

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10874

研究課題名(和文) 加齢黄斑変性におけるブルッフ膜修復過程の解明～Gタンパクの役割～

研究課題名(英文) in age related macular degeneration

研究代表者

加藤 亜紀 (AKI, KATO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60405157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素上皮細胞を継代培養し、培養した網膜色素上皮細胞を採取し培地にメチルセルロースを添加し、スフェロイドを作製した。RPEスフェロイド作製後、1日ごとでスフェロイドを経時的に採取しブルッフ膜様膜構造の生成過程を評価するため免疫染色でアクチンの発現状態を観察した。  
タイムラプス撮影が可能な顕微鏡下で培養を行い、RPEをプレートに蒔いてから、スフェロイドができるまでの過程を連続的に撮影し、経時変化を観察した。さらにRPEスフェロイドを作製する際にRhoキナーゼ阻害薬を培地に添加して、スフェロイドの生成過程を検討、スフェロイドの直径、関連タンパク質の発現を評価した。

研究成果の概要(英文)：Human retinal pigment epithelium (RPE) cells were cultured without growth factor. For making spheroids, human RPE cells were trypsinized, collected, and resuspended with methylcellulose solution in round-bottom culture plate. Spheroids were collected every day and fixed in 4% paraformaldehyde, thereafter, the expression of actin was evaluated by immunohistochemistry. Suspended human RPE cells with methylcellulose solution in round-bottom culture plate has been imaged in long-term time-lapse movies over 48 hours. The shape and size of spheroids were analyzed at each time point. The effect of Rho-associated kinase (Rho-kinase) inhibitor for spheroids was evaluated by time-lapse imaging and expression of associated protein.

研究分野：網膜硝子体

キーワード：加齢黄斑変性 網膜色素上皮 ブルッフ膜

## 1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は我が国において成人失明の主要原因である。網膜色素上皮へのドレーゼンの出現、網膜色素上皮の色素異常などの前駆症状に始まり、滲出型では網膜下または網膜色素上皮下に脈絡膜新生血管が発生し、やがて瘢痕形成し黄斑部網膜が著明に傷害され不可逆的な視力障害の原因となる。一方、萎縮型では滲出性変化を認めず地図状萎縮という状態に至り視力低下に至る。滲出型では光線力学的療法や抗血管内皮増殖因子（抗 VEGF）療法により、一定の視力維持効果が得られるものの、未だ十分とは言えず正常組織への侵襲、全身疾患への副作用などの問題もある。また萎縮型に関しては現在有効な治療法はない。

2014 年秋に多能性幹細胞(iPS 細胞)から分化させた網膜色素上皮細胞から単層の網膜色素上皮シートを作成し、その断片を進行した加齢黄斑変性患者の網膜下への移植が試みられた。しかし、この手法は、容易な手術とは言えず、様々な問題を抱えて現在実用化に向けて著しく前進しているとはいえない。そのため、さらなる汎用可能な新しい治療法や予防法の開発が期待されている。

## 2. 研究の目的

新規治療法の開発のためには病態に深く関与している網膜色素細胞の生理機能を理解する必要がある。我々は以前から網膜色素上皮の培養を行い、生体の網膜色素上皮のモデルを *in vitro* で再現する研究をおこなっている。網膜色素上皮細胞(RPE)を粘弾性培養液内で3次元浮遊培養を行うと表面に一層の上皮を形成する球状塊(RPE スフェロイド)が形成され、その表面にブルッフ膜様の構造物が形成される。(Sato R, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54:1740-49). この培養系は単層上皮層形成過程において、細胞の貪食、

ブルッフ膜様構造の形成、基底膜側へのリポタンパクの排泄などの現象が確認され、網膜色素上皮の生体機能を *in vitro* で模倣しており、網膜色素上皮細胞の生理機能の解明に非常に有用である。

近年我々は、ブルッフ膜の生成、修復過程に注目している。ブルッフ膜は網膜色素上皮細胞の基底膜であり、その働きは多岐にわたるが、生体内におけるバリアとしてブルッフ膜は網膜色素上皮細胞と脈絡膜の間で物質交換の制御をし、さらには網膜色素上皮細胞同士の接着の補助をしている。また創傷治癒にも関与する。これらの働きは加齢黄斑変性の発生機序を考える上で非常に重要である。

我々はブルッフ膜の生成・修復過程を、まずアクチンが発現し、細胞表面を葉状仮足で覆っていく、続いてエラスチンや4型コラーゲンが発現してアクチン繊維を架橋し、さらに1型コラーゲンが発現し成熟したブルッフ膜を形成されると考えている。つまり、ブルッフ膜の生成において、アクチンの発現は必須であり、トリガーとなると考えている。

細胞内のシグナル伝達においてセカンドメッセンジャーとして作用するグアニンヌクレオチド結合タンパク質(G タンパク質)はブルッフ膜のメンテナンスのために重要で、その発現および働きを解明することは、加齢黄斑変性の病態を解明することにつながると考えられる。

そこで我々の持つ網膜色素上皮細胞塊を用いて[1]RPE スフェロイドのG タンパク質の発現を検証し、[2]その役割を解明し、[3]治療法開発をめざした。

## 3. 研究の方法

### 1. ヒト網膜色素上皮の培養:

ヒト網膜色素上皮細胞は、販売目的で海外の研究所において人眼から分離・培養し、国内のメーカーが輸入したものをを用いる。培地は一般的に上皮細胞の増殖に用いられる培地

を用い、血清及び抗菌剤を除いては増殖因子や分化誘導因子などは添加しない。

## 2. 網膜色素上皮スフェロイド作成:

培養した網膜色素上皮細胞を採取し培地にメチルセルロースを添加し、96 ウェルラウンドボトムプレートに 6750 cell /well の RPE を撒き RPE スフェロイドを作製する。

