

令和元年6月5日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11287

研究課題名(和文) 外的ストレスによるiPS由来網膜色素上皮細胞障害の機構解明

研究課題名(英文) Mechanism of iPS RPE cell injury by external stress

研究代表者

木村 修平 (Kimura, Shuhei)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：90628710

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)：網膜疾患が網膜色素上皮細胞(RPE)の機能に及ぼす影響を検討するため、種々のストレスを負荷し、RPEの障害に關与する因子を検討し、網膜疾患に対する新たな治療法開発の基盤となる研究を行った。

RPEに対する組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)の毒性によるストレス負荷の検討では、tPAは低濃度短時間(83 µg/ml, 6時間)ではRPEに対して毒性を示さなかったが、濃度および時間依存性に毒性が増加した。tPAによる細胞毒性の原因として添加剤であるL-arginineが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜疾患は本邦の失明の主な原因であり、今後患者数が急増すると考えられている。網膜疾患において視力が障害される共通のメカニズムとして、網膜色素上皮細胞(RPE)の障害が挙げられる。本研究は、RPEにどのようなストレスがかかると障害されるのかということを探る基盤となる検討を行った。中でも、網膜下出血に対して投与される組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)のRPEに対する毒性が、濃度および時間依存性に増加する点が判明したことにより、難治である網膜下出血に対する治療選択の一つの指標になる研究結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：To examine the effect of retinal diseases on the function of retinal pigment epithelial cells (RPE), we investigated RPE injury under various stress conditions. Among them, the most clinically relevant result was the examination of the stress due to the toxicity of tissue plasminogen activator (tPA) to RPE. tPA showed no toxicity to RPE at low concentration and short time (83 µg/ml, 6 hours). However, tPA showed toxicity in concentration and time dependence. The additive L-arginine was considered as a cause of cytotoxicity by tPA.

研究分野：眼科

キーワード：網膜色素上皮細胞 外的ストレス 組織プラスミノゲン活性化因子

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19, CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜疾患は本邦の失明の主な原因であり（糖尿病網膜症：2位，網膜色素変性：3位，黄斑変性：4位，2014年厚労省），今後患者数が急増すると考えられている。また網膜剥離や網膜静脈閉塞症等，他の網膜疾患も重篤な視機能障害を引き起こし難治である。網膜疾患において視力が障害される共通のメカニズムとして，網膜色素上皮細胞（RPE）の障害が挙げられる。RPEは視細胞の恒常性の維持を司るため，RPEの障害は視細胞の細胞死につながる。ひとたび視細胞が細胞死を起こすと，網膜疾患の病勢が落ち着いても視力は回復しない。申請者は，これまでの網膜疾患の治療経験から，網膜疾患に対しては既存の治療法に加えて，RPEの障害を未然に防ぎRPEを保護する治療法の開発が必要であると考えた。網膜疾患におけるRPEを障害する因子として各種ストレスが知られている。具体的には炎症や虚血に伴う酸化ストレス，網膜表面の病的な膜形成によってRPEが牽引される機械的ストレス，そして網膜疾患の治療薬による薬剤性ストレスである。

iPS細胞は分化多能性と自己複製能を有する細胞であり，現在様々な疾患に対して創薬や再生医療分野での活用が進められている。特に加齢黄斑変性に対する再生医療は最も臨床応用が進んでおり，2014年に理化学研究所によって世界で初めてiPS-RPEの移植手術が行われた。iPS-RPEの移植手術が早期に実現した背景には，iPS-RPEが形態学的にも細胞機能の面でもヒトのRPEと同等の特性を有すること，また細胞の安全性が十分に確認されている。

2. 研究の目的

ヒト初代培養網膜色素上皮細胞(pRPE)，人工多能性幹細胞由来RPE (iPS-RPE)，ARPE-19を用いて，網膜疾患がRPEの機能に及ぼす影響を検討する。さらに，RPEの障害に関与する因子を分子生物学的に明らかにし，網膜疾患に対する新たな治療法開発の基盤となる研究を行う。

3. 研究の方法

(3-1) pRPE, iPS-RPE, ARPE-19 に対する組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA) による薬剤ストレスの検討

