

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861464

研究課題名(和文) 加齢黄斑変性における網膜色素上皮の機能的相転移の解析とエピジェネティックな制御

研究課題名(英文) The analysis of the phase transition of retinal pigment epithelium and the epigenetic regulation in age-related macular degeneration

研究代表者

畑中 宏樹 (Hatanaka, Hiroki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80368050

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)：加齢黄斑変性、増殖性硝子体網膜症などにおける後眼部組織の線維化による癒痕形成は永続的な視機能低下につながるが、今なお直接的な治療法は開発されていない。その病態には網膜色素上皮(RPE)の線維性変化が大きく関わる。そこで線維性変化においてどのような分子ネットワークが変化をしているのかを網羅的に解析し、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬を用いて線維化抑制効果を調べた。細胞モデルではTGF β 2、TNF α を線維化誘導剤として使用し、 α -SMAの発現亢進、CD44、MMP9の遺伝子、タンパクレベルでの有意な発現亢進を認め、HDAC阻害薬によりRPEの線維芽細胞様変化が抑制された。

研究成果の概要(英文)：Age-related macular degeneration and proliferative vitreoretinopathy are the major cause of vision loss and poor visual prognosis due to the chorioretinal fibrosis. The epithelial mesenchymal transition of retinal pigment epithelium (RPE) has been theorized to play a critical role in the development of such pathological fibrosis. The purpose of this study was to elucidate the change of the molecular network in the fibrotic change of the human RPE cell line (ARPE-19) and to investigate if the fibrotic change of ARPE-19 could be inhibited by HDAC inhibitor. The morphology of the ARPE-19 cultured with TGF β 2 or TNF α was changed to the spindle shape. The expression of α -SMA, CD44, and MMP9 were significantly increased by TGF β 2+TNF α . The morphological change of ARPE-19 cultured in the medium with TGF β 2 or TNF α was suppressed by a HDAC inhibitor.

研究分野：眼科学

キーワード：組織線維化 エピジェネティック 眼内増殖性疾患 加齢黄斑変性

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性ではほぼ全例で脈絡膜新生血管の発育のための土台として早期から線維性組織を生じ、その多くは不可逆性変化であり、新生血管が消失しても瘢痕組織として残存し、永続的な視力低下をきたしている。現在は血管新生抑制療法しかなく、患者数が増加する中、大きな医療上の課題となっており直接的な治療法が望まれている。本研究では、加齢黄斑変性の進行期病態の首座を網膜色素上皮の「細胞老化-上皮間葉系移行-線維化」という「細胞の機能的相転移」として捉える医療概念を検証する。加齢黄斑変性の成因は多因子であるが、その中でエピジェネティックな調節機構の破綻やその結果として網膜色素上皮内チュブリンのアセチル化によりミスフォールド蛋白が蓄積し、加齢黄斑変性における線維化に関わると示唆されている。網膜色素上皮の変性を「細胞の機能的相転移」として考え、相転移制御機構の破綻をエピジェネティックな破綻と捉える。本破綻を遺伝子、miR 発現レベルで網羅的に解析し、鍵を握る分子標的を見出す。さらにヒストン脱アセチル化酵素 histone deacetylase (HDAC) 阻害剤を用いた調節機構の正常化という介入の可能性が期待できるため候補薬剤による相転移抑制の検証を行う。

2. 研究の目的

加齢黄斑変性は今なお視力予後の不良な疾患である。本予後を左右する因子として後眼部間質の線維化が挙げられる。進行性病態の首座を網膜色素上皮細胞における細胞老化-上皮間葉系移行-線維化という「細胞の機能的相転移」として捉え、新しい治療概念を創出する。

(1) 相転移制御を遺伝子発現と miRNA (miR) による遺伝子機能制御レベルで網羅的に解析することで、斬新な分子標的を見定める。

(2) 網膜色素上皮の機能変性におけるエピジェネティックな制御機構の破綻をヒストン脱アセチル化酵素阻害薬や肝細胞線維化抑制特性を有する新規分子により修復する試みで科学的合理性を検証する。それらの結果から加齢黄斑変性の新規治療法創出に留まらず、線維化の早期診断法創出に向けての先駆的知見を得る。

3. 研究の方法

(1) モデル作成

① *in vitro* モデル

ヒト RPE 細胞株を用いる。免疫組織染色法において ZO-1, Na⁺K⁺-ATPase, RPE65 など機能関連タンパクの消失、 α SMA, fibronectin, collagen, phalloidin などの線維化関連マーカーの発現増加をもって線維化モデルの完成とする。

② *in vivo* モデル

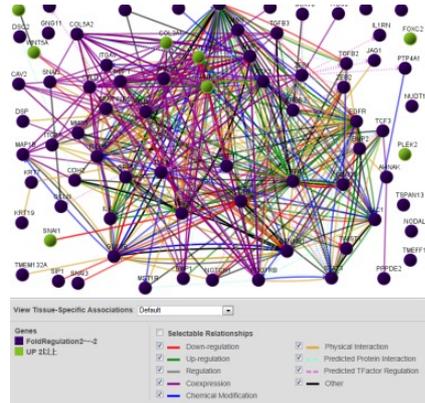
C57/BL/6 マウスを用いる。アルゴンレーザー

にて視神経乳頭周囲 4 象限に照射 (150mW, 0.1 秒, 50 μ m) を行い熱凝固させ、約 10、35 日後の病変発症眼底所見の観察を行う。

(2) RPEの相転移に係わる分子ネットワークの解析

細胞老化-EMT-線維化により変動する遺伝子群やEMT化の制御に係わる候補として選択した分子標的の間のネットワークの解析の一例を図1に示す。

図1 EMTに係わる分子標的間ネットワーク



相転移誘導剤としては、TGF β 、TNF α を用いる。RPEへの細胞ストレスなどで惹起される細胞相転移においてEMT抑制、MET促進、細胞の分化促進、p27抑制、細胞周期促進、枯死抑制など遺伝子発現を制御するmiR が選択的にupもしくはdown regulate されることを見出した。分子標的の同定にはHeat map を縦横に駆使するとともに、qRT-PCR により再現性を厳正に確認する。東レの3Dgeneやキアゲン社の細胞相転移に係わるPCRアレイを駆使する。miRについてはその作用標的遺伝子の推定を行う。推定された責任遺伝子、miRについては遺伝子導入、ならびに、現在の方法で機能の解析まで実施する。

(3) ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 (HDAC 阻害剤) などによるepigeneticな調節機構の正常化による線維化への影響を検証する。RPEに線維性変化を誘導させOBP-801 (HDAC阻害剤)、同対照化合物SAHA, TSAを投与し線維性変化の抑制効果を多角的に(位相差顕微鏡、免疫染色、western blotting、PCR) 検証し、HDAC阻害剤においてはさらにアセチル化/脱アセチル化の測定を行うことでepigeneticな調節機構の正常化が認められるかを検証し、各種線維化抑制検証との関連付けを行う。機能検定は前年度候補のZO-1, α -SMA, CD44, MMP9から選択されたものに限って実施する。相転移誘導剤としては、TGF β 、TNF α に特化する。POS食食能、スキヤベンジャー受容体発現などの機能や図2に示すECM(extracellular matrix)関連タンパクの変動との対応を精査する。

