

平成 30 年 5 月 20 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20263

研究課題名(和文)AMPキナーゼを標的とした未熟児網膜症の新治療戦略

研究課題名(英文)Treatment of retinopathy of prematurity by targeting AMP-dependent kinase

研究代表者

細川 海音(Hosokawa, Mio)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：00711053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、未熟児網膜症の病態が網膜を構成する細胞の生存や蛋白発現に及ぼす影響を明らかにし、AMP依存性キナーゼの治療への応用の可能性を検討した。その結果、酸素濃度の変化や酸化ストレスは網膜色素上皮細胞におけるイオン輸送や細胞外マトリックス分解能を変化させ、未熟児網膜症の病態に関与していることが示唆された。また、AMP依存性キナーゼによってこれらの変化が阻害された。今後、未熟児網膜症に対するAMP依存性キナーゼの治療応用の可能性についてさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified the influence of retinopathy of prematurity on the survival and protein expression of cells constituting the retina and investigated the possibility of application of AMP - dependent kinase for treatment. As a result, it was suggested that changes in oxygen concentration and oxidative stress changed ion transport in retinal pigment epithelial cells and extracellular matrix resolution capability, and are involved in the pathology of retinopathy of prematurity. In addition, these changes were inhibited by AMP-dependent kinase. Further investigation is needed on the possibility of therapeutic application of AMP-dependent kinase for prematurity retinopathy in the future.

研究分野：眼科

キーワード：未熟児網膜症

### 1. 研究開始当初の背景

近年、高齢出産や不妊治療による多胎出産の増加、超低出生体重児(1000g以下)の救命率の向上を背景に、未熟児網膜症の症例数の増加や重症化が社会問題となっている。本疾患は、児への酸素投与と児の体重増加に伴って、網膜が相対的に低酸素状態になり、病的血管新生が起こり発症する。主な治療は網膜をレーザーで焼灼する光凝固術である。光凝固術は、網膜症の進行を止める効果があるが、一度生じた血管新生や増殖膜による網膜の牽引は残存する。また、網膜の組織破壊を伴うため、短期的には眼内出血、長期的には網膜剥離や斜視等の合併症を伴う問題点があり、患児とその家族の期待に真に応える治療法とはいえない。現在、光凝固術を補完する治療として、抗血管内皮増殖因子抗体の投与療法が未熟児網膜症に対して行われている。しかし、抗血管内皮増殖因子抗体療法の治療効果は限定的であり、抗血管内皮増殖因子抗体療法では網膜光凝固療法を上回るような成果は得られていない。

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の最上位の調節因子はAMP依存性キナーゼである。AMP依存性キナーゼは、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、AMP依存性キナーゼが血管新生に関わる重要なサイトカインの発現を制御する等様々な機能を有することが明らかにされている。そこで、本研究では、未熟児網膜症の病態におけるAMP依存性キナーゼの役割を解析する。また、未熟児網膜症の病態が網膜を構成する細胞の生存や蛋白発現に及ぼす影響についても検討する。

### 2. 研究の目的

本研究では、未熟児網膜症の病態におけるAMP依存性キナーゼの役割、そして、未熟児網膜症の病態が網膜を構成する細胞の生存や蛋白発現に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、1)高濃度酸素から低濃度酸素への酸素濃度の変化が網膜色素上皮細胞の蛋白発現に及ぼす影響、2)酸化ストレスが網膜色素上皮細胞の蛋白発現に及ぼす影響、そして、これらに対してAMP依存性キナーゼの活性化が及ぼす影響について検討した。

### 3. 研究の方法

網膜色素上皮細胞としては、不死化培養網膜色素上皮細胞株であるARPE-19、初代培養網膜色素上皮細胞、iPS細胞由来網膜色素上皮細胞を用いた。また、網膜グリア細胞としてはミューラー細胞の培養細胞株であるMIO-M1細胞を用いた。未熟児網膜症における酸素濃度変化を培養細胞に負荷するために、酸素濃度を変化することが可能な培養器を使用した。低酸素状態を培養細胞に負荷する他の方法として塩化コバルトを培養液に加えた。また、酸化ストレスが細胞に及ぼす影響を検討するために、過酸化水素とtert-ブチルヒドロペルオキシドを用いた。これらの細胞障害性刺激が細胞の蛋白発現に及ぼす影響については、western blot法、定量RT-PCR、免疫組織化学染色を用いて検討し、細胞遊走に及ぼす影響については、独自に開発したcell exclusion assayを用いて検討した。

### 4. 研究成果

培養時の酸素濃度を変化させた結果、初代培養網膜色素上皮細胞、iPS細胞由来網膜色素上皮細胞において蛋白発現に変化がみられた。変化のあった蛋白の一つとしては細胞間イオン輸送に関連する膜蛋白の一群が挙げられ、この結果は、塩化コバルトを用いた低酸素状態においても同様の結果が得られた。

しかし、これらの結果は ARPE-19 ではみられなかった。この結果を受け、低酸素刺激が RPE を介したイオン輸送に影響を及ぼすかどうかについて、トランスウェルを用いて検討したが、有意な変化はみられなかった。また、これらの変化に対して、AMP 依存性キナーゼの活性化剤である AICAR を用いて細胞内の AMP 依存性キナーゼを活性化させその影響を検討したが、短期間の検討では有意な影響はみられなかった。培養時の酸素濃度の変化が蛋白発現に及ぼす影響は時間に対する依存性を認めたので、より長期間における変化について検討する必要があると考え今後の課題とした。次に酸化ストレスを培養細胞に負荷する目的で、過酸化水素と tert-ブチルヒドロペルオキシドを培養細胞に負荷した。その結果、細胞外マトリックス分解酵素の発現が亢進した。この結果は AMP 依存性キナーゼの活性化によって抑制された。一方で酸化ストレス負荷は細胞遊走を有意に抑制した。網膜において抗酸化作用を示すとされているルテインを前もって作用させたが細胞遊走に有意な変化はみられなかった。以上のことから、眼内における酸素濃度の変化や酸化ストレスは網膜色素上皮細胞におけるイオン輸送や細胞外マトリックス分解を変化させ、未熟児網膜症でみられるような病的な血管新生に関与している可能性が示唆された。またこれらの変化の一部は AMP 依存性キナーゼの活性化によって阻害された。今後、未熟児網膜症の治療における AMP 依存性キナーゼ活性化の有用性について検討する必要がある。

## 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 1 件)

① Shiode Y, Morizane Y, Matoba R, Hirano M, Doi S, Toshima S, Araki R, Hosogi M,

Takahashi K, Kanzaki Y, Yonezawa T, Shiraga F. A novel cell exclusion zone assay with a barrier made from room temperature vulcanizing silicone rubber. PLoS One. 2017 Dec 21;12(12):e0190198. doi:10.1371/journal.pone.0190198. eCollection 2017. 査読有り.

[学会発表] (計 1 件)

① 塩出雄亮、細胞外基質が細胞遊走に及ぼす影響の評価を目的とした細胞遊走アッセイ、日本眼科学会、2018 年 4 月 20 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 海音 (HOSOKAWA, Mio)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：00711053

(2) 研究協力者

白神 史雄 (SHIRAGA, Fumio)  
森實 祐基 (MORIZANE, Yuki)  
塩出 雄亮 (SHIODE, Yusuke)