

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592563

研究課題名(和文) 滲出型、萎縮型加齢黄斑変性への小胞体ストレスの関与とそれを標的とした治療法の開発

研究課題名(英文) The influence of unfolded protein response on age related macular degeneration.

研究代表者

加地 秀 (Kachi, Shu)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30345904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性(AMD)の発症には、網膜色素上皮(RPE)の細胞死、血管内皮増殖因子(VEGF)の発現が関与している。これらへの小胞体ストレス(UPR)の関与を検討した。RPEにUPRを誘発すると、細胞死を引き起こす因子の増加が確認できた。レーザーによる脈絡膜新生血管(CNV)発症モデルを作成し、CNVの計測ができることを確認した。UPRを抑制する薬剤の内服投与により、CNVの抑制が可能であるかを検討したが、有意な差は得られなかった。AMDの前駆病変であるドルーゼンの構成因子であるアミロイドが蓄積するマウスは加齢に伴い子を育成しなくなり、若い親マウスが必要であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Death of retinal pigment epithelial cells (RPE) and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) is the cause of age related macular degeneration (AMD). We have studied the influence of unfolded protein response (UPR) to these. When UPR occur in RPE, there was increase of factors that cause apoptosis. We have made laser induced choroidal neovascularization (CNV) model mice, and confirmed that we could measure the size of CNV. The mice was orally treated by drug which prevent UPR, however we could not detect the prevention of CNV.

Druzen is a precursor of AMD, and Amyloid beta is a component of the druzen. As amyloid beta cause expression of VEGF in RPE cells, we have bought caveolin 1 knockout mice which is known to cause amyloid beta deposit in the brain. We have found old mothers doesn't feed the babies, and need of the young mothers to increase the colony.

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：眼細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

タンパクは特異的な三次構造をとることによって機能することができるが、ときに異常な三次構造をとったタンパク(unfolded protein)が生じる。この三次構造の異常なタンパクを小胞体内から細胞質へ送り出し、小胞体関連タンパク分解機構 (endoplasmic reticulum-associated degradation: ERAD)により分解させるという役割を小胞体が果たしている。なんらかのストレスによって小胞体に unfolded protein が蓄積された状態が小胞体ストレスである。これに対する応答としては、(1)翻訳の抑制、(2)分子シャペロンの転写誘導、(3)ERAD 因子の転写誘導が含まれるが、それでも異常タンパクを処理しきれない場合には(4)アポトーシスによる細胞死をひきおこす。近年この小胞体ストレスが糖尿病、神経変性疾患を含む多くの疾患の発症に関与していることが明らかになってきており、眼科領域においてもマウスモデルにおいて網膜変性の発症に関与していることが報告された。

加齢黄斑変性は高齢者の社会的失明の非常に重要な原因であるが、その発症原因のひとつとしてドルーゼンの構成成分であるアミロイドが注目されている。アミロイド はアルツハイマー病などにおいてもその誘引として注目されているが、神経細胞を用いた実験によってアミロイド 負荷は神経細胞における小胞体ストレスを増大させ、神経細胞にアポトーシスを引き起こすこと[Nakagawa T, 2000]、また小胞体ストレスにより VEGF の発現が亢進することが明らかになっている[Abcouwer SF, 2002]。網膜色素上皮(RPE)にアミロイド を負荷することによって VEGF の発現が亢進することが報告されている [Yoshida T, 2005]。我々はこれまでの in vitro の研究によって、このアミロイド 負荷にともなう RPE からの VEGF 発現の亢進は小胞体ストレスを介したものであり、小胞体ストレスを抑制する細胞内浸透圧調製因子である 4-phenylbutyric acid(PBA)によって、この VEGF 発現を抑制できることを報告している(第 48 回網膜硝子体学会)。このことは滲

出型加齢黄斑変性発症への小胞体ストレスの関与を示唆するものと考えられる。また、これまで小胞体ストレスは RPE のアポトーシスをもたらすという報告と、もたらさないという報告の両方があるが、我々はこの VEGF 発現の研究の過程で、アミロイド 負荷は活動性のある RPE 細胞の減少を引き起こし、小胞体ストレスを抑制することによって RPE は保護されることを見いたした。rd マウスを用いた研究で、視細胞の変性に小胞体ストレスが関与していることが報告されていること、酸化ストレスは小胞体ストレスの誘因となることを併せて考えると、小胞体ストレスは萎縮型加齢黄斑変性の RPE、視細胞の変性にも関与している可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

