

平成 30 年 5 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10867

研究課題名(和文) 網膜におけるキサントフィルの新機能探索と代謝調節機構の解明

研究課題名(英文) Metabolism and function of xanthophyll in the retina

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、キサントフィルが網膜内に取り込まれる機構や、網膜の機能に果たす役割を明らかにすることを目的として、網膜を構成する細胞である網膜色素上皮細胞と網膜グリア細胞を用いて、キサントフィルの細胞内への取り込みとその経路、そして細胞の遊走に及ぼす影響について検討した。ルテインは濃度および時間依存性に細胞内に取り込まれることが明らかになった。既知のルテイン輸送経路を阻害してもルテインの取り込みに有意な変化はみられなかった。また、ルテインは細胞遊走に対して有意な影響を及ぼさなかった。今後、細胞内ルテインの代謝とルテインの役割について詳細に検討することが課題と考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, with the aim of clarifying the mechanism by which xanthophyll is incorporated into the retina and the role played by retinal function, we investigated the uptake into the cell, its pathway, and the effect on cell migration by using retinal pigment epithelial cells and retinal glial cells which constitute the retina. It was revealed that lutein is taken up into cells in concentration and time dependence. Inhibition of the known lutein transport pathway did not cause a significant change in lutein uptake. Also, lutein had no significant effect on cell migration. It is important to investigate the metabolism of intracellular lutein and the role of lutein further in the near future.

研究分野：眼科

キーワード：キサントフィル

1. 研究開始当初の背景

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位であり、今後患者数が急増すると考えられている。加齢黄斑変性は酸化ストレスによる網膜色素上皮細胞の障害を背景に、網膜に病的な血管新生が起り視力が低下する。現在、加齢黄斑変性に対して抗 VEGF 抗体の投与が行われているが、視力の回復は難しく患者の期待に真に応える治療法ではない。そのため、加齢黄斑変性は予防が極めて重要であり、酸化ストレスによる網膜色素上皮細胞の障害を未然に防ぐ方法の開発が必要である。

キサントフィルは生体色素の一つで緑黄色野菜に多く含まれる。これまでに、1) 網膜内のキサントフィル含有量は他の臓器に比べて高く、キサントフィルの中でも特にルテインとゼアキサントフィルが存在すること、2) 加齢黄斑変性患者の網膜はキサントフィル含有量が有意に低下していること、3) キサントフィルの摂取量を増やすと加齢黄斑変性の発症を予防できること(米国 NIH, AREDS2 研究)が明らかにされている。網膜に存在するキサントフィルは、ルテインとゼアキサントフィルである。ルテインとゼアキサントフィルは低比重リポ蛋白と結合し、血行性、リンパ行性に細胞へ運搬され細胞内に取り込まれる。そして最終的に自己消化(オートファジー)によって処理される。網膜においてキサントフィルは、1) 活性酸素の消去、および 2) 網膜色素上皮細胞を障害する青色光の遮断、によって網膜色素上皮細胞および網膜を保護すると考えられている。

申請者は、分層黄斑円孔の手術において、キサントフィルを意図的に黄斑部に残すと、黄斑形態と視力が改善することを見出した(Shiraga, Morizane et al. Retina 2013)。この臨床研究を通して、「キサントフィルには、抗酸化作用や青色光遮断作用以外の作用、例えば網膜神経細胞への栄養作用や創傷治

癒を亢進する作用があるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

これまでに、キサントフィルが網膜色素上皮細胞に取り込まれる機構や、取り込まれたキサントフィルが網膜色素上皮細胞の機能に及ぼす影響については十分な検討がなされていない。そこで、本研究では、1) 網膜色素上皮細胞におけるキサントフィルの代謝の特性を明らかにすること、2) 網膜色素上皮細胞におけるキサントフィルの取り込みと排出の経路を明らかにすること、3) 網膜色素上皮細胞の機能に対してキサントフィルが及ぼす影響を明らかにすること、4) 網膜における創傷治癒において重要な役割を果たすグリア細胞に着目し、その機能にキサントフィルが及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

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ラー細胞の培養細胞株である MIO-M1 細胞を用いた。キサントフィルとしては、網膜に存在する主要なキサントフィルであるルテインを用いた。上記の細胞をトランスウェルに培養し、培養上清にルテインを付加し、一定時間培養後に細胞を採取し、細胞を溶解し、細胞内に取り込まれたルテインの量を経時的に高速液体クロマトグラフィーを用いて定量した。次に、ルテインの細胞内取り込みに関与すると考えられる取り込み経路に作用する薬剤を前もって作用させ、網膜色素上皮細胞におけるルテインの取り込みに及ぼす影響を検討した。最後に、独自に開発した細胞遊走アッセイを用いて、網膜色素上皮細胞とミュラー細胞の細胞遊走に対してル

