

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890133

研究課題名(和文)AMPキナーゼの活性化による網膜色素上皮細胞の老化防止：加齢黄斑変性治療への展開

研究課題名(英文)Anti-aging of the retinal pigment epithelial cells by activation of AMP kinase

研究代表者

木村 修平(Kimura, Shuhei)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：90628710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性は加齢を背景とした網膜色素上皮細胞(以下RPE)の機能異常が原因で発症する。本研究では、AMPキナーゼ(AMPK)に着目し、加齢によるRPEの機能異常におけるAMPKの役割を解明することを目的とし研究を行った。加齢黄斑変性で見られる慢性炎症のモデルにおいて、RPEの細胞増殖、遊走をAMPKの活性化が抑制することを明らかにした。また、慢性酸化ストレスを細胞に負荷することによって、RPEの老化を誘導できることを明らかにした。さらに、老化に伴うRPEの細胞機能の変化を評価する実験法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Aging related dysfunction of retinal pigment epithelial cells (RPE) is the key factor in the pathogenesis of age-related macular degeneration. In this study, we focused on the energy sensing enzyme AMP kinase (AMPK) and elucidated the role of AMPK in the dysfunction of RPE with aging. In a model of chronic inflammation seen in age-related macular degeneration, we revealed that the activation of AMPK inhibited cell proliferation and migration of RPE. Further, by loading the cell chronic oxidative stress, we clarified that it is possible to induce senescence of RPE. In addition, I have established the experimental methods to evaluate the changes in the cellular function of RPE associated with aging.

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：加齢黄斑変性

1. 研究開始当初の背景

(1) 加齢黄斑変性は加齢を背景とした網膜色素上皮細胞 (RPE) の生理機能の低下が原因で発症する。加齢黄斑変性では、RPEの機能低下によって網膜の恒常性が破綻し、老廃物の蓄積 (ドルーゼン形成)、血管新生、網膜障害が起こり、視力が低下する。

(2) 加齢黄斑変性に対しては、現在抗 VEGF抗体による治療が行われているが、その治療効果は十分ではない。そこで、加齢黄斑変性に対して予防法を確立し、網膜障害を防ぐことが極めて重要である。具体的には血管新生の前駆期であるドルーゼン形成期にRPEの機能を改善し血管新生を阻止する方法の開発が必要である。

(3) 私達はこれまでに、エネルギー代謝の恒常性を維持する最上位の調節因子であるAMPKに着目し、眼疾患に果たす役割を明らかにした。その結果、本来考えられてきたAMPKの機能、すなわち細胞内ATP量の調節以外に、病的な炎症や細胞遊走を抑制することが明らかになった。

上記を背景に、本研究では加齢に伴うRPEの機能低下におけるAMPKの役割を明らかにし、加齢黄斑変性の予防法の開発の基盤となる研究を行う。

2. 研究の目的

加齢黄斑変性では加齢に伴うRPEの機能不全を基盤に、老廃物が蓄積し、慢性炎症が誘導される。この一連の病態にAMPKの活性化が及ぼす影響について検討する。そこで下記の検討を行うことを目的とした。

(1) RPEの細胞増殖におけるAMPKの役割

(2) 炎症モデルでのRPEの増殖、遊走、線維化におけるAMPKの役割

(3) 細胞培養系における酸化ストレス負荷モデルの確立

(4) RPEの細胞機能の評価方法の確立

(5) 酸化ストレスモデルにおけるRPEの細胞機能の変化とAMPKおよびその影響

3. 研究の方法

培養 RPE 細胞として、ヒト RPE である ARPE-19 とマウスの初代培養 RPE を用いた。

(1) これらの細胞に細胞増殖を促す目的で上皮細胞増殖因子 (EGF)、炎症を誘導する目的で腫瘍壊死因子 (TNF) α と形質転換成長因子 (TGF) β を作用させた。細胞の AMPK の活性化には AMPK 活性化剤である AICAR を用いた。これらの条件下で、AMPK の活性化が細胞の増殖、遊走、増殖性細胞塊作成に及ぼす影響を細胞数のカウント、migration assay, 細胞塊のカウントを行い評価した。また、RPE から分泌される各種サイトカインを ELISA 法によって定量した。

(2) 細胞の老化の誘導は2つのモデルを用いて誘導し、安定して老化が誘導できる条件を探った。一つは急性酸化ストレスを過酸化水素で細胞に与えるモデルであり、もう一つは慢性的な酸化ストレスを tert-BHP を作用させて細胞に与えるモデルである。

(3) これらの老化モデルにおいて、RPE の機能を評価するために、①2 well RPE 培養による細胞間の電気抵抗の測定 (タイトジャンクション形成能)、②蛍光ビーズを用いた RPE の貪食能の評価、③蛋白分解酵素の western blotting での検出などの評価方法を確立した。

(4) 上記 (2) (3) によって、RPE の老化に伴う RPE の機能障害について検討し、また、RPE の AMPK を活性化した際の RPE の機能に及ぼす影響を評価した。

4. 研究成果

(1) EGF による刺激でみられる RPE の増殖は AICAR による RPE の AMPK の活性化によって、有意に抑制されることを細胞増殖曲線およびフローサイトメトリーで明らかにした。RPE の増殖は AMPK によって S 期から G2 期への移行が阻害されていた。この際に、細胞増殖に関わる因子の内、サイクリン A2, D1, D3, E2 の発現が AMPK の活性化によって抑制されることが明らかとなった。また、AMPK の下流の経路において、mTOR 経路および FOXO 経路の抑制を介して細胞増殖が抑制されることがわかった。一方で CDK2, 4, 6 および p21, p27 の発現には AMPK の活性化は関与しなかった。

(2) 加齢黄斑変性でみられる慢性炎症モデルとして用いた、RPE の TNF α と TGF β による共刺激によって、RPE の著明な遊走と pile up が誘導された。この pile up は RPE が上皮間葉転換を来したためと考えられた。これらの現象は、眼内でみられる RPE の増殖性変化を模したものと考えられるが、AMPK の活性化で完全に抑制された。RPE の上皮間葉転換に関係する因子の一つであるヒアルロン酸に着目し、産生量の変化を検討したところ、TNF α と TGF β の共刺激によってヒアルロン酸の産生が mRNA レベルでも、蛋白レベルでも低下し、AICAR による AMPK の活性化で非刺激群と同レベルまで回復した。したがって、AMPK の活性化は RPE からのヒアルロン酸の産生を介して RPE の上皮間葉転換を抑制した可能性が示唆された。

(3) RPE に酸化ストレスを急性および慢性的に負荷したところ、細胞に老化を誘導することが可能であった。どちらの方法によっても、老化のマーカーである β ガラクトシダーゼの上昇がみられた。しかし、急性モデルにおいて、たとえばドルーゼンの主成分のアミロイド β の分解酵素であるネプリライシンの

発現については、急性酸化ストレス負荷モデルでは明らかな変化を見いだせなかった。また、加齢黄斑変性の病態は、慢性的な病態であるため、慢性的な酸化ストレス負荷の方が適していると考えられた。

(4) RPE の細胞機能を評価する方法として、2 well RPE 培養を行い、電気抵抗の経時的変化を定量したところ、ARPE-19 細胞において、約 2 週間でタイトジャンクション形成に伴う電気抵抗の上昇を認めた。この上昇は慢性的酸化ストレスモデルでは軽度であった。

(5) RPE の抗酸化に重要な因子としてカタラーゼの産生に着目し、AMPK の活性化によって産生が増加することを確認した。

(6) 蛍光ビーズを一定時間培養 RPE に作用し、ビーズの貪食量を定量する方法を確立した。貪食されたビーズが細胞内に存在することを共焦点レーザー顕微鏡で確認した。

(7) 本研究費の期限内に計画した全ての目的、特に動物を用いた実験について実験途中で結果を得るまでには至らなかった。しかし、RPE の細胞増殖、慢性炎症による細胞遊走、線維化における AMPK の役割について成果を得ることができた。また、今後研究を進めていく上で基盤となる実験系の確立に成功した。今後、慢性酸化ストレスモデルを用いて RPE の細胞機能に慢性酸化ストレスが及ぼす影響および AMPK の果たす役割を明らかにする。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 塚本真啓、森實祐基、木村修平、米澤朋子、小阪淳、白神史雄、ARPE-19 の細胞増殖における AMP 依存性キナーゼの役割、日本眼科学会、2013 年 4 月 4 日、東京

(2) 森實祐基、竹内喉雄、鈴木潤、吉村武、

塚本真啓、木村修平、Viollet Benoit、白神史雄、Miller Joan、Vavvas Demetrios、マウス網膜色素上皮の細胞の細胞遊走における AMP 依存性キナーゼの役割、日本眼科学会、2013 年 4 月 4 日、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〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 修平 (KIMURA, Shuhei)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90628710

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

森實 祐基 (MORIZANE, Yuki)

岡山大学・附属病院・講師

研究者番号：50432646