

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18402

研究課題名(和文) 加齢黄斑変性の予防に資する網膜色素上皮細胞のメラニン生成機構の解明

研究課題名(英文) Melanogenesis mechanism of retinal pigment epithelium for age-related macular degeneration

研究代表者

鎌尾 浩行 (Kamao, Hiroyuki)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：30388946

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)：先進国における主要な視覚障害の1つである加齢黄斑変性は、酸化ストレスによる網膜色素上皮細胞の機能低下を病因としている。本研究は抗酸化能を有する網膜色素上皮細胞(RPE)のメラニンが加齢とともに減少することに基づき、RPEのメラニン生成を促進させる物質の同定を試みた。網膜色素上皮細胞にmTOR阻害薬を添加し培養すると、コントロールと比較しRPEの透過率が、添加2週後は96%、添加4週後は93%と有意に低下し、RPEのメラニン量が増加することを確認した。このためmTOR阻害薬がRPEのメラニン生成の促進を通してAMDに対する新しい予防薬となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AMDは酸化ストレスによるRPEの機能低下を原因とし、今回mTOR阻害薬が抗酸化能を有するRPEのメラニン生成を促進させることが確認できた。このことから、今後、mTOR阻害薬がAMDに対する新規の予防薬となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Age-related macular degeneration (AMD) is a leading cause of blindness in developed countries. The progressive degeneration of the retinal pigment epithelium (RPE) by oxidative stress is a leading factor in its pathogenesis. In this study, we identified a substance that promotes melanin production in RPE based on the fact that melanin in RPE has an antioxidant capacity and decreases following age. The mTOR inhibitor reagent induced the 96% and 93% reduction of transmittance in RPE at two weeks and four weeks, respectively. These results suggested that mTOR inhibitor reagent may be new preventatives against AMD through the promotion of RPE melanin production.

研究分野：網膜硝子体分野

キーワード：網膜色素上皮細胞 加齢黄斑変性 メラニン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (AMD) は先進国における中途失明の主要な原因疾患の 1 つで (日本: 4 位、欧米: 1 位)、網膜色素上皮細胞 (RPE) の機能低下を病因とする疾患である。AMD の危険因子として、年齢、喫煙、人種、性別、遺伝子、高血圧、食生活、日光などが報告されているが、中でも加齢は明確な危険因子として同定されている (Rudnicka, et al. 2012)。RPE の加齢変化としては、細胞内のリポフスチンの増加 (Feeney, et al. 1978) とメラニンの減少 (Weirer, et al. 1986)、基底膜への脂質沈着 (Pauleilhoff, et al. 1990) が報告されている。リポフスチンとは RPE に貪食された老廃物 (視細胞外節の代謝副産物) で、主要な構成成分である A2E は光刺激により活性酸素を発生させ (光酸化)、RPE を障害することが知られている。このため抗酸化物質による AMD の予防に関する研究が行われ、 β カロチン、亜鉛、ビタミン C などの摂取が一定の有効性を示した (AREDS, 2001)。一方、加齢とともに減少するメラニンは A2E の光酸化に対する抗酸化作用を有し (Wang, et al. 2006)、また抗酸化物質である亜鉛を貯蔵し必要に応じて放出することが報告されている (Psters, et al. 2001)。

申請者はこれまで、AMD の治療法の開発を目的に RPE の研究を行い、ヒト iPS 細胞由来 RPE への分化誘導 (Hirami, et al. 2009)、ヒト iPS 細胞由来 RPE 移植の前臨床研究 (Kamao, et al. 2014)、そして世界初のヒト iPS 細胞を用いた臨床研究としてヒト iPS 細胞由来 RPE 移植に成功した (Mandai, et al. 2017)。また、作製したヒト iPS 細胞由来 RPE は長期培養に伴い細胞内のメラニン量が増加することから、画像解析や吸光度計を用いて RPE のメラニン量を非侵襲的に定量する方法を開発し、メラニン量と RPE の機能が相関していることを明らかにした (Kamao, et al. 2014)。

以上より、光酸化に対する抗酸化能を有するメラニン量が増加することで、RPE の抗酸化能が促進し、これが最終的に AMD の予防につながるのではないかと研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、RPE のメラニン生成を促進させる物質の同定である。次に、同定した物質がどのようにして RPE のメラニン生成を促進させるのか、また RPE の抗酸化能にどのような影響を与えるのかを解明する。そのために、以下の項目を明らかにする。

- メラニン形成に関わる細胞内シグナル経路にどのような影響を与えるのか
- メラニン形成に関わる酵素群にどのような影響を与えるのか
- 細胞の抗酸化能にどのような影響を与えるのか
- 酸化ストレスによる細胞死にどのような影響を与えるのか

