

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592251

研究課題名（和文）加齢黄斑変性における網膜色素上皮細胞の小胞体ストレスの関与の解明と治療法への応用

研究課題名（英文）Application to the clarification and treatment of endoplasmic reticulum stress related the retinal pigment epithelium cells in Age-related macular degeneration.

研究代表者

高橋 寛二（TAKAHASHI KANJI）

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：60216710

研究成果の概要（和文）：小胞体はタンパクの折りたたみや修飾に重要な役割を果たす細胞内器官である。小胞体ストレスは糖尿病網膜症や加齢黄斑変性に関連していると報告されている。そこで我々は小胞体ストレスが網膜色素上皮細胞のタイトジャンクションに対して変化を与えるのかを検討した。小胞体ストレスによって網膜色素上皮細胞のタイトジャンクションの蛋白発現と経上皮電気抵抗測定が上昇し、加齢黄斑変性の一因となる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The endoplasmic reticulum (ER) is an important intracellular organelle responsible for the biosynthesis and folding of proteins. It has been reported that ER stress has been linked to the diabetic retinopathy and age-related macular degeneration (AMD). Increased protein expressions and transepithelial electrical resistance of tight junctions by ER stress in RPE cells indicate that ER stress can alter the function of RPE cells and may be involved in the pathogenesis of AMD.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：小胞体ストレス、加齢黄斑変性、網膜色素上皮、Tight junction

## 1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性(AMD)は本邦における失明原因の第4位を占める疾患であり、欧米諸国と同様に高齢者の社会的失明の大きな原因となっている。AMDでは眼球後方にある神経網膜の光学的、解剖学的、機能的中心に位置する黄斑部に萎縮または異常な新生血管が発生して出血や細胞増殖を引きおこし、最終的に神経網膜の構造的、機能的破壊を招いて

著しい視機能障害の原因となる。病態の根幹となる新生血管は網膜下に存在する脈絡膜組織から発生し、網膜と脈絡膜の間に存在するブルッフ膜を貫通して網膜下および網膜内へと進展、増殖する。AMDの治療法には新生血管に対するレーザー光凝固、光線力学的療法、外科的新生血管除去などがあるが、いずれも神経網膜の組織障害を完全には回避できないため、方法の改良や新しい治療法

の開発が熱望されている。AMD の病因には、ブルッフ膜の黄斑部における脆弱性、網膜色素上皮細胞の細胞間結合の破壊などが関与するといわれている。さらに最近糖尿病や神経変性疾患で小胞体ストレスが様々な疾患の一因となっていることが明らかになってきており、我々は小胞体ストレスも AMD の発生、進展の一因である可能性があると考えている。小胞体は生体の細胞小器官に属し、蛋白質の合成やフォールディング等の精製プロセスを司るもので、核、ミトコンドリア、ゴルジ装置などと同様に細胞を構成する重要な要素である。小胞体ストレスとは小胞体に低酸素・低栄養・老化・異常蛋白質合成などの負荷がかかって蛋白質のフォールディングがうまくいかず、異常な蛋白質が蓄積する現象を意味する。このことは、AMD の前駆状態として網膜色素上皮と神経網膜の間にドルーゼンと呼ばれる異常蛋白質の集積がみられることや、AMD の病因に紫外線や青色光、およびそれにより発生する活性酸素、遺伝的要因、喫煙などが関係すると考えられていることに合致する。網膜色素上皮細胞に発現している蛋白質の一つに色素上皮由来因子 (PEDF) があるが、この蛋白質はセルピン・キナーゼのファミリーに属し、神経細胞死を抑制する効果などを持つことが報告されている。PEDF は血管新生を抑制する作用も持っているが、PEDF と小胞体ストレスの関係は不明である。本研究で AMD における脈絡膜新生血管の発生、増大に網膜色素上皮細胞や脈絡膜血管内皮細胞の小胞体ストレスが関与しているかどうかを解明すれば、それらを抑制することで発症予防や治療法の開発へとつながっていくことが期待できる。

## 2. 研究の目的

1) インフォームド・コンセントが得られた AMD 患者から臨床において採取された脈絡膜新生血管に対して免疫組織学的、分子生物学的手法を用いて小胞体ストレス蛋白質、tight junction を構成するオクルディンや ZO-1、カドヘリンなどの細胞接着分子、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、色素上皮由来因子 (PEDF) などが発現しているかどうかを検討する。

2) 網膜血管内皮細胞および網膜色素上皮細胞を培養し、小胞体ストレス起因物質である tunicamycin, thapsigargin などを添加して小胞体ストレスを誘導し、培養細胞における小胞体ストレス蛋白質、tight junction を構成するオクルディンや ZO-1、カドヘリンなどの細胞接着分子、PEDF、VEGF の発現を調べる。

