

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861457

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と生物学的意義

研究課題名(英文) The importance of EMT in RPE cells

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(医)・助教

研究者番号：60622602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：後眼部における線維性増殖に関連する網膜色素上皮細胞の上皮間葉転換のメカニズムについて、ERMタンパク質ファミリーに属するマーリンタンパク質が網膜色素上皮細胞の上皮性に重要であることを見出した。腫瘍壊死因子は網膜色素上皮細胞の上皮間葉転換誘導因子であり、この刺激によりマーリンの発現は低下し、それに続いてERMタンパク質の活性化、p38マップキナーゼのリン酸化がTAK1を介して生じており、このシグナルが腫瘍壊死因子が誘導する上皮間葉転換に重要であった。

研究成果の概要(英文)：Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is associated with ocular fibrosis, especially proliferative vitreoretinopathy and subretinal fibrosis in age-related macular disease. We found that Merlin, one of ERM protein family, is essential for maintenance of epithelial phenotype in retinal pigment epithelial (RPE) cells. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha is an inducer of EMT in RPE cells and TNF- decreased the expression of Merlin, leading to phosphorylation of ERM proteins, p38MAPK via TAK1. TAK1-p38MAPK signaling pathway plays an important role in TNF-induced EMT in RPE cells.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜色素上皮 上皮間葉転換 TNF- ERMタンパク質ファミリー p38MAPK TAK1

1. 研究開始当初の背景

網膜色素上皮細胞 (retinal pigment epithelial cells, RPE 細胞) は、脈絡膜と感覚網膜の間に位置し、細胞間接着を保持する単層上皮で、細胞外節の貪食や血液網膜関門など、網膜の機能維持や免疫に関与する。網膜色素上皮細胞の機能低下によるバリア機能の低下は漿液性網脈絡膜症や脈絡膜新生血管の侵入の、裂孔原性網膜剥離などによる RPE 細胞の散布に伴う形質転換の誘導は増殖硝子体網膜症の原因の一つと考えられている。

これらの RPE 細胞の病的状態の母地には、酸化ストレスや光毒性、様々なリポタンパクやアミロイドなどを含む蓄積したドルーゼンなど持続的な炎症刺激暴露が関連すると考えられている。当研究室では、持続的な酸化ストレス刺激が p120catenin を介して RPE 細胞の細胞間接着の解離に関与しており、さらに、腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor- α 、TNF- α) 刺激によって RPE 細胞は紡錘状の形態へと変化するだけでなく細胞外マトリクスが豊富な繊維素性細胞集塊を形成するが、この現象には上皮間葉転換 (Epithelial mesenchymal transition, EMT) が関連することを見出した。EMT とは、上皮細胞が増殖因子やサイトカイン、ケモカイン刺激などにより転写因子の活性化を介して、細胞外マトリクス産生が亢進するだけでなく、マトリクスメタロプロテアーゼの活性が亢進することにより、運動能や浸潤能の亢進といった間葉系の性質を獲得する現象で、発生の過程や癌細胞の浸潤転移に密接に関連する現象であるだけでなく、組織の線維化にも関連する現象であることがわかってきた。眼科領域において EMT が病態の一つとして考えられている疾患は翼状片や角膜変性があり、RPE 細胞においても、増殖硝子体網膜症における増殖膜の形成、増殖膜の収縮に関連する病態であることが以前より報告されており、近年は加齢黄斑変性における線維化への関連も示唆されている。加齢黄斑変性や増殖硝子体網膜症は視力予後不良の難治性疾患であり、加齢黄斑変性は近年抗 VEGF 治療により著名な視力予後の改善を得ているが、再燃や線維化など課題は多く残っている。これらの疾患の病態の母地となる RPE 細胞の EMT の誘導機構を明らかにすることは、新たな治療薬の開発につながるだけでなく、RPE 細胞の機能回復を得ることが可能となれば、病態自体の改善を目的とした治療となる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

我々は、TNF- α が誘導する RPE 細胞の EMT において、Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) タンパク質ファミリーのリン酸化が重要であることを見出した。ERM タンパク質は、FERM ドメインを持つ Ezrin, Radixin, Moesin と、FERM ドメインを持たない

Merlin タンパク質がある。ERM タンパク質はアクチン細胞骨格との架橋タンパクとして、様々な細胞膜における受容体と結合するが、RPE 細胞においてはヒアルロン酸受容体である CD44 と会合し、EMT 誘導シグナルに関連している。一方、Merlin はアクチン細胞骨格と結合しないことがわかっている。

Merlin は構造が異なることから ERM タンパク質とは制御が異なり、さらには EMT における役割も異なることが推測される。そこで、本研究では、Merlin が EMT の過程でどのように制御され、また、EMT にどのように関連するかを明らかにすることで、新たなメカニズムを見出し、治療標的を発見することを目的とし、行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

