

平成23年5月2日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791677

研究課題名(和文)

網膜色素変性、加齢黄斑変性への小胞体ストレスの関与とそれを標的とした治療法の研究
 研究課題名(英文) Unfolded protein response in age related macular degeneration and retinal degeneration.

研究代表者

加地 秀 (KACHI SHU)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30345904

研究成果の概要(和文)：培養網膜色素上皮細胞(RPE)へのアミロイドβ負荷により血管内皮増殖因子(VEGF)の産生は増加するが、その際に小胞体ストレスマーカーも増加しており、これらは小胞体ストレスを抑制する薬剤である4-フェニル酪酸(PBA)により抑制可能であった。

研究成果の概要(英文)：It is reported that amyloid beta stimulates the vascular endothelial growth factor (VEGF) expression from the retinal pigment epithelium (RPE) cells. We found that amyloid beta also increases the expression of the unfolded protein response (UPR) markers. These increases of VEGF and UPR were down-regulated by addition of 4-phenylbutyric acid (PBA), UPR inhibitor, to the medium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

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、アミロイドβ、アポトーシス、カスパーゼ12、カスパーゼ4、GADD153/CHOP、4-フェニル酪酸、ARPE-19

1. 研究開始当初の背景

目的：網膜色素上皮(RPE)へのアミロイドβ負荷により、血管内皮増殖因子(VEGF)の発現が増大することが報告されている。また近年、小胞体ストレスは様々な疾患の発生に関与することが明らかになってきているが、アミロイドβは神経細胞に小胞体ストレスを引き起こし、アポト

シスを引き起こすことが報告されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) 網膜色素上皮(RPE)へのアミロイドβ負荷による血管内皮増殖因子(VEGF)の発現の増大に小胞体ストレスが関与しているか否かを確認すること、
 (2) RPEが小胞体ストレスを介したアポ

トーシスをおこすかどうかを確認すること、そして、(3) これらが小胞体ストレスを抑制する薬剤により抑制可能かどうかを検討することである。

3. 研究の方法

ヒト RPE 由来の培養細胞である ARPE-19 をコンフルエントまで培養したのち、アミロイドβを加えた培養液に交換して 24 時間培養し、細胞と培養液を回収した。また、小胞体ストレスを抑制する薬剤である 4-フェニル酪酸 (PBA) を培養液中に添加した群も作成し、細胞と培養液を回収した。培養液については ELISA 法により、VEGF 濃度の測定を行った。細胞ライセートについてはウエスタンブロッティングにより細胞ライセート中の GAPDH、小胞体ストレスに伴うアポトーシスに関わるタンパクである CHOP、カスパーゼ 4、12 などのタンパクを検出した。また一部の細胞についてはガラスベースディッシュにて培養し、固定した後に、小胞体ストレスのマーカーである GRP78/Bip の免疫染色、ApopTag® Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit を用いた TUNEL 染色を施行した。

4. 研究成果

アミロイドβ (Aβ) 負荷により、培養液中の VEGF 濃度は濃度依存的に上昇したが、PBA の添加により減少した。(図 1)

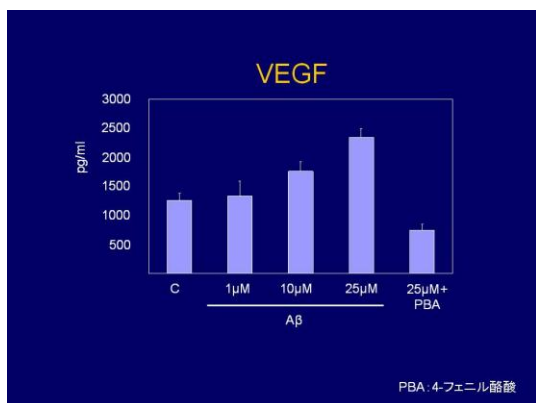


図 1 アミロイドβ負荷と VEGF

また、GRP78/Bip の発現はアミロイドβ負荷により増加し、PBA の添加により減少していた。(図 2)

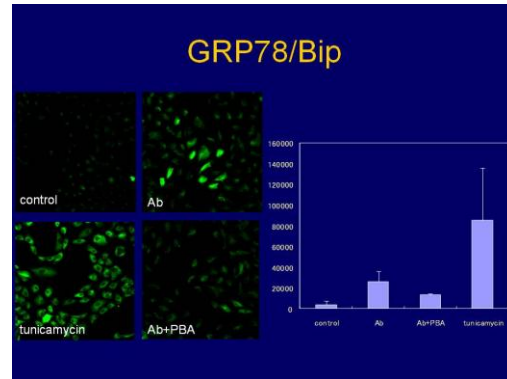


図 2 アミロイドβ負荷と GRP78/Bip

CHOP、プロカスパーゼ 4、活性型のカスパーゼ 12 のバンドはアミロイドβ負荷により増強していたが、これらは PBA を添加することにより減少した。(図 3)

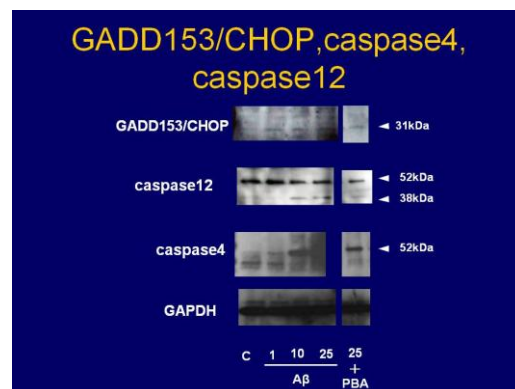


図 3 アミロイドβ負荷と小胞体ストレスを介したアポトーシスのマーカー

TUNEL 染色の結果であるが、アミロイドβにより、著しい増加とはいえないものの、陽性細胞がみられ、PBA を添加するとによりそれは減少した。(図 4)

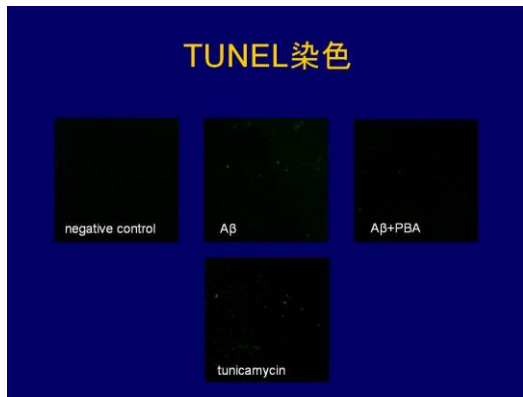


図4 アミロイドβ負荷とアポトーシス

以上をまとめると、アミロイドβは、小胞体ストレスを介して、RPEからのVEGF発現を増大させ、RPEにアポトーシスを起こす可能性がある。また、これらの反応はPBAにより抑制可能であった。

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10件) 全て査読有り

- 1) Tomida D, Nishiguchi KM, Kataoka K, Yasuma TR, Iwata E, Uetani R, Kachi S, Terasaki H. Suppression of choroidal neovascularization and quantitative and qualitative inhibition of VEGF and CCL2 by heparin. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 in press
- 2) Kataoka K, Nishiguchi KM, Kaneko H, van Rooijen N, Kachi S, Terasaki H. The roles of vitreal macrophages and circulating leukocytes in retinal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 ;52:1431-8
- 3) Fujii Y, Kachi S, Kawasumi T, Honda H, Ito A, Terasaki H. Transfer of Gene to Human Retinal Pigment Epithelial Cells Using Magnetite Cationic Liposomes. Br J Ophthalmol. 2010 Aug;94(8):1074-7.

4) Kondo M, Mokuno K, Uemura A, Kachi S, Nakamura M, Kondo A, Terasaki H. Paraneoplastic retinopathy associated with retroperitoneal liposarcoma. Clin Ophthalmol. 2010 Apr 26;4:243-5.

5) Kachi S, Kobayashi K, Ushida H, Ito Y, Kondo M, Terasaki H. Regression of Macular Edema Secondary to Branch Retinal Vein Occlusion during Anti-TNF- α Therapy for Rheumatoid Arthritis. J Clinical Ophthalmol. 2010 Jul 30;4:667-70.

6) Nishiguchi KM, Kataoka K, Kachi S, Komeima K, Terasaki H. Regulation of pathologic retinal angiogenesis in mice and inhibition of VEGF-VEGFR2 binding by soluble heparan sulfate. PLoS One. 2010 Oct 20;5(10):e13493.

