

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462721

研究課題名(和文) 加齢黄斑変性症における上皮間葉転換のレドックス制御を標的とした創薬への基盤研究

研究課題名(英文) Research of epithelial-to-mesenchymal transition via redox regulation for age related macular degeneration

研究代表者

猪俣 泰也 (Inomata, Yasuya)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50452884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素上皮細胞の上皮間葉転換(EMT)を検討した。我々は、炎症性サイトカインTumor necrosis factor- α がヒアルロン酸受容体CD44の細胞質内ドメイン結合タンパクであるMerlinの発現低下を誘導し、Merlinの発現低下により、CD44とActin細胞骨格の架橋タンパクであるERMタンパクが活性化すると同時にヒアルロン酸の細胞内取り込みが亢進し、このヒアルロン酸取り込みがp38MAPKの活性化に必要であった。MerlinはTAK1の活性化にも関与し、p38MAPKのリン酸化、細胞増殖を制御することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Our results demonstrated that merlin exerts inhibitory effects on TNF- α -induced EMT by regulating hyaluronan endocytosis and the TAK1-p38MAPK signaling pathway. The proliferative and mesenchymal characteristics of RPE cells play important roles in the development of intraocular fibrotic disorders.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜色素上皮 上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

応募者は以前小胞体ストレスや酸化ストレスが緑内障の網膜興奮毒性に関与することを明らかにした。(Awai M, Inomata Y et al. *Journal of Neurochemistry*. 2006, Inomata Y et al. *Journal of Neurochemistry*. 2006) その後本疾患の基礎的研究として加齢黄斑変性モデルマウスの解析によりマクロファージや血管内皮の酸化 LDL 受容体発現の解析から、脈絡新生血管の発症機序において酸化ストレス修飾産物による病態増悪機序を解明し、また細胞内レドックス制御による病態進展の抑制機序を解明し加齢黄斑変性症における新規メカニズムを提唱してきた。(Inomata Y et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008, Inomata Y et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009) 一方、当研究室では、酸化ストレスにより網膜色素上皮細胞 (retinal pigment epithelial cells; RPE) 間隙が解離することを報告し (Inumaru J et al. *Gene to Cell*)、また、共同研究者である高橋はさらに、炎症性サイトカイン TNF- α が RPE 細胞において EMT 誘導因子であることを明らかにし、この EMT によるフィブロネクチンやヒアルロン酸などの細胞外マトリックス (ECM) 産生が眼内増殖疾患の分子メカニズムの一部を解明してきた。(Takahashi E et al. *J Biol Chem*. 2010)

2. 研究の目的

今回我々は EMT に着目し、加齢黄斑変性の脈絡膜新生血管形成過程や網膜上・網膜下に生じた増殖膜の収縮により牽引性網膜剥離が生じる予後不良の疾患である増殖硝子体網膜症における、RPE の EMT 誘導のメカニズムに関する解明を本研究にて計画した。

3. 研究の方法

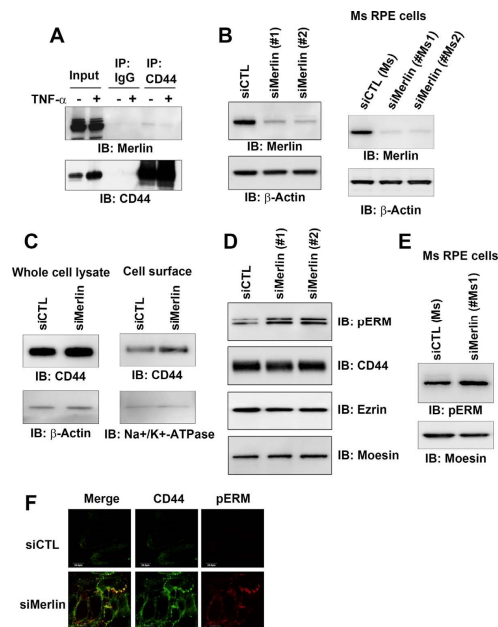
RPE) の EMT におけるシグナル解析を以下の方法で行い結果を得た。

4. 研究成果

1) Tumor necrosis factor- α (TNF- α) 刺激による RPE の EMT モデルにおいて様々な阻害薬を検討した結果 TAK-1 阻害薬が EMT の阻害薬であり、EMT 誘導後も上皮様形態を再獲得することを見いだした。Wound healing assay を行うと TNF- α 除去だけで運動能は維持されたが、TAK-1 阻害薬投与により運動能抑制が確認され、また細胞間接着が再構築されることを確認した。EMT マーカーを検討すると経時的に間葉系マーカーが減少し、ま

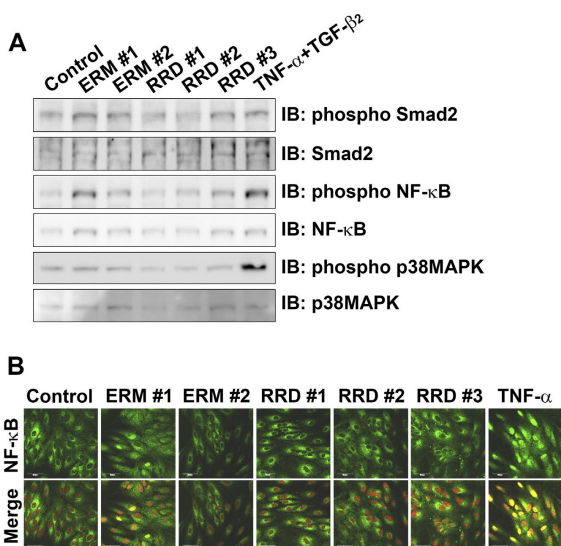
た濃度依存的に減少することが確認された。コラーゲン収縮能においても TNF- α 刺激下の RPE は著名にゲル収縮を認めたが TAK-1 阻害薬投与添加にてその効果が抑制された。以上より TAK-1 阻害薬により MET が誘導されることが確認された。