RPE に tPA (83 µg/ml, 250 µg/ml), L-arginine (2.7mg/ml, 8.3mg/ml) のいずれかを作用させ (tPA は 6 および 12 時間, L-arginine は 12 時間), MTS 法を用いて細胞毒性を評価した。次に, RPE に tPA(83 µg/ml, 6 時間) を作用させ, 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) と色素上皮由来因子 (PEDF) の産生量を ELISA 法を用いて測定した。

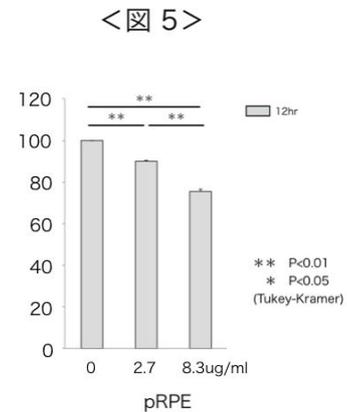
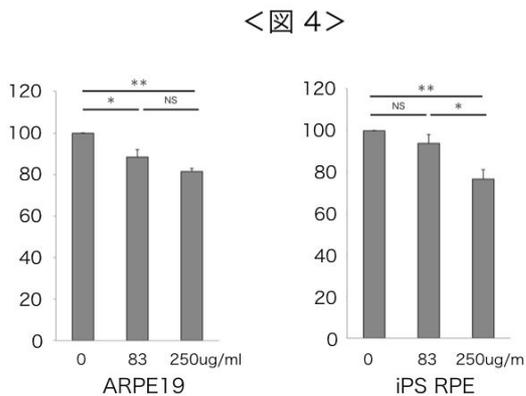
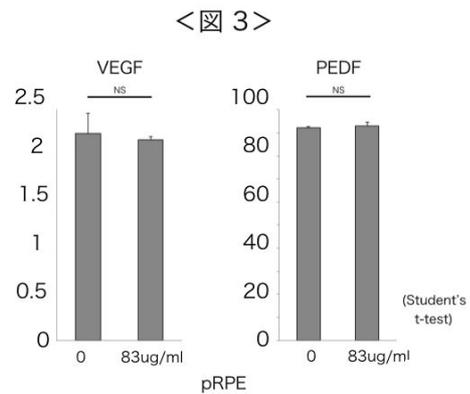
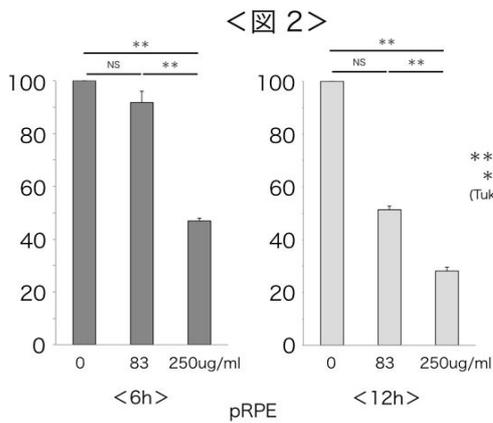
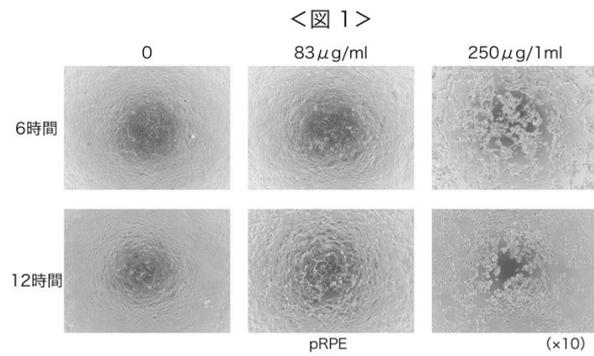
(3-2) ARPE-19 に対する慢性酸化ストレスが及ぼす影響の検討

ARPE-19 に対して, tert-Butylhydroperoxide (8mM) を 1 時間/日 x 5 日間負荷 (慢性酸化ストレスを負荷) した場合について培養上清中の MMP-2, 3, 9 量を ELISA 法を用いて測定した。