- (1) 実際の萎縮型、滲出型加齢黄斑変性患者の摘出組織を用いてその発症への小胞体ストレスの関与を調べることを目的の一つとしている。
- (2) 炎症なども小胞体ストレスの原因となることが報告されているが、一方でこれはまた AMD の発症にも関与していると考えられている。そして、レーザーによる脈絡膜新生血管(CNV)モデルにおいては炎症が CNV 発症に関与していると考えられるが、このモデルにおいて小胞体ストレスが亢進していることを確認し、このモデルを用いた CNV の治療実験を行うことも目的としている。
- (3) アミロイド 刺激により RPE での VEGF 発現の亢進が報告されており、また、Caveolin1 ノックアウトマウスにおいて、脳へのアミロイド の沈着が報告されている。このモデルマウスの眼の状態を確認し、これが小胞体ストレス負荷モデル足りうるかを確認する。

3. 研究の方法

- (1) 小胞体ストレス関連因子などについての免疫染色を行うことを目的とし、実際の加齢黄斑変性患者の組織を採取する。著しい網膜下出血を伴う AMD に対して CNV 除去術を施行した場合、それを検体として採取し

たいと考えたが、本術式は現在ほとんど行われておらず、結果的に採取できなかった。また、米国の San Diego Eye Bank より購入した AMD 眼球は、パラフォルムアルデヒド固定がなされており、これを凍結保存、切片を作成する。

(2) in vitro における小胞体ストレスとアポトーシス。

培養 RPE である ARPE19 の培養液中に UPR を誘発する薬剤であるツニカマイシンを添加し、RPE を回収、ライセートを作成した。また培養液も回収した。小胞体ストレスに伴って発現が変化すると考えられる GRP78, CHOP, Caspase4, Caspase12 の発現を細胞ライセートを用いてウェスタンブロッティングを行うことにより確認した。また、TNF、IL-1a、IL-1b、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IFN などのサイトカインの発現については培養液を用いて ELISA を行うことにより確認した。ELISA には少量のサンプルから多くのタンパクの定量が可能であるクオンシス社の Q-Plex ELISA アレイを用いた。

(3) レーザー CNV モデルによる実験。

眼底にレーザーを照射し、ブルッフ膜を先行することによりレーザー CNV モデルを作成した。まずは基礎実験として、レーザー照射後に PBS を硝子体注射したものと、VEGF 抗体を硝子体注射したものについて、眼球を摘出し、蛍光を用いて染色した CNV の計測を行った。また、UPR を抑制する薬剤である 4-phenylbutyl phosphonylacetate (PBA) をガバージ針を用いて内服投与し、CNV のサイズが抑制できるかどうかを検討した。

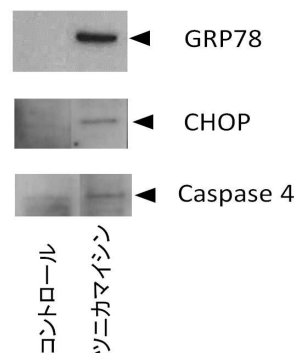
(4) カベオリン 1 ノックアウトマウスを用いた研究。

また、AMD の前駆病変であるドレーゼンの構成因子であるアミロイド が蓄積するモデルとして、カベオリン 1 ノックアウトマウスを入手し、メイティング、匹数を増やしている。それと並行して、視細胞特異的にカベオリン1をノックアウトしたマウスの眼球を入手し、プラスチック包埋切片を作成、電子顕微鏡下に観察した。

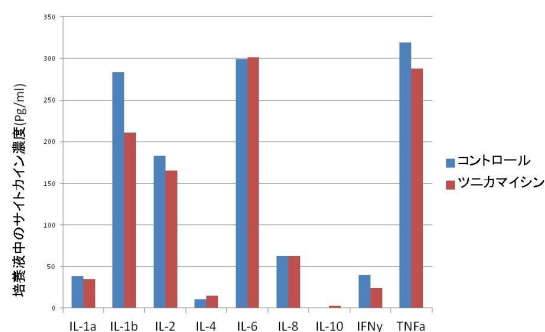
4. 研究成果

(1) 日本人の AMD 患者の CNV は採取できなかったものの、米国アイバンクから、パラフォルムアルデヒド固定したヒト加齢黄斑変性眼を入手した。萎縮型 AMD であった。冷凍保存している。

(2) RPE にツニカマイシン負荷を行うと、GRP78、CHOP の発現増加があり、小胞体ストレスがかかっていることが確認できた。また炎症性サイトカインの産生、アポトーシスに関わるカスパーゼの増加が確認できた。



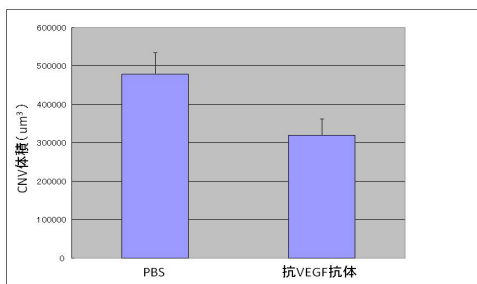
ツニカマイシン負荷による培養液中のサイトカインの変化をとらえるべく、ELISA を施行した。IL-10 については非常に発現量が少なくほとんど検出できなかったが、TNF、IL-1a、IL-1b、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IFN については検出が可能であった。



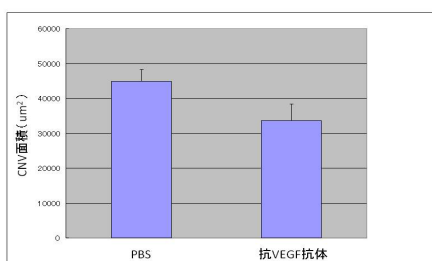
これらの in vitro の実験については、RPE 由来のセルラインである ARPE19 を用いて行ってきたが、この間、RPE の極性培養が行われるようになってきた。そして、本研究期間内に投稿した他の論文に対して査読者より、極性培養した RPE を用いて再実験するよという指示が出たため、現

在はこの実験を中断して、RPE の極性培養に取り組んでいる。

(3)基礎実験としてレーザーCNV モデルを作成し、現在の実際の治療のスタンダードである VEGF 抗体硝子体投与の有無により CNV のサイズに差があるかどうかを確認した。CNV の体積積は VEGF 抗体投与群は $319993 \pm 42093 \text{ um}^3$ 、PBS 群は $478719 \pm 55642 \text{ um}^3$ であった。

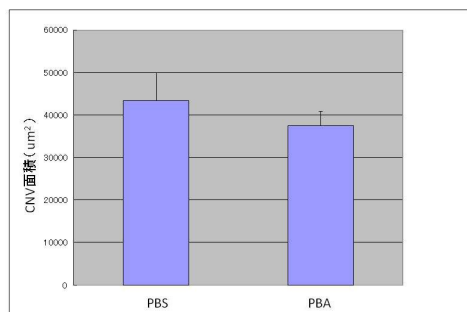


CNV の最大面積は VEGF 抗体投与群で $33717 \pm 4763 \text{ um}^2$ 、PBS 群で $44999 \pm 3403 \text{ um}^2$ であり、両者の間に有意な差が検出できた(それぞれ $p=0.034$, 0.043 ; Mann Whitney U test)。



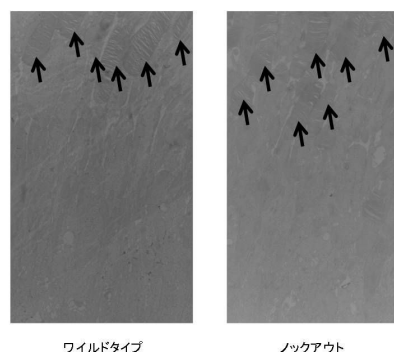
また、CNV の容積と最大面積の間には VEGF 抗体群、PBS 群いずれにおいても相関関係があった(それぞれ $p<0.001$, $R=0.85$ 、 $p=0.013$, $R=0.59$; Spearman rank correlation coefficient)。我々のセッティングで CNV モデルによる実験が可能であることが確認でき、また容積を計測せずとも面積で CNV サイズの変化を捉えることが可能であることを確認した。しかしながら、小胞体ストレスを抑制する PBA の内服投与によって、CNV サイズに差があるかの実験を行ったが、PBS 群の CNV サイズは $43398 \pm 6569 \text{ um}^2$ 、

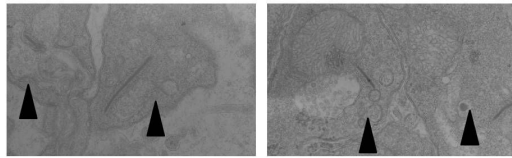
PBA 投与群の CNV サイズは $37497 \pm 410 \text{ um}^2$ とやや PBS 群の CNV のサイズが大きい傾向があるかにも見えるが、有意な差は得られなかった($p=0.86$, Mann Whitney U test)。