RPE 細胞は American Type Culture Collection から購入し、10% ウシ胎児血清 (FBS) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): Nutrient Mixture F-12 培地で、5%CO₂、37℃ の条件下で培養した。

(2) マウス RPE 細胞の単離培養

生後 3 から 4 日目のマウスを安楽死後、眼球を摘出し、dispase を添加した 10%FBS の DMEM で眼球を処理し、前眼部、水晶体、硝子体、網膜を摘出、RPE 層を剥離し培養を行い、初代 RPE 細胞を単離した。

(3) 免疫染色

4%パラホルムアルデヒドで固定後、トライトン処理し、一次抗体を室温で 1 時間処理または 4℃ で一夜処理し、Phosphate Buffered Saline (PBS) で洗浄後、二次抗体は室温で 1 時間処理した。マウント後、蛍光顕微鏡 (キーエンス社) により解析した。

(4) ウェスタンブロッティング

BCA assay で細胞溶解液のタンパク量を測定し、タンパク量を同量に調整し電気泳動を行い、Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜へ転写した。PVDF 膜は一次抗体を室温で 1 時間、または 4℃ で一夜処理し、洗浄後、二次抗体を処理後、化学発光によりバンドを検出した。

(5) 細胞運動能解析

単層の密に培養した RPE 細胞を滅菌したチップで創を作成し、その創への細胞の運動を経時的に観察、撮影した。

(6) 増殖能解析

無血清培地に各刺激因子、阻害薬を添加し、24 時間培養後、Bromodeoxyuridin (BrdU) を培養液中に添加し、4 時間、37℃ 5% CO₂ の条件で更に培養し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、抗 BrdU 抗体を用いて

BrdU の取り込みとその割合を蛍光顕微鏡で撮影、解析した。

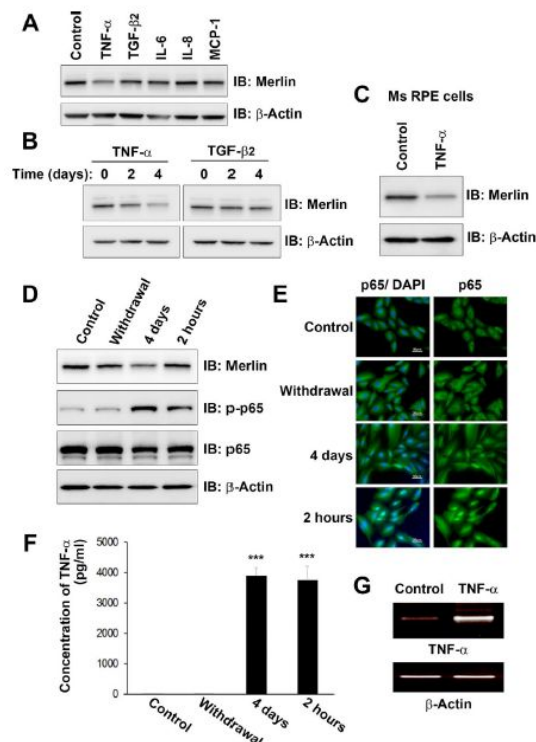
(7) ヒアルロン酸取り込み実験

蛍光標識されたヒアルロン酸を培地へ添加し3時間培養後、細胞を固定し、蛍光顕微鏡で撮影、解析を行った。

4. 研究成果

(1) TNF- α 刺激は Merlin の発現を抑制する。

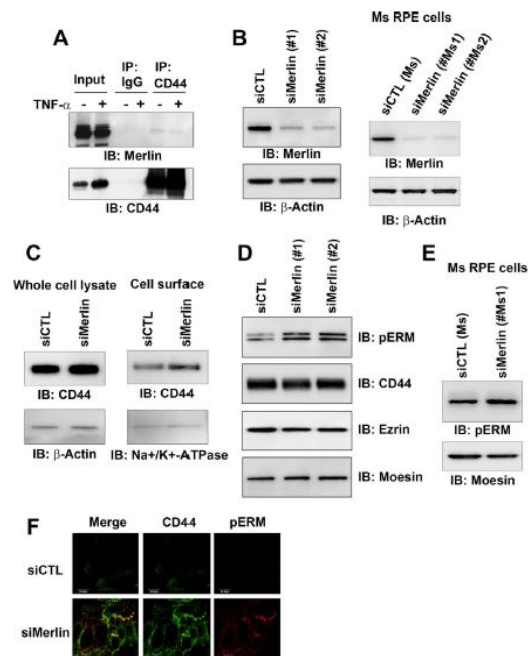
各種増殖因子やサイトカイン刺激を行った結果、TNF- α 刺激が Merlin の発現を抑制することを見出し、マウス RPE 細胞でも同様の結果であった (A, B, C)。また、TNF- α 長期刺激では著明な Merlin の発現抑制を認め、一方、短時間処理で TNF- α を除去し長期間培養した細胞と、短時間処理のみの RPE 細胞では Merlin の発現がコントロールと変わらなかった (D)。ELISA による培養液中の TNF- α 濃度は除去群では検出不能であったのに対し、長期培養では2時間処理群と同等であり (F) RT-PCR の結果より (G) TNF- α 刺激したでは、TNF- α の自己分泌により TNF- α 濃度は維持され、TNF- α の下流のシグナルも活性化が維持されていた (D, E)。



