

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791860

研究課題名(和文) 網膜色素上皮細胞における上皮間葉転換

研究課題名(英文) Epithelial Mesenchymal Transition in ARPE-19 cells

研究代表者

高橋 枝里 (Takahashi, Eri)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：60622602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：外傷や裂孔原性網膜剥離術後に続発する増殖硝子体網膜症は眼内に著名な増殖膜を認め、失明に至る視力予後不良の疾患である。硝子体中に含まれる様々なサイトカインや増殖因子が網膜色素上皮細胞の脱分化や増殖に関与することが報告されているが、硝子体と網膜色素上皮細胞の関係はいまだ不明な点が多い。今回の研究において、機械的刺激を受けた培養網膜色素上皮細胞において、TGF- β -Smadシグナル経路が活性化されることに加え、硝子体刺激によってp38 MAPKシグナルが活性化し、増殖シグナルに関与することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Proliferative vitreoretinopathy (PVR) is severe ocular fibrosis, resulting in severe visual loss. Vitreous fluid is thought to be one of important stimulators of the dedifferentiation and proliferation of retinal pigment epithelial (RPE) cells. However, the effects of vitreous fluid in RPE cells remain to be clarified.

We found that the injured RPE cells show high levels of TGF- β -Smad signaling activities and that the exposure to vitreous fluid triggers the proliferative response of injured RPE cells through activation of p38 MAPK signaling.

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：上皮間葉転換 網膜色素上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

増殖硝子体網膜症 (PVR) は外傷や裂孔原性網膜剥離の術後にみられる視力予後不良の増殖性疾患である。現在に至るまで外科的治療のみが治療手段であるが、手術成績は低く、著しく視力が低下する例も少なくない。加齢黄斑変性における網膜下の線維化も視力予後に関与する病態であるが、線維化を標的とした治療手段はまだ確立していない。

網膜色素上皮 (RPE) 細胞は網膜の最外層に位置する単層の上皮層である。細胞間接着を維持し、血液網膜関門、視細胞外節の貪食や免疫など網膜のホメオスタシスに関与するといわれている。網膜色素上皮細胞の病的状態が関与するといわれている疾患に上述した PVR や fibrosis がある。PVR では、裂孔や外傷により硝子体中へと散布された網膜色素上皮細胞が形質転換を起こし、再増殖するとともにコラーゲンやファイブロンectinなどの細胞外マトリクスの異常産生や細胞骨格の変化に伴うマトリクス収縮能の亢進が増殖膜の形成や、それに伴う牽引性網膜剥離に関与すると考えられている。この形質転換には硝子体中に含有する Transforming Growth Factor (TGF)- β などの増殖因子や Interleukin (IL)-2, IL-6, Tumor Necrosis Factor (TNF)- α などの炎症性サイトカインがこの RPE の細胞外マトリクスの産生亢進やコラーゲン収縮能に関与することが報告されている。

我々は培養 RPE 細胞を用いて、TGF- β と TNF- α 刺激が RPE 細胞に、上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition, EMT) を誘導することを見出した。TNF- α 刺激により、培養 RPE 細胞は著名な細胞外マトリクスの沈着を生じ、線維性凝集塊を形成する特徴的な phenotype を示した。この phenotype は RPE に EMT が誘導された結果生じたものであることを明らかにした。さらに、この EMT の誘導において、TNF- α 刺激によって Protein Kinase C (PKC) が活性化され、架橋タンパクであるERM タンパク質ファミリーのリン酸化が亢進し、細胞骨格のリモデリングが誘導されると同時に、ヒアルロン酸受容体 CD44 とリン酸化ERM タンパクは actin microdomain で共局在を示し、EMT 誘導因子である TGF- β シグナルの活性化に関与することがわかった。

硝子体と RPE の形質転換の誘導について、その含有サイトカインの種類や濃度の検討や、直接硝子体刺激を行いシグナルや形質転換の解析を多くの報告があるが、未だ RPE の活性化メカニズムと硝子体の関係については不明な点が多い。

