

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25713056

研究課題名(和文)萎縮型加齢黄斑変性のモデルマウス確立と、その病態の解明

研究課題名(英文) Generation of dry age-related macular degeneration model mouse and elucidation of the pathogenesis

研究代表者

兼子 裕規 (Kaneko, Hiroki)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20647458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,200,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイド をRPEに負荷すると、VEGFの産生が亢進し、小胞体ストレスマーカーが発現亢進した。小胞体ストレスの抑制薬剤でVEGF産生が抑制された。リノール酸をマウスに大量投与すると、malondialdehyde (MDA)が血液・RPE中に蓄積され、加齢黄斑変性モデルマウスとして応用できることが確認された。MDAはAMD患者の血液・RPE中でも高く、培養RPE細胞では低濃度MDAでは細胞障害が発生せずVEGF産生が亢進するが、高濃度MDA負荷によって細胞障害が発生し始め、VEGFの産生が減少していった。この変化は加齢黄斑変性の病態を理解するうえで重要な所見であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Amyloid induced vascular endothelial growth factor (VEGF) and endoplasmic reticulum (ER) stress marker up-regulation in retinal pigment epithelium (RPE). ER stress inhibitor blocked VEGF secretion. When large amount of linoleic acid was administered in mice, malondialdehyde (MDA) was accumulated in RPE and blood. MDA was also detected in the RPE and blood from the patients with AMD. In the administration of MDA in cultured human RPE cells, low concentrations of MDA induced VEGF up-regulation without inducing RPE damage, whereas high concentrations of MDA induced VEGF down-regulation and RPE degeneration. This change suggested the difference of wet- and dry-AMD. We verified the expression of histamine receptor H4 (HRH4) in the choroidal neovascularization (CNV) and the vitreous injection or oral administration of the anti-HRH4 medicine reduced CNV. Plasma-activated medium irradiated with low temperature plasma also reduced CNV in mice.

研究分野：網膜硝子体疾患

 キーワード：加齢黄斑変性 脈絡膜新生血管 不飽和脂肪酸 malondialdehyde アミロイド ヒスタミン受容体H4
 プラズマ照射液 リノール酸

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (Age-related macular degeneration: AMD) は先進国の失明原因の第1位の疾患である。AMD は大きく滲出型 (wet AMD) と萎縮型 (dry AMD) に分けられ、特に日本では wet AMD が多い。Wet AMD の原因は脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization: CNV) である。この CNV が網膜下に侵入し神経網膜が障害を受けると視力が著しく低下する。Wet AMD においては、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) が CNV の成長に重要な役割を示すことが明らかになっており、既に抗 VEGF 薬が治療薬として使用されている。一方 dry AMD はその治療法はおろか病態すら明らかになっていない。私はこれまで AMD を主に専門として研究しており、AMD と DICER1 の関連 (Kaneko H, et al. Nature 2011) や炎症との関与 (Tallaro V, Kaneko H, et al. Cell, 2012) を報告してきた。

2. 研究の目的

上述のとおり dry AMD に対する研究は wet AMD に比べて極めて遅れている。その理由の一つとして、wet AMD では VEGF という絶対的な治療ターゲット因子が早くから発見されていたのに対し、dry AMD の原因は遺伝子や喫煙、脂肪摂取など様々な因子が考えられることが考えられる。今回の研究期間中に既報から関連性が示唆されている多くの因子を全て分析するのは非現実的であると考えられた。そこで今回我々は、AMD と脂質代謝との関係を明らかにすることを第一目標とし、さらに脂質代謝だけでなく酸化ストレスや小胞体ストレスが加齢黄斑変性に与える影響について分析した。その病態解明を目的とし、モデルマウス作成を試みた。

3. 研究の方法

まず VEGF の産生量という観点から、wet AMD と dry AMD の違いについて検討した。既報から、malondialdehyde という脂質代謝産物が AMD 患者の血液中に多いということが明らかになっているため、名古屋大学も追試を行った。名古屋大学医学部附属病院を受診した AMD 患者から採血を行った。この臨床検査は名古屋大学医学部附属病院倫理委員会での審査・承認を受けて行い、患者に対し十分な説明の上インフォームドコンセントを得て行われた。

同様に、アメリカのアイバンクから AMD 患者の眼球を取得し、網膜色素上皮細胞を採取、その組織中の malondialdehyde の量を定量した。

さらに、網膜色素上皮細胞を使用して、malondialdehyde が網膜色素上皮に与える影響について検討した。具体的には、malondialdehyde 負荷時における網膜色素上皮細胞の VEGF 産生量を測定し、オートファ