(2) Merlin は ERM のリン酸化と CD44 と Merlin の会合を抑制する。

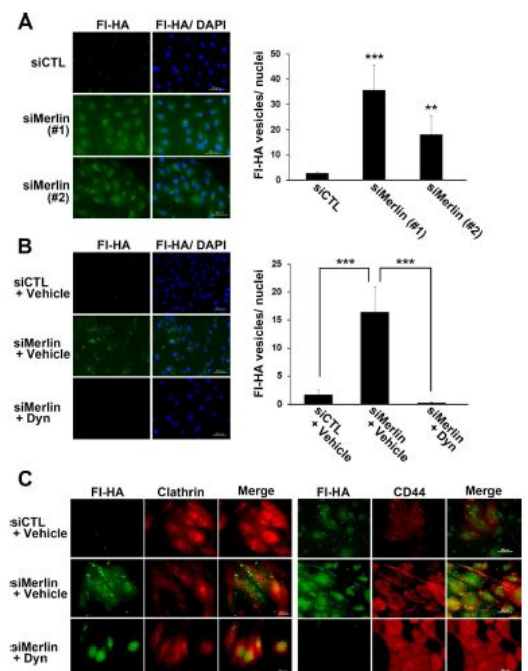
TNF- α 刺激下において Merlin の発現は抑制されるとともに、CD44 と会合する Merlin も減少していた (A)。siRNA で Merlin の発現を抑制すると (B, C) 細胞膜表面に局在

する CD44 は増加し (C) ERM のリン酸化が亢進するとともに (D, E) 免疫染色では siMerlin 導入細胞で CD44 とリン酸化 ERM の共局在を示した (F)。

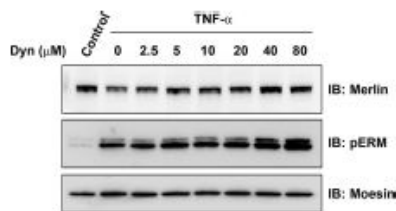


(3) Merlin 発現抑制細胞におけるヒアルロン酸取り込みの亢進

リン酸化 ERM と CD44 の結合はヒアルロン酸取り込みに密接に関わるシグナルである。そこで、蛍光標識ヒアルロン酸を用いてヒアルロン酸の取り込みを検討したところ、siMerlin 細胞では有意にヒアルロン酸の取り込みが亢進し (A) これは endocytosis に関連する dynamin 阻害薬で抑制された (B, C)。

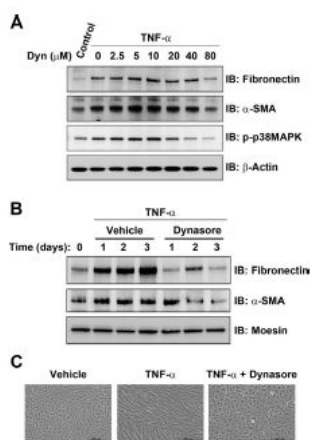


(4) Dynamin 阻害薬により TNF- α により Merlin の発現抑制は阻害される。一方、リン酸化 ERM の蓄積も認め、これは、endocytosis 阻害により、膜上でタンパクが蓄積したことが推測された。



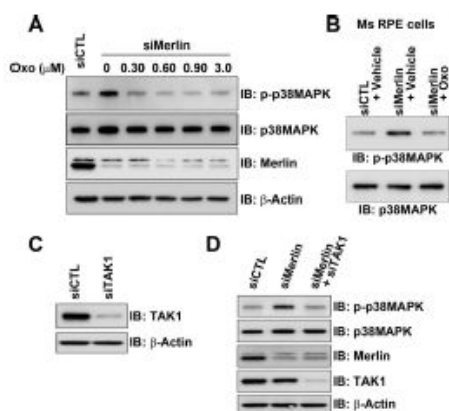
(5) Dynamin 阻害薬は TNF- α による EMT の誘導を抑制する。