2. 研究の目的

PVR や網膜下の線維化に病的に活性化した網膜色素上皮細胞が関与することが知られている。RPE の異常活性化のメカニズムの

一つとして、持続的な酸化ストレス、炎症性サイトカインや増殖因子の暴露が挙げられる。さらに上皮の特性を喪失させる細胞間接着の解離や基底膜の分解など、microenvironment の変化が異常活性化の維持、さらには EMT 誘導に関連するのではないかと考えた。この RPE の活性化のメカニズムを明らかにすることで、増殖性変化や線維化の新たな治療戦略を得ることを目的とし、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 硝子体サンプルの採取

硝子体サンプルの取得については当大学倫理委員会にて受理され、同意を得た患者より術中硝子体サンプルを取得した。2.5ml シリンジより硝子体カッターの吸引ラインより灌流液により希釈していない硝子体を採取した。採取した硝子体はすぐに液体窒素により凍結、-80 で保存された。硝子体サンプルのタンパク量は Bicinchonic acid (BCA) assay により測定された。

(2) 細胞培養

網膜色素上皮細胞は American Type Culture Collection から購入し、10% ウシ胎児血清を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 培地で培養した。すべての実験は無血清培地で行われた。

(3) 免疫染色

細胞は 4%パラホルムアルデヒドで固定され、トライトン処理後、一次抗体を室温で1時間処理し、Phosphate Buffered Saline (PBS) で洗浄後、二次抗体を1時間処理した。共焦点顕微鏡による解析はオリンパス社のフルオビューを使用した。

(4) ウエスタンブロッティング

細胞溶解液は BCA assay でタンパク量を測定し、同タンパク量を電気泳動した。Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜へ転写後、一次抗体を室温で一時間処理し、洗浄後、二次抗体を処理後、化学発光により検出した。

(5) 細胞運動能解析

密に培養した RPE 細胞を滅菌したチップでスクラッチし、細胞運動を経時的に観察した。無血清培地で行い、硝子体サンプルは 20% 濃度で使用した。

(6) 機械的刺激

滅菌されたシリコンラバーで RPE 細胞を剥離し、TNF- α または TGF- β 2、または 10% 硝子体を添加した培養液にて 37 度 5% CO₂ 下一時間培養した。細胞培養皿への細胞接着を阻害するために、poly 2-hydroxyethyl methacrylate コートしたディッシュを使用した。

(7) 増殖能解析

RPE 細胞播種し 24 時間後、無血清培地に培地交換を行い、TNF- α 、TGF- β 2、p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) 阻害薬を添加し、24 時間培養を行った。Bromodeoxyuridin (BrdU) を培養液中に添加し、更に 4 時間、37 度 5% CO₂ の条件下で培養後、4% パラホルムアルデヒドで固定し、抗 BrdU 抗体を用いて BrdU の取り込みの有無について confocal microscopy で観察した。

(8) 3D 培養法

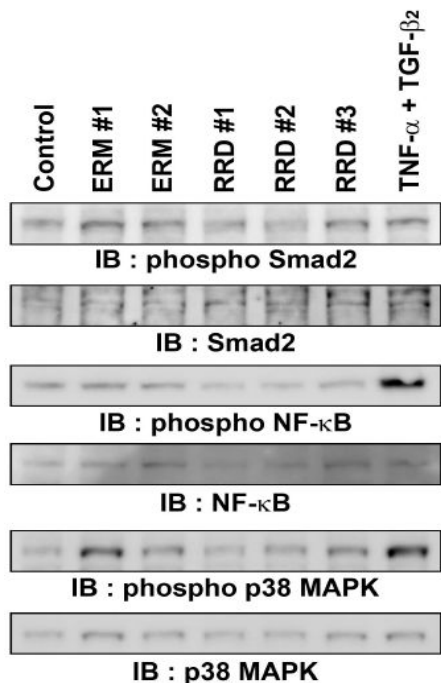
2% growth factor reduced matrigel 上に RPE 細胞を播種し、硝子体を各濃度に希釈添加し、37、5% CO₂ 下で培養した。

4. 研究成果

(1) 硝子体刺激とシグナルの活性化の検討

約 80% 密度に培養した RPE 細胞を 24 時間無血清培地で培養後、に培養した RPE 細胞へ、黄斑上膜 (epiretinal membrane, ERM)、裂孔原性網膜剥離 (rhegmatogenous retinal detachment, RRD) 患者より採取した硝子体サンプルを培地へ添加し、24 時間培養し、シグナルの活性化についてウエスタンブロッティングにより検討した。一部の硝子体サンプル刺激により Smad2, p38 MAPK の活性化を認められたが、疾患群における差は認めなかった。

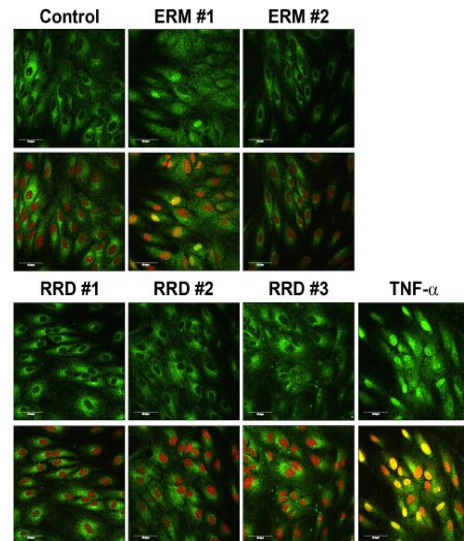
(下図)



NF κ B のリン酸化はウエスタンブロットでは認めなかったが、免疫染色では一部の細胞に核内移行を認めた。シグナル誘導にお

いて、疾患群だけでなく、同疾患においても、硝子体刺激では、シグナルの誘導にバラつきがあり、有意な結果は認めなかった。

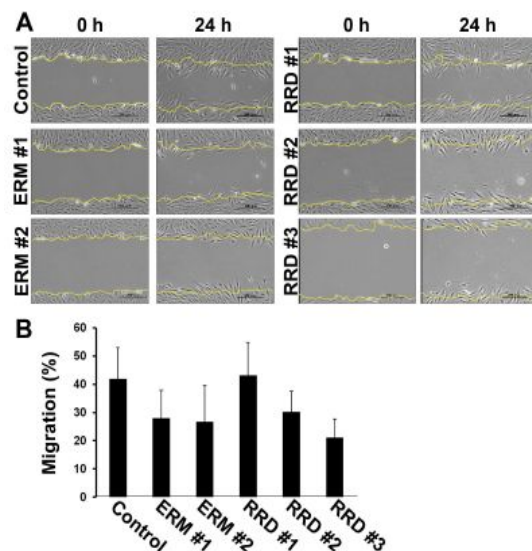
(右図上)



(2) 硝子体刺激と細胞運動能の検討

RPE 細胞を密に培養し、24 時間無血清培地で培養した後、20%硝子体刺激を 24 時間行い、wound healing assay にて解析を行った。ERM サンプルからの硝子体刺激では、運動能が低下する傾向にあった。一方、RRD サンプル刺激では、バラつきが大きく明らかな結果は得られなかった。硝子体濃度 20%では、運動能亢進と硝子体との相関は得られなかった。

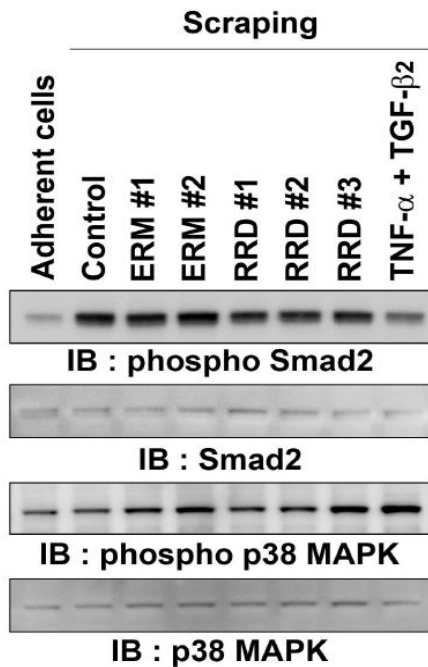
(下図)



(3) 機械的刺激とシグナルの活性化

結果(1)(2)が示すように、培養皿上での硝子体刺激は一部シグナルの誘導を示すものの、明らかな形質転換の誘導を示さなかった。裂孔原性網膜剥離や外傷では、RPE細胞はその基底膜から機械的な剥離が生じ、硝子体へ散布され、その過程で増殖が再開されると考えられている。この機械的剥離がRPEの活性化を誘導するのではないかと考えた。今回我々は、機械的刺激によりRPEを培養皿から剥離し、RPEにどのようなシグナル経路が活性化されるかを検討した。興味深いことに、機械的剥離を行った結果、RPE細胞では、サイトカイン・増殖因子の添加に関わらず、Smad2のリン酸化が亢進することがわかった。機械的剥離に加え、硝子体刺激を行うと、疾患群に関わらず、p38MAPKのリン酸化が亢進することがわかった。

(下図)



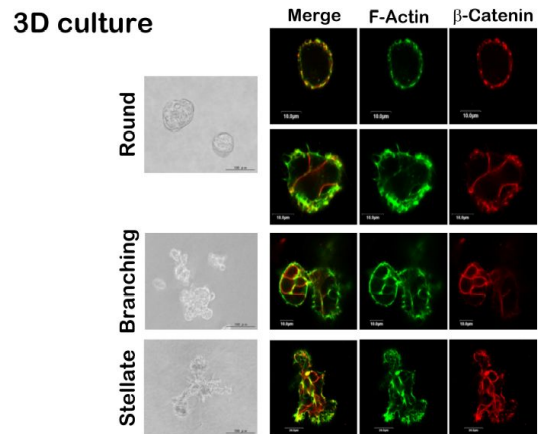
NF-kappaBのリン酸化は変化しなかった。これらの結果から、機械的刺激がRPEの増殖シグナルに関与する可能性が示唆された。また、活性化状態において、さらに硝子体刺激が加わることで、p38 MAPKのリン酸化が亢進したことは、RPEが機械的刺激により活性化したことにより、硝子体中に含有されるサイトカインなどへの感度が亢進した可能性が考えられた。

(4) 3D培養におけるRPEと硝子体の関係

機械的刺激により、EMT誘導刺激であるSmad2のリン酸化が亢進し、活性化RPEに

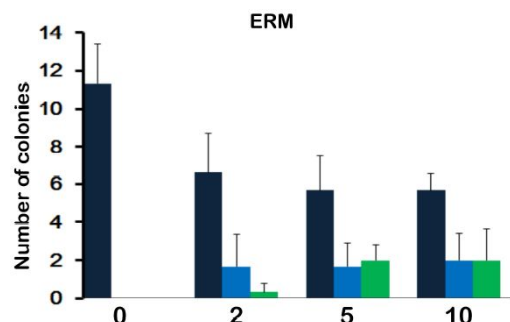
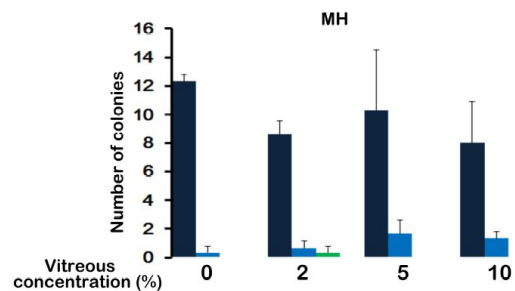
おいて、p38 MAPKが活性化することがわかった。次に、3次元培養において、硝子体刺激がRPEの形質転換に關与するかどうかを検討した。2% Growth Factor Reduced Matrigelを用いた3次元培養を行うと、RPE細胞は、round type, branching type, stellate typeの三種類の形態をとることがわかった。

