養細胞およびヒト脈絡膜新生血管摘出検体における解析を検討した。

4. 研究成果

SOD1 ノックアウトマウスは、加齢とともに網膜全層の菲薄化が見られ、電気生理検査にも振幅の低下が見られた。このことから、酸化ストレスの亢進によって網膜変性が起こると報告した (Hashizume, Hirasawa et al American Journal of Pathology 2008) (図 2)。

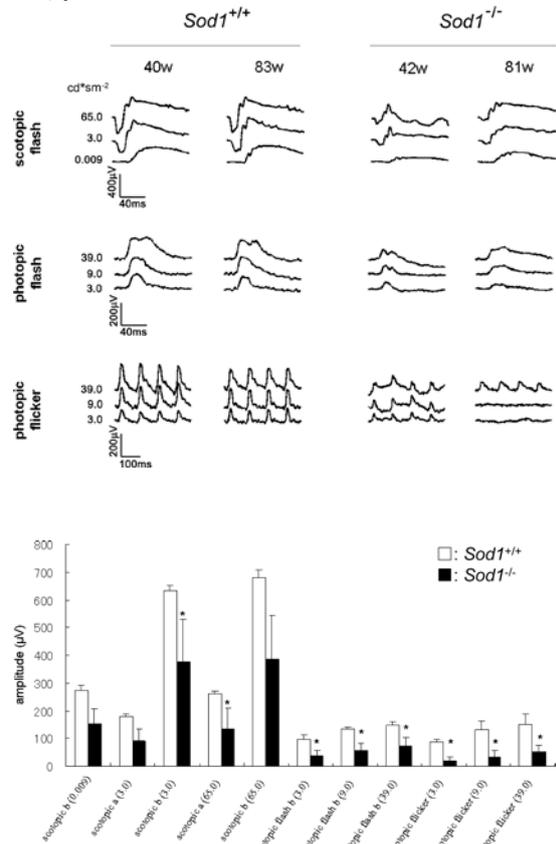


図 2 SOD1 ノックアウトマウスは加齢にともなう、網膜の機能低下が認められた。

また、同マウスでは、老化の過程で RPE 細胞 (RPE) の接着障害が生じていることが明らかになった。予備実験でみられた RPE の網膜内への遊離は、細胞間の接着障害がひとつの原因と考えられた (図 3)。

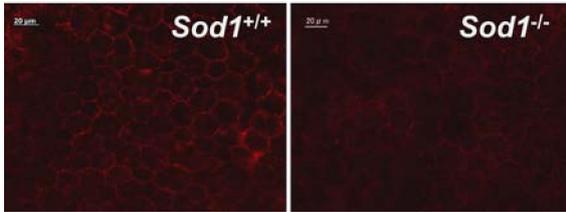


図3 SOD1 ノックアウトマウスにおける、網膜色素上皮の接着障害。フラットマウント状態にした網膜色素上皮に対し、RPE で観られる主な細胞接着分子である、N-Cadherin の免疫染色を行った。SOD1 ノックアウトマウスでは野生型マウスに比して N-Cadherin の発現低下を認めていた。

しかし、遊離した RPE では、接着分子の発現低下を認めていたものの、間葉系マーカーの発現については僅かであった。また、EMT を制御する転写因子については、Snail family の核内局在につき解析を試みたものの、SOD1 ノックアウトマウスの遊離 RPE については、局在は明らかではなかった。

同時に検討していた、ヒト加齢黄斑変性における、RPE の EMT の関与については、ヒト脈絡膜新生血管摘出標本にて、組織内の RPE に EMT 関連転写因子である Snail の核内染色像を認め、RPE における Snail の発現亢進と EMT 様変化が、AMD 病態および組織の線維化形成に関与している可能性が示唆された (図4)。

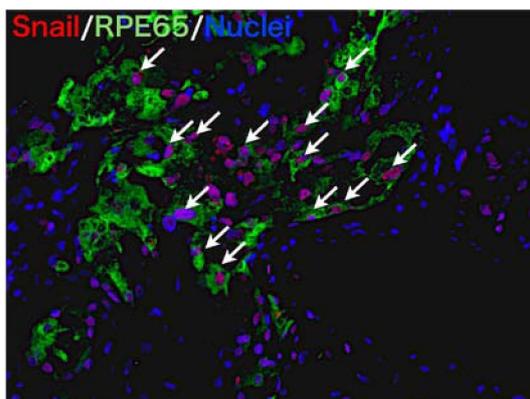


図4 ヒト脈絡膜新生血管摘出検体における Snail の局在。組織内の RPE (緑) の細胞核 (青) 内に、Snail (赤) の局在を認めた (矢印部。紫に染まっている)。正常ヒトおよびマウス RPE では Snail の局在は認められず、AMD の病態に関連した RPE の機能・形態変化と関連があるものと考えられる。

培養細胞にて、TGF-beta1 をはじめとして、

Snail の発現亢進を促すいくつかのサイトカインが同定された (Hirasawa et al 投稿準備中)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Hirasawa M, Noda K, Shinoda H, Ozawa Y, Tsubota K, Ishida S. Secondary macular hole associated with central retinal vein occlusion treated with corticosteroid injection. Japanese Journal of Ophthalmology 査読有、2009; 53: 279-281

② Hashizume K, Hirasawa M, Imamura Y, Noda S, Shimizu T, Kurihara T, Noda K, Shinoda K, Ozawa Y, Ishida S, Miyake Y, Shirasawa T, Tsubota K. Retinal dysfunction and progressive retinal cell death in SOD1-deficient mice. Am J Pathol. 査読有、2008; 172: 1325-1331

③ 平沢学、今村裕. 加齢黄斑変性の予防と生活習慣. 特集「眼科領域におけるアンチエイジング医学」. 眼科 査読無、50: 409-419, 2008

④ 平沢学、今村裕. 加齢黄斑変性 動物モデル. 網膜硝子体診療 update IV. 注目の疾患. 臨床眼科 査読無、第 62 巻 増刊号 208-210, 2008

⑤ 平沢学. アンチエイジングサプリメント処方. アンチエイジング医学の基礎と臨床 査読無、改訂 2 版 268-269、2008

[学会発表] (計 4 件)

① 宮田博、平沢学 緑内障手術後の遷延性脈絡膜剥離 日本緑内障学会 2009 年 11 月 13 日

② 西別府弘子, 五十嵐俊, 間宮純子, 苗村かおり, 平沢学, 宮田博, 高尾良洋 白内障手術症例における $\alpha 1$ 遮断薬の使用状況第 19 回日本医療薬学会年会 2009 年 10 月 24 日

③ Hirasawa M, Imamura Y, Hashizume K, Noda K, Ishida S, Tsukamoto N, Kudo-Saitoh C, Kawakami Y, Tsubota K. Age-related changes of gene expression profile in retina of SOD1-deficient mice ARVO 2008 2008. 4. 27~5. 1

④ Hashizume K, Imamura Y, Hirasawa M, Sawanobori M, Ishida S, Kurosaka D, Tsubota K. Oxidative Stress Markers in

Japanese Patients With Age-Related
Macular Degeneration: A Pilot Study ARVO
2008 2008.4.27~5.1

〔図書〕(計 2 件)

①平沢学, 他、メディカルレビュー社、患者
さんから浴びせられる眼科疾患100の質
問 メディカルレビュー社 2008 208-211

②平沢学, 他、加齢黄斑変性の患者さんへの
指導必須3項目. 眼科ケア メディカルビ
ュー社 2008 Vol. 10 no.2 38-43

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平沢 学 (HIRASAWA MANABU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 80365345

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし