

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592630

研究課題名(和文) AMPキナーゼの活性化による網膜色素上皮細胞の老化防止：加齢黄斑変性治療への展開

研究課題名(英文) Inhibition of RPE senescence by AMPK activation

研究代表者

森實 祐基 (Yuki, Morizane)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：50432646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素上皮細胞(RPE)は網膜の恒常性を維持する多彩な生理機能を有しており、加齢黄斑変性では、加齢に伴うRPEの機能低下によって網膜の恒常性が破綻し、血管新生、網膜障害が起こり、視力が低下する。本研究では、ARPE-19とヒトiPS由来RPEに対して、慢性酸化ストレス負荷によってRPEの老化を誘導し、老化に伴うRPEの機能の変化を明らかにした。また、炎症モデルを用いてRPEの上皮間葉転換を誘導し、AMPKの活性化がRPEの上皮間葉転換を阻害することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Retinal pigment epithelial cells (RPE) has a variety of physiological functions to maintain homeostasis of the retina. In the age-related macular degeneration, homeostasis of the retina collapses by decreased function of the RPE associated with aging, and leads to visual disturbance. In this study, for the ARPE-19 and human iPS-derived RPE, we induced senescence of RPE by chronic oxidative stress, and revealed a change in the functions of the RPE associated with aging. In addition, using models of inflammation to induce epithelial-mesenchymal transition in the RPE, we revealed that the activation of AMPK inhibits epithelial-mesenchymal transformation in the RPE.

研究分野：医歯薬学

キーワード：加齢黄斑変性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 加齢黄斑変性は本邦の失明原因の第4位、欧米の成人の失明原因の第1位の疾患であり、今後本邦において患者数が急増すると考えられている。網膜色素上皮細胞 (RPE) は網膜の恒常性を維持する多彩な生理機能 (活性酸素除去能、サイトカイン産生能、バリア機能、貪食能) を有しており、加齢黄斑変性では、RPE の機能低下によって網膜の恒常性が破綻し、老廃物の蓄積 (ドルーゼン形成)、血管新生、網膜障害が起こり、視力が低下する。

(2) 近年、加齢黄斑変性における血管新生に対して抗 VEGF 抗体による治療が行われており、視力の“維持”に有効とされている。しかし、ひとたび血管新生が起こると網膜の不可逆的障害は不可避であり、視力の“改善”は見込めない。そのため、患者の期待に真に応える治療法であるとは言えない。そこで、加齢黄斑変性に対しては血管新生を来す前に予防的治療を行い、網膜障害を防ぐことが極めて重要であると考えた。具体的には血管新生の前駆期であるドルーゼン形成期に RPE の機能を改善し血管新生を阻止する治療の開発が必要である。

(3) 生物が生きていくためにはエネルギー (アデノシン三リン酸、ATP) の代謝を調節し恒常性を維持しなければならない。エネルギー代謝の恒常性を維持する最上位の調節因子は AMPK である。AMPK は、細胞内 ATP の減少を感知して活性化し、異化の亢進 (ATP 産生の促進) と同化の抑制 (ATP 消費の抑制) を誘導し、細胞内 ATP レベルを回復させる。そのため“細胞のエネルギーセンサー”と呼ばれる。近年、AMPK がレブチンやアディポネクチンにより活性化されシグナル伝達物質としてエネルギー代謝を改善する事、AMPK の活性化が上皮細胞の極性を維持する事、mTOR、Sir2 との相互作用を通じて細胞増殖を調節する事が明らかになった。これらの機能

は老化や加齢性疾患の予防につながることから、AMPK は“長寿遺伝子”とも呼ばれている。近年、AMPK は、老化、メタボリックシンドローム、癌の重要な予防および治療標的である。これらの病態では AMPK 活性が低下しており、AMPK の活性化によって細胞機能や病態が改善することが明らかにされている。

## 2. 研究の目的

上記の背景のもと、AMPK の活性化によって RPE の機能低下を防止し加齢黄斑変性の進行を阻止できるのではないかと仮説を立てた。したがって本研究では、老化が RPE の機能に及ぼす影響について検討し、また AMPK の活性化が老化による RPE への影響にどのように作用するかについて検討する。

## 3. 研究の方法

実験材料：培養 RPE として、ARPE-19、ヒト iPS 由来 RPE (hiPS-RPE)

老化誘導モデル：

細胞の老化誘導は tert-BHP を用いて慢性的な酸化ストレスを細胞に与えて誘導した。老化誘導によって細胞から分泌される様々なサイトカインの変化を定量評価した。また、この時みられた変化に対して、細胞の AMPK を活性化させた時の影響についても検討した。

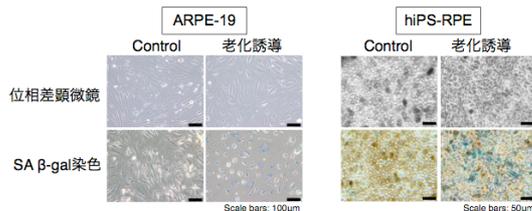
上皮間葉転換誘導モデル：

ARPE-19 に炎症を起こし、上皮間葉転換を誘導する目的で腫瘍壊死因子 (TNF)  $\alpha$  と形質転換成長因子 (TGF)  $\beta 2$  を作用させた。上皮間葉転換は加齢黄斑変性の後期にみられる線維性瘢痕の形成において重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、上皮間葉転換による RPE の形態変化、細胞移動-細胞集簇形成能の変化、加齢黄斑変性に関与する因子の発現の変化を検討した。また、この時みられた変化に対して、細胞の AMPK を活性化させた時の影響についても検討した。

#### 4. 研究成果

##### 1) tert-BHP による老化誘導

ARPE-19、hiPS-RPE 共に、tert-BHP 刺激によって、細胞が肥大化し、増殖が遅延し、また SAb-gal 染色に陽性を示した。以上のことから老化に類似した細胞状態を得ることが出来たと考えた。



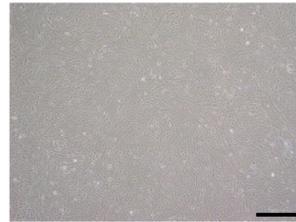
##### 2) 老化誘導に伴う、MMP/TIMP 発現の変化

老化誘導に伴って、ARPE-19 では、MMP-2 および MMP-2/TIMP-2 比が低下した。一方で、MMP-3, TIMP-1, TIMP-2 の産生は増加した。MMP-1, 9 については検出限界以下であった。hiPS-RPE においても同様に、MMP-2 および MMP-2/TIMP-2 比が低下した。一方で、TIMP-1 の産生は増加した。MMP-1, 3, 9 については検出限界以下であった。hiPS-RPE を trans well に培養し、細胞極性による MMP-2 分泌の違いを検討すると、細胞の apical 側に向けての分泌が基底膜側への分泌よりも有意に多かった。この傾向は老化誘導を行っても変化はなく、apical 側、基底膜側共に MMP-2 の分泌が低下した。

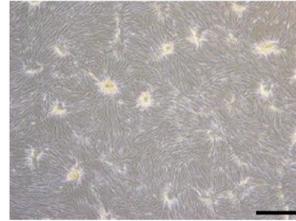
##### 3) TNF α + TGF β 2 刺激が ARPE-19 に及ぼす影響

TNF α + TGF β 2 刺激によって、ARPE-19 は遊走し、細胞凝集塊を形成した。この現象は TNF α と TGF β 2 の濃度に依存して強くみられた。また、TNF α 10ng/ml と TGF β 2 5ng/ml の組み合わせで安定して上記の現象がみられたことから、以後の実験ではこの濃度で実験を行った。

##### コントロール



##### TNF-α + TGF-β2



Scale bars, 500 μm

##### 4) TNF α + TGF β 2 刺激による ARPE-19 の細胞凝集に対して AMPK の活性化が及ぼす影響

TNF α + TGF β 2 刺激を行う前に、ARPE-19 に AMPK の活性化剤 (AICAR) を作用させた。すると、TNF α + TGF β 2 刺激によってみられた細胞凝集が完全に抑制された。

##### 5) TNF α + TGF β 2 刺激による ARPE-19 の上皮間葉転換に対して AMPK の活性化が及ぼす影響

TNF α + TGF β 2 刺激による凝集塊の形成は ARPE-19 の上皮間葉転換が関与していると考えられた。そこで、上皮間葉転換のマーカーとして、E-cadherin, fibronectin, α-SMA の発現を検討した。すると、TNF α + TGF β 2 刺激によって、E-cadherin の発現が減少し、fibronectin, α-SMA の発現が増加していることがわかった。また、TNF α + TGF β 2 刺激の前に AMPK を活性化させると、これらの変化が阻害された。

##### 6) TNF α + TGF β 2 刺激による ARPE-19 の上皮間葉転換に伴う各種サイトカイン分泌と AMPK の活性化が及ぼす影響

TNF α + TGF β 2 刺激による ARPE-19 の上皮間葉転換に伴って、MMP-2/TIMP-2 比及び MMP-9/TIMP-1 比が増加した。また、血管新生、慢性炎症に関連すると考えられる IL-6, VEGF の産生も増加した。なお、これらの変化は AMPK の活性化によって抑制された。

以上のことから、RPE の老化に伴う変化、炎症と上皮間葉転換に伴う変化が AMPK の活性化によって抑制されることが示唆され、AMPK が加齢黄斑変性治療の治療標的の一つとなる可能性が考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 2 件）

①的場 亮、森實 祐基、塩出 雄亮、荒木 亮一、土居 真一郎、平野 雅幸、米澤 朋子、白神 史雄、AMPK 活性化による網膜色素上皮細胞の上皮間葉転換の抑制、日本眼科学会、ロイトン札幌（北海道・札幌市）、2015 年 4 月 16 日

②荒木 亮一、森實 祐基、塩出 雄亮、的場 亮、土居 真一郎、平野 雅幸、白神 史雄、異なった酸化ストレス負荷が網膜色素上皮細胞の MMP 産生に及ぼす影響、日本眼科学会、ロイトン札幌（北海道・札幌市）、2015 年 4 月 18 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

無し

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森實 祐基 (Morizane, Yuki) 岡山大学・大学病院・講師 研究者番号：50432646

##### (2) 研究分担者

小阪 淳 (Kosaka, Jun) 国際医療福祉大学・基礎医学研究センター・教授 研究者番号：40243216

米澤 朋子 (Yonezawa, Tomoko) 岡山大学・医歯 (薬) 学総合研究科・助教 研究者番号：30304299

##### (3) 連携研究者

無し