2) Tumor necrosis factor- α がヒアルロン酸受容体 CD44 の細胞質内ドメイン結合タンパクである Merlin の発現低下を誘導することを見出した。Merlin の発現低下により、CD44 と Actin 細胞骨格の架橋タンパクである ERM タンパクが活性化すると同時にヒアルロン酸の細胞内取り込みが亢進し、このヒアルロン酸取り込みが p38MAPK の活性化に必要であった。また、Merlin は TAK1 の活性化にも関与し、p38MAPK のリン酸化、細胞増殖を制御することを明らかにした。(下図)

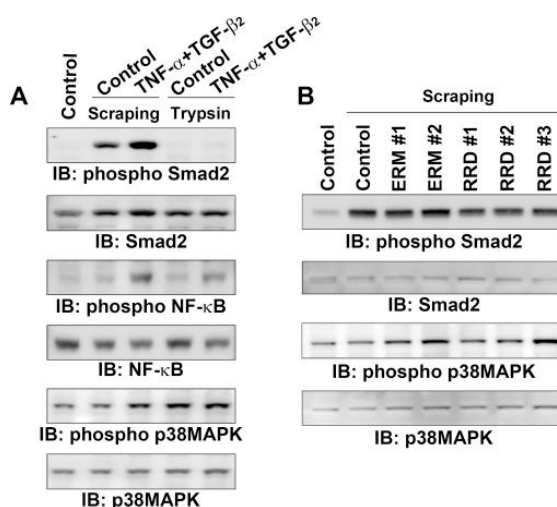
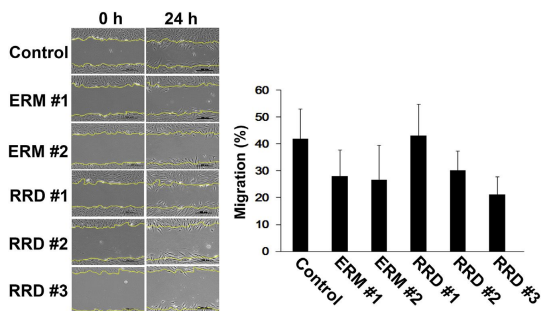


3) 臨床に即した病的状態での EMT を確認する実験系を作成した。方法は裂孔原性網膜剥離、黄斑上膜、黄斑円孔に硝子体手術を行った際に採取した硝子体サンプルをヒト RPE 細胞株に添加し 2D 培養を行った。硝子体サンプルの取得については当大学倫理委員会にて受理され、同意を得た患者より術中硝子体サンプルを取得した。サンプルを 60 分添加後に機械的ストレスをかけ細胞誘導能と細胞内シグナル伝達を解析した。また 3D 培養

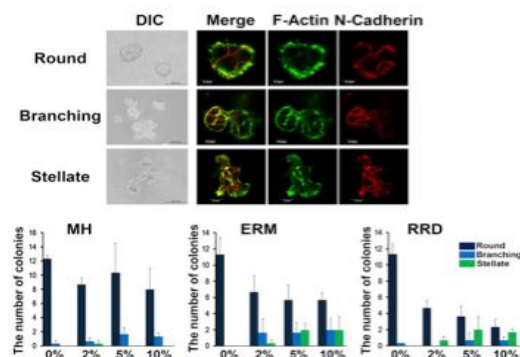
を行い各病的硝子体負荷により細胞の形態変化も確認した。結果は裂孔原性網膜剥離、黄斑上膜患者より採取した一部の硝子体サンプル刺激により Smad2、p38MAPK の活性化を認め、疾患群による差は認めなかった。NFkappaBのリン酸化はウエスタンブロットでは認めなかったが、免疫染色では一部の細胞に核内移行を認めた。



機械的刺激により Smad2 のリン酸化の亢進を認めた。



3D 培養では硝子体負荷にて星状の形態変化が認められた。(次ページ図)



5. 主な発表論文等 (計 2 件)
(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 2 件)

1)Merlin Regulates Epithelial-to-Mesenchymal Transition of ARPE-19 Cells via TAK1-p38MAPK-Mediated Activation.
Takahashi E, Haga A, Tanihara H.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015

2)Effects of mechanical stress and vitreous samples in retinal pigment epithelial cells.
Takahashi E, Fukushima A, Haga A, Inomata Y, Ito Y, Fukushima M, Tanihara H.
Biochem Biophys Res Commun. 2016

[学会発表](計 件)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況（計 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 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
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

猪俣 泰也 (Inomata Yasuya)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50452884

(2) 研究分担者

川路 隆博(Kawaji Takahiro)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30423677
H25 = H26年度

(3) 連携研究者

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