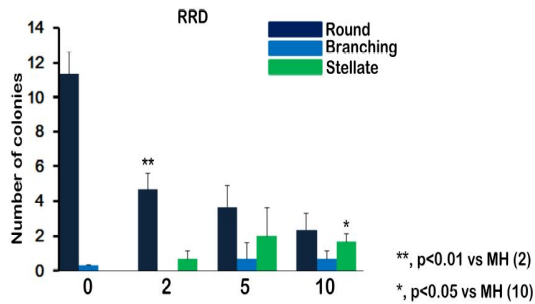
(下図)



各硝子体サンプルの疾患群で検討を行ったところ、特にERM群とRRD群において浸潤性の強いStellate typeを認めた。硝子体刺激を行わないコントロールではStellate typeは認めなかった。

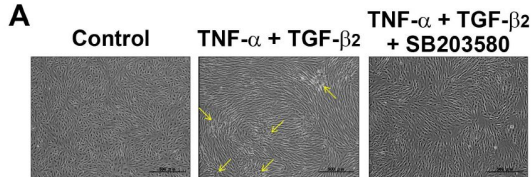
(下図、次頁上図)





(5) p38MAPK は TNF- α と TGF- β 刺激における増殖能に關与する。

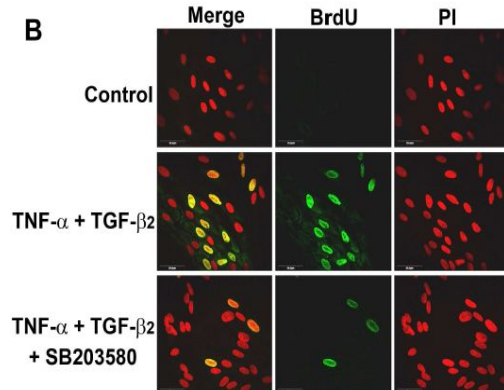
結果(3)より、p38 MAPK の活性化が、硝子体刺激により増強されることが示唆された。前述したように、TNF- α と TGF- β 刺激により RPE 細胞が fibrotic foci を形成する、in vitro EMT model を用いて、p38 MAPK の役割について検討を行った。TNF- α と TGF- β 刺激による fibrotic foci は、p38 MAPK 特異的阻害薬である SB203580 により抑制されることがわかった。(下図)



次に、細胞増殖と p38 MAPK の関係について検討を行うために、BrdU 取り込み実験を行った。細胞播種後 24 時間無血清培地で細胞を培養し、続いて、TNF- α と TGF- β 共刺激、SB203580 同時処理を行い、24 時間培養した。コントロールではほとんど BrdU の取り込みが見られなかった。一方、TNF- α と TGF- β 刺激下では BrdU 取り込みの亢進を認めた。この TNF- α と TGF- β 共刺激により亢進した BrdU の取り込みは SB203580 で抑制された。

(次頁上図)

これらのことより RPE の増殖能の獲得に p38MAPK が關与することがわかった。



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 0 件)

[学会発表](計 5 件)

高橋枝里、眼疾患と上皮間葉転換研究、第 83 回九州眼科学会、2013 年 5 月 31 日 6 月 2 日、熊本、熊本パレア

高橋枝里、猪俣泰也、川路隆博、伊藤康裕、谷原秀信、Epithelial Mesenchymal Transition and Human Vitreous Samples in 2D and 3D culture of ARPE-19 cells、ARVO 2013、2013 年 5 月 5 日 9 日、シアトル、アメリカ合衆国

高橋枝里、谷原秀信、Hyaluronic Acid as a Contributing Factor to Epithelial-Mesenchymal Transition in Retinal Pigment Epithelial Cells and Angiogenesis、ARVO 2012、2012 年 5 月 6 日 9 日、フロリダ、アメリカ合衆国

高橋枝里、谷原秀信、Experimental Study on Signaling Pathways Activated by Scraping and Exposure of Vitreous Samples in ARPE-19 cells、The 27th Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress、2012 年 4 月 13 日 16 日、プサン、大韓民国

高橋枝里、網膜色素上皮細胞における上皮間葉転換、第 116 回日本眼科学会総会、2012 年 4 月 5 日 8 日、東京、東京国際フォーラム

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 枝里 (TAKAHASHI, Eri)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：60622602

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：