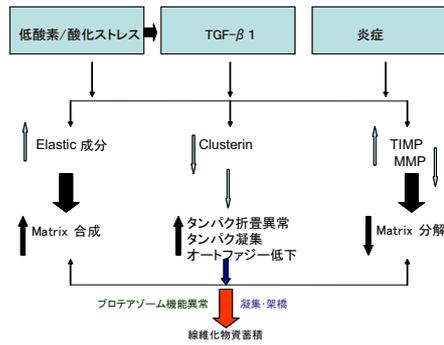


図2 ECM 関連タンパクの変動

4. 研究成果

C57/BL/6 マウスの右眼網膜にマルチカラーレーザーを照射後 10 日の眼球においてイソレクチンで血管内皮を染色したところ、脈絡膜レベルで血管新生を認め、フルオレセインを腹腔内投与蛍光顕微鏡で観察したところ蛍光物質の漏出を認めた。以上より加齢黄斑変性のマウスモデルの作成を確認できた。次に RPE の線維化 in vitro モデルとして ARPE-19 を使用し、線維化誘導剤として TGF β 2 (30ng/ml)、TNF α (10ng/ml) を用いて線維化誘導を行い、細胞形態の線維芽細胞様変化ならびに機能関連タンパク ZO-1 の発現減少 (TGF, TNF)、線維化関連タンパクである α -SMA 発現の亢進 (TGF) をもって線維化への相転移を確認した (図 4)。この相転移に関わる分子ネットワークの網羅的解析を行ったところ、CD44、MMP9 発現の有意な亢進を TGF β 2、TNF α で認め (図 5, 6)、それら誘導剤を合わせた環境では相乗効果も認められた。CD44 は細胞外基質と結合するたんぱく質であり、MMP9 は基底膜を破壊させ血管新生に働くタンパクであることから、線維化誘導に伴うそれらの発現の増加を通じて、血管新生の増悪やフィブリンなどの線維化につながる分子標的として重要な役割をしていることが示唆された。HDAC 阻害薬である OBP-801 を線維化誘導環境に加えたところ、1nM の OBP-801 で形態学的 (位相差顕微鏡) に線維化抑制効果が認められ (図 3)、免疫染色にて ZO-1 発現の回復、 α SMA 発現の抑制を認め、同類 HDAC 阻害薬と比較し低濃度で線維化抑制効果を有することが確認できた。今後は線維化誘導に伴う、HDAC、HAT の発現変化ならびに OBP-801 によるその影響の検証を行い、得られた結果の裏付けを行っていく予定である。

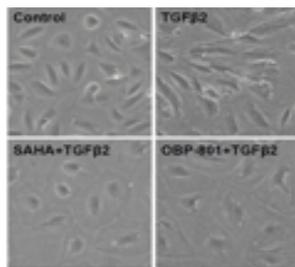


図3 OBP-801による線維化抑制効果

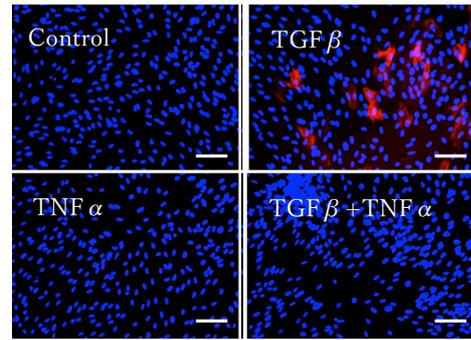


図4 TGF- β 2による α -SMA発現亢進

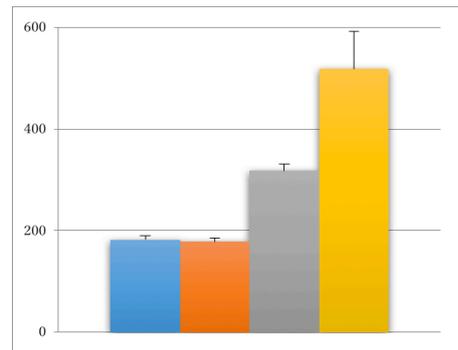


図5 TGF+TNFでCD44の遺伝子発現が

有意に上昇

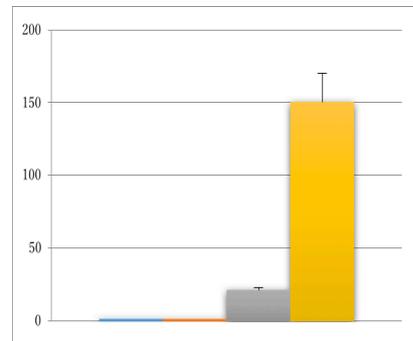


図6 TGF+TNFでMMP9の遺伝子

発現が有意に上昇

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

①畑中宏樹、向敦史、米田一仁、山田潤、外園千恵、木下茂、羽室淳爾. 網膜色素上皮の線維性変化に対するエピジェネティックな調整機構の影響. 第120回日本眼科学会総会、2016. 04. 07. 仙台国際センター (宮城県、仙台市)

②Hiroki Hatanaka, Atsushi Mukai, Kazuhito Yoneda, Jun Yamada, Chie Sotozono, Shigeru Kinoshita, and Junji Hamuro. Effect of Epigenetic Regulation on Fibrotic Change in Retinal Pigment Epithelium Cells. ARVO2016. 2016. 05. 05. シアトル (アメリカ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑中 宏樹 (HATANAKA, Hiroki)

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：80368050