

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15157

研究課題名(和文) 加齢黄斑変性症病態理解に向けた網膜色素上皮細胞Cx43のPGE2放出への役割解明

研究課題名(英文) Evaluation of Cx43 proteins for PGE2 release from retinal pigment epithelial cells for understanding the pathological role in age-related macular degeneration.

研究代表者

細谷 健一 (HOSOYA, Ken-ichi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：70301033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、加齢黄斑変性症の発症・進行に関与する物質の一つ、プロスタグランジン(PG)E2について、網膜色素上皮(RPE)細胞における放出機能変動にコネクシン43(Cx43)が関与する可能性検証を目的とした。通常条件下にて細胞膜表面を透過しない蛍光色素についてRPE細胞間及びhemichannel開口刺激時における輸送が観察され、Cx43特異的遺伝子ノックダウン環境下においてその輸送が低下した。さらに、PGE2放出はhemichannel阻害剤共存下において低下したことから、病態時におけるRPE細胞からのPGE2放出にCx43が関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aim to evaluate the role of connexin (Cx) 43 on the retinal pigment epithelial (RPE) cells in the alteration of prostaglandin (PG) E2 release under the pathological conditions including age-related macular degeneration. Under the normal conditions, several fluorescent substances, such as Lucifer Yellow, do not cross the plasma membrane of the cells. With the stimulus which open the hemichannels, these fluorescent substances were actively taken up into RPE cells. In addition, gene-knockdown for Cx43 in RPE cells caused the decrease of hemichannel mediated uptake of the substances. Moreover, PGE2 release from the RPE cells was significantly decreased in the presence of a hemichannel inhibitor. Taking these lines of evidence into consideration, it is suggested that Cx43 is involved in PGE2 release under the pathological conditions.

研究分野：医療系薬学

キーワード：薬学 網膜色素上皮細胞 プロスタグランジン 外側血液網膜関門 ヘミチャネル Cx43 PGE2

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性症 (AMD) は欧米における 50 歳以上中途失明原因が 1 位であり、日本でも失明による身体障害者手帳受給率が 2004 年で第 4 位から年々増加している。AMD 中でも深刻な滲出型 (wet) AMD について、各種治療戦略が立てられているものの、多くの問題を有し、これらは、臨床研究が進行している人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 由来 RPE 細胞シート移植でも、克服できていない。これら AMD 治療法の限界を突破するにあたり、新たな治療戦略構築が必須と言える。

AMD の病態は、後眼部に沈着するドルーセン由来炎症などにてプロスタグランジン E₂ (PGE₂) などの各種血管内皮細胞メディエーターが網膜色素上皮 (RPE) 細胞外に放出され、脆弱な血管形成が誘導されることで、増悪する。この PGE₂ の RPE 細胞における動態解明を目的に申請者は予備的検証を進めたところ、以下の知見を見出した。

1. 炎症惹起物質リポ多糖 (LPS) 処理時間依存的に RPE 細胞からの PGE₂ 放出は増大する。
2. 正常状態 RPE 細胞からの PGE₂ 放出は既報 PGE₂ トランスポーター阻害剤と比してコネキシン阻害剤によって強力に阻害される。
3. コネキシン分子種の一つ Cx43 は、免疫組織化学的解析の結果、細胞間連結部位のみならず、細胞内外を隔てる形質膜にも局在し、hemichannel として機能することが示唆された。

hemichannel は、環境変化に応じ開口し、細胞内外の基質輸送を促進することから、『Cx43 は異常時における促進的 PGE₂ 放出を理解する上で重要な分子』といえる。PGE₂ 介在脈絡膜内血管新生の抑制という新たな AMD 治療法を構築する上で Cx43 の有望性を解明するため、本課題計画の立案に至った。

2. 研究の目的

本研究は、申請者の予備的検証結果から導かれる仮説『加齢黄斑変性症 (AMD) の発症・進行に関与する物質の一つ、PGE₂ の炎症時網膜色素上皮 (RPE) 細胞における放出機能変動にコネキシン 43 (Cx43) が関与する』ことを実証し、AMD 新規治療法確立の上で Cx43 が有望な候補となること明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト網膜色素上皮細胞株 (ARPE-19 細胞) の培養

ARPE-19 細胞 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) の培地として、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM): Nutrient Mixture F-12 (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) に、20 mM NaHCO₃ と 100 U/mL benzylpenicillin potassium、100 µg/mL streptomycin、10% fetal bovine serum

