

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791867

研究課題名(和文) 加齢黄斑変性病態解明のための網膜色素上皮細胞のシート培養の確立

研究課題名(英文) Simple procedure to form an implantable, well-differentiated monolayer of cultured retinal pigment epithelial cells

研究代表者

加藤 亜紀 (Kato, Aki)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60405157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：経時的に回収した網膜色素上皮単層シートを処理して、ウェスタンブロットを行い、RPE-65発現を確認した。ZO-1、オクルーディンなどタイトジャンクションを構成する蛋白の免疫染色及びウェスタンブロットを施行し、その存在を確認した。また透過型電子顕微鏡で観察を行い細胞間のジャンクションの存在を確認した。ブルッフ膜様構造を検討するため網膜色素上皮単層シート表面の1型コラーゲン、4型コラーゲン、エラスチンの局在を免疫染色あるいはウェスタンブロットで確認した。また、走査型電子顕微鏡を用いて、シート表面の形態の観察し、これらが発現していると思われるような形態を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：Light microscopy revealed the hexagonal shape of RPE cells with an overlying fibrous membrane, suggesting upside-down polarity of RPE and the sheet was easily detached from the bottom of the plate by the gentle pipetting technique. The RPE sheet expressed occludin and ZO-1 as tight junction markers as well as actin, collagen type IV and elastin as a Bruch's membrane component in Western blotting. In SEM images, the upper side showed microvilli and lamellipodia of RPE cells and, thereafter, Bruch's membrane-like structures involving elastic fibers and collagen. TEM disclosed the tight junctions of the RPE cells. Confocal immunofluorescence microscopy showed the expression of ZO-1 and occludin among RPE cells. The RPE sheet manufactured by our original method was well-structured as an implantable sheet with Bruch's membrane and tight junction. This RPE sheet may have a potential as a better option for RPE transplantation.

研究分野：網脈絡膜疾患

キーワード：網膜色素上皮単層シート ブルッフ膜 タイトジャンクション

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は先進諸国における成人失明の主要原因である。網膜色素上皮へのドルーゼンの出現、網膜色素上皮の色素異常などの前駆症状に始まり、進行例では網膜下または網膜色素上皮下に脈絡膜新生血管が発生し、やがて癒痕形成するという経過をたどる。黄斑部網膜が著明に傷害され不可逆的な視力障害の原因となる。一方、一部の症例では滲出性変化を認めず地図状萎縮という状態に至り視力低下に至る。

加齢黄斑変性に対しては、滲出型に関しては光線力学的療法や抗血管内皮増殖因子療法により、一定の視力維持効果が得られるようになったが、良好な視力に回復する症例はいまだ十分とは言えず、正常組織への侵襲、全身疾患への影響などの問題もある。また萎縮型に関しては現在有効な治療法はない。そのため新しい治療法や予防法の開発が期待される。そのためには、病態に深く関与している眼の加齢現象を理解する必要がある。

網膜色素上皮内へのリポフスチン蓄積と30代頃より顕著になってくるブルッフ膜への脂質沈着、それに続く硬性ドルーゼン形成など、これらの関連を理解する必要があるが、これまで、網膜色素上皮の「上皮」としての生理機能を解明するための良い培養系がなく、リポフスチンなど不溶性物質の影響などを従来の分子生物学的手法で調査するのは困難である。

加齢黄斑変性の国内外の研究としては、ヒト眼球による免疫組織学的検討から、ドルーゼンなどの沈着物に補体H因子、アミロイドを初めとする炎症の存在を示唆するタンパク質が同定されている(Anderson DH et al. *Am J Ophthalmol.* 2002;134:411)。さらに遺伝学的検討により加齢黄斑変性の危険因子として補体H因子や視細胞内節に多く存在して酸化ストレス応答に関与している可能

性のあるARMS2などの遺伝子多型が確認されたことにより(Daiger SP. *Science* 2005;308:362, Fritsche LG, et al. *Nat Genet.* 2008;40:892)、病態への炎症の関与が強く示唆され注目されている。しかし、これらの炎症が加齢性の沈着物の原因であるのか結果であるのか示す証拠はなかった。

我々は、ドラッグデリバリーシステムの開発の際に習得した医療工学的技術を用いて、リポフスチンの模擬顆粒を作製し、家兎の網膜下に注入し網膜色素上皮に貪食させることにより加齢現象としてのリポフスチン蓄積を模倣した動物モデルを世界で初めて開発したが、このモデルにおいてドルーゼンの形成や脈絡膜新生血管の発生を確認した(Yasukawa T, et al. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007;245:1475)このことから、最初に起こる加齢現象であるリポフスチン蓄積の病態への強い関与が示唆され、網膜色素上皮の上皮としての機能を解明する必要があると考えられた。しかし、網膜色素上皮細胞は通常の培養では容易に線維芽細胞様に脱分化してしまう点と、基底部側の観察に培養皿の物理化学的影響が障壁となる点である。

そこで我々は網膜色素上皮細胞の粘弾性培養液内での浮遊培養を行ったところ、表面に一層の上皮を形成する球状塊を形成され、さらに表面にはブルッフ膜様の構造物が形成されることを発見した。(Sato R, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54:1740-9)。3次元培養では細胞間の接着が速やかに形成され、培地中に含まれる血清と接触する側に基底膜複合体が形成される。その後内部の基底膜と接していない細胞はアポトーシスを起こし単層の上皮が形成されると考えられる。

