

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592634

研究課題名(和文)極性の变化による網膜色素上皮の環境制御に関する研究

研究課題名(英文)The difference of cell reactivity from the presence or absence of retinal pigment epithelial cell polarity

研究代表者

園田 祥三 (Sonoda, Shozo)

鹿児島大学・医学部・歯学部病院・講師

研究者番号：20325806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素上皮細胞(RPE)は網膜の恒常性を保つために重要な役割を担っている。網膜疾患の病態解明のため、RPE培養細胞による研究が行われているが、従前報告が少ない、生体に近い特性を持つ極性を示す培養RPEを使って研究を行った。極性RPEへのサイトカイン刺激を行ったところ、腫瘍増殖因子刺激では、血管内皮増殖因子の分泌は減少し、従来の培養細胞と逆の結果であった。RPE細胞は極性の有無によって、各種刺激に対する反応性が異なる事が解明された。極性RPEを利用することでより正確な病態理解につながると考えられる。

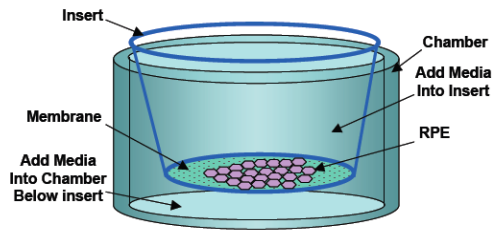
研究成果の概要(英文)：Retinal pigment epithelial (RPE) cells form a blood retinal barrier, and their polarized property is crucial for maintaining the barrier functions. Cell culture RPE models have contributed to our understanding of how RPE cells are involved in the pathophysiology of retinochoroidal diseases, however, most studies have been performed on weakly polarized cells, such as ARPE-19 cells, which do not have barrier properties. Recently, a new cell culture method was developed that produced RPE cells with characteristics of the native tissue which called polarized RPE. Exposure to Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  decreased the vascular endothelial growth factor secretion in polarized RPE cells but increased it in non-polarized RPE cells in culture. Cell polarization is an important factor for determining the response of RPE cells to various cytokines, and the different responsive patterns to these upon cell polarity might explain the complicated pathology of corio-retinal diseases.

研究分野：網膜疾患

キーワード：細胞極性 網膜色素上皮細胞 細胞培養 腫瘍壊死因子 細胞間接着装置

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 網膜色素上皮細胞 (RPE) は眼球の恒常性を維持するため様々の重要な役割をもち、RPE がストレス下で種々の生理活性物質を生成し、病態形成および創傷治癒に関与している。RPE *in vitro* 研究では、ARPE-19 を用いた培養系での研究が主に行われているが、ライン化された細胞である ARPE-19 は継代や培地条件によってその性質が変化することが報告され、また、生体 RPE が持つ細胞間接着装置や細胞間の物質輸送を制御する働きなど持たず、厳密には生体 RPE を反映しているとは言いがたい。言い換えると、*in vivo* の RPE 機能と解離した培養細胞を用いて実験を行っていることになる。近年、transwell™ を利用した培養によって、細胞極性を示す RPE (polarized RPE) 培養が可能になっている。我々は、さらに培養法を改良し、ヒトおよびブタ RPE で、細胞極性が高く (trans epithelial resistance (TER) 値が  $500 \cdot \text{cm}^2$  以上)、より分化した微絨毛をもつ RPE 培養に成功している。また、transwell™ を利用した研究における優位点は、transwell™ によって培養チャンバー内が上下2つ空間に分けられるため、RPE 上皮面(上方)・基底面(下方)に分けて解析が可能なこと(下図)、さらに transwell™ 上での免疫染色等が可能のため、極性を維持した状態で実験ができることが挙げられる。



