

北 陸 大 学
学 長 殿

代表者	所属	薬学部	職位	講師	氏名	周尾 卓也
-----	----	-----	----	----	----	-------

研究課題名	閾値下レーザーのヒト網膜色素上皮細胞に対する効果： 作動原理から追求する黄斑浮腫治療の基礎研究
-------	--

交付額	1,000,000 円
-----	-------------

研究成果の概要

<恒常性を維持する仕組み> 閾値下レーザー照射において、温熱に耐性する(1)網膜色素上皮細胞の恒常性が、(2)転写因子HSF1を介在する(3)HSPA1AやHSPA6の発現と、(4)Hsp70・DNAJB1・BAG3複合体の誘導に依拠するオートファジー-リソソーム体系の観点から特定できつつある。

<微細構造を改変する仕組み> 傍細胞輸送を調整する(1,2)網膜色素上皮細胞の微細構造が、経上皮電気抵抗値の測定から検知できたが、タイト結合の一時的な開口に(3)ZO-1やアクチンの動態が関連しない分子メカニズムが顕在化しつつある。

研究目的 研究開始時の背景・着想に至った経緯などを含めて目的を記入して下さい。

<研究目的の概要> 黄斑浮腫は視覚情報の中枢を担う黄斑部に出現するむくみで、患者の視界を奪うことで健康寿命を著しく害する眼疾患であり、急増する糖尿病の重大な合併症として、根本的な治療法の確立が喫緊の課題となっている。申請者は光凝固に注力し、閾値下レーザー光が浮腫を軽減する分子作用の理解から、治療効果の高い施術法の開発に取り組んでいる。自作のレーザー照射実験系を用いた分子レベルの検討により、光エネルギーが負荷された網膜色素上皮層において、①熱ショックタンパク質Hsp70とその共役因子や②細胞外マトリックスAMTNの発現増強、および③タイト結合分子ZO-1の脱局在を見出している。

本研究は、3つの観察結果から展開する“細胞の恒常性維持と微細構造”の詳細を解析し、光エネルギーを吸収した網膜色素上皮細胞が第一にどのような挙動を起こすのかを解明することで、根拠に基づく治療法を築くための学術的な基盤の獲得を目指すものである。

<研究成果を踏まえ着想に至った経緯と内容> 申請者は、次世代質量分析計のレーザーイオン化法を開発した経験から [PLoS One 7:e43751 (2012), 日本経済新聞], レーザー光の医療応用を目標に、眼科医術の革新とされる網膜光凝固に着目し、作用機序が全く不明であった黄斑浮腫に対する閾値下レーザーの有効性に焦点した。網膜を一層に裏打ちして、光エネルギーを選択的に吸収する網膜色素上皮の微細領域への的確なレーザー照射が浮腫軽減の分子機序を解明する糸口になると考え、培養網膜色素上皮細胞に対する独自のレーザー照射実験系を自作した [J Ophthalmol 2015:729792 (2015)]. DNAマイクロアレイの手法で網羅的に測定した遺伝子発現情報と免疫細胞化学の観察から、閾値下レーザーの標的となる3つの分子 (Hsp70, AMTN, ZO-1) を同定し、これらの生理機能を基礎として、本計画で解析する“細胞の恒常性と微細構造”にかかわる研究を着想した。

研究の方法

<研究方法の概要> 有孔膜 (トランスウェル) の表面にコンフルエントな単層として8週間培養した天然のヒト網膜色素上皮細胞に、一様にレーザーを照射して、経時的に実験に供する。レーザー照射部位の物理的な変容は明視野イメージングおよび走査型電子顕微鏡により精査する。

(1) 恒常性を維持する仕組みの解析

実験内容：Pifithrin-uでHsp70の働きを阻害した条件で、タンパク質の凝集をProteoStatで検出されるアグリソームとして共焦点顕微鏡で定性、フローサイトメトリーで定量する。またJNK経路 (JNK, c-Jun, Bax, cytochrome c) の賦活化は、JNK, c-Junのリン酸化をウエスタンブロットで、Baxの細胞質からミトコンドリア膜への局在を免疫細胞化学で、cytochrome cの含有量を細胞質とミトコンドリア画分のELISAで調べる。

