

閾値下レーザーに応答する網膜色素上皮細胞の分子基盤

—糖尿病黄斑浮腫治療に向けた光刺激の実証—

1. 研究の目的

糖尿病黄斑浮腫は視覚情報の中心を担う黄斑部に出現するむくみで、糖尿病を契機に、病期にかかわりなく発症し、患者の視力を奪うことで健康寿命を著しく害する。近年、糖尿病黄斑浮腫の治療には、分子標的薬が積極的に導入されているが、繰り返し注射を頻回する施術は、患者の肉体的、精神的な負担だけでなく、高額な医療費による経済的な負担という点で、問題を内包している。

閾値下レーザー光凝固は、網膜組織に凝固斑(瘢痕)を生じさせないように設定した強度で、眼内の浮腫に向けてレーザーを照射する手法で、旧来のように破壊的でない安全性と治療効果を両立している。しかし、レーザー光がどのような分子機序で浮腫に作用するかは不明であるために、最適な施術法の確立には至っていない。そこで私たちは、自作のレーザー照射実験系を駆使した細胞レベルの研究によって、浮腫を軽減する分子機序を理解することで、治療効果を最大限に発揮する非侵襲的な閾値下レーザー療法を提案を目指している。

眼内へと照射したレーザー光は網膜色素上皮層に選択的に吸収される。これまでに私たちは、生体内と同等の細胞極性を獲得した単層細胞への光エネルギーの負荷に成功している。閾値下レーザーに対する網膜色素上皮層の反応として、3つの標的分子を明らかにした。

本研究では、標的分子の生理活性から予想される細胞機能を踏まえて、光エネルギーが負荷された網膜色素上皮細胞で、最初期に起こる変化を、(1)Hsp70とDNAJB1、BAG3が担う恒常性の維持について、タンパク凝集とアポトーシスに着目して、分子細胞生物学的に調べるとともに、(2)CXCL8とZO-1が担う接着装置の改変について、傍細胞輸送にかかわる溶質透過・経上皮電気抵抗・膜電位に着目して、生物物理学的に調べる。

以上より、閾値下レーザーに応答する網膜色素上皮細胞の分子作用機序というテーマの解明を達成して、糖尿病黄斑浮腫に対抗する新たな学術的基盤の創出につなげる。

2. 研究の計画

光刺激と“恒常性の維持”や“接着装置の改変”との相互関係を明らかにして、傷害がなく治療を有効とする最適解の分子基盤を確立するために、有孔膜の表面にコンフルエントな単層として60日間培養した天然あるいはiPS人工多能性細胞に由来する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。

(1) 恒常性を維持する仕組みの解析

①ここまでの実験結果は、オートファジー体系のHsp70・DNAJB1・BAG3、加えてLC3、p62、CHIPが恒常性の維持に重要なことを示している。そこで、オートファジー体系の定量実験によって、種々のレーザー出力で発現増強するオートファジー体系のタンパク質分子全体をPy-Tag誘導体で安定同位体標識し、液体クロマトグラフ質量分析計の多重反応モニタリングによる相対定量法で調べる。

(2) 接着装置を改変する仕組みの解析

①CXCL8は好中球を特異的に強力に誘引することが明らかになっている。そこで、好中球の遊走実験によって、光刺激した網膜色素上皮層の培養液に対して、末梢血から調製した好中球が移動することをボイデンチャンバーの化学走化性アッセイで調べる。

②CXCL8はタイト結合を緩和させる。また、過去の動物モデルの実験結果は、好中球が網膜色素上皮層の細胞間隙を往来していることを示している。そこで、タイト結合の開閉実験によって、生細胞間での脂質二重膜の張力をリアルタイムに観測できるFlipper-TRプローブを利用して、細胞間隙の変化を光寿命顕微鏡法で調べる。

③アクチンはZO-1を介して接着装置OccludinとClaudinを繋ぎ止めるが、ここまでの実験結果は光刺激でアクチンが脱重合していることを示している。そこで、アクチンの再構築実験によって、生細胞中でのアクチン重合体をリアルタイムに観測できるSpirochromeプローブを利用して、アクチン線維の変化を多点共焦点顕微鏡法で調べる。

