

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月13日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20318

研究課題名(和文) 中心性脈絡網膜症の病態におけるアドレノメデュリンの関連解明

研究課題名(英文) The role of adrenomedullin in central serous chorioretinopathy

研究代表者

三木 明子(Miki, Akiko)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10726988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：中心性脈絡網膜症(CSC)は、病態として網膜色素上皮細胞のタイトジャンクションが障害されていると考えられているが、その病態は未だ不明なままである。我々はCSCの疾患感受性遺伝子としてCFH領域の遺伝子多型との関連を報告した。CFHはアドレノメデュリンと結合する蛋白であることから、我々はCSCの病態にアドレノメデュリンが関連していると考えた。本研究では、これらについてアドレノメデュリンによる網膜色素上皮細胞のタイトジャンクション機能の変化は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子レベルで中心性漿液性脈絡網膜症(CSC)との関連ある補体因子Hはアドレノメデュリン(AM)と結合する。CSCの病態は網膜色素上皮細胞(RPE)のタイトジャンクション(TJ)障害および脈絡膜血管拡張・透過性亢進である。本研究では前者とAMの関係について調べた。AMはRPEに発現するが、AMの発現変化がRPEのTJ機能に作用していると、当初我々は考えた。しかし、本研究では、AMの発現変化とTJ機能の関連は示されなかった。AMは血管拡張作用を有することから、CSCのもう一つの病態である、脈絡膜血管拡張・透過性亢進と関連しているのかもしれない。これについては今後さらに研究を進める予定である。

研究成果の概要(英文)：The impaired tight junction of retinal pigment epithelium (RPE) is thought to be a major contributor of central serous chorioretinopathy (CSC). However, the pathology of CSC is still unknown. Previously, we reported the association between CSC and CFH variants. CFH binds to adrenomedullin. We expected the adrenomedullin would affect the tight junction of RPE. In this study, the tight junction of RPE was not altered by adrenomedullin.

研究分野：眼科

キーワード：網膜色素上皮細胞

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

1. 研究開始当初の背景

中心性漿液性脈絡網膜症 (CSC) はアジア人の中年男性に好発する疾患で、加齢黄斑変性症(AMD)の危険因子とされる。CSC の病態としては、脈絡膜血管の透過性亢進、それに伴う脈絡膜膠質浸透圧の上昇、そして網膜色素上皮細胞 (RPE) の機能低下により漿液性網膜剥離を生じると考えられているが、臨床的知見を元にした考察でしかなく、分子生物学的な報告はなされていなかった。

CSC は続発性に AMD を生じるが、AMD について、過去に研究代表者らは、遺伝子レベルにおいて補体因子 H (CFH) が AMD の発症に関連していることを報告してきた。

最近、臨床分野において CSC と AMD がオーバーラップした疾患概念 (Pachychoroidopathy) も提唱されるようになり、CSC と AMD には共通した病態背景が存在する可能性が示唆されている。そこで、我々は、CSC における CFH の関与について遺伝子レベルで、CFH が CSC の発症に関連していることを世界で初めて報告した。その後海外 2 施設において追試がなされ、同様の結果が報告された。

本研究は、遺伝子レベルにおいて解明された CFH と CSC の関係について分子生物学的にさらに考察するものである。

アドレノメデュリン (AM) はヒト褐色細胞腫から発見された蛋白であり、主な作用として、血管拡張作用および抗炎症作用を有する。AM は妊娠や喫煙下において亢進することが実験レベルで報告されているが、いずれも CSC の危険因子である。また、AM は血管拡張作用を有するが、臨床的に CSC では脈絡膜血管の拡張が見られる。これらの背景は、AM が CSC の病態発症に関連している可能性を示唆する。また、AM は CFH と結合して補体経路に働くこと、CFH と結合して CFH の作用を調節すること、CFI を介した C3b の分解促進をすることで、その調節がなされることが知られている。

そこで本研究では、AM と CSC の関係について検討し、次に、その背景における CFH の関与について検討する。

AM が亢進している喫煙や妊娠など類似した背景で生じる CSC では、AM が亢進していると考えられる。また、臨床的に見られる脈絡膜の血管拡張は、AM による血管拡張作用と考えられ、AM の亢進状態が、網膜色素上皮細胞の tight junction への機能障害に寄与しているのではないかと想定される。その AM と結合する CFH は亢進もしくは低下の発現変化を生じていると考えられる。

CSC と AM の関連性については未だ報告がなく、遺伝子レベルから分子生物学的な解明につながる本研究は、CSC のより深い病態解明や治療法の開拓に重要な役割を果たせると考える。

2. 研究の目的

CSC では脈絡膜血管の透過性亢進および RPE の機能低下が生じているとされているが、その

分子生物学的機序については概ね不明であった。我々は疾患-遺伝子関連解析において、遺伝子レベルにおいて、CFHがCSCと関連していることを報告した。一方、AMはCFHと結合し、CFIを介してC3bの分解を促進することで、その作用を調節することが知られている。

本研究では、AMによる血管透過性および網膜色素上皮細胞のtight junction機能との関係を明らかにし、CSC治療の新たな道筋を構築することを目指す。具体的な研究項目は、下記の3つである。