## 3. RPE スフェロイドにおける G タンパク発現の検討:

RPE スフェロイド作製後、数時間(24 時間まで)ごと、その後 1 日ごとにスフェロイドを採取し、G タンパク(RhoA, Rac, Cdc42)の発現を RNA レベル、タンパク質レベルで経時的に測定する。

具体的には RNA レベルは Real time PCR で評価し、タンパク質レベルでは G-LISA®などの高感度な ELISA キットで定量、およびウェスタンブロットで評価する。

## 4. RPE スフェロイドにおけるブルッフ膜様膜構造の生成過程の検討:

RPE スフェロイド作製後、G タンパク発現評価と同じタイムテーブルでスフェロイドを経時的に採取し走査型電子顕微鏡でブルッフ膜様構造、特に葉状仮足の発現に注目する。また免疫染色でアクチンの発現状態を観察する。

## 5. G タンパク発現抑制:

継代培養中の網膜色素上皮細胞において、RPE スフェロイドを作製する直前におのこの G タンパク質(RhoA, Rac, Cdc42)の siRNA を Lipofectamine®を用いて細胞に導入する。導入効率は GFP 標識 siRNA を用いてその蛍光で評価する。

## 6. siRNA 導入網膜色素上皮細胞を用いたスフェロイド作製:

siRNA を導入した網膜色素上皮細胞を用いて RPE スフェロイドを作製し、経時的に光学顕微鏡的に観察し、サイズや表面の状態などから作用時間、siRNA の濃度などコントロール群と相違が見られ、かつ活性そのものに影響しないと思われる最適条件を探る。

## 7. G タンパク発現の検討:

siRNA 導入 RPE スフェロイドを経時的に採取し、G タンパクの発現を Real time PCR、ELISA およびウェスタンブロットで評価し、コントロール群との相違を検討する。

## 8. スフェロイドの形態、膜構造生成過程の検討:

siRNA 導入 RPE スフェロイドにおいて G タンパク発現評価と同じタイムテーブルでスフェロイドを経時的に採取し走査型電子顕微鏡でブルッフ膜様構造、特に葉状仮足の発現に注目しタンパク抑制の影響を評価する。また免疫染色でもアクチンの発現状態を観察し、コントロール群と比較する。

## 9. スフェロイドの生理機能の検討:

siRNA 導入 RPE スフェロイドにおいて、リポたんぱく排泄やドルーゼン形成といった、基底膜側の生理機能を観察し、G タンパク発現との関連を検討する。生理機能の評価は、スフェロイド作製から 1 週間ほど経過し機能が安定した時期に、ウェスタンブロットによるリポタンパクの確認、走査型顕微鏡でのスフェロイド表面の観察を行う。

## 10. 新規治療法の開発:

得られた結果から、G タンパク質のブルッフ膜メンテナンスにおける役割を検討し、加齢黄斑変性において、G タンパクの発現を制御することが、新しい治療法として応用できないか検討する。

#### 4. 研究成果

##### 1. ヒト網膜色素上皮細胞の培養およびスフェロイド作製:

入手したヒト網膜色素上皮細胞は、増殖因子なしで培養可能であり、メチルセルロースを添加してラウンドボトムプレートに撒くのみで安定してスフェロイドを作製することが可能であった。

##### 2. RPE スフェロイドにおけるブルッフ膜様膜構造の生成過程の検討:

RPE スフェロイド作製後、スフェロイドを経時的に採取し免疫染色でアクチン、オクルディンなどの発現状態を確認した。

アクチンはスフェロイド作製直後から発現していると考えられるが、western blot では3日目7日目でしかとらえることができなかった。

ブルッフ膜生成にかかわる種々のタンパク質(オクルディン、コラーゲン I、IV, エラスチン、サイトケラチン)は免疫染色によりその発現が確認できた。

##### 3. G タンパク発現抑制:

継代培養中の網膜色素上皮細胞において、RPE スフェロイドを作製する際に Rho kinase 阻害薬(Y-27632)を作用させスフェロイドを作製、対照群と経時変化を比較した。

両群において初期のスフェロイド径に有意差がみとめられ ROCK 阻害薬により早期のスフェロイドの生成が抑制されることが証明された。

免疫染色においては早期のスフェロイドは不安定で観察が困難であった。同様に電子顕微鏡による観察も困難であった。

Western blot、ELISA では両群に明らかな差を認めることができなかった。

##### 4. スフェロイドのタイムラプス撮影:

初期の変化の分子生物学的、組織学的な評価が困難であったため、スフェロイドの生成

過程観察を別の形で評価することを考えた。そこで培養中しながら顕微鏡下で細胞を観察できる装置をもちいて、作製~48 時間のスフェロイドのタイムラプス撮影をおこなった。スフェロイドが集まりながら凝集していく詳細が観察された。

##### 5. スフェロイドの生理機能の検討:

ROCK 阻害薬により、生成過程に変化が現れたことから、初期に G タンパクが深く関連していることが示唆された。アクチンはブルッフ膜形成のトリガーとなっていると考えられる。

##### 6. 今後の課題:

加齢黄斑変性の発症予防において、網膜色素上皮細胞~ブルッフ膜修復メカニズムの解明は重要で今回、G プロテインとアクチンに注目して研究をすすめたが、分子生物学的にも組織学的にも超早期の変化、またその働きを阻害した時の差異を確認することは困難であった。

今後は別の方法でブルッフ膜修復の初期のメカニズムの解明をめざし、あらたな治療薬の開発につなげていきたい。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[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]

ホームページ等

<http://ncu-ganka.jp>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

加藤 亜紀 (KATO, Aki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号:60405157