

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20270

研究課題名(和文) 極性をもつ網膜色素上皮細胞を用いた加齢黄斑変性の病態解明

研究課題名(英文) Pathology of age-related macular degeneration using polarized RPE cells

研究代表者

寺崎 寛人(Terasaki, Hiroto)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：20746888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：臨床で用いられている3種類の血管内皮細胞増殖因子(VEGF)阻害薬(Bevacizumab/Ranibizumab/Aflibercept)の極性をもつ網膜色素上皮細胞(RPE)に対する影響を調べた。各薬剤ともに極性RPEに対して細胞毒性を持たず、バリア機能に影響しないことが分かった。その一方で、VEGF抑制作用や細胞の透過性には薬剤間で違いがあることが分かった。今回の結果から、臨床所見に応じて抗VEGF薬を使い分けることでより良い治療効果が得られる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Effects of anti-vascular endothelial growth factor(VEGF) on polarized RPE cells were studied. All of these drugs did not affect cellular toxicity or barrier function in polarized RPE cells. However, we found that there were differences of anti-VEGF effect and permeability between drugs in polarized RPE cells. These results suggested that we might be able to clarify the choice of anti-VEGF drugs based upon clinical findings.

研究分野：眼科学

キーワード：加齢黄斑変性 網膜色素上皮細胞 血管内皮細胞増殖因子

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (Age-related macular degeneration, AMD) は先進国における中途失明のトップを占める深刻な疾患である。本邦に多い Wet AMD では脈絡膜から新生血管を生じ、その出血により網膜下に線維化を起こすことで視機能の悪化に繋がる。網膜色素上皮細胞 (Retinal pigment epithelium cells, RPE) は、生体内で感覚網膜や脈絡膜の恒常性の維持に重要な役割をもち、視機能の維持に不可欠な上皮細胞であり、解剖学的にも分子生物学的にも AMD の発症に密接に関与していると考えられている。

我々は生体内の RPE に外見が類似し、分子生物学的にも生体の RPE の性質に近い、極性をもつ RPE (polarized RPE, 極性 RPE) の培養系を確立し (Sonoda et al. Nat Protoc. 2009)、これを用いて AMD の病態メカニズムの新知見を発見し多くの論文を報告している。

今日、Wet AMD に対し病的な新生血管からの漏出を抑える数種類の抗 VEGF (vascular endothelial growth factor) 薬の硝子体内注射が臨床で用いられており、一定の効果を得ている (図 3)。その一方で、再発を防ぐために抗 VEGF 薬を定期的に投与し続ける症例も多く、病態に応じて適切な薬剤を選び、最小限の投与回数で最大の治療効果を得ることは患者自身のみならず、医療経済面でも大きな課題である (薬価: 16-18 万円/本)。

また、脈絡膜の血管の維持に重要な蛋白でもある VEGF を抑制することで生じる脈絡膜萎縮などの副作用への懸念も生じている (Terasaki et al. Plos one 2013)。しかし、これ程臨床で普及して

いるにも関わらず、抗 VEGF 薬が RPE に与える影響を調べた基礎研究は少なく、病形に応じた薬剤の選択や適切な投与回数に関する分子生物学的な裏付けは乏しい。

2. 研究の目的

本研究では AMD の治療に対し現在臨床で用いられている 3 種類の VEGF 薬が極性 RPE に与える影響について調べた。

3. 研究の方法

極性 RPE の培養については、まずは RPE 細胞をフラスコで Confluent になるまで培養し、その後フィブロネクチンでコーティングしたトランスウェル上に細胞を播種した。RPE 細胞は播種後数日でコンフルエントになり、時間とともに色素を持ち始め、形状も in vivo の RPE の様に六角形状になっていった。2 週間ほど経過すると、TER も上昇し、VEGF の分泌も極性を示すようになる。本研究では TER が $200 \Omega \cdot \text{cm}$ 以上の細胞を用いて研究を行った。

今後の実験を正確に行う為に 3 種類の抗 VEGF 薬の細胞毒性を調べた。上方のチャンバーに臨床的に RPE が暴露すると思われる最大濃度の抗 VEGF 薬を加え、24 時間後の RPE 細胞に TUNEL 染色等で細胞毒性を評価した。更に、以下の研究は細胞障害を認めない濃度で行った。

次に抗 VEGF 薬が極性 RPE のバリア機能に与える影響を調べる。抗 VEGF 薬を極性 RPE の上方のチャンバーに添加し、24 時間後の経上皮抵抗値 (上皮細胞のバリア機能を反映する) を測定し、比較した。また、細胞間のバリアとなっている細胞接着に関与するタンパク質の発現に変化がないか、ZO-1・Occludin 等の Tight junction associated protein の発現の変化を免疫染色・ウエスタンブロットで解析する。

極性 RPE は生体の RPE と同様に VEGF を特に下方 (基底膜側) に分泌するが、こ

の RPE の生理的な分泌パターンに、添加した抗 VEGF 薬がどのような影響を与えるかを、抗 VEGF 薬添加後の培養液を回収し、ELISA 法で測定した。

最後に、臨床において AMD の中でも RPE の下に存在する新生血管に対する治療効果に各薬剤で差があるという報告があり、それぞれの薬剤の RPE 透過率には違いがある可能性があるが、それを調べた報告はなかったため、上方の培地に抗 VEGF 薬を添加し、下の培地に透過した薬剤の量を ELISA 法で測定した。

上皮細胞の物質透過には paracellular pathway, intracellular pathway(クラスリン依存性エンドサイトーシス、ファゴサイトーシス、FcRn を介したエンドサイトーシスなど)があるが其々の阻害剤を用いて各薬剤の透過の機序を検討した。

4. 研究成果

(1) 抗 VEGF 薬の極性 RPE に対する細胞毒性について TUNEL 染色や MTT 試験を用いて調べたが、いずれの抗 VEGF 薬も極性 RPE に対し細胞毒性を認めず、今回の条件では極性 RPE に対し安全な薬剤であることが示唆された。

(2) 抗 VEGF 薬が極性 RPE のバリア機能に与える影響を調べるために極性 RPE に抗 VEGF 薬を 24 時間暴露させて、その前後で TER を測定した。その結果、いずれの薬剤においても TER の値は有意な変化を示さなかった。また、極性 RPE のバリア機能に重要なタイトジャンクション関連タンパク質である ZO-1 の免疫染色では、その発現パターンは治療前後で変化を示さなかった。以上の結果から抗 VEGF 薬は極性 RPE のバリア機能に影響を与えないことが示唆された。

(3) 極性 RPE が分泌する VEGF に対する各薬剤の抑制作用を調べた。極性 RPE は上方(感覚網膜側)と基底膜側(脈絡膜側)に VEGF を分泌するが、上方の VEGF に関してはいずれの薬剤でも VEGF をほぼ完全に抑制したが、基底膜側の VEGF 抑制作用は薬剤によって違いがみられ、Aflibercept、Ranibizumab、Bevacizumab の順に抑制作用が強力であった。

また、極性 RPE の透過率は Ranibizumab、Bevacizumab、Aflibercept の順であった。

(4) 抗 VEGF 薬によって極性 RPE の透過性の違いに差があることが分かったので、次に抗 VEGF 薬透過のメカニズムについて、Ranibizumab と Bevacizumab を用いて検証した。方法で記載した細胞内経路の薬剤性阻害剤を用いると、Bevacizumab、Ranibizumab の両薬剤共に、Protein kinase C (PKC) の阻害剤である Staurosporine によってその透過性が有意に低下した。PKC はアクチンの細胞骨格の変化や RPE の Phagocytosis など、細胞の機能に重要な経路であり、両薬剤の透過には、少なくとも一部は RPE の Phagocytosis が関与している可能性が示唆された。また、阻害剤の効果は多くの場合、Bevacizumab の方が大きく阻害される傾向があったので、両薬剤の RPE の透過は異なる機序で生じている可能性が考えられた。

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 11 件)

- 1, Yoshihara, N., H. Terasaki, M. Shirasawa, H. Kawano, S. Sonoda, M. Yamaguchi, T. Hashiguchi, T. Hisatomi, T. Ishibashi and T. Sakamoto (2017). "Permeability and Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Effects of Bevacizumab, Ranibizumab, and Aflibercept in Polarized Retinal Pigment Epithelial Layer in Vitro." Retina **37**(1): 179-190. (査読有)
- 2, Kawano, H., S. Sonoda, S. Saito, H. Terasaki and T. Sakamoto (2017). "Choroidal Structure Altered by Degeneration of Retina in Eyes with Retinitis Pigmentosa." Retina. (査読有)
- 3, Matsunaga, D., P. G. Sreekumar, K. Ishikawa, H. Terasaki, E. Barron, P. Cohen, R. Kannan and D. R. Hinton (2016). "Humanin Protects RPE Cells from Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis by Upregulation of Mitochondrial Glutathione." PLoS One **11**(10): e0165150. (査読有)
- 4, Nakazawa, M., H. Terasaki, T.

Yamashita, A. Uemura and T. Sakamoto (2016). "Changes in visual field defects during 10-year follow-up for indocyanine green-assisted macular hole surgery." Jpn J Ophthalmol **60**(5): 383-387. (査読有)

5, Shiihara, H., H. Terasaki, N. Yoshihara, M. Shirasawa, H. Otsuka, T. Yamashita, K. Yamakiri, S. Sonoda and T. Sakamoto (2016). "Amount of Residual Silicone Oil in Vitreous Cavity Is Significantly Correlated with Axial Length." Retina **36**(1): 181-187. (査読有)

6, Terasaki, H., T. Yamashita, N. Yoshihara, Y. Kii, M. Tanaka, K. Nakao and T. Sakamoto (2016). "Location of Tessellations in Ocular Fundus and Their Associations with Optic Disc Tilt, Optic Disc Area, and Axial Length in Young Healthy Eyes." PLoS One **11**(6): e0156842. (査読有)

7, Sonoda, S., T. Sakamoto, T. Yamashita, E. Uchino, H. Kawano, N. Yoshihara, H. Terasaki, M. Shirasawa, M. Tomita and T. Ishibashi (2015). "Luminal and stromal areas of choroid determined by binarization method of optical coherence tomographic images." Am J Ophthalmol **159**(6): 1123-1131 e1121. (査読有)

8, Terasaki, H., K. Nakao, K. Fujiwara, T. Hiraki, W. Shirasawa, N. Abematsu, S. Yonezawa and T. Sakamoto (2015). "Non-rhegmatogenous retinal detachment associated with hair-like object in vitreous: a case report." Clin Exp Optom **98**(4): 379-380. (査読有)

9, Terasaki, H., T. Sakamoto, M. Shirasawa, N. Yoshihara, H. Otsuka, S. Sonoda, T. Hisatomi and T. Ishibashi (2015). "Penetration of bevacizumab and ranibizumab through retinal pigment epithelial layer in vitro." Retina **35**(5):

1007-1015. (査読有)

10, Yamashita, T., T. Sakamoto, H. Terasaki, M. Tanaka, Y. Kii, E. Uchino, T. Hisatomi and K. Nakao (2015). "Association of retinal thickness and optic disc-to-fovea angle to axial length of young healthy eyes." Clin Ophthalmol **9**: 2235-2241. (査読有)

11, Ishikawa, K., S. He, H. Terasaki, H. Nazari, H. Zhang, C. Spee, R. Kannan and D. R. Hinton (2015). "Resveratrol inhibits epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelium and development of proliferative vitreoretinopathy." Sci Rep **5**: 16386. (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

1, Sreekumar PG, Terasaki H., Spee C, Mehta HH, Wan J, Yen K, Cohen P, Kannan R, Hinton DR. Humanin enhances mitochondrial biogenesis in RPE cells. 2016年5月4日、米国ワシントン州シアトル

2, Terasaki H., Sreekumar PG, Sonoda S, Spee C, Sakamoto T, Hinton DR, Kannan R. Increased expression and apical distribution of beta A3/A1 crystallin in polarized RPE cells. 2016年5月3日、米国ワシントン州シアトル

3, 寺崎寛人、抗 VEGF 薬が極性網膜色素上皮細胞に与える影響と薬剤による違い、2015年5月29日~31日、鹿児島市鹿児島県医師会館

4, Terasaki H., Yoshihara N, Shirasawa M, Sonoda S, Sakamoto T. The effect of aflibercept on the barrier function of retinal pigment epithelial cells in vitro. The annual meeting of the association of research in vision and ophthalmology. 2015年5月9日~13日、米国コロラド州デンバー

5, 寺崎寛人、極性網膜色素上皮細胞を用いた加齢黄斑変性の病態と抗 VEGF 薬の作用機序の解明、2015年4月16日~19日、北海道札幌市さっぽろ芸文館 ニトリ文化ホール

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺崎 寛人 (Terasaki, Hiroto)

鹿児島大学医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：20746888