(FBS) を添加したものをを用いた。ARPE-19 細胞は上記培地中にて加湿した 37°C 及び 5% CO₂/air 条件下にて維持培養した。

(2) ARPE-19 細胞における gap junction 機能評価

ARPE-19 細胞を 35 mM No.1 ガラスボトム dish に、 5.0×10^5 cells/dish となるように播種し、8 日間培養した。細胞を 37°C に加温した extracellular fluid (ECF) buffer (122 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 3 mM KCl, 0.4 mM K₂HPO₄, 1.2 mM MgSO₄, 1.4 mM CaCl₂, 10 mM D-glucose, 10 mM HEPES; pH 7.4) にて洗浄後、1 mM Lucifer Yellow または 500 µM FITC-dextran を添加した。速やかに外科用メスでガラスボトムを scrape し、37°C 条件下にて 5 分間 incubate した。蛍光の拡散は共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP5; Leica, Heidelberg, Germany) にて観察し、取得した写真は Image J software (National Institutes of Health, USA) を用い拡散距離を定量化した。

(3) ARPE-19 細胞における hemichannel 機能評価

ARPE-19 細胞を 24-well plate に播種し、confluent に達した際に実験を行った。本細胞を ECF buffer にて洗浄後、ECF buffer もしくはヘミチャネル開口を促す Ca²⁺-free ECF buffer にて 37°C 条件下 5 分間 pre-incubation した。その後、ヘミチャネル基質である各種生細胞非透過性蛍光基質を加え、37°C 条件下にて取り込み反応を開始した。指定時間後、4°C ECF buffer にて 3 回細胞を洗浄した。細胞は ECF buffer 中にて sonication することで破碎し、破碎液中の蛍光強度を SpectraMax i3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) にて測定した。取り込み量を well 内のタンパク質量で補正するため、並べて detergent-compatible protein assay kit (BIO-RAD; Hercules, CA, USA) にて破碎液のタンパク質濃度を測定した。

Cx43 遺伝子ノックダウンを Cx43 特異的 small interfering RNA (siRNA) 導入にて行った。具体的には、ARPE-19 細胞を 0.9×10^5 cells/well となるように 24-well plate に播種し、1 日培養後、LipofectamineTM RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を導入試薬として、25 nM Cx43-specific siRNA を transfection した。本処理 2 日後に輸送解析を実施した。Cx43 タンパク質発現量低下は、ARPE-19 細胞 whole lysate をサンプルとした Western blot 法にて評価した (詳細は後述)。

(4) 抗 Cx43 抗体作出

マウス Cx43 の 349-382 アミノ酸部位を epitope とし、対象塩基配列を pGEX-4T2 plasmid (GE Healthcare, Chalfont, ST. Giles, UK) に導入後、glutathione S-transferase (GST) 結合タンパク質として、作出・精製した。本 recombinant タンパク質と Freund's incomplete

adjuvant (Difco, Detroit, MI, USA) とのエマルジョンを作成し、モルモットに対し2週間間隔にて6回投与した。投与後のモルモット血清を protein G Sepharose と recombinant タンパク質を結合させた cyanogen bromide-activated Sepharose 4B (GE Healthcare) を用いて精製し、抗 Cx43 ポリクローナル抗体を得た。

(5) Tet-on/off Cx43 過剰発現細胞株構築

マウス Cx43 全長を pcDNATM4/TO plasmid (Thermo Fisher Scientific) に挿入した。本 plasmid と pcDNATM6/TR plasmid を LipofectamineTM 2000 を用いて HeLa 細胞に transfection した。導入後1日目に 1 µg/mL tetracycline 含有培地にて24時間処理することで Cx43 タンパク質の HeLa 細胞における発現を誘導した。

(6) Cx43 タンパク質発現解析

ddY マウス脳及び HeLa 細胞の粗精製膜画分は suspension buffer (320 mM sucrose, 10 mM HEPES-NaOH, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1/100 容 protease inhibitor cocktail (sigma), pH 7.4) 中にてホモジナイズ次いで窒素キャビテーション (900 psi, 4°C, 30 分) 後に、遠心 (10,000 ×g, 4°C, 15 分) 次いで超遠心 (100,000 ×g, 4°C, 60 分) し、pellet として得た。siRNA 処理後の ARPE-19 細胞 whole lysate は、lysis buffer (50 mM Tri-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, pH 7.4) にて可溶化し、遠心後 (10,000 ×g, 4°C, 15 分) の上清として得た。