AMと培養網膜血管内皮細胞の血管透過性機能との関係解明

AMと培養網膜色素上皮細胞のtight junction機能との関係

、におけるCFHの関与。

3. 研究の方法

<AMによるRPEタイトジャンクションへの影響>

培養ヒト網膜色素上皮細胞(ARPE-19)を用いた。ARPE-19は購入したものを扱い、3代から6代継代した後以下の実験に用いた。ARPE-19は5%CO₂、37℃のインキュベーターにて、DMEM培養液を用いて培養した。

培養ヒト網膜色素上皮細胞(ARPE-19)にAMを一定時間(6時間、12時間、24時間)様々な濃度(10⁻⁷M、10⁻⁸M、10⁻⁹M)で添加し、内在性AMおよびCFHの発現変化についてリアルタイムRT-PCRを用いて確認した。

様々な濃度(10⁻⁷M、10⁻⁸M、10⁻⁹M)のAMをトランスウェル上に培養したARPE-19に一定時間(6時間、12時間、24時間)の間添加し、permeability assayにて血管透過性の変化を評価した。具体的には、FITC標識を行ったデキストランを加えた後に、トランスウェルを通過したFITC標識されたデキストランの蛍光強度について、蛍光プレートリーダーを用いて測定した。細胞間接着が障害されると、FITC標識されたデキストランがトランスウェルを通過するため、蛍光量が上昇する。Permeability assayは市販のキットを用いた。

様々な濃度(10⁻⁷M、10⁻⁸M、10⁻⁹M)のAMを培養したARPE-19に一定時間(6時間、12時間、24時間)の間添加し、タイトジャンクションについて、経上皮電気抵抗装置(TER)を用いて、そして、ZO-1およびoccludinによる免疫染色にて評価した。TERは3回計測し、平均値を採用した。

培養ARPE-19にAMのsiRNAを用いてAMのノックダウンを行った。ノックダウン効率はリアルタイムRT-PCRで確認した。ノックダウン後12時間および24時間後に、TER、免疫染色(ZO-1、occludin)を行い、同様に検討した。

< AM による血管透過性への影響 >

培養ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いた。HUVEC は購入したものをを用い、3代から6代継代した後に以下の実験に用いた。HUVEC は 5%CO₂、37℃ インキュベーターにて、M199 培養液を用いて培養した。

HUVEC を用いて、上記①～④について、同様に検討した。

4 . 研究成果

< AM による RPE タイトジャンクションへの影響 >

まず、培養 ARPE-19 細胞に AM を様々な濃度 (10⁻⁷M、10⁻⁸M、10⁻⁹M) で付加し、リアルタイム RT-PCR を用いて、内在性の AM および CFH の発現変化について継時的に検討した。しかし、いずれの時間においてもいずれの濃度においても、AM および CFH の発現について有意な変化は見られなかった。

次に、AM による RPE の tight junction 機能への影響について検討した。

ARPE-19 を 96well プレートに培養し、様々な濃度 (10⁻⁷M、10⁻⁸M、10⁻⁹M) の AM を添加し、6時間、12時間、24時間後の TER を測定した。しかし、TER はいずれの時間および濃度においても変化はなく、過去の文献のように濃度依存性に TER の上昇についても見られなかった。

同様に、培養 ARPE-19 細胞に様々な濃度 (10⁻⁷M、10⁻⁸M、10⁻⁹M) の AM を添加し、6時間、12時間、24時間後、免疫染色 (ZO-1、occludin) を行なったが、いずれの時間および濃度においても、ともに発現の変化は見られなかった。

同様に、培養 ARPE-19 細胞に様々な濃度 (10⁻⁷M、10⁻⁸M、10⁻⁹M) の AM を添加し、6時間、12時間、24時間後、permeability assay にて血管透過性の変化を評価した。しかし、いずれの時間および濃度においても有意な変化は見られなかった。

次に我々は、AM はバリア機能を保護する方向で作用すると推察し、siRNA を用いた AM のノックダウンについて、培養 ARPE-19 を用いて行なった。リアルタイム RT-PCR にて siRNA 作用後 6 時間の時点で AM の発現が低下していることを確認した。AM のノックダウンを行なった培養 ARPE-19 細胞を用いて、TER の測定および免疫染色 (ZO-1、occludin) を行なったが、TER の測定値および免疫染色における発現変化は見られなかった。

これらの結果から、AM は RPE の tight junction 機能には関係しない可能性がある。

< AM による血管透過性への影響 >

培養 HUVEC 細胞に AM を様々な濃度 (10⁻⁷M、10⁻⁸M、10⁻⁹M) で付加し、リアルタイム RT-PCR を用いて、内在性の AM および CFH の発現変化について継時的に検討した。しかし、いずれの時間においてもいずれの濃度においても、AM および CFH の発現について有意な変化は見られなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Miki A, Sakurada Y, Tanaka K, Semba K, Mitamura Y, Yuzawa M, Tajima A, Nakatochi M, Yamamoto K, Matsuo K, Imoto I, Honda S. Genome-Wide Association Study to Identify a New Susceptibility Locus for Central Serous Chorioretinopathy in the Japanese Population. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2018,59(13):5542-5547. 査読あり

〔学会発表〕(計1件)

Akiko Miki, Association between CFH variants and Choroidal Thickness in Central Serous Chorioretinopathy, ARVO, 2018

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中井駿一郎、北村萌

ローマ字氏名：Nakai Shunichiro, Megumi Kitamura

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。