(2) 微細構造を改変する仕組みの解析

実験内容：バリウム含有・重炭酸不含の培養液やアンモニウムで傍細胞輸送にかかわるイオンチャネルを阻害した条件で、単層細胞を横切るFITC標識デキストランの変化量を蛍光プレートリーダーで、電気抵抗を経上皮電気抵抗計で、電解質 (LiCl/NaCl/KCl/RbCl/CsCl) に依存的な膜電位をウッシングチャンバへ接続した電流電圧クランプの回路で調べる。

研究成果 引用文献は文末に〈引用文献〉として記入して下さい。

<恒常性を維持する仕組み>

(1)Hsp70は細胞の脆弱化を抑制する

Pifithrin-uの選択的なHsp70活性阻害によって、細胞傷害性アデニル酸キナーゼの経時的な放出増加を示すことができた

(2)Hsp70はHSF1の制御下でmRNA転写される

4個のファミリーからなる転写因子HSFのうち、KRIBB11の選択的なHSF1活性阻害によって、細胞傷害性の惹起、HSPA1AとHSPA6の下方制御を示すことができた

(レーザー照射後3時間で1.6, 0.7, 0.5倍であった)

(3)Hsp70はHSPA1とHSPA6からタンパク合成される

13個のファミリーからなるHsp70 mRNAのうち、HSPA1AとHSPA6の上方制御を示すことができた

(同様に4.3, 134.9倍であった)

(4)Hsp70はDNAJB1やBAG3と共役する

温熱ストレスを感受して作動する分子群のうち、Hsp70と連動するDNAJB1とBAG3の上方制御を示すことができた(同様に2.7, 2.0倍であった)

現在に『タンパク凝集の過程を、オートファジー-リソソーム体系の構成要員となるHsp70・DNAJB1・BAG3複合体, CHIP, p62, LC3』として、および『アポトーシスの過程を、Hsp70が動員されるシグナル伝達カスケードJNK-cJun-BAX軸』として、それぞれの明確化に取り組んでいる。

網膜色素上皮層は、多能性幹細胞(iPS)から分化誘導されて、移植に供する再生医療の臨床治験が開始されている。本研究で探究する細胞恒常性の維持は、レーザー治療の学術的基盤となるだけでなく、生体外で細胞を賦活(耐ストレス)化する手段の開発に進展できると考えている。

<微細構造を改変する仕組み>

(1)タイト結合は培養60日で定常化する

有孔膜で培養した単層の経上皮電気抵抗値は、タイト結合の強度を反映するが、培養初日の139Ωから、7日以降の上行、60日の257Ωに達する安定水準を示すことができた

(2)タイト結合は開閉する

閾値下レーザーの照射で一過的な抵抗値の減少を示すことができた

(1時間で最小、3日で処置前と同等であった)

(3)タイト結合は、ZO-1と連動せずに、開口する

最小の抵抗値においてもなお、タイト結合を細胞質側で裏打ちするZO-1や細胞骨格アクチンフィラメントの不変な局在を示すことができた

現在に『溶質透過の過程を、分子直径が異なるデキストランの流通』、および『タイト結合変調の過程を、細胞内タンパク質の可逆的なリン酸化反応』として明確化に取り組んでいる。

網膜色素上皮層は、閾値形成により物質の往来を規定する。本研究で探究するタイト結合の開口は、浮腫軽減の基盤だけでなく、薬物送達的手段に進展できると考えている。

・新旧レーザーの比較

レーザーは治療光出力と照射時間で調節されるが、アレニウス積分により制御する閾値下型において、従来型とは異なり、本実験の培養細胞でも生体内と類似する光エネルギーの直線的な制御を示すことができた

・病態モデルの解析

重度糖尿病患者の血糖値を模倣するグルコースの高糖培地で、200日培養した細胞においても、閾値下レーザーによるHsp70と共役分子の上方制御を示すことができた

主な発表論文等 論文・学会・HP等の発表があれば、項目ごとに記入して下さい

<学会発表>

(1)LIGHT 2018 [The International Retinal Laser Society] 4th annual meeting

2018.10.25 (Chicago, USA)

Heat shock protein and Metallothionein family genes expression after sublethal micropulse laser photocoagulation in primary human retinal pigment epithelial cells

(2)第123回 日本眼科学会総会

2019.4.19 (東京, 千代田区)

細胞障害を引き起こさないマイクロパルス波がヒト網膜色素上皮細胞に与える効果