それぞれのタンパク質サンプルは SDS-PAGE にて分離後、PVDF membrane に転写した。5%脱脂粉乳を含んだ TBS-0.1% Tween-20 にて処理後に抗 Cx43 抗体と反応させた。HRP-conjugated モルモット IgG と反応後、化学発光を ECL Prime Western Blotting Detection System (GE Healthcare) にて検出した。

(7) 免疫組織化学的解析

マウスに対し、4% formaldehyde 含有 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) にて全身灌流後に眼球を摘出した。30% sucrose 溶液にて cryoprotection 後に cryostat (CM1900; Leica, Heidelberg, Germany) にて 15 µm 厚の切片を作成した。0.1% Triton X-100/PBS(-) にて透過処理後に各種 counter-stain 用抗体共存・非共存条件下にて抗 Cx43 抗体と反応させた。Alexa Fluor 488 標識もしくは Cy3 標識二次抗体と反応させ、核を 4 µM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) にて標識後に共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) にて観察した。

(8) 初代培養マウス RPE 細胞調製及び培養

C57BL/6J マウス眼球を 5% povidone-iodine 溶液にて消毒後に、Hank's Balanced Salt Solution

(HBSS; 138 mM NaCl, 4.2 mM NaHCO₃, 0.34 mM Na₂HPO₄, 5.3 mM KCl, 0.44 mM KH₂PO₄, 5.6 mM D-glucose, 0.02 mM Phenol Red) にて洗浄した。酵素液 (20 U/mL collagenase 及び 40 U/mL testicular hyaluronidase) にて45分処理後 0.1% trypsin 溶液にて処理後、RPE 細胞を回収し、20% FBS、170 U/mL benzylpenicillin、8 µg/mL gentamycin、及び 120 µg/mL streptomycin sulfate 含有 DMEM: Nutrient Mixture F-12 培地にてマウス初代培養 RPE 細胞を得た。

(9) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

ARPE-19 細胞サンプルから RNeasy Mini kit (QIAGEN; Hilden, Germany) を用いて total RNA を調製した。本 total RNA から ReverTra Ace (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて complementary DNA を合成し、これを鋳型とし、標的分子特異的 primer を用いた PCR を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト RPE 細胞における gap junction 機能

ARPE-19 細胞間の Lucifer Yellow 拡散度は FITC-dextran と比して 1.4 倍高値であったことから、ARPE-19 細胞における gap junction 介在物質輸送機能の存在が示唆された。この Lucifer Yellow 拡散は Cx を初めとした hemichannel 阻害剤である carbenoxolone 共存によって 52% 有意に阻害された。以上の結果から、ヒト RPE 細胞における gap junction 介在物質輸送に少なくとも一部 Cx の関与が示唆された。

(2) ヒト RPE 細胞における hemichannel 機能

Ca²⁺-free 条件下における ARPE-19 細胞への Lucifer Yellow、sulforhodamine (SR) -101 及び propidium iodide (PI) の取り込みは通常条件下と比して有意に上昇した。また、Ca²⁺-free 条件下における Lucifer Yellow、SR-101 及び PI の取り込みは飽和性を示し、その K_m 値はそれぞれ 116 µM、64 µM 及び 72 µM であった。従って、ARPE-19 細胞における hemichannel 介在輸送は、一般的なトランスポーター介在輸送と酷似することが示唆された。さらに、その輸送は hemichannel 阻害剤である、carbenoxolone 共存によって有意に阻害された。従って、ARPE-19 細胞における hemichannel 介在輸送の存在が示唆された。

本申請にて着目している Cx43 について、特異的 siRNA を ARPE-19 細胞に導入し、Ca²⁺-free 条件下における輸送の変化を解析した。その結果、Ca²⁺-free buffer 処理による Lucifer Yellow 取り込みは Cx43 siRNA 導入によって有意な上昇が観察されなくなった。Ca²⁺-free 条件下における Lucifer Yellow 取り込みの上昇度を「ヘミチャネル介在輸送」と定義すると、Cx43 siRNA 導入後のヘミチャネル介在輸送は control siRNA 導入後と比較し有

意に 73%低下した。siRNA 導入後の whole lysate を用いた解析から、Cx43 siRNA 導入後の Cx43 タンパク質発現量は 97%有意に低下していたことから、ARPE-19 細胞における hemichannel 介在 Lucifer Yellow 輸送の 75%は Cx43 が寄与することが示された。以上の結果から、RPE 細胞における hemichannel 介在輸送を主に担うのは Cx43 であることが示唆された。