(2) これまでの予備実験で、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子(TNF-)をブタ RPE に作用させた場合、極性を持たない RPE と極性を持つ RPE とでは血管内皮増殖因子(VEGF)分泌における反応が異なることを確認している。また、ブタ極性 RPE に TNF- 刺激を行うと、バリア機能を反映する TER や密着結合蛋白である ZO-1 の発現が低下することもわかっている。これらの治験から、従来の ARPE-19 を用いた実験で言われている、種々のサイトカイン刺激による反応は、より生体に近い特徴を有する極性 RPE では異なる可能性があり、培養 RPE の極性の有無による、各種刺激による反応性の違いを検討することを目的とした。

(3) 現在、網膜疾患に対し、抗 VEGF 抗体の硝子体内注射などの薬物治療が一般的に行われるようになった。これらの背景から、今後ますます眼内への選択的薬物送達の重要性がますます予想される。薬物送達におい

て、標的指向性を持つ薬剤の開発や送達効率の高い投与法の開発が必要である。我々は、これまで眼組織への効率的な送達法として低エネルギー超音波の可能性を報告してきた。ヒトへの利用を進める上で生体に近い RPE モデルを用いて、さらに安全性・有効性の検討を行う。

### 2. 研究の目的

(1) RPE は生体内において血液網膜関門を形成しており、そのバリア機能の破綻が病態形成に関与していることが予想される。本研究では、生体により近い極性 RPE を用いてより正確な病態解明につなげることを目的とする。また、病的刺激として、各種サイトカイン刺激による、極性 RPE での反応を解析することを目的とする。

(2) 病的な状態が続く結果、細胞の破壊が起こる。これは極性という観点から考えると、病的状態では細胞は極性を失った状態とも言える。そこで、上記のサイトカイン刺激に対しての、極性の有無による違いを検討することを目的とする。

(3) 眼内薬物送達の可能性として、低エネルギーの超音波の可能性を、生体に近い極性 RPE を使って、*in vitro* で検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

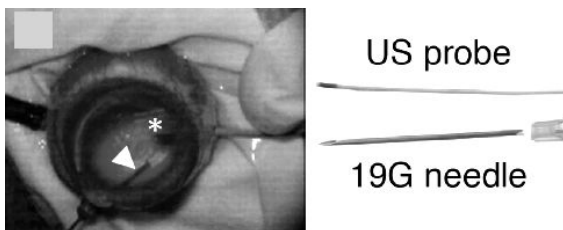
(1) ブタ RPE の初代培養細胞を、transwell™ 上に播種し極性を持った細胞を培養し実験に用いる。これまで我々は、生体内で正常 RPE が分泌する VEGF や色素上皮由来因子(PEDF)の絶対量が、細胞極性の獲得に伴って増加することを示した。本研究では、病的な状態で分泌が亢進している代表的なサイトカインである、TNF-、IL-1 (炎症)、Thrombin(出血)、TGF- (細胞遊走)等を選択し、極性 RPE に刺激をおこない、VEGF、PEDF などの分泌パターンの解析を ELISA 法、real time-PCR 等を用いて行う。また、バリア機能を持つことが極性を持つ細胞の特徴であることから、バリア機能に関連する因子(TER, tight junction protein, adhesion protein, F-actin 等)の解析を western blot, 免疫染色等を用いて行う。

(2) (1)で用いた各種サイトカイン刺激を上皮面・基底面個別に行いその違いを解析する。解析方法については(1)と同様に解析する。

(3) 極性 RPE を培養するには、約2週間の期間を要する。また極性の程度と TER 値がよく相関するため、transwell™ 上に培養開始後3日目で、TER 値が  $50 \cdot \text{cm}^2$  以下のものを、非極性 RPE と定義して、(1)で用いた各種サイトカイン刺激に対する RPE の反応の違いを、極性の有無によって比較検討した。(1)の解

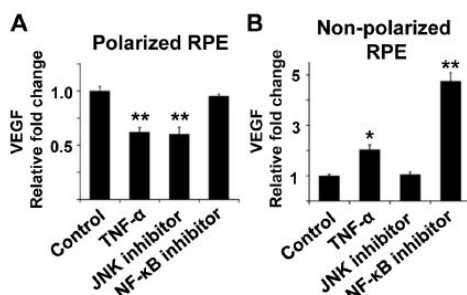
析に加えて、刺激の差異の検討として、細胞内シグナル解析を行い、また、細胞周期と細胞増殖能の関与も疑われるために、Ki-67 や P27 等を用いた、免疫染色を行って反応の違いを解析する。

