

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18377

研究課題名（和文）低侵襲レーザーによる網膜色素上皮由来脂質メディエーター変化の網羅的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of changes in retinal pigment epithelium-derived lipid mediators by subthreshold micropulse laser

研究代表者

荒木 章之（Araki, Fumiyuki）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20724652

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトiPS細胞由来RPE（網膜色素上皮）細胞を培養し、黒色化したものを用いて、レーザー照射によってRPEの細胞死がなく、かつ、HSP70の発現量が十分に出ているレーザー条件を決定した。レーザー照射3時間後、24時間後の上清を回収し、脂質メディエーターの網羅的脂質解析を行い、レーザー照射24時間後の上清において、コントロール群と比較して、リゾフォスファチジン酸（LPA）産生酵素であるオートタキシン（ATX）の濃度が低下していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実験用の網膜凝固装置を用いて培養網膜色素上皮細胞に閾値下凝固を行うレーザーの条件を確立し、糖尿病黄斑浮腫に対する網膜閾値下凝固の基礎実験を可能とした。また、細胞死を引き起こさない低侵襲照射において、コントロール群と比較してリゾフォスファチジン酸（LPA）産生酵素であるオートタキシン（ATX）の濃度が低下していることを発見し、脂質メディエーターが網膜に対する低侵襲照射治療に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Human iPS cell-derived RPE (retinal pigment epithelium) cells were cultured and blackened, and the laser conditions under which there was no RPE cell death and sufficient HSP70 expression was determined. Supernatants 3 and 24 hours after laser irradiation were collected, and comprehensive lipid analysis of lipid mediators was performed. Autotaxin (ATX) concentration was lower than that of control.

研究分野：糖尿病網膜症

キーワード：糖尿病黄斑浮腫 網膜閾値下凝固

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病黄斑浮腫 (DME) の治療は血管透過性亢進を抑制する抗 VEGF 療法が第一選択であるが、治療抵抗例も存在する。近年ではレーザー治療との効果的な併用療法が期待されており、レーザー治療が担う役割は大きいものの、その奏功機序については十分に解明されていないのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、培養 RPE (ARPE-19) を用いた理想的な低侵襲レーザー照射条件の確立と、網膜色素上皮 (RPE) で発現している脂質メディエーターを網羅的に解析し、これまで分かっていないレーザー治療が及ぼす脂質分泌変化について調べ、それに伴う RPE のバリア機能の変化を確認する。さらに、網羅的解析から得られた脂質項目について、その生理活性の評価を行うことである。

3. 研究の方法

(1) レーザー照射によって RPE の細胞死を生じる条件と、細胞死のない低侵襲条件の決定

実験用の網膜凝固装置を用いて培養 RPE (ARPE-19) にレーザーを照射したが、閾値下凝固を行うことができなかつたため、ヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞を培養し、黒色化したものを用いた。照射条件は 5×5 のパターン照射、スポットサイズ 200 μm, 0.02sec, spacing 0.5 として、出力については、0mW (コントロール) / 100mW / 200mW / 300mW / 500mW の条件を割付けた。Live/Dead Cell Staining Kit を用いて、照射部位における細胞死が確認されない出力を同定した。また、その条件下で HSP70 の発現量が十分に出ていることを qPCR により確認した。その結果、出力は 300mW とした。

(2) RPE に対する閾値下レーザー照射後の脂質メディエーターの網羅的解析

次に、従来法である continuous wave (CW) 方式を用いた凝固法と、上記で決定した閾値下凝固 (SMPL) 群、レーザー非照射のコントロール群の 3 群に対し、レーザー照射 3 時間後、24 時間後の上清を回収し、脂質メディエーターの網羅的脂質解析を行った。

(3) 高血糖負荷培地における RPE に対する脂質メディエーターの影響

培養 ARPE-19 細胞にて、コントロール群と、高血糖群、低酸素群 (DFX: Desferrioxamine mesylate salt, 低酸素負荷を再現する) 高血糖 + 低酸素群において、HSP70、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) HIF-1α, Enpp2 と、経上皮電気抵抗 (TEER) 測定によるバリア機能の変化、および、ATX 阻害剤による変化がおきるかを検討した。

4. 研究成果

(1) レーザー照射によって RPE の細胞死を生じる条件と、細胞死のない低侵襲条件の決定

顕微鏡観察下では凝固斑を認めず、LIVE/DEAD assay にて 300mW 以下では細胞死を認めなかつた。また、HSP70 の mRNA 発現量は 0mW と比べて 300mW, 500mW では有意に上昇していた。そのため、300mW を SMPL 法の出力とした。

SMPL法

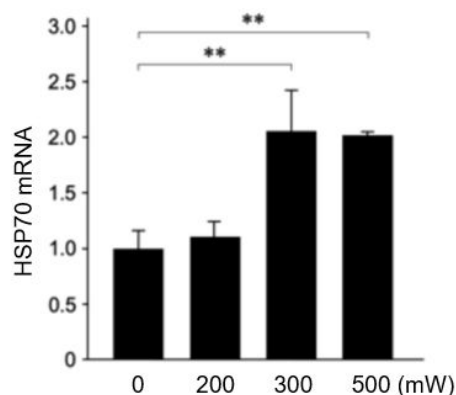
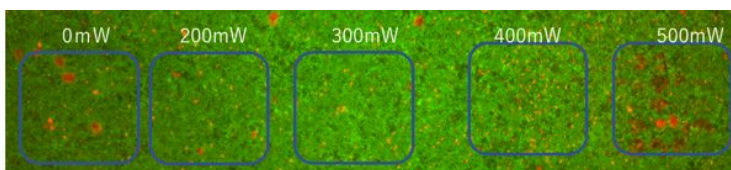
spot size: 200 μm

duration: 0.2sec

5% duty cycle

5×5 pattern

spacing: 0



(2) RPE に対する閾値下レーザー照射後の脂質メディエーターの網羅的解析

レーザー照射 24 時間後の CW 群と SMPL 群において、コントロール群と比較して、リゾフォスファチジン酸 (LPA) 産生酵素であるオートタキシン (ATX) の濃度が低下していることを確認した。また、同時刻において、SMPL 群において、CW 群と比較して ATX 濃度が低下していたことを確認した。これにより、SMPL 法では CW 法よりも細胞死のリスクが低い可能性が示唆された。

(3) 高血糖負荷培地における RPE に対する脂質メディエーターの影響

各群を比較して、明らかな有意差は認められなかった。また、ATX に関連する LPA 受容体の発現の変化も qPCR 法により調べたが、発現変化は認められなかった。今後は、培養ヒト網膜血管内皮細胞 (HRMEC) に対して、同様の刺激を行い、VEGF や各種炎症性サイトカインの発現変化を含む生理活性変化を確認する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ikegami Yasuko, Shiraya Tomoyasu, Araki Fumiyuki, Ueta Takashi, Toyama Taku, Yanagita Tomohiko, Numaga Jiro, Shoji Nobuyuki, Kato Satoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Microperimetric analysis of diabetic macular edema after navigated direct photocoagulation with short-pulse laser for microaneurysms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Retina and Vitreous	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40942-023-00447-y	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiraya Tomoyasu, Araki Fumiyuki, Nakagawa Suguru, Ueta Takashi, Totsuka Kiyohito, Abe Hitoshi, Naito Yasuyuki, Toyama Taku, Sugimoto Koichiro, Kato Satoshi	4. 巻 66
2. 論文標題 Differential gene expression analysis using RNA sequencing: retinal pigment epithelial cells after exposure to continuous-wave and subthreshold micropulse laser	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 487 ~ 497
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10384-022-00925-0	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荒木 章之, 白矢 智靖, 上田 高志, 戸塚 清人, 外山 琢, 杉本 宏一郎, 加藤 聡, 本庄 恵, 相原 一
2. 発表標題 ヒト網膜色素上皮細胞を用いたレーザー照射が及ぼすオートタキシンへの影響
3. 学会等名 第75回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤 大樹, 荒木 章之, 白矢 智靖, 上田 高志, 戸塚 清人, 外山 琢, 杉本 宏一郎, 内藤 泰幸, 阿部 均, 加藤 聡, 本庄 恵, 相原 一
2. 発表標題 閾値下レーザー照射によるヒト培養網膜色素上皮由来のセラミド関連物質産生
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------