ARPE-19 細胞に存在する hemichannel がどのような薬物を認識するかを、各種中枢神経系疾患治療薬を対象とし、阻害スクリーニング解析を行った。その結果、抗てんかん薬バルプロ酸が hemichannel 介在蛍光色素取り込みを強力に阻害した。これまでに AMD 治療においてバルプロ酸が応用された例は無く、今後、バルプロ酸の AMD モデル動物に対する投与とその効果検証を通じて、その有用性が明らかになると期待される。

(3) RPE 細胞における hemichannel 関連分子発現

RT-PCR 法を用いた解析を通じ、ARPE-19 細胞に発現するヘミチャネル関連分子として Cx43 に加え pannexin 1 の mRNA 発現が示された。本結果から、遺伝子ノックダウン解析において hemichannel 介在輸送について minor な寄与 (25%) を担う分子として pannexin 1 が考えられた。

ヒト RPE 細胞における hemichannel 介在輸送において主に寄与する分子である Cx43 の RPE 細胞における発現局在パターンの詳細を解析した。本解析を実施するにあたり、モルモット由来抗 Cx43 ポリクローナル抗体を作出し、その認識性を Tet-on/off Cx43 過剰発現 HeLa 細胞を用いた Western blot 解析にて評価した。その結果、tetracycline 処理過剰発現細胞サンプルにおいて単一で検出された 43 kDa の band は、tetracycline 未処理細胞サンプルにおいて検出されなかった。従って、作出した抗 Cx43 抗体は Cx43 タンパク質を認識することが示唆された。また、マウス RPE 細胞をサンプルとした Western blot 解析から、目的のサイズにおける単一のバンドが検出されたことから、本作出抗体は RPE 細胞において Cx43 タンパク質を特異的に認識することが示唆された。マウス眼球切片をサンプルとした免疫組織化学的解析から、Cx43 由来のシグナルは RPE 細胞の網膜側形質膜と細胞間において強力に検出されたことから、Cx43 タンパク質は RPE 細胞において RPE 細胞間の gap junction 及び網膜-RPE 細胞間のヘミチャネル介在輸送に役割を果たすことが示唆された。

(4) マウス RPE 細胞における炎症誘発時における PG 放出

マウス RPE 細胞における PGE₂ 放出を ELISA 法を用いて定量した結果、ヘミチャネル阻害剤である carbenoxolone 共存によって有意に 45%阻害されたことから、RPE 細胞における

PGE₂ 放出にヘミチャネルが一部関与することが示唆された。この放出について LPS 処理条件下において、有意に上昇し、その変動度は RPE 細胞における各種 PG 合成酵素の上昇度と相関した。今後、Cx43 の発現量変動との相関性について解析を行うことで、AMD 時における PG 放出とヘミチャネル介在輸送の重要性が明らかになると期待される。

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 2 件)

Akanuma S., Higashi H., Maruyama S., Murakami K., Tachikawa M., Kubo Y., Hosoya K., Expression and function of connexin 43 protein in mouse and human retinal pigment epithelial cells as hemichannels and gap junction proteins.

Exp. Eye Res., 168, 128-137 (2018)

査読有り

DOI: 10.1016/j.exer.2018.01.016

Akanuma S., Shimada H., Kubo Y.,

Hosoya K., Involvement of carrier-mediated transport at the blood-cerebrospinal fluid barrier in spermine clearance from rat brain., **Biol. Pharm. Bull.**, 40, 1599-1603 (2017)

査読有り

DOI: 10.1248/bpb.b17-00394

[学会発表] (計 3 件)

牧野 令奈、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一、ラット網膜色素上皮細胞における chloroquine 過剰蓄積による lysosome 空胞化、日本薬学会 第 138 年会(金沢)、2018 年

牧野 令奈、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一、網膜色素上皮細胞における chloroquine の lysosomal trapping と細胞障害作用、日本薬学会北陸支部 第 129 回例会、2017 年

丸山 蒼平、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一、ヒト網膜色素上皮細胞における物質輸送へのヘミチャネル分子の関与、日本薬学会第 137 年会(仙台)、2017 年

[図書] (計 0 件)

ありません。

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

ありません。

取得状況 (計 0 件)

ありません。

[その他]

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phaphzai/index-j.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

細谷 健一 (HOSOYA, Ken-ichi)
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・
教授
研究者番号：70301033

(2)研究分担者

久保 義行 (KUBO, Yoshiyuki)
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・
准教授
研究者番号：20377427

酒井 秀紀 (SAKAI, Hideki)
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・
教授
研究者番号：60242509

(3)連携研究者

立川 正憲 (TACHIKAWA, Masanori)
東北大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：00401810

(4)研究協力者

該当なし