3) ラット眼における強度レーザーによる実験的脈絡膜新生血管モデルの脈絡膜新生血管での小胞体ストレス蛋白質の発現を検討し、in

vivo における脈絡膜新生血管の発生、増大、退縮における小胞体ストレスの関与を明らかにする。

4) PEDF や BDNF などの細胞保護効果を持つ蛋白質の遺伝子を組み込んだ遺伝子ベクターを培養細胞に導入し、in vitro における小胞体ストレス蛋白質の変動や細胞接着因子、tight junction 構成蛋白質の発現に与える効果を検討する。

5) 4) で用いた遺伝子ベクターを実験的脈絡膜新生血管モデルに応用し、in vivo における新生血管の発生、増大、退縮に対する影響を検討する。

6) 上記 4) および 5) のモデルに、蛋白質のフォールディングを是正して小胞体ストレスを軽減する作用を持つ分子シャペロンの GRP78/Bip, GRP94, GRP170 などの蛋白質を遺伝子導入により強制的に発現させ小胞体ストレスの軽減と脈絡膜新生血管に対する影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

AMD 患者の脈絡膜新生血管組織を手術時に抜去した症例のうち、同意が得られた症例の組織を組織学的に検討して構成要素を検討するとともに、分子生物学的手法を用いて小胞体ストレス蛋白質 (活性型 XBP1) の存在を検討する。また小胞体ストレスによって影響を受ける可能性がある tight junction を構成するオクルディンや ZO-1, ZO-2, ならびにカドヘリン、NCAM, ICAM などの細胞接着分子ならびに VEGF, PEDF の発現についても検討する。また電子顕微鏡による細胞間接着装置の形態的特長を検討して脈絡膜新生血管組織における小胞体ストレスと細胞間結合の状態を明らかにする。

AMD の脈絡膜新生血管組織における小胞体ストレス蛋白質 (活性型 XBP1)、tight junction 構成分子、細胞接着分子、VEGF、PEDF の発現の検討を行う。

AMD の脈絡膜新生血管組織における細胞内小器官、tight junction などの微細構造の電子顕微鏡による検討を行う。

臨床におけるフルオレセイン蛍光眼底造影像では活動性の強い脈絡膜新生血管から蛍光色素の旺盛な血管外漏出が観察される。そのため組織ではおそらく無秩序に増殖した血管内皮細胞や周細胞などの血管そのものの組織、反応性に脱分化、増殖した網膜色素上皮細胞、マクロファージなどの炎症性細胞が存在すると想定される。上記実験で脈絡膜新生血管組織における小胞体ストレスの存在と tight junction や細胞接着因子の状態を検討する。

tunicamycin, thapsigargin による小胞体ストレス誘導条件で培養した網膜色素上皮細胞・血管内皮細胞の小胞体ストレス蛋白質、細

胞接着因子、tight junction 構成分子、VEGF、PEDF の発現の検討を行う。

ヒト培養網膜色素上皮細胞および血管内皮細胞に tunicamycin、thapsigargin を負荷して小胞体ストレスを誘導し、細胞に起こる変化を検討する。

高出力レーザー光凝固によるラット脈絡膜新生血管モデルにおける小胞体ストレス蛋白の発現を検討し、脈絡膜新生血管の発生における小胞体ストレスの関与の検討を行う。in vitro における小胞体ストレスと tight junction や細胞接着分子への影響を、ラット脈絡膜新生血管モデルを用いて in vivo で検討し、脈絡新生血管の発生、増大、退縮の過程において小胞体ストレスがどのように影響しているのかを調べると同時に眼内各組織に与える影響を検討する。

#### 4. 研究成果

培養網膜色素上皮細胞において、小胞体ストレス 暴露 ( tunicamycin(1  $\mu$  g/ml)、thapsigargin(1  $\mu$  M)にて小胞体ストレスマーカー (Bip, ATF6, CHOP, caspase-4) の発現を western blot 法にて検討した。コントロール群と比較して、小胞体ストレス群では恒常性維持に働く Bip, ATF6 の発現が増加、一方アポトーシスに働く CHOP, caspase-4 の発現も上昇しており、恒常性維持と細胞死へのプロセスの両方が働き unfolded protein response が最大限に働いた可能性が考えられた。