ジーのマーカである LC3B の発現変化について検討した。

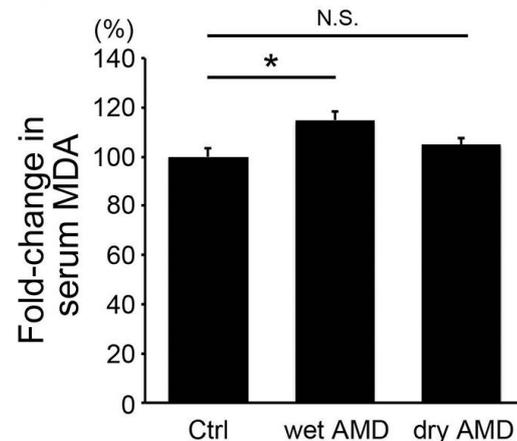
また体内の malondialdehyde が増加・蓄積するモデルマウス作成を試みた。オーストラリアのコホート研究から報告された内容では、リノール酸摂取が AMD 発症のリスクとして挙げられたことから、我々はマウスにリノール酸を高濃度 (15%) 負荷しモデルマウスを作成した。さらにこのマウスを用いて、眼球中および血清中 malondialdehyde の測定を行い、レーザー誘発脈絡膜新生血管を作成しその体積を対照群と比較した。

また酸化ストレスに関する実験では、アルツハイマー病の脳に蓄積されることで知られている amyloid を網膜色素上皮細胞に投与し、VEGF の産生量の変化について検討した。さらに、小胞体ストレスの阻害剤として 4-phenylbutyric acid (PBA) を用いて VEGF の変化について分析した。

酸化ストレスに関する研究では、酸化ストレス下で核内移行し、酸化ストレスに対する重要な因子と言われる Nrf2 を欠損するマウスを入手し、Nrf2 ノックアウトマウスから網膜色素上皮細胞を初代培養し、青色 LED 光下での細胞生存度について検討した。

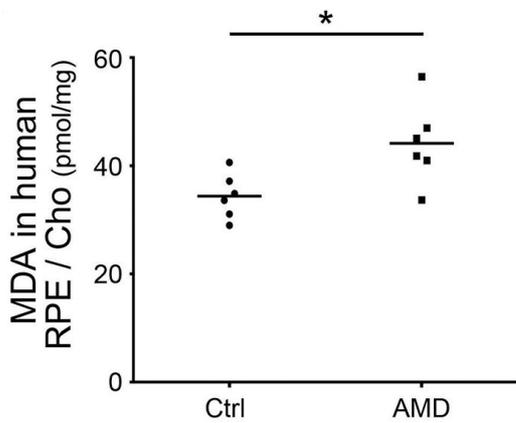
4. 研究成果

AMD の血清中 malondialdehyde を測定したところ、対照群と比べて有意に高いことが確認された。

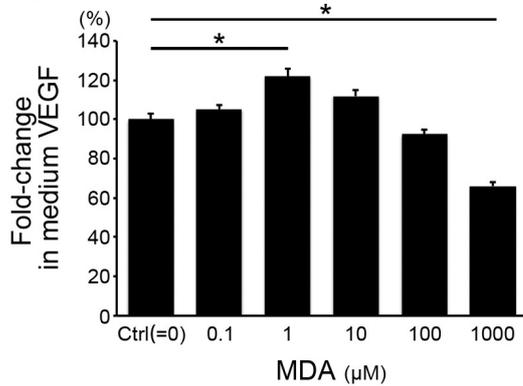


(図1)

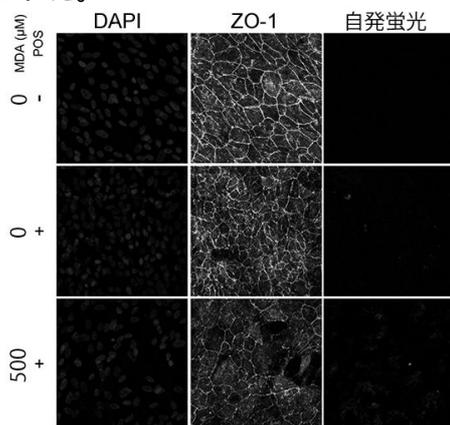
また、米国のアイバンクから入手した AMD 眼球から網膜色素上皮を採取し malondialdehyde を測定したところ、対照眼に比べて網膜色素上皮中の malondialdehyde が高いことが確認された。