テインが及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

ARPE-19 をトランスウェルに培養し、培養上清中に市販のルテイン原末を加えたところ、脂溶性であるルテインが培養上清中では粒状の塊となり、網膜色素上皮細胞への取り込み量の測定を困難にすることがわかった。そこで、ルテインをミセル化したもの、粒の直径をナノメートルレベルまで小さくしたナノ化ルテインの両者について検討を行い、ナノ化ルテインを下方のトランスウェルに付加することによって安定した結果が得られることがわかった。そして、網膜色素上皮細胞におけるルテインの取り込み量は濃度依存性にまた時間依存性に増加することがわかった。しかし、付加するルテインの濃度が10 μ M 以上では濃度依存性が明らかではなくなること、同一の濃度において48時間以上の経過では取り込み量に大きな差がみられないことがわかった。さらに、ARPE-19 と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では同一条件における細胞内取り込み量はほぼ同一であることがわかった。ルテインを細胞内に取り込ませた後に、時間経過とともに細胞内のルテイン量がどのように変化するかを検討した。しかし、細胞内のルテインの排出量を培養上清から検出することはできなかった。微量の変化を検出する測定方法の改善が必要であると考えられ今後の課題とした。次に、ルテインの細胞内取り込みに重要な経路であると考えられている、SR-B1 および網膜色素上皮細胞の食作用の阻害薬である、BLT-1、サイトカラシン、クロルプロマジンを用いて、これらの阻害薬が網膜色素上皮細胞におけるルテインの取り込みに及ぼす影響を検討した。その結果、いずれの阻害薬も軽度の取り込み阻害効果を示したものの、有意な阻害効果を示さなかった。また、付加するルテインの濃度に

よっても阻害効果が異なり、安定した結果が得られなかった。次に、ルテインの輸送蛋白として重要な SR-B1 や GSTP1 と相互に作用して脂質代謝や自己消化の調節に関与されていると考えられている AMP 依存性キナーゼの活性が網膜色素上皮細胞におけるルテインの取り込みに及ぼす影響を検討した。AMP 依存性キナーゼの活性化剤である AICAR を網膜色素上皮細胞に作用させ、ルテインの取り込み量を計測したが、AMP 依存性キナーゼの活性化はルテインの取り込み量に有意な影響を及ぼさなかった。以上の結果から、本研究によって、網膜色素上皮細胞におけるルテインの取り込み量を評価する実験系を新たに構築した。また、これまでに考えられてきたルテインの取り込み経路が網膜色素上皮細胞においても重要な経路であるかどうかについては、さらなる検討が必要であることが示唆された。これまでに見出されていない新たな経路や運搬輸送体によって、ルテインの取り込みが調整されている可能性がある。さらに、細胞内に取り込まれたルテインは細胞遊走には影響しない可能性が示唆された。一方で、本研究で用いた実験系では、微細なルテイン量の変化を十分に検出できていない可能性も考えられた。今後、ルテインの細胞内の動態を詳細に明らかにできれば、網膜色素上皮細胞へのルテインの取り込みを変化させ、網膜色素上皮細胞やグリア細胞の機能に及ぼす影響を明らかにすることが可能となると考えられた。

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3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.

② Shiode Y, Morizane Y, Matoba R, Hirano M, Doi S, Toshima S, Takahashi K, Araki R, Kanzaki Y, Hosogi M, Yonezawa T, Yoshida A, Shiraga F. The Role of Inverted Internal Limiting Membrane Flap in Macular Hole Closure. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2017 Sep 1;58(11):4847-4855. doi:10.1167/iovs.17-21756. 査読有り.

③ Matoba R, Morizane Y, Shiode Y, Hirano M, Doi S, Toshima S, Araki R, Hosogi M, Yonezawa T, Shiraga F. Suppressive effect of AMP-activated protein kinase on the epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelial cells. PLoS One. 2017 Jul 18;12(7):e0181481. doi:10.1371/journal.pone.0181481. 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).

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

菅原 満 (SUGAWARA, Mitsuru)

北海道大学・薬学研究科 (研究院)・教授

研究者番号：60332467

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) 研究協力者

塩出 雄亮 (SHIODE, Yusuke)

的場 亮 (Matoba, Ryo)