また小胞体ストレス下での培養液中 (トランスウェルを使用し apical 側と basolateral 側から採取) の血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) 濃度を ELISA 法にて検討した。apical 側の VEGF165 濃度は小胞体ストレス群ではコントロールと比較して 24 時間後に上昇し、basolateral 側は 48 時間後に上昇していた。しかし VEGF 濃度の上昇は最大で約 1800pg/ml であり tight junction に影響を及ぼす十分な濃度ではなかったと考えられた。

本研究の tunicamycin、thapsigargin の濃度・暴露時間では小胞体ストレスは網膜色素上皮細胞に対して細胞保護的に働き、tight junction の機能、構造が増強されていた。VEGF の発現も上昇していたが、経上皮電気抵抗に変化を生じさせうる十分な蛋白濃度ではなかった。このことを臨床と関連して考えると、小胞体ストレスが生じることで tight junction が強くなり、またアミロイド  $\beta$  の蓄積によりブルッフ膜と網膜色素上皮の接着が弱くなることで、網膜色素上皮剥離発生に関与するのではないかと考えられた。

#### 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 12 件)

①Increased expression of tight junctions in ARPE-19 cells under endoplasmic reticulum stress.

Yoshikawa T, Ogata N, Izuta H, Shimazawa M, Hara H, Takahashi K.

Curr Eye Res. 2011 Dec;36(12):1153-63. 査読有

②Characteristics of age-related macular degeneration in patients with diabetic retinopathy.

Yoshikawa T, Ogata N, Wada M, Otsuji T, Takahashi K

Jpn J Ophthalmol 2011;55(3):235-240 査読有

③Effects of intravitreally injected bevacizumab on vascular endothelial growth factor in fellow eyes.

Matsuyama K, Ogata N, Matsuoka M, Wada M, Nishimura T, Takahashi K

J Ocul Pharmacol 2011;55(4):502-505 査読有

④網膜血管腫状増殖を合併した網膜色素変性の 1 例

長央由里子、平本裕盛、高橋寛二

日眼会誌 2011 ; 115(2) : 139-143 査読有

⑤ラニズマブ硝子体内注射における反応不良例の検討

正 健一郎、尾辻剛、津村晶子、津田メイ、高橋寛二 眼臨紀 2011 ; 4(8) : 782-784

査読有

⑥加齢黄斑変性の分類と診断

高橋寛二

あたらしい眼科 2011 ; 28(2) : 157-163 査読無

⑦網膜血管腫状増殖

高橋寛二

臨眼 2011 : 65(増) : 274-281

査読無

⑧加齢黄斑変性の治療指針

高橋寛二

Geriatr Med 2011 : 49(4) : 379-383

査読無

⑨Plasma levels of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor before and after intravitreal injection of bevacizumab.

Matsuyama K, Ogata N, Matsuoka M, Wada M, Takahashi K, Nishimura T

Br J Ophthalmol 2010 Sep;94(9):1215-1218 査読有

⑩滲出型加齢黄斑変性におけるスペクトラルドメインOCT所見  
永井由巳、有澤章子、正健一郎、尾辻剛、西川真生、津村晶子、久保木香織、長央由里子、高橋寛二

眼科臨床紀要 2010;3(8):804-811  
査読有

⑪加齢黄斑変性—治療の進歩

高橋寛二

総合臨床 2010;59(7):1633-1634

査読無

⑫加齢黄斑変性の新しい分類と診断基準

高橋寛二

眼科手術 2009;22(3):333-336

査読無

〔学会発表〕(計4件)

① 高橋寛二ほか:

加齢黄斑変性の治療指針、日本臨床眼科学会、  
2011年10月7日～10日、東京

② 吉川匡宣、高橋寛二ほか:

小胞体ストレスを高濃度もしくは長時間暴露時の tight junction の変化、日本眼科学会、2011年5月12日～15日、東京

③ 吉川匡宣、高橋寛二ほか:

Altered expression of tight junctions in APRE19 cells under endoplasmic reticulum stress, The Association for Research in Visual Science and Ophthalmology、2010年5月2日～6日、アメリカ

④ 吉川匡宣、高橋寛二ほか:

小胞体ストレス負荷時の網膜色素上皮細胞における tight junction の変化、日本眼科学会、2010年4月15日～18日、東京

〔図書〕(計1件)

①脈絡膜新生血管、病気の分子形態学、日本臨床分子形態学会編、学際企画

高橋寛二

2011; 357-360

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋寛二 (TAKAHASHI KANJI)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号 60216710

### (2) 研究分担者

緒方奈保子 (OGATA NAHOKO)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号 60204062

<2009-2010>

安藤 彰 (ANDO AKIRA)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号 50319612

<2009-2010>

(3) 連携研究者: なし