(図2) Malondialdehyde をヒト網膜色素上皮細胞に投与したところ、低濃度域では Malondialdehyde 濃度依存的に VEGF の産生が増加したが、高濃度域では逆に濃度依存的に VEGF 産生が減少することが確認された。

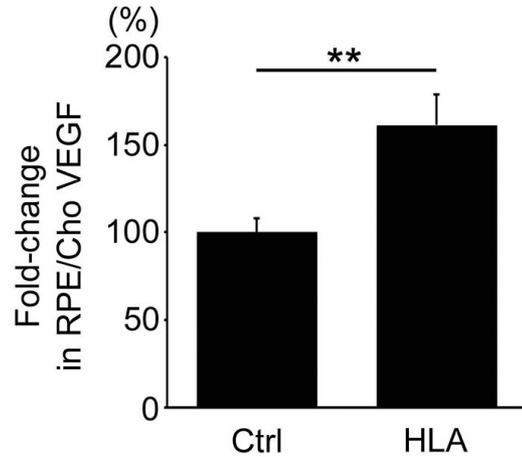


(図3) ヒト網膜色素上皮細胞を通常の培養法ではなく極性培養し、malondialdehyde を投与した後に抗 ZO-1 抗体で網膜色素上皮細胞の形態を観察したところ、低濃度では網膜色素上皮細胞の形態に変化は見られなかったが、高濃度投与によって網膜色素上皮細胞の形態が崩れ、変性していくことが確認された。

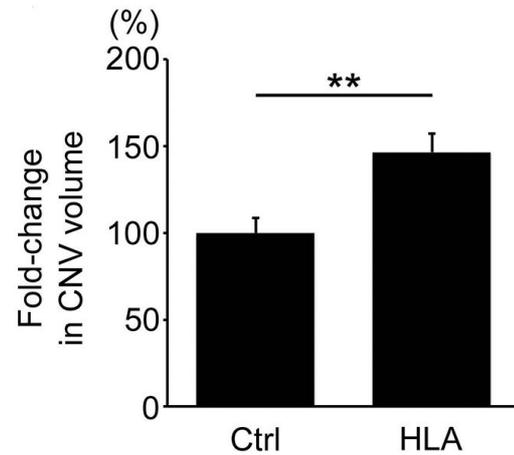


(図4)

次に、AMD モデルマウスの作成を試みた。前述するように高濃度リノール酸を餌として投与したところ、リノール酸負荷マウスの血液・網膜色素上皮細胞中から高濃度の malondialdehyde が検出された。また、網膜色素上皮細胞中の VEGF 濃度も対照群に比べて高いことが確認された。

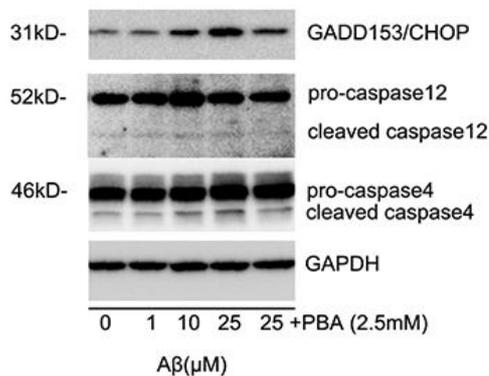


(図5) この高 malondialdehyde マウスにレーザー誘発脈絡膜新生血管を作成したところ、普通食を投与したマウスに比べて有意にレーザー誘発脈絡膜新生血管が増大した。



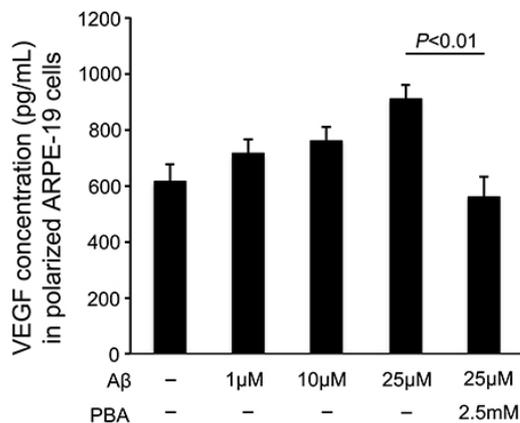
(図6) これらの報告をまとめ、Free Radical Biology and Medicine (2016)に報告した。

