

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18405

研究課題名（和文）網膜色素上皮細胞en face画像と硝子体液解析による黄斑微小環境の解明

研究課題名（英文）En face images of retinal pigment epithelial cell and vitreous humor analysis to elucidate macular microenvironment

研究代表者

田中 寛 (Tanaka, Hiroshi)

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：60850899

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではin vitroにおいて網膜色素上皮細胞の分化培地を用いて細胞形態と機能の両者が向上することを示した。また、培養ヒトRPE細胞変性モデルの構築として、ミトコンドリアの電子伝達系を抑制することで細胞分化を抑制できるモデルを構築し、そのモデルよりRPEの分化における細胞形態と機能維持にエネルギー代謝が必須であることを示した。次に、in vivo 家兎黄斑円孔モデルを安定して作成することに成功した。そのモデル作成一月後に円孔部を電子顕微鏡で観察したところ、正常眼に比較し、円孔モデルでは網膜色素上皮細胞の形態異常とミトコンドリア形態の異常が確認され、両者が密接に関連していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により網膜色素上皮細胞の細胞内エネルギー代謝、具体的にはミトコンドリアの呼吸能をコントロールすることと細胞分化が密接に関連していることが明らかとなり、細胞形態と機能の関連があることも示した。またその結果がin vitroの実験のみならずin vivo実験にても関連していることが示唆され、細胞レベルの基礎研究から疾患モデルとして臨床の疑問を解決するの橋渡しとなる研究であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we showed that both cell morphology and function are improved by using differentiation media for retinal pigment epithelial cells in vitro. We also constructed a model of cultured human RPE cell degeneration in which cell differentiation can be inhibited by suppressing the mitochondrial electron transport chains, and showed from this model that energy metabolism is essential for maintaining cell morphology and function during RPE differentiation. Next, we succeeded in creating an in vivo rabbit macular hole model. One month after the creation of the model, electron microscopic observation of the macular hole revealed abnormal retinal pigment epithelial cell morphology and mitochondrial morphology in the macular hole model compared to normal eyes, indicating that the two are closely related.

研究分野：網膜硝子体

キーワード：網膜色素上皮細胞 ミトコンドリア エネルギー代謝 黄斑円孔 細胞形態

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

黄斑円孔の病態・治療に関する研究は硝子体と感覚網膜に重きが置かれているが、我々はその視点を変え、視細胞の健全性を担保している網膜色素上皮細胞 (RPE) の変性と黄斑局所微小環境の悪化が黄斑円孔閉鎖後に残存する視機能の低下を惹起しているという斬新な着想を得た。黄斑円孔における RPE の変性においてはヒトサンプルでの撮像を予定していたが、コロナ感染拡大に伴う受診抑制のため *in vitro* モデル作成に切り替えた。その *in vitro* での正常 RPE の形態と変性モデルにおける細胞形態・機能・エネルギー代謝の関連性に注目し、また *in vivo* 黄斑円孔モデルを作成し、黄斑円孔局所の RPE を詳細に検討を行い *in vitro* の結果と *in vivo* の結果を統合し、新たな知見を得ることを目的とした。

### 2. 研究の目的

黄斑円孔手術術後の視機能回復不全は、視機能を司る感覚網膜 (視細胞) ではなく、視細胞の健全性を担保している網膜色素上皮細胞 (RPE) の変性と黄斑局所微小環境の悪化によって惹起されるとの斬新な概念を提供する。RPE が硝子体腔に露出した黄斑円孔症例において、細胞レベルでの RPE 画像を取得することで網膜色素上皮細胞 (RPE) の形態を理解し、非侵襲的に評価する。RPE の分化培地を用いて六角形格子をとる細胞集団を構築し、ミトコンドリアによる細胞代謝がどのように関わっているか、またその代謝を抑制することで細胞形態・機能を指標として分化がどのように変化するかを検討する。

### 3. 研究の方法

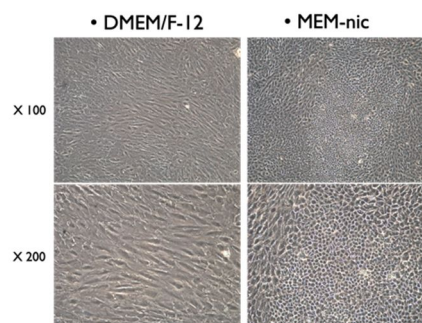
本研究では *in vitro* において網膜色素上皮細胞の不死化細胞である ARPE-19 を分化培地 (MEM-Nic) を用いて培養を行う。位相差顕微鏡画像を用いて細胞形態と免疫組織化学染色にてタイトジャンクションである ZO-1、N-cadherin、RPE の分化マーカーである CRALBP、Bestrophin、また貪食機能を示す MerTK の発現を Western blotting を用いて調べる。分化細胞と通常培養群においてミトコンドリアの呼吸能を調べるために細胞外フラックスアナライザーによる検討とミトコンドリア膜電位測定のために JC-1 による染色を行う。また、培養ヒト RPE 細胞変性モデルの構築として、ミトコンドリアの電子伝達系を抑制するロテノン添加により細胞分化を抑制できるかを検討する。次に、*in vivo* 家兎黄斑円孔モデル作成し、そのモデル作成一月後に円孔部の電子顕微鏡検討を行い、正常眼に比較し、円孔モデルでの網膜色素上皮細胞の形態、またミトコンドリア形態の変化を確認する。