TNF- α による間葉系のマーカーの発現亢進は Dynamin 阻害薬により抑制され (A, B) 細胞形態の変化も抑制された (C)。



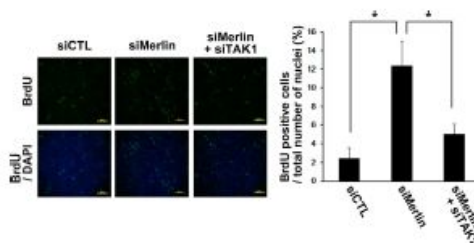
(6) Merlin は p38MAPK の活性化に関連する。

さらに我々は siMerlin 導入細胞では p38MAPK のリン酸化が亢進することを見出し、これは TAK1 阻害薬 (A, B) TAK1 siRNA 導入により抑制されたことから (C, D) TAK1 を介していることを明らかにした。



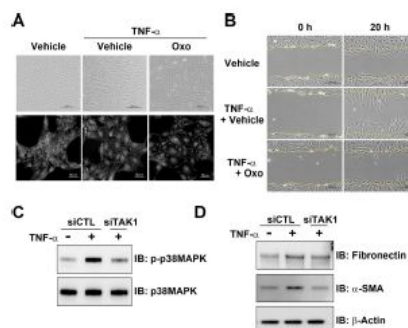
(7) Merlin の発現抑制により細胞増殖能が

亢進し、TAK1 siRNA と Merlin siRNA の co-transfection により、この増殖能亢進は有意に抑制されることもわかった。



(8) TAK1 を阻害すると TNF- α による EMT の誘導は抑制される。

最後に、TNF- α による EMT の誘導に TAK1 が関与するかを検討した。TAK1 阻害薬により TNF- α による形態の変化、細胞間接着の解離は抑制され、運動能の亢進も抑制された。さらに、siTAK 導入でも TNF- α による p38MAPK のリン酸化亢進を抑制し、間葉系マーカーである fibronectin と α -SMA の発現亢進が抑制されることを明らかにした。



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5件)

- Haga A, Takahashi E, Inomata Y, Kawahara K, Tanihara H. Differentiated Expression Patterns and Phagocytic Activities of Type 1 and 2 Microglia. Invest Ophthalmol Vis Sci. 57(6):2814-23, 2016.
- Takahashi E, Fukushima A, Haga A, et al (7人中1番目). Effects of mechanical stress and vitreous samples in retinal pigment epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 470(3):569-74, 2016.
- Nishizawa A, Inoue T, Ohira S, Takahashi E, Saruwatari J, Iwao K, Tanihara H. The Influence of

Phacoemulsification on Surgical Outcomes of Trabeculectomy with Mitomycin-C for Uveitic Glaucoma. PLoS One. 11(3):e0151947. 2016.

4. Ohira S, Inoue T, Iwao K, Takahashi E, Tanihara H. Factors Influencing Aqueous Proinflammatory Cytokines and Growth Factors in Uveitic Glaucoma. PLoS One.11(1):e0147080. 2016
5. Takahashi E, Haga A, Tanihara H. Merlin Regulates Epithelial-to-Mesenchymal Transition of ARPE-19 Cells via TAK1-p38MAPK-Mediated Activation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 56(4):2449-58. 2015.

〔学会発表〕(計 8 件)

高橋枝里、芳賀彰、谷原秀信 Merlin regulates hyaluronan endocytosis and epithelial mesenchymal transition in ARPE-19 cells. 2015年05月03日 05月07日、ARVO、デンバー、アメリカ合衆国

松原光希、高橋枝里、芳賀彰、谷原秀信 TGF- β -activated kinase 1 is essential for tumor necrosis factor- α -induced epithelial mesenchymal transition in ARPE-19 cells. 2015年05月03日 05月07日、ARVO、デンバー、アメリカ合衆国

芳賀彰、高橋枝里、猪俣泰也、谷原秀信 The subtypes of retinal microglia in rat after optic nerve crush injury. 2015年05月03日 05月07日、ARVO、デンバー、アメリカ合衆国

高橋枝里、西澤麻保、井上俊洋、川畑和幸、谷原秀信 Two cases with scleral fixation of intraocular lens after trabeculectomy. XXX Congress of the ESCRS 2015年09月05日-09月09日、バルセロナ、スペイン

西澤麻保、高橋枝里、大平さおり、岩尾圭一郎、井上俊洋、谷原秀信 The effect of phacoemulsification on failure of trabeculectomy in uveitic glaucoma patients. XXX Congress of the ESCRS 2015年09月05日-09月09日、バルセロナ、スペイン

高橋枝里 眼疾患における上皮間葉転換とその制御 2016年4月9日 第120回日本眼科学会 仙台

高橋枝里 線維柱帯細胞における上皮間葉転換様現象 第27回緑内障学会 2016年9月17日、横浜

福島亜矢子、高橋枝里、谷原秀信 The activation of hyaluronan signaling

pathway in epithelial mesenchymal transition-induced retinal pigment epithelium in proliferative vitreoretinopathy model. 2017年3月1日 5日、第32回Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress、サンテック、シンガポール

〔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：