7) Yokoi R, Asami T, Kachi S, Ito Y, Nakamura M, Terasaki H. A case of acute retinal necrosis after corticosteroid pulse therapy for unilateral Vogt-Koyanagi-Harada disease. Retinal Cases & Brief Reports. 2010;4(1):51-54.

8) Yamakoshi T, Kachi S, Sugita J, Asami T, Ishikawa K, Ito Y, Terasaki H. Triamcinolone-assisted removal of internal limiting membrane enhances the effect of vitrectomy for diabetic macular edema. Ophthalmic Res. 2009;41(4):203-9.

9) Ito Nonobe N, Kachi S, Kondo M, Takai Y, Takemoto K, Nakayama A, Hayakawa M, Terasaki H. Concentration of Vascular Endothelial Growth Factor in Aqueous Humor of Eyes with Advanced Retinopathy of Prematurity before and

after Intravitreal Injection of Bevacizumab. Retina. 2009;29(5):579-85.

10) Kondo M, Kondo N, Ito Y, **Kachi S**, Kikuchi M, Yasuma TR, Ota I, Kensaku M, Terasaki H. Intravitreal injection of bevacizumab for macular edema secondary to branch retinal vein occlusion: results after 12 months and multiple regression analysis. Retina. 2009;29(9):1242-8.

〔学会発表〕（計 24 件）

- 1) 日比展昭、近藤峰生、石川浩平、米今敬一、加地秀、伊藤逸毅、寺崎浩子：（一般講演、黄斑円孔）黄斑円孔術後の網膜神経線維層の一過性肥厚 第 34 回日本眼科手術学会総会 2011. 1. 28 京都
- 2) 原日輪子、井口優子、岩田英嗣、牛田宏昭、安田俊介、大岩和博、黒土愛、加地秀、上野真治、寺崎浩子：硝子体手術中の眼内温度変化 名古屋大学眼科集談会 2010. 12. 18 名古屋
- 3) 植谷留佳、加地秀、石川浩平、高橋明子、岩田英嗣、牛田宏昭、大岩和博、寺崎浩子：加齢黄斑変性の Quality of Life 名古屋大学眼科集談会 2010. 12. 18 名古屋
- 4) 牛田宏昭、加地秀、安田俊介、植谷留佳、朴昌華、近藤峰生、寺崎浩子：（一般口演、診断・治療 I）糖尿病黄斑浮腫における眼内血管内皮増殖因子濃度と網膜電図 第 16 回日本糖尿病眼学会総会 2010. 11. 26 大阪
- 5) 加地秀、松井朝子、黒土愛、牛田宏昭、藤井康生、寺崎浩子：網膜色素上皮へのアミロイドβ負荷と小胞体ストレス 第 49 回日本網膜硝子体学会総会 2010. 11. 26 大阪
- 6) 伊島亮、安田俊介、加地秀、近藤峰生、寺崎浩子：網膜中心静脈閉塞における眼内血管

内皮増殖因子濃度と漿液性網膜剥離の関係 第 49 回日本網膜硝子体学会総会 2010. 11. 26 大阪

7) **加地秀**：加齢黄斑変性に対する PDT と抗 VEGF 療法 第 31 回日本レーザー医学会総会 2010. 11. 14 名古屋

8) 二村裕紀子、加地秀、野々部典枝、近藤峰生、早川昌弘、寺崎浩子：（一般口演、小児眼科）Stage4 未熟児網膜症に対する強膜内陥術の成績 第 64 回日本臨床眼科学会 2010. 11. 12 神戸

9) Kondo M, Yasuda S, Kachi S, Piao CH, Ueno S, Terasaki H: Significant correlations between ERG components and VEGF concentration in aqueous humor in eyes with central retinal vein occlusion. XL VIIIth ISCEV 2010 2010. 11. 9 Western Australia

10) Kataoka K, Nishiguchi KM, **Kachi S**, Terasaki H : The distribution and characteristics of bone marrow-derived cells in the retina during physiological and pathological angiogenesis WOC 2010 2010. 6. 6 Berlin