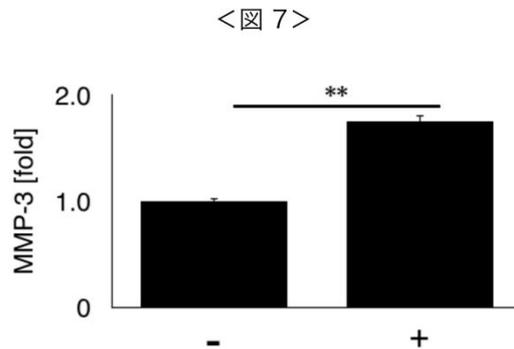
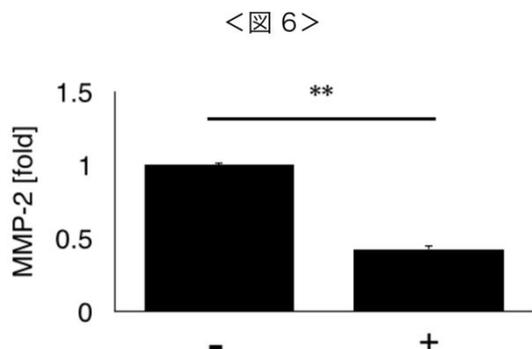
4. 研究成果

(4-1) pRPE に tPA 83 µg/ml を 6 時間作用させた群では有意な細胞毒性を認めなかったが, 12 時間作用させると有意な細胞毒性を認めた ($P < 0.01$, Tukey-Kramer, 図 1, 2)。tPA 250 µg/ml を作用させた群ではいずれも有意な細胞毒性を認めた (いずれも $P < 0.01$, Tukey-Kramer)。

tPA(83 μg/ml, 6時間)は VEGF と PEDF の産生に有意な影響を及ぼさなかった (図 3). iPS-RPE, ARPE-19 に細胞を変えて同様の検討を行ったが, pRPE の結果と同傾向で, 濃度および時間依存性に毒性を示した (図 4). tPA による細胞毒性の原因を探るため, 添加剤である L-arginine による負荷を行ったところ, 濃度依存的に細胞毒性を認め, L-arginine が tPA の網膜毒性の原因であることが考えられた (図 5).



(4-2) 慢性酸化ストレスによって MMP-2 の産生が有意に減少し (0.4 倍, $p < 0.01$, 図 6). MMP-3 の産生は増加したが (1.8 倍, $p < 0.01$, 図 7). MMP-9 は検出限界以下であった. 慢性酸化ストレスで RPE の MMP の産生に及ぼす影響は, MMP の種類により産生が異なる可能性が示唆された.



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計2件）

Kimura S, Morizane Y, Hosokawa M, Shiode Y, Doi S, Hosogi M, Fujiwara A, Okanouchi T, Inoue Y, Shiraga F, Long-term outcomes of vitrectomy combined with subretinal tissue plasminogen activator injection for submacular hemorrhage associated with polypoidal choroidal vasculopathy. Jpn J Ophthalmol. 2019 accepted 査読あり

Kimura S, Morizane Y, Matoba R, Hosokawa M, Shiode Y, Hirano M, Doi S, Toshima S, Takahashi K, Hosogi M, Fujiwara A, Shiraga F, Retinal sensitivity after displacement of submacular hemorrhage due to polypoidal choroidal vasculopathy: effectiveness and safety of subretinal tissue plasminogen activator. Jpn J Ophthalmol. 2017 Nov;61(6):472-478. 査読あり

〔学会発表〕（計2件）

Shuhei Kimura, Yuki Morizane, Mio Morizane Hosokawa, Yusuke Shiode, Masayuki Hirano, Shinichiro Doi, Shinji Toshima, Kosuke Takahashi, Yuki Kanzaki, Mika Hosogi, Atsushi Fujiwara, Fumio Shiraga, Long-term outcomes of vitrectomy combined with subretinal tissue plasminogen activator injection for submacular hemorrhage associated with polypoidal choroidal vasculopathy. ARVO, 2018

木村修平, 森實祐基, 細川海音, 塩出雄亮, 平野雅幸, 土居真一郎, 戸島慎二, 高橋耕介, 松前洋, 細木三佳, 藤原篤之, 岡野内俊雄, 白神史雄. PCVによる黄斑下血腫に対する t-PA 網膜下注入併用硝子体手術の長期成績. 網膜硝子体学会, 2017 年

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大内 淑代 (Hideyo Ohuchi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00253229

(2)研究協力者

白神 史雄 (Fumio Shiraga)

森實 祐基 (Yuki Morizane)

戸島 慎二 (Shinji Toshima)

荒木 亮一 (Ryoichi Araki)