同様に網膜色素上皮細胞に対する amyloid の影響について検討した。Amyloid をヒト網膜色素上皮細胞に投与したところ、小胞体ストレスのマーカである CHOP の発現や caspase1 の活性化が western blotting で確認された。



(図 7)

そこで小胞体ストレスの阻害剤である PBA を投与したところ、amyloid によって誘発された VEGF 産生が PBA によって阻害された。このことから、amyloid による VEGF 産生には小胞体ストレスが関与しており、小胞体ストレスを阻害することで AMD の原因となる VEGF の産生を抑制できる可能性が示唆された。これらの研究結果を Ophthalmic Research (2016) に報告した。



(図 8)

次に網膜色素上皮細胞に対する青色 LED の光障害についても検討した。ヒト網膜色素上皮細胞に青色 LED を照射すると、活性酸素が産生され、ヒト網膜色素上皮細胞が死滅していくことが確認された。この青色 LED によるヒト網膜色素上皮細胞の障害に、酸化ストレスに応答する重要な防御因子とされる Nrf2 が関与しているか Western Blotting で確認したところ、青色 LED 照射によって ヒト網膜色素上皮細胞の Nrf2 が核内移行することが観察された。そこで、Nrf2 ノックアウトマウスを入手し、網膜色素上皮細胞の初代培養を行い、青色 LED を照射したところ、野生型マウスの網膜色素上皮細胞に比べて有意に細胞死が誘導されることが明らかになった。これらの研究結果をまとめ、現在投稿中である。

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 11 件)
(全て査読あり)

1. Matsui A, Kaneko H*, Kachi S, Ye F, Hwang SJ, Katayama K, Nagasaka Y, Sugita T, Terasaki H.

“Expression of Vascular Endothelial Growth Factor by Retinal Pigment Epithelial Cells Induced by Amyloid Beta is Depressed by an Endoplasmic Reticulum Stress Inhibitor”

Ophthalmic Res, 2016;55:37-44 (*Corresponding author)

2. Bogdanovich S, Kim Y, Mizutani T, Yasuma R, Bastos-Carvalho A, Kerur N, Hirano Y, Baffi J, Tarallo V, Li S, Yasuma T, Arpitha P, Fowler B, Gelfand B, Tudisco L, Cicatiello V, Apicella I, De Falco S, Greco A, Brunetti A, Ruvo M, Sandomenico A, Nozaki M, Ogura Y, Kaneko H, Ijima R, Terasaki H, Ambati BK, Leusen J, Langdon W, Clark M, Armour K, Bruhns P, Verbeek J, Wright C, Ambati J

“Human IgG1 antibodies suppress angiogenesis in a target-independent manner”

Signal Transduction and Targeted Therapy. 2016;1,1

3. Ye F, Kaneko H*, Hayashi Y, Takayama K, Hwang SJ, Nishizawa Y, Kimoto R, Nagasaka Y, Tsunekawa T, Matsuura T, Yasukawa T, Kondo T, Terasaki H.

“Malondialdehyde induces autophagy dysfunction and VEGF secretion in the retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration.”

Free Radic Biol Med. 2016;94:121-134. Equal contribution

(*Corresponding author)

4. Ye F, Kaneko H*, Nagasaka Y, Ijima R, Nakamura K, Nagaya M, Takayama K, Kajiyama H, Senga T, Tanaka H, Mizuno M, Kikkawa F, Hori M, Terasaki H

“Plasma-activated medium suppresses choroidal neovascularization in mice: a new therapeutic concept for age-related macular degeneration”

Sci Rep 2015; 5:7705 (*Corresponding author)

5. Ijima R, Kaneko H*, Ye F, Takayama K, Nagasaka Y, Kataoka K, Funahashi Y, Iwase T, Kachi S, Kato S, Terasaki H “Suppression of laser-induced choroidal neovascularization by the oral medicine targeting histamine receptor h4 in mice”

Transl Vis Sci Technol. 2015;4(2):6 (*Corresponding author)

6. Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Kondo H,

Takeda K, Hashizume H, Nakamura K, Utsumi F, Kajiyama H, Kano H, Okazaki Y, Toyokuni S, Akiyama S, Maruyama S, Yamada S, Kodera Y, Kaneko H, Terasaki H, Hara H, Adachi T, Iida M, Yajima I, Kato M, Kikkawa F, Hori M
“Plasma with high electron density and Plasma-Activated Medium for Cancer Treatment”
Clinical Plasma Medicine, 2015;3;72-76