(4) 眼組織への低エネルギー超音波を用いた薬物・遺伝子送達法の研究の中で、眼内へ挿入可能な極小な超音波プローブを開発した(下図)。この装置の安全性、有効性の検討に *in vitro* のモデルが必要であり、機能的・形態的に生体と類似する極性 RPE は本研究に適すると考え実験を行った。極性 RPE に様々な照射条件、緑色蛍光タンパク質 (GFP) プラスミド濃度を設定し投与を行い、導入効率、安全性について、GFP 定量、免疫染色を行い評価する。

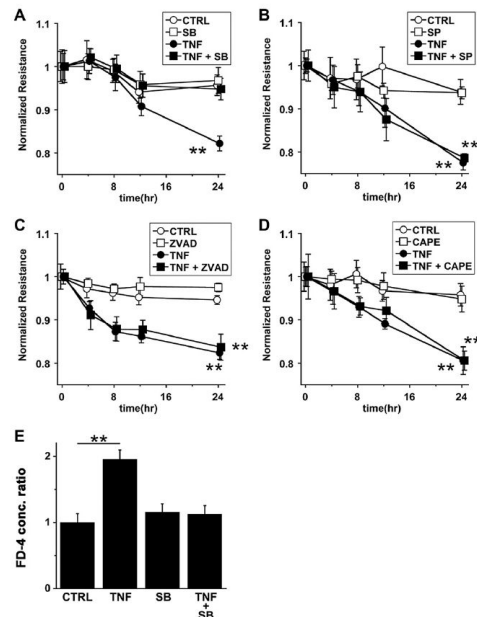


#### 4. 研究成果

(1) TNF- $\alpha$  刺激に関する解析が最も進んだ結果であった。VEGF 分泌については、従来の APRE-19 では TNF 刺激によって、VEGF 分泌の亢進が既知であったが、我々の研究でも、非極性 RPE では、これまでと同様の結果が得られたが、極性 RPE では逆に VEGF 分泌が低下することが分かった。そのメカニズムについては、JNK や NF- $\kappa$ B の細胞内シグナルの、相互作用が、極性の有無の違いによって異なる事が関係している可能性を示唆できた(下図)。このことは、臨床で治療に苦慮している萎縮型 AMD の発症のメカニズムを考える上で手がかりになると考えている。



(2) 極性の獲得は細胞間結合装置の発達と非常に関係があるため解析を行った結果、TNF- $\alpha$  は、極性 RPE では、特に密着結合を形成する、ZO-1 や Occludin の発現を低下させることで、TER 値が減少することが分かった。またその作用は細胞内シグナル p38MAPK を介して作用していることが分かった(下図)。



(3) Thrombin 刺激を行った結果、極性 RPE の密着結合に対しては、TNF- $\alpha$  と異なり影響を与えなかった。また、VEGF 分泌については、極性の有無による違いはなく、ともに VEGF 分泌亢進を認めた。IL-1 については有意なデータは得られなかった。TGF- $\beta$  については、現在解析途中である。各種サイトカイン刺激による、極性の有無による反応性の違いは、加齢黄斑変性や糖尿病黄斑症などの病態を理解する上で手がかりになると考えている。すなわち、RPE 形態が保たれる状態では、極性を持った細胞と置き換えられ、また RPE 形態が破壊され菲薄化している状態では、極性を失っていると考えられる。疾患のある状態では、RPE については、極性・非極性の特性の異なる細胞がモザイク状に存在している可能性があり、病態形成に向かう炎症などのシグナルの反応が異なる本研究結果は、より正確な病態を解明する手がかりとなると考えている。

