

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18389

研究課題名(和文) 網膜色素上皮の色素産生能が加齢黄斑変性発症に与える役割

研究課題名(英文) The role of pigment production of retinal pigment epithelium in the pathogenesis of age-related macular degeneration.

研究代表者

辻中 大生(Hiroki, Tsujinaka)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号：50596749

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)：網膜色素上皮(RPE)の異常な色素沈着や色素失脱は加齢黄斑変性(nAMD)の前駆病変として知られている。今回我々はRPE由来細胞を用いて、喫煙に含まれるヒドロキノン(HQ)のメラニン産生に及ぼす影響を評価した。HQの短期投与では、メラニン量は低下したが、長期投与はメラニン量を増加させた。メラニン量の減少した群では、ブルーライトの透過性が亢進していた。これは脈絡膜の光障害を誘発している可能性がある。また逆に、メラニン量の増加した群は、青色光の刺激によってVEGFの発現量が増加していた。RPEのメラニン量のムラがVEGF産生に影響を与え、nAMDの発症に影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢黄斑変性は、中途失明の原因として社会的に大きな問題となっており、あらたな治療法が模索されている疾患でもある。これまで、加齢黄斑変性の発症に、網膜色素上皮細胞の色素むらが前駆病変として指摘されていたが、その原因や、病態における役割は不明であった。今回、色素上皮のむらによって、加齢黄斑変性の発症要因となるVEGFの発現量が変化することを突き止めたことは、病態解明にとって大きな意味を持つと考えられる。色素上皮のむらを解消するための薬剤や、治療法がみつければ、加齢黄斑変性の発症そのものを抑制できる可能性を秘めており、今後、これらの薬剤が加齢黄斑変性抑制のブレイクスルーになるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Abnormal pigmentation or depigmentation of the retinal pigment epithelium (RPE) is a known precursor lesion of Neovascular age-related Macular degeneration (nAMD). We evaluated the effect of Hydroquinone (HQ) on melanin production using RPE cells. iPS-derived RPE and ARPE-19 cells were cultured with HQ. Realtime RT-PCR revealed that the expression of melanin-related production genes was significantly decreased by the addition of HQ for 1 day. The absorbance of RPE suspension was decreased, especially in the blue light. On the other hand, melanin expression was significantly increased after the addition of HQ for 1 week. After the blue light irradiation, VEGF in the RPE medium was significantly higher with HQ for 1 week than the control group. HQ-induced changes in melanin production may be responsible for the uneven pigmentation of RPE. It was suggested that uneven melanin levels in RPE may affect VEGF production and influence the development of nAMD.

研究分野：網膜疾患

キーワード：加齢黄斑変性 網膜色素上皮 喫煙 ブルーライト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、中途失明原因として注目されている浸出型加齢黄斑変性の脈絡膜新生血管の発症には様々な因子が指摘されており、その中の一つに青色光をはじめとする有害光の過剰暴露があげられる。本来、有害光が眼内に侵入しても、様々な防御機構が働くことで脈絡膜の障害が回避される。網膜色素上皮細胞が発現するメラニン色素もその一つで、メラニン色素が光を吸収することで、脈絡膜への障害を予防していると考えられている。

しかし、加齢黄斑変性などの病的状態では、色素上皮の機能不全に伴い、黄斑部の色素ムラが発生することが知られている。これには、色素上皮細胞数そのものの減少の可能性もあるが、色素上皮のメラニン産生能力が低下しているとも考えられる。

しかし、これまで多く用いられてきた培養色素上皮細胞は生体的色素上皮細胞とは異なりもともと色素の産生能が低いものが多く、メラニン色素の研究がほとんどなされていないのが当時の背景であった。

2. 研究の目的

本研究では、病的状態における黄斑部に生じる色素ムラが起こる原因を究明し、加齢黄斑変性の発生機序解明ならびに治療法の開発につなげる、ということを目指とした。

これまで汎用されてきた ARPE-19 株をはじめとする既存の網膜色素上皮由来培養細胞はそもそも色素産生能が低く、網膜色素上皮の色素産生能に与える外的因子の研究はほとんど行われていない。しかし近年、iPS 細胞由来の培養網膜色素上皮細胞が流通するようになり、これらの細胞は実際の網膜色素上皮細胞に酷似した性質を持ち、高いメラニン産生能力を持っていることが既に証明されている。

これらの新しい技術を応用し、網膜色素上皮が生体内で持つ性質に酷似した細胞で網膜色素上皮のメラニン産生、ならびに病的状態における産生能の低下がおこるメカニズムを解明することとした。

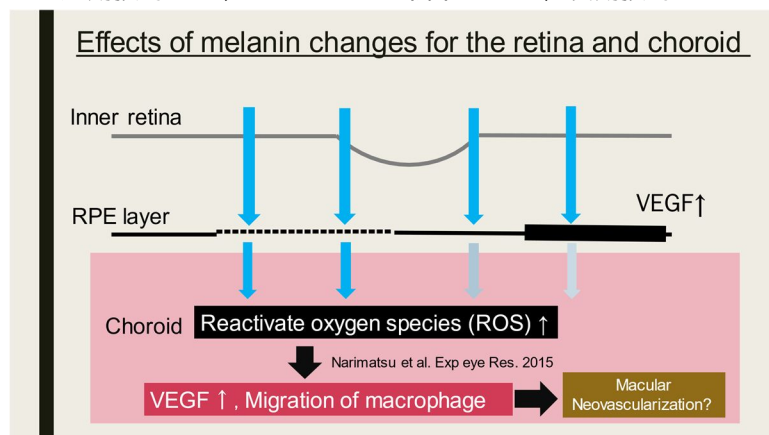
3. 研究の方法

iPS-RPE ならびに ARPE-19 を試験管内で培養し、HQ を 1 日または 1 週間培養液に添加した。その後、WST-8 にて生存細胞数の評価を行った。その際、生存細胞数に変化のない HQ の濃度 (2 μ M) でのメラニン産生関連遺伝子を Real-time PCR 法にて、メラニン量について ELISA 法を用いて測定した。また、RPE 細胞に HQ を添加し、24 時間後にその RPE 細胞の懸濁液を作成し、吸光度の変化について測定した。また、培養液中に 1 週間 HQ (2 μ M) を添加した RPE 細胞に青色光 (455 nm) を 24 時間照射し、その後培養液中に放出された VEGF の発現について ELISA 法を用いて測定した。

4. 研究成果

ARPE-19 細胞では発現量が低下していたメラニン関連産生遺伝子の mRNA は、iPS 由来 RPE 細胞では発現があり、その量は培養液に 24 時間 HQ (2 μ M) 添加することで有意に低下した。また、メラニン量に関しても、HQ (2 μ M) を培養液に添加することで有意に減少していた。その際、RPE 細胞を用いた懸濁液における吸光度を測定した結果、特に青色光を中心に、吸光度が低下していた。一方、培養液中に 1 週間 HQ (2 μ M) を添加した群では、メラニン発現量が有意に増加していた。その際、メラニン産生カスケードの受容体にあたる MCR1 受容体の mRNA 発現量が HQ 添加によって有意に増加していた。1 週間 HQ (2 μ M) を添加した細胞に青色光を照射した結果、培養液中にコントロール群と比較して、有意に多い VEGF-A が認められた。

HQ の短期投与では、メラニン量は低下したが、長期投与はメラニン量を増加させた。HQ によるメラニン産生量の変化が、RPE の色素むらを生んでいるかもしれない。また、RPE の色素むらが、色素量の多い場合、少ない場合のいずれの場合においても、VEGF の発現を介して、加齢黄斑変性発症に関与している可能性が示唆された (左図)。上記の内容について、2022 年の日本眼科学会総会で発表し、学術展示優秀賞を受賞した。現在、論文投稿準備中である。今回は喫煙因子