(4)また、AMD の前駆病変であるドレーゼンの構成因子であるアミロイド が蓄積するモデルとして、カベオリン 1 ノックアウトマウスを入手し、メイティングを行った。当初は出産はするものの、仔が発育せず、死亡していた。これは母親の脳内に蓄積したアミロイド の影響で育児をしないのではないかと考え、若い母親に児を育てさせたところ、アダルトマウスまで生育するようになった。若いマウスに育児をさせなければ、コロニーの拡大が不可能であることがわかった。

また、視細胞特異的カベオリン1ノックアウトマウスの網膜を電子顕微鏡下に観察したが、視細胞は外節(矢印)から神経終末(矢頭)まで正常、変性はみとめられなかった。





ワイルドタイプ

ノックアウト

これは視細胞のカベオリン1がノックアウトされることでは視細胞に変化はおきないことを示している。

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 11 件)

1. Yasuda S, Kachi S, Ueno S, Ushida H, Piao CH, Kondo M, Terasaki H. Electroretinograms and level of aqueous vascular endothelial growth factor in eyes with hemicentral retinal vein occlusion or branch retinal vein occlusion. Jpn J Ophthalmol. 2014 in press. 査読有
2. Nishiguchi KM, Ushida H, Tomida D, Kachi S, Kondo M, Terasaki H. Age-dependent alteration of intraocular soluble heparan sulfate levels and implication for proliferative diabetic retinopathy. Molecular Vision 2013 May, 19: 1125-1131. 査読有
3. Ushida H, Kachi S, Asami T, Ishikawa K, Kondo M, Terasaki H. Influence of preoperative intravitreal bevacizumab on visual function in eyes with proliferative diabetic retinopathy. Ophthalmic Research 2013; 43(1): 30-3. 査読有
4. Takeuchi K, Kachi S, Iwata E, Ishikawa K, Terasaki H. Visual function 5 years or more

after macular translocation surgery for myopic choroidal neovascularisation and age-related macular degeneration. Eye (Lond) 2012; 26(1): 51-60. 査読有

5. Yasuda S, Kachi S, Kondo M, Ushida H, Uetani R, Terui T, Piao CH, Terasaki H. Significant correlation between electroretinogram parameters and ocular vascular endothelial growth factor concentration in central retinal vein occlusion eyes. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011; 52(8): 5737-5742. 査読有
6. Tomida D, Nishiguchi KM, Kataoka K, Yasuma TR, Iwata E, Uetani R, Kachi S, Terasaki H. Suppression of choroidal neovascularization and quantitative and qualitative inhibition of VEGF and CCL2 by heparin. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011; 52(6): 3193-3199. 査読有
7. Kataoka K, Nishiguchi KM, Kaneko H, van Rooijen N, Kachi S, Terasaki H. The roles of vitreal macrophages and circulating leukocytes in retinal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011; 52(3): 1431-1438. 査読有

(学会発表) (計 16 件)

1. Kachi S, Yasuda S, Ushida H, Kondo M, Ueno S, Piao C, Terasaki H. Electronretinogram and aqueous vascular endothelial growth factor in the eyes with hemi-central retinal vein occlusion or branch retinal vein occlusion. (ポスター) ARVO Annual Meeting. Seattle, USA. 2013.5.8
2. Kaneko H, Ijima R, Kachi S, Terasaki H. Anti-histamine receptor 4 therapy inhibits choroidal neovascularization in mice. (ポスター) ARVO Annual Meeting 2013.5.5-9 Seattle, USA. 2013.5.5

3. Ijima R, Kaneko H, Kachi S, Terasaki H. Interleukin-18 induced retinal pigment epithelium cell death, but did not suppress choroidal neovascularization in mice. (ポスター) ARVO Annual Meeting 2013.5.5-9 Seattle, USA. 2013.5.5
4. Kachi S, Yasuda S, Ushida H, Uetani R, Kondo M, Terasaki H. Changes in implicit times of 30Hz Flicker Electroretinograms after photocoagulation in eyes with central retinal vein occlusion. (ポスター) ARVO Annual Meeting. Fort Lauderdale, USA 2012.5.6

(図書)(計 1 件)

1. 加地秀ら:新生血管と遺伝子治療. あたらしい眼科. メディカル葵出版 第 29 巻 8 号:1107-1109. 2012 年.

6. 研究組織

(1)研究代表者

加地 秀 (Kachi Shu)
名古屋大学医学部附属病院講師
研究者番号:30345904

(2)研究分担者

寺崎 浩子 (Terasaki Hiroko)
名古屋大学医学系研究科教授
研究者番号: 40207478

近藤 峰生 (Kondo Mineo)
三重大学医学系研究科教授
研究者番号:80303642

(3)連携研究者なし