通常の培養では細胞と細胞外基質との接着が先に起こるため培養、継代により脱分化を

生じるが3次元培養では細胞間接着が先におこるため上皮として分化できる。このことから通常の培養でも、細胞間の接着が先に起こるような環境を作れば分化した上皮形成を促進できる、つまり3次元培養のように細胞間接着が速やかに起こるような条件で細胞を播けばよいと思われる。

そこで、我々は網膜色素上皮細胞を高密度で培養したところ、網膜色素上皮が六角形に近い形となり、単層のシート状になることを確認した。このモデルでは網膜色素上皮は本来の生理機能と近い機能を有していると考えられ、ブルッフ膜形成過程やリポ蛋白などの排泄、さらには網膜色素上皮の生理機能、特に基底膜側へのリポ蛋白排泄やブルッフ膜のメンテナンスなどの機能の解明が可能と考えられる。

一方で従来から加齢黄斑変性の病態の改善のために網膜色素上皮の移植が試みられている。従来は細胞を移植する手法がとられてきたが、近年、安定し、分化した網膜色素上皮を移植するためにあらかじめ羊膜上(Yaji N et al. Biomaterials. 2009;30:797-803, Akrami H et al. Biochem Genet.2011)、あるいはポリテトラフルオロエチレンなどの人工の膜(Thomson HAJ et al. Br J Ophthalmol. 2011;95:563-568, Krishna Y et al. Br J Ophthalmol. 2011;95:569-573)を用いて それらを足場として網膜色素上皮のシートを作成し、それを網膜下に移植する新たなこころみがなされてるしかしこれらの代替膜は元々の網膜色素上皮とブルッフ膜との機能を傷害する可能性がある。

しかし今回我々が考案した培養法では人工の膜を使うことなくシートの作成が可能であり、さらに色素上皮細胞自体がブルッフ膜を形成すると考えられ、色素上皮ブルッフ膜を同時に移植できる可能性があった。

2. 研究の目的

本研究においては、単層網膜色素上皮からの、ブルッフ膜形成過程やリポ蛋白などの排泄を確認し、網膜色素上皮の生理機能、特に基底膜側へのリポ蛋白排泄やブルッフ膜のメンテナンスなどの機能の解明を目指す。さらにはシートを安定させ網膜色素上皮ブルッフ膜組織を網膜色素上皮の萎縮部位や欠損部位に移植することを目指す。

3. 研究の方法

網膜色素上皮細胞の培養を行い、種類の細胞数で培養して単層シートを作製し、適切な細胞数を評価する。

細胞活性維持のため、十分な培養液中で培養し、光学顕微鏡で経時的に観察し、細胞密度、再現性、生理活性、分化状態を評価する。

一定期間培養後の単層シート、及び培地を採取し、培地側に形成されるブルッフ膜様の構造物、付随して産生されと考えられる、ドルーゼンやリポ蛋白を免疫組織学的に検討する。また走査型顕微鏡により、細胞表面の構造や、膜の構造を観察する。さらにウエスタンブロットにより、細胞内、あるいは細胞外の種類のタンパク質の発現を評価する。

単層シートを長期培養し、生物活性を評価するとともに移植に適切な形に処理可能であるか検討する。

4. 研究成果

ヒト網膜色素上皮の培養：

ヒト網膜色素上皮細胞の培養は一般的に上皮細胞の増殖に用いられる培地を用い、血清及び抗菌剤を除いては増殖因子や分化誘導因子などは添加しないで継代培養が可能であった。

網膜色素上皮の分化マーカーの検討：

継代回数によらず分化が誘導できるかを確認するため、経時的に回収した網膜色素上皮単層シートを処理して、ウエスタンブロット

を行い、RPE-65 発現を確認した。

タイトジャンクションの検討：

ZO-1、オクルーディンなどタイトジャンクションを構成する蛋白の免疫染色及びウェスタンブロットを施行し、その存在を確認した。また透過型電子顕微鏡で観察を行い細胞間のジャンクションの存在を確認した。

ブルッフ膜様構造検討：

網膜色素上皮単層シート表面の1型コラーゲン、4型コラーゲン、エラスチンの局在を免疫染色あるいはウェスタンブロットで確認した。また、走査型電子顕微鏡を用いて、シート表面の形態の観察し、これらが発現していると思われるような形態を確認することができた。

移植に向けての操作：得られたシートを網膜下への移植に用いるために培養皿から剥離し別の容器に移すことを可能にした。

リポタンパク・ドルーゼン様分泌物に関する検討：

これらの検討に関しては、以前より研究している網膜色素上皮スフェロイドでも確認が困難であったためシートでも困難が予想された。シートは培養液の量の調整が難しく、分泌型の成分を観察するのは困難であった。走査型顕微鏡ではリポたんぱくやドルーゼン様分泌物がと思われるものを確認できることもあったがタンパク質の発現、内容物の発現を確認することはできなかった。しかし、これらの因子は現在当教室で行っている他の研究にもつながるため今後も検討を続けていきたい。

移植について：移植を実現するためには、取り出したシートを適当な大きさに切除する必要があるが、その検討には至らなかった。また、もし採取したシートを凍結して安定した状態を保つことができればさらなる発展が得られるがその検討も行うことができなかった。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

Structural Analysis of a Monolayer Sheet of Cultured Retinal Pigment Epithelial Cells with Bruch's membrane. Hideaki Usui, Tsutomu Yasukawa, Noriaki Takase, Aki Kato, Masaharu Ohbayashi, Yuichiro Ogura Annual Meeting of the association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2010 (フォートローダーデール、米国) 2015年5月3日~5月7日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加藤 亜紀 (Aki Kato)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：60405157