3. 研究の成果

治療の奏効機序を解明するための糸口として、閾値下レーザー照射後の網膜色素上皮細胞内

で、最初期に発現誘導される分子を同定することが必須であると予想し、以下の項目を、実行してきた。

(1) レーザーが、なぜ糖尿病黄斑浮腫の治療に有効なのか？

- ① 網膜光凝固と閾値下レーザーの相違について、網膜光凝固の概念では、レーザー照射部位を焼き固めて、酸素の消費を制限することが、浮腫軽減の機構として定説であるが、一方、閾値下レーザーは、細胞組織を傷害しないのが前提である。
- ② ヒト網膜色素上皮について、iPS細胞から分化誘導した網膜色素上皮細胞を、透過膜上で、集密的に40日間培養し、細胞体の形態と色相が、敷石状で黒褐色となる単層のシートを調製した。
- ③ レーザー照射系について、網膜色素上皮シートに対し、垂直に落射する経路を設計し、1箇所 (0.7 mm²) あたり49点のレーザーを78箇所 (112 mm²) に、TxCell-IQ577発振器によって、自動照射した。
- ④ 閾値下レーザーの設定について、臨床に準じ、レーザー出力のみを増減させ、細胞層のCalceinシグナルを共焦点顕微鏡観察することで、傷害のない強度を特定した。
- ⑤ 包括的な遺伝子解析について、照射直後の時間経過において、23種類の遺伝子発現が上方制御されることがわかった。
- ⑥ 標的分子の経時的発現について、CXCL8とHSP70B' とが、mRNAだけでなく、タンパク質としても、一過性のピークとして発現することがわかった。
- ⑦ 標的分子の生物活性について、CXCL8は、網膜色素上皮内の代謝活性化にかかわり、免疫細胞を誘引し、免疫細胞間のパラ分泌シグナルを亢進する、他方、HSP70B' は、網膜色素上皮内の恒常性維持にかかわり、オートファジーを誘導し、オートファジーのタンパク質分解を促進する、という2つの分子メカニズムを考案した。

4. 研究の反省・考察

本研究において、閾値下レーザーに応答した、iPS細胞由来ヒト網膜色素上皮シートが、ケモカイン分子CXCL8とシャペロン分子HSP70B' とを、一過性のピーク (mRNAでは3時間、タンパク質では12時間までに最大) に発現することをゲノムワイドな解析から見出した。

この研究成果は、CXCL8とHSP70B' の経時的な発現パターンと同調する細胞外液性因子を、網膜色素上皮が分泌する代謝物質やタンパク質の全体 (精密質量データベースを活用した高分解能質量分析) から、閾値下レーザー治療の有効性をモニタリングできる分子マーカーの発見と、その臨床検査への応用を目指すことを可能とする。

現状の閾値下レーザー治療は、施術条件の設定方法が統一されておらず、患者の個々人に対して至適とはいえず、治療有効性の評価は、施術から1ヶ月もの時間経過を必要としている。

本研究の結果を基礎として、閾値下レーザーが照射された糖尿病モデルヒト網膜色素上皮のセクレトームを、メタボロミクス法およびプロテオミクス法で測定し、閾値下レーザーの標的分子CXCL8とHSP70B' の発現パターンを経時的に比較するという、先例のない方法論を展開することで、糖尿病黄斑浮腫の治療を保証するモニタリングマーカーとなる、細胞外液性因子を選定する全く新しい取り組みに発展している。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Takuya Fujimaru、Takuya Shuo、Masahiko Nagahama、Fumika Taki、Masaaki Nakayama、Yasuhiro Komatsu
Assessing Urine Ammonium Concentration by Urine Osmolal Gap in Chronic Kidney Disease Assessing Urine Ammonium Concentration by Urine Osmolal Gap in Chronic Kidney Disease
Nephrology 26 809-812 2021年7月
- ② Eri Shishido、Takuya Shuo、Kazuyuki Shinohara、Shigeko Horiuchi
Effects of epidural anesthesia on postpartum maternity blues and fatigue and its relation to changes in oxytocin
Japan Journal of Nursing Science 18(3) e12406 2021年1月
- ③ 宍戸恵理、周尾卓也、堀内成子

(2) 口頭発表

- ① 高畑香織、宮内愛、仲丸律子、田所由利子、周尾卓也、堀内成子
分娩時の医療介入による乳汁分泌量と母乳育児率および唾液オキシトシン値への影響
第36回日本助産学会学術集会 2022年3月
- ② 高畑香織、宮内愛、仲丸律子、田所由利子、周尾卓也、堀内成子
高度生殖補助医療 ART 後の妊娠における乳汁分泌量と母乳育児率
第35回神奈川母性衛生学会学術集会 2022年2月

(3) 出版物

なし