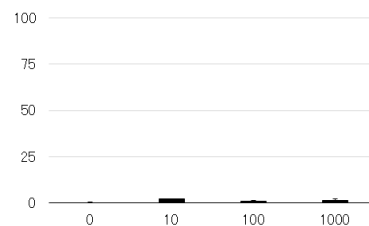
3. 研究の方法

細胞は市販されているヒト primary RPE (LONZA 社) を使用し、培養方法は細胞増殖培地と維持培地を用いて行った (Kamao, et al. 2014)。mTOR 阻害薬は Rapamycin を用いた。

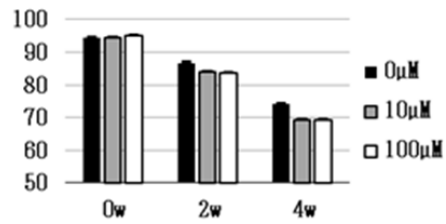
1. RPE のメラニン生成を促進させる物質の同定: RPE がコンフルエント後に Rapamycin を $10\mu\text{M}$ と $100\mu\text{M}$ 添加し、添加前、添加 2 週後、添加 4 週後に細胞の透過率をプレートリーダーにて測定した。これまでに、プレートリーダーを用いて RPE のメラニン量を非侵襲的に定量する方法 (メラニン量の増加と透過率の低下が相関する) を報告している (Kamao, et al. 2014)。
2. メラニン形成特有遺伝子への影響: RPE がコンフルエント後に Rapamycin を添加し、添加前、添加 1 日、添加 3 日後の細胞を回収する。回収した細胞の cDNA を抽出し、メラニン形成に関わる遺伝子 (MITF、TYR、TYRP1) の発現量を定量 PCR (Real-Time qRT-PCR) にて測定した。
3. RPE の抗酸化能への影響: RPE がコンフルエント後に Rapamycin を添加し、添加 4 週後に過酸化水素 ($800\mu\text{M}$) を添加、その 6 時間後に Annexin V/PI 染色し、これをフローサイトメトリーにて測定した。

4. 研究成果

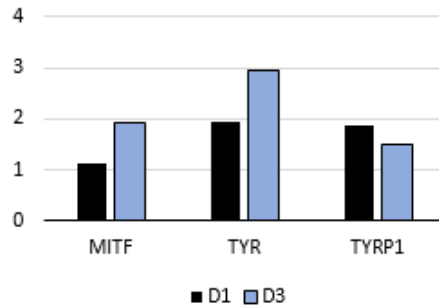
1. Rapamycin の薬剤毒性: Rapamycin 添加 1 日後の細胞障害率 (LDH 試験) は、添加なしが 0%、 $10\mu\text{M}$ が 2.2%、 $100\mu\text{M}$ が 0.9%、 $1000\mu\text{M}$ が 1.5% と 4 群に有意差を認めなかった。このことから、Rapamycin を $10\mu\text{M}$ と $100\mu\text{M}$ の濃度を用いて次の実験を進めた。



2. RPE のメラニン生成を促進させる物質の同定：コントロールと比較し RPE の透過率が、Rapamycin 添加前は 100% と有意差を認めなかったが、Rapamycin 添加開始 2 週間後は 96%、添加開始 4 週間後は 93% と有意に低下した。一方、Rapamycin の濃度の違いによる透過率の差はなかった。このことから、Rapamycin が RPE のメラニン形成を促進させることを確認した。また、10 μ M と 100 μ M でメラニン量に差を認めなかったため、10 μ M の濃度を用いて次の実験を進めた。



3. メラニン形成特有遺伝子の発現量への影響：メラニン形成特有遺伝子の発現量は、コントロールと比較し MITF が Rapamycin 添加開始 3 日後に 1.9 倍、TYR が Rapamycin 添加開始 1 日後に 2.0 倍、3 日後に 2.9 倍、TYRP1 が Rapamycin 添加開始 1 日後に 1.9 倍、3 日後に 1.5 倍と有意に上昇した。メラニン形成特有遺伝子の古典的な経路は、上流から MITF、TYR、TYRP1 となるが、今回の Rapamycin 添加による RPE のメラニン形成特有遺伝子への影響は、TYR の遺伝子発現量が上昇し、その後に MITF と TYRP1 の遺伝子発現量が上昇したため、Rapamycin が直接 TYR の遺伝子発現を促進させたと考えた。



4. RPE の抗酸化能への影響：過酸化水素添加 6 時間後の RPE の Annexin V 陽性細胞は、Rapamycin 添加なしが 18.8% (H2O2 添加なし) から 21.9% (H2O2 添加あり)、Rapamycin 添加ありが 22.0% (H2O2 添加なし) から 38.9% (H2O2 添加あり) と両群とも細胞死が誘導された。しかし、Rapamycin 添加により細胞死の抑制は認められなかった。このことから、Rapamycin 添加により RPE のメラニン形成を誘導しても、RPE の抗酸化能を上昇させることはできなかった。

引用文献

1. Kamao H, et al. Stem Cell Reports 2, 205-218 (2014)
2. Kamao H, et al. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 55, 8309-8318 (2014)

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------