11) Ushida H, **Kachi S**, Asami T, Ishikawa K, Kondo M, Terasaki H. : Effect of Preoperative Intravitreal Bevacizumab on Visual Function for Proliferative Diabetic Retinopathy Eyes. ARVO 2010 Annual Meeting 2010. 5. 5 Fort Lauderdale

12) Yasuda S, Kondo M, **Kachi S**, Ito Y, Terui T, Terasaki H. : Rebound of Macular Edema After Intravitreal Bevacizumab Therapy in Eyes With Macular Edema Secondary to Branch Retinal Vein Occlusion. ARVO 2010 Annual Meeting 2010. 5. 5 Fort Lauderdale

13) Nishiguchi KM, Kataoka K, **Kachi S**, H. Terasaki. : The Role of Heparan Sulfate in

Oxgen-Induced Retinopathy. ARVO 2010 Annual Meeting 2010.5.4 Fort Lauderdale

14) 王春霞、細野克博、川野敏夫、加地秀、中村誠、寺崎浩子、三宅養三、中西伸夫、堀田喜裕、簗島伸生：(一般講演；網脈絡膜研究(1)) 青錐体一色型色覚日本人系系の赤緑遺伝子解析 第 114 回日本眼科学会総会 2010.4.16 名古屋

15) 安田俊介、加地秀、近藤峰生、牛田宏昭、植谷留佳、照井隆行、朴昌華、寺崎浩子：(一般講演、網膜静脈閉塞症) 網膜中心静脈閉塞症における眼内血管内皮増殖因子濃度と網膜電図 第 114 回日本眼科学会総会 2010.4.15 名古屋

16) 小林謙信、加地 秀、牛田宏明、伊藤逸毅、近藤峰生、寺崎浩子：抗 TNF- α 薬で改善した BRVO に伴う黄斑浮腫の一例 第 420 回東海眼科学会 2010.2.6 名古屋市

17) 牛田宏昭、加地 秀、浅見 哲、石川浩平、近藤峰生、寺崎浩子：増殖糖尿病網膜症における bevacizumab 術前投与の視機能に対する影響。 第 33 回日本眼科手術学会 2010.1.22 東京

18) 加地 秀：抗血管新生治療 —基礎と臨床—：新しい抗血管新生治療の開発第 48 回日本網膜硝子体学会、第 26 回日本眼循環学会、第 15 回日本糖尿病眼学会 3 学会合同シンポジウム 2009.12.5 名古屋

19) 松井朝子、加地 秀、藤井康生、寺崎浩子：網膜色素上皮細胞における血管内皮増殖因子発現増加への小胞体ストレスの関与。第 48 回日本網膜硝子体学会、第 26 回日本眼循環学会 合同学会 2009.12.5 名古屋

20) 安田俊介、近藤峰生、照井隆行、上野真治、加地 秀、伊藤逸毅、寺崎浩子：網膜静脈分枝閉塞の黄斑浮腫に対するベバシズマブ療法後のリバウンド現象。 第 48 回日本網膜硝子体学会、第 26 回日本眼循環学会 合

同学会 2009.12.5 名古屋

21) 牛田宏昭、加地 秀、近藤峰生、浅見 哲、寺崎浩子：術前網膜電図と糖尿病黄斑浮腫の手術成績。 第 15 回日本糖尿病眼学会 2009.12.5 名古屋

22) 安田俊介、近藤峰生、照井隆行、上野真治、加地 秀、寺崎浩子：網膜静脈分枝閉塞の黄斑浮腫に対するベバシズマブの効果：漿液性網膜剥離の有無による比較。 第 63 回日本臨床眼科学会 2009.10.10 福岡

23) 二村裕紀子、野々部店枝、加地 秀、近藤峰生、中沢陽子、寺崎浩子：バックリング手術に抗 VEGF 療法を併用した未熟児網膜症の一例。 第 419 回 東海眼科学会 2009.6.21 浜松

24) Terui T, Kondo M, Kondo N, Ito Y, Kachi S, Yasuma T, Kikuchi M, Ota I, Miyake K, Terasaki H: Intravitreal injection of bevacizumab for macular edema secondary to BRVO: Results after 12-months and multiple regression analysis. The 24th Congress of the Asia-Pacific Academy of Ophthalmology 2009.5.16, Bali.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加地 秀 (KACHI SHU)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30345904

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号：