### 4. 研究成果

本研究では *in vitro* において網膜色素上皮細胞の分化培地を用いて細胞形態と機能の両者が向上することを示した。また、培養ヒト RPE 細胞変性モデルの構築として、ミトコンドリアの電子伝達系を抑制することで細胞分化を抑制できるモデルを構築し、そのモデルより RPE の分化における細胞形態と機能維持にエネルギー代謝が必須であることを示した。次に、*in vivo* 家兎黄斑円孔モデルを安定して作成することに成功した。そのモデル作成一月後に円孔部を電子顕微鏡で観察したところ、正常眼に比較し、円孔モデルでは網膜色素上皮細胞の形態異常とミトコンドリア形態の異常が確認され、両者が密接に関与していることが示された。

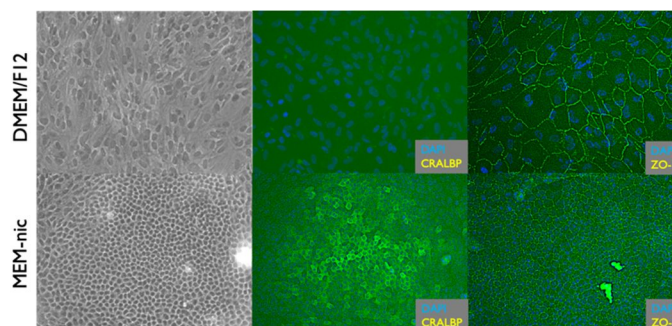
#### 1) 位相差顕微鏡による細胞形態の評価

従来培地群 (DMEM/F12) に比較し、ニコチンアミド添加培地群 (MEM-nic) で六角形格子をとるより小型化した細胞によるクラスターが確認できた (右図)



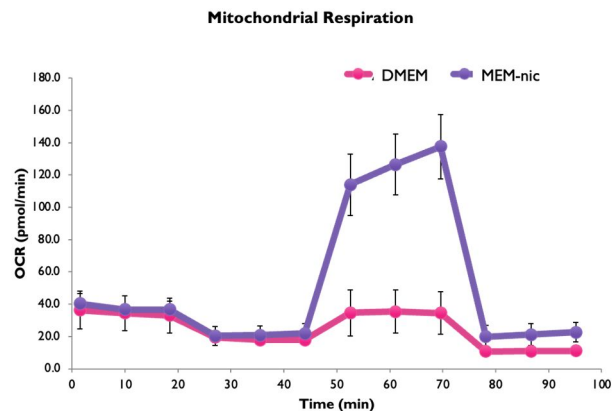
#### 2) 免疫細胞学的検討

従来培地群 (DMEM/F12) に比較し、ニコチンアミド添加培地群 (MEM-nic) では小型細胞のコロニーにおいて CRALBP が発現することが確認できた。タイトジャンクションを示す ZO-1 については両群において確認することができた。(右図)



### 3) ミトコンドリア呼吸能解析

酸素消費速度(OCR)指標を利用することによりミトコンドリア呼吸能(ミトコンドリア活性)を解析し、従来培地(DMEM/F12)群、ニコチンアミド添加培地(MEM-nic)群を細胞外フラックスアナライザー(XFe24; Agilent Technologies; Santa Clara, CA)を用いてミトストレステストを行なったところ、礎酸素消費速度については、両培地群間でそれぞれ  $22.3 \pm 9.5/16.7 \pm 3.8$  と有意差を認めなかったが、最大酸素消費速度では、24.8、117.8 pmol/min とニコチンアミド添加培地群で有意に高値を示した。(右図)



### 4) 黄斑円孔モデル

in vivo 家兎黄斑円孔モデルを安定して作成することに成功した。そのモデル作成一月後に円孔部を電子顕微鏡で観察したところ、正常眼に比較し、円孔モデルでは網膜色素上皮細胞の形態異常とミトコンドリア形態の異常が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 寛, 宮谷 崇史, 沼 幸作, 堀切 智子, 向 敦史, 羽室 淳爾, 外園 千恵
2. 発表標題 ニコチンアミドによる網膜色素上皮細胞の分化とエネルギー代謝
3. 学会等名 第125回日本眼科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮谷 崇史, 田中 寛, 沼 幸作, 堀切 智子, 向 敦史, 羽室 淳爾, 外園 千恵
2. 発表標題 網膜色素上皮細胞のミトコンドリア呼吸能とエネルギー代謝
3. 学会等名 第126回日本眼科学会
4. 発表年 2022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
---------	---------