子の中で特に還元力の強いヒドロキノンに着目したが、今後この系が確立されれば、その他の黄

斑变性発症に関連する因子に検討にもつなげることが可能であり、発展性のある研究と考えられ、今後も継続した検討を計画中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kusuhara Sentar, Tsujinaka Hiroki, Sakamoto Taiji et.al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Treatment of diabetic macular edema in real world clinical practice: The effect of aging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13801	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ijuin Nobuo, Tsujinaka Hiroki, Hirai Hiromasa, Jimura Hironobu, Nakao Shigeya, Yamashita Mariko, Nishi Tomo, Ueda Tetsuo, Ogata Nahoko	4. 巻 20
2. 論文標題 Clinical implications of pachyvessels in polypoidal choroidal vasculopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 170 ~ 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12886-020-01443-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shimura Masahiko, Tsujinaka Hiroki, Sakamoto Taiji et.al	4. 巻 104
2. 論文標題 Real-world management of treatment-na?ve diabetic macular oedema: 2-year visual outcome focusing on the starting year of intervention from STREAT-DMO study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1755 ~ 1761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bjophthalmol-2019-315726	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hackett Sean F., Fu Jie, Kim Yoo Chun, Tsujinaka Hiroki, Shen Jikui, Lima e Silva Raquel, Khan Mahmood, Hafiz Zibrán, Wang Tao, Shin Matthew, Anders Nicole M., He Ping, Ensign Laura M., Hanes Justin, Campochiaro Peter A.	4. 巻 243
2. 論文標題 Sustained delivery of acriflavine from the suprachoroidal space provides long term suppression of choroidal neovascularization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 119935 ~ 119935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2020.119935	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishiyama Takeyuki, Tsujinaka Hiroki, Mizusawa Yutaro, Ueda Tetsuo, Ogata Nahoko	4. 巻 22
2. 論文標題 Acute retinal necrosis in a patient on immunosuppressive treatment for COVID-19 pneumonia: a case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12886-022-02692-5	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 Kimura Takeshi, Araki Takashi, Yasukawa Tsutomu, Kato Aki, Kuwayama Soichiro, Kinoshita Takamasa, Okamoto Fumiki, Murakami Tomoya, Mitamura Yoshinori, Sakamoto Taiji, Terasaki Hiroto, Kusuhara Sentaro, Miki Akiko, Takamura Yoshihiro, Kondo Mineo, Matsubara Hisashi, Ueda Tetsuo, Tsujinaka Hiroki, Gomi Fumi	4. 巻 17
2. 論文標題 Differences in clinical characteristics and treatment outcomes of submacular hemorrhage caused by age-related macular degeneration and retinal macroaneurysms: A multicenter survey from the Japan Clinical Retina Study (J-CREST) group	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0274508 ~ 0274508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0274508	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 Inoue Naomi, Kato Aki, Araki Takashi, Kimura Takeshi, Kinoshita Takamasa, Okamoto Fumiki, Murakami Tomoya, Mitamura Yoshinori, Sakamoto Taiji, Miki Akiko, Takamura Yoshihiro, Matsubara Hisashi, Tsujinaka Hiroki, Gomi Fumi, Yasukawa Tsutomu	4. 巻 17
2. 論文標題 Visual prognosis of submacular hemorrhage secondary to age-related macular degeneration: A retrospective multicenter survey	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0271447 ~ 0271447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0271447	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 Kusuhara Sentaro, Tsujinaka Hiroki et.al	4. 巻 13
2. 論文標題 Treatment of diabetic macular edema in real world clinical practice: The effect of aging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1339 ~ 1346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13801	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西山武孝 辻中大生 水澤裕太郎 緒方奈保子
2. 発表標題 COVID-19感染後にEBウイルス起因と思われる急性網膜壊死を発症した1例
3. 学会等名 日本臨床眼科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西山武孝、辻中大生、上田哲生、緒方奈保子
2. 発表標題 ヒドロキノン（HQ）添加による網膜色素上皮細胞のメラニン量変化
3. 学会等名 日本眼科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西山 武孝 辻中 大生 慶田 真喜子 丸岡 真治 緒方 奈保子
2. 発表標題 術中光干渉断層計（OCT）併用で傍中心部角膜穿孔に層状角膜移植術を施行した一例
3. 学会等名 日本臨床眼科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西山武孝 辻中大生 平井宏昌 上田哲生 緒方奈保子
2. 発表標題 網膜色素上皮の色素産生能に喫煙が与える役割
3. 学会等名 日本眼科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻中大生 佐伯圭吾 大林賢史 西智 上田哲生 緒方奈保子
2. 発表標題 黄斑色素密度は腎系球体濾過量と正の相関関係にある
3. 学会等名 日本網膜硝子体学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内崇 井本翔 治村寛信 辻中大生 上田哲生 緒方奈保子
2. 発表標題 再発性黄斑円孔に対して水晶体後囊の移植が奏功した一例
3. 学会等名 日本網膜硝子体学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沢田敦 辻中大生 和田大史 山口尚希 上田哲生 田代将人 泉川公一 緒方奈保子
2. 発表標題 Purpureocillium lilacinumによる真菌性角膜炎にナタマイシン点眼が著効した 一例
3. 学会等名 日本臨床眼科学会
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
---------	---------