7. Kim Y, Tarallo V, Kerur N, Yasuma T, Gelfand BD, Bastos-Carvalho A, Hirano Y, Yasuma R, Mizutani T, Fowler BJ, Li S, Kaneko H, Bogdanovich S, Ambati BK, Hinton DR, Hauswirth WW, Hakem R, Wright C, Ambati J.
“DICER1/Alu RNA dysmetabolism induces Caspase-8-mediated cell death in age-related macular degeneration.”
Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; 111(45):16082-7

8. Ijima R, Kaneko H*, Ye F, Nagasaka Y, Takayama K, Kataoka K, Kachi S, Iwase T, Terasaki H.
“Interleukin-18 induces retinal pigment epithelium degeneration in mice.”
Invest Ophthalmol Vis Sci. 6673-8. 2014;55 (10): (*Corresponding author)

9. Kaneko H*.
“Author response: interleukin-18 bioactivity and dose: data interpretation at a crossroads.”
Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014;55(12): 8350-2. (*Corresponding author)

10. Hirano Y, Yasuma T, Mizutani T, Fowler B, Tarallo V, Yasuma R, Kim Y, Carvalho AB, Kerur N, Gelfand B, He S, Zhang X, Nozaki M, Ijima R, Kaneko H, Ogura Y, Terasaki H, Nunez G, Ambati B, Hinton D, Nagai H, Haro I, Ambati J
“IL18 is not therapeutic for neovascular age-related macular degeneration”
Nat Med. 2014; 20(12):1372-5.

11. Kaneko H*, Ye F, Ijima R, Kachi S, Kato S, Nagaya M, Higuchi A, Terasaki H
“Histamine receptor h4 as a new therapeutic target for choroidal neovascularization in age-related macular degeneration”
Br J Pharmacol, 2014;171(15):3754-63 (*Corresponding author)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Hiroki Kaneko, “Dry AMD: Potential Therapeutic Targets” Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress, Symposium, Age-Related Macular Degeneration: Anti-VEGF and Other Treatment, 2016/3/25, Taipei International Convention Center, Taipei

2. Hiroki Kaneko, “Histamine receptor H4 as a new therapeutic target for age-related macular degeneration”
13th Congress of the International Ocular Inflammation Society (IOIS), Symposium, AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION-ON, Molecular Targets in Age-Related Macular Degeneration: Beyond VEGF, 2015/9/26, San Francisco, USA

3. 兼子裕規 “DICER1 減少による萎縮型 AMD の分子メカニズム” 日本眼科学会総会 2015, シンポジウム, 加齢黄斑変性発祥の分子メカニズムと予防戦略, 2015/4/7 北海道札幌市ニトリホール

4. Hiroki Kaneko “A new therapeutic target in age-related macular degeneration”
Asia-ARVO 2015, Symposium, Molecular Mechanisms in Age-related Macular Degeneration, 2015/2/17 神奈川県横浜市パンフィコ横浜

5. 兼子裕規, 高山圭、叶福相、伊島亮、加地秀、加藤省一、長屋匡俊、樋口暁子、寺崎浩子 “ヒスタミン H4 受容体をターゲットとした滲出型加齢黄斑変性の治療” (ポスター): 第 35 回 日本炎症・再生医学会 第 1 回 日本骨免疫会議
2014.7.2 沖縄県名護市 万国津梁館

6. Fuxiang Ye, Hiroki Kaneko, Ryo Ijima, Shu Kachi, Seiichi Kato, Masatoshi Nagaya, Akiko Higuchi, Hiroko Terasaki.
“Histamine Receptor H4 as a New Therapeutic Target for Choroidal Neovascularization in Age-related Macular Degeneration”
ARVO Annual Meeting 2014/5/6, County Convention Center, Orlando, FL, USA

7. Ryo Ijima, Hiroki Kaneko, Fuxiang Ye, Shu Kachi, Seiichi Kato, Masatoshi Nagaya, Akiko Higuchi, Hiroko Terasaki
“Anti-histamine receptor h4 treatment reduced choroidal neovascularization independent of vascular endothelial growth factor”
ARVO Annual Meeting 2014/5/6, County Convention Center, Orlando, FL, USA

6 . 研究組織

(1)研究代表者

兼子 裕規 (Hiroki, KANEKO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号 : 20647458