#### (4) 極性 RPE への遺伝子導入

通常、極性を持った RPE は細胞周期においては G0 期にあるといわれ、遺伝子導入は従来のリポフェクション法などでは難しい。極性 RPE に対して低エネルギーの超音波を用いて GFP プラスミドの導入を試みた結果、極性 RPE では GFP 陽性細胞を約 10~20% に認めた。また、眼内に挿入可能な、超音波プローブを用いて、照射おこなった結果、組織障害は認めず、細胞間接着装置は保たれていた。今後、さらなる超音波プローブの改良を続け、マイクロバブルと超音波と併用することでさらに導入効率が上がることが、報告されているため、現在それらの併用効率を検討している。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 16 件)

Terasaki H, Sakamoto T, Shirasawa M, Yoshihara N, Otsuka H, Sonoda S, Hisatomi T, Ishibashi T. Penetration of bevacizumab and ranibizumab through retinal pigment epithelial layer in vitro. Retina. 査読有, 2015, 35(5):1007-15. doi: 10.1097/IAE.0000000000000428.

Terasaki H, Shirasawa M, Otsuka H, Yamashita T, Uchino E, Hisatomi T, Sonoda S, Sakamoto T. Different Effects of Thrombin on VEGF Secretion, Proliferation, and Permeability in Polarized and Non-polarized Retinal Pigment Epithelial Cells. Curr Eye Res, 査読有, 2014, 13:1-10. Epub ahead, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25310246>

Sonoda S, Yamashita T, Suzuki R, Maruyama K, Sakamoto T. Application of ultrasound-enhanced gene and drug delivery to the ocular tissue. Yakugaku Zasshi. 2013;133(12):1269-76. 査読有, [https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/133/12/133\\_13-00222-2/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/133/12/133_13-00222-2/_article/-char/ja/)

Terasaki H, Kase S, Shirasawa M, Otsuka H, Hisatomi T, Sonoda S, Ishida S, Ishibashi T, Sakamoto T. TNF- $\alpha$  decreases VEGF secretion in highly polarized RPE cells but increases it in non-polarized RPE cells related to crosstalk between JNK and NF- $\kappa$ B pathways. PLoS One. 2013, 29;8(7):e69994. 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0069994.

Shirasawa M, Sonoda S, Terasaki H, Arimura N, Otsuka H, Yamashita T, Uchino E, Hisatomi T, Ishibashi T, Sakamoto T. TNF- $\alpha$  disrupts morphologic and functional barrier properties of polarized retinal pigment epithelium. Exp Eye Res. 2013, 110:59-69. 査読有, doi:10.1016/j.exer.2013.02.012.

Sonoda S, Tachibana K, Yamashita T, Shirasawa M, Terasaki H, Uchino E, Suzuki R, Maruyama K, Sakamoto T: Selective gene transfer to the retina using intravitreal ultrasound irradiation. J Ophthalmol, 査読有, 2012, 2012:412752, DOI:10.1155/2012/412752

〔学会発表〕(計 21 件)

寺崎 寛人, 芳原 直也, 白澤 誠, 大塚 寛樹, 園田 祥三, 坂本 泰二 極性をもつ網膜色素上皮細胞における抗VEGF薬の透過性のメカニズム 第68回日本臨床眼科学会、2014.11.13-16、神戸国際展示場(兵庫県、神戸市)

寺崎 寛人, 白澤 誠, 大塚 寛樹, 園田 祥三, 坂本 泰二、極性をもつ網膜色素上皮細胞におけるTNF- $\alpha$ のVEGF分泌抑制作用、第117

回日本眼科学会総会、2013.4.4-7、東京国際フォーラム(東京都、東京)

園田祥三、山下敏史、鈴木亮、丸山一雄、立花克郎、坂本泰二、ナノテクノロジーを駆使した革新的診断・治療システムの構築に向けて 眼科における低照射エネルギー超音波の利用、第133回日本薬学会、2013.3.27-30、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

園田祥三、極性をもつ培養網膜色素上皮を用いた網膜疾患へのアプローチ、第116回日本眼科学会総会、2012.4.5-8、東京国際フォーラム(東京都、東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)  
取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

園田 祥三 (SONODA Shozo)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師  
研究者番号：20325806

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし