

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 2 日現在

機関番号：17701  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010 ～ 2011  
 課題番号：22791674  
 研究課題名（和文）：Transwell を利用した極性をもつ網膜色素上皮細胞の培養法の確立  
 研究課題名（英文）：Assay for establishment of highly polarized retinal pigment epithelial cells  
 研究代表者：園田 祥三 (SONODA SHOZO)  
 鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教  
 研究者番号：20325806

研究成果の概要（和文）：近年、Transwell を利用した網膜色素上皮細胞（RPE）培養によって、細胞極性を示すRPE（polarized RPE）培養が可能になっている。我々は、さらに培養法を改良し、ヒトおよびブタRPE で、細胞極性が高くより分化した培養法を確立した。極性RPEの特徴は、形態的には細胞表面に微絨毛がよく発達、tight junction, adherence junctionがよく発達し形態的に生体RPEときわめて類似。機能的には、trans epithelial resistance (TER)値がブタで  $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$  以上)、permeability assayで自由な物質の透過が制御、さらにVEGFやPEDFの極性分泌が生体と同じであることを確認した。

研究成果の概要（英文）：Our group attempted to establish a reproducible method for culturing highly polarized RPE and tried to elucidate the pathophysiological mechanism of retinal disease using polarized culture RPE.

Highly polarized RPE cells were grown on Transwell™ filters (12 mm, i.d). Primary cultures of RPE cells on T75 flask were seeded on fibronectin-coated Transwell™. RPE cells were cultured in 1% FBS for more than 4 weeks. As in native tissue, porcine RPE cells formed a monolayer, were well pigmented, and were arranged in a regular hexagonal array. The integrity of RPE layer was confirmed by expression of TJ proteins ZO-1 and occluding and well developed microvilli, localization of pigment on the apical side, nuclei on basal side, and presence of tight-junctional complexes by electron microscopy. Well-differentiated RPE cells secreted VEGF-A preferentially to the basolateral side of the tissue. With respect to application of polarized culture RPE system, after stimulation with TNF- $\alpha$ , TER decreased about 15% of reduction in comparison to control at 24 hours, which was abolished by anti-TNF- $\alpha$  antibody. This reduction was inhibited by SB203580 inhibitor, but not by any other inhibitors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：細胞・組織、polarized cell、網膜色素上皮、加齢黄斑変性

1. 研究開始当初の背景：網膜色素上皮細胞 (RPE) は視細胞と脈絡膜の間に位置し、両者間における手術の物質輸送に関与するのをはじめとして、視細胞の外節の貪食、ビタミン A 代謝、視細胞微小循環の維持など、眼球の恒常性を維持するために、様々な重要な役割を担っている。また RPE の異常が加齢黄斑変性 (AMD) や増殖硝子体網膜症などの各種病変形成に深く関与している。すなわち、RPE が種々の生理活性物質を生成し、病態形成および創傷治癒に関与している。

RPE の機能や病態関与のメカニズムを解明するために、RPE 培養細胞を用いて主に研究が行われている。本邦では ARPE-19 を用いた研究がほとんどある。ARPE-19 はヒト RPE の cell line であるが、継代や培地条件によってその性質が変化することが報告されている (Luo, Rizzolo *et al.* IOVS2006)。また、RPE は強固な細胞間接着装置をもち、血液網膜関門や感覚網膜・脈絡膜間の物質輸送を制御する働きがある。通常の RPE 培養法では、これらの RPE の機能を再現することは不可能である。言い換えると、*in vivo* の RPE 機能と解離した培養細胞を使って実験を行っていることになる。近年、transwell を利用した培養によって、細胞極性や tight junction をもつ RPE (polarized RPE) 培養が可能になっている (Hu, Bok, *Mol vis*2001)。我々は、さらに培養法を改良しより細胞極性が高胃培養法の確立を試みている。

2. 研究の目的：眼内特に網膜や脈絡膜の恒常性を保つ重要な働きを持つ RPE に関して、polarized RPE と non-polarized RPE (非極性 RPE) では、これまでの報告とは結果が異なる可能性がある。より生体に近い解析を行うために、polarized RPE の安定した再現性の

高い培養法を確立することは重要である。そのため、本法で比較的入手が容易であるブタ RPE を用いて培養を行うことを目的し、培養 RPE の機能的・形態的な解析を行う。

また、polarized RPE を用いて、様々なサイトカインで刺激を行うことで、病態を意識した解析を行う。さらに、培養 RPE のシート移植を意識して、生体分解性のある物質上でも併せて培養を試みる。

3. 研究の方法：① **polarized RPE 培養の確立**：ブタ RPE の初代培養細胞を用いて、細胞極性をもち、より生体の RPE に類似した polarized RPE の培養法を確立する。12 ウェル用 transwell™ 上に細胞を播種 ( $1 \times 10^5$  個) し、10% FBS 含有特殊培地 (MEM 培地をベースに、タウリン、N-1 サプリメント、ハイドロコルチゾン等を添加) を用いて 24 時間培養、細胞を transwell に十分に接着させた後、FBS を 1% に減じた同培地中で約 1 ヶ月間培養を行う。培養 RPE の評価として、走査型・透過型電子顕微鏡、tight junction、adherence junction に関する免疫染色・Western blot (形態解析)、TER、permeability assay (バリア機能)、VEGF や PEDF の ELISA による増殖因子分泌能解析 (後者 2 つ機能解析) を行った。

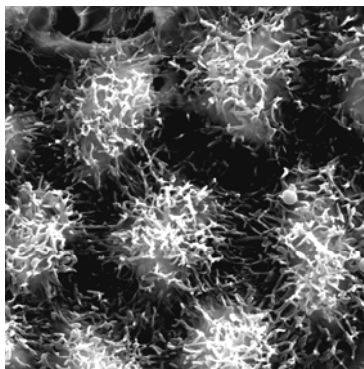
② Polarized RPE を利用したサイトカイン刺激による反応：炎症性サイトカインの代表である TNF- $\alpha$  による刺激を行い (上下チャンパーともに 10ng/ml)、主にバリア機能に関する因子を中心に解析を行った。

③ 極性 RPE の生体内移植を目指して生体内分

解性を持つ PLGA 上での培養方法の確立を目指した。

4. 研究成果：培養 RPE の形態的評価は、走査型電顕で細胞表面に微絨毛がよく発達、透過型電顕では、生体 RPE 同様に、細胞管接着装置、色素顆粒、細胞内器官の極性配列や基底陥入などの所見を認めた。また、培養 RPE の機能評価として、バリア機能は TER が  $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$  以上となり、permeability assay では物質の自由な交通が制御されていた。また、VEGF や PEDF は、それぞれ生体 RPE と同様のパターンを示し、VEGF は基底側、PEDF は上皮側に有意に分泌していて、機能的にも生体 RPE に類似して極性を持った RPE が培養できたと考えている。

また、TNF- $\alpha$  による刺激実験では、TER が低下、関与するシグナルに関しては、TNF により活性化される p38MAPK の関与が確認できた。また TNF- $\alpha$  によって、tight junction 関



Transwell 上で特殊培地を用いて培養。SEM で高分化の微絨毛が観察できる。

連蛋白が主に障害を受け、adherence junction の N-cadherin は発現の低下は認めなかった。

#### 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 4 件)

- ① Ueno Y, Sonoda S, Suzuki R, Yokouchi M, Kawasoe Y, Tachibana K, Maruyama K,

Sakamoto T, Komiya S. Combination of ultrasound and Bubble liposome enhance the effect of doxorubicin and inhibit murine osteosarcoma growth. *Cancer Biol Ther.* 査読有、2011 Aug 15;12(4):270-277.

<http://dx.doi.org/10.4161/cbt.12.4.16259>

- ② Otsuka H, Arimura N, Sonoda S, Nakamura M, Hashiguchi T, Maruyama I, Nakao S, Hafezi-Moghadam A, Sakamoto T.

Stromal cell-derived factor-1 is essential for photoreceptor cell protection in retinal detachment. *Am J Pathol.* 査読有

. 2010. Nov;177(5):2268-2277.

<http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2010.100134>

- ③ Kase S, He S, Sonoda S, Kitamura M, Spee C, Wawrousek E, Ryan SJ, Kannan R, Hinton DR. alphaB-crystallin regulation of angiogenesis by modulation of VEGF.

*Blood.* 査読有、2010. Apr 22; 115(16)3398-3406. doi:10.1182/blood-2009-01-197095

[学会発表] (計 15 件)

- ① 園田祥三, 大塚寛樹, 白澤 誠, 有村昇, 上笹貫太郎, 喜井裕哉, 大久保明子, 坂本泰二、中心性漿液性脈絡網膜症に対する低照射容量 PDT の検討、TEAM2011 2011 年 12 月 2 日、東京国際フォーラム (東京都)
- ② 上笹貫太郎, 大塚寛樹, 喜井裕哉, 園田祥三, 坂本泰二、黒色細胞腫に伴う網膜下新生血管に対しベバシズマブ硝子体注

- 射が奏功した1例、第81回九州眼科学会、2011年5月28日、沖縄県市町村自治会館（那覇市）
- ③ 内野英輔，園田祥三，藤田敦子，楠松泰子，坂本泰二、角膜内皮移植術後に発症したサイトメガロウィルス角膜内皮炎の一例、第81回九州眼科学会、2011年5月27日、沖縄県市町村自治会館（那覇市）
- ④ 吉永就正，有村 昇，大塚寛樹，竹之内和則，貞村ゆかり，野間 聖，川原幸一，園田祥三，橋口照人，丸山征郎，坂本泰二、NSAIDs点眼による脈絡膜血管新生抑制、第115回日本眼科学会総会、2011年5月13日、東京国際フォーラム（東京都）
- ⑤ 加瀬 諭，園田祥三，北村 瑞，StephenRyan，DavidHinton，石田 晋、AlphaB-crystallinによる実験的脈絡膜新生血管の制御、第115回日本眼科学会総会、2011年5月12日、東京国際フォーラム（東京都）
- ⑥ 園田祥三，大塚寛樹，白澤 誠，有村 昇，園田恭志，坂本泰二、Transwell™を用いた極性ブタ網膜色素上皮細胞の培養、第115回日本眼科学会総会、2011年5月12日、東京国際フォーラム（東京都）
- ⑦ Shozo Sonoda，Makoto Shirasawa，Hiroki Otsuka，Toshio Hisatomi，Noboru Arimura，Yasushi Sonoda，Taiji Sakamoto. Assay For Establishment Of Highly Polarized Porcine Retinal Pigment Epithelial Cells. ARV02011 2011年5月1日. Fort Lauderdale U.S.A
- ⑧ 園田祥三，白澤 誠，有村 昇，上笹貫太郎，大塚寛樹，大久保明子，坂本泰二、ポリープ状脈絡膜血管症に対するbevacizumabとranibizumabの治療の比較、厚生労働省難治性疾患克服研究事業網膜脈絡膜・視神経萎縮症調査研究班平成22年度班会議、2011年1月21日、名古屋市立大学（名古屋市）
- ⑨ 有村 昇，吉永就正，大塚寛樹，山切啓太，園田恭志，尾辻 太，園田祥三，坂本泰二、硝子体出血における硝子体中液性因子濃度の評価、第49回日本網膜硝子体学会、2010年11月26日、大阪国際会議場（大阪市）
- ⑩ 園田祥三，白澤 誠，有村 昇，上笹貫太郎，松尾由紀子，大久保明子，坂本泰二、ポリープ状脈絡膜血管症に対するbevacizumabとranibizumabの治療の比較、第27回日本眼循環学会、2010年7月31日、ポートピアホテル（神戸市）
- ⑪ 松尾由紀子，園田祥三，有村 昇，大久保明子，坂本泰二、インターフェロン療法中に生じた脈絡膜新生血管に対しbevacizumab投与が有用であった1例、第27回日本眼循環学会、2010年7月30日、ポートピアホテル（神戸市）
- ⑫ N. Yoshinaga, N. Arimura, S. Sonoda, K. Takenouchi, S. Noma, K.-I. Kawahara, T. Hashiguchi, I. Maruyama, T. Sakamoto. NSAIDs Induce Antioxidant Proteins in Retinal Pigment Epithelial Cells. ARV02010 Annual Meeting. 2010年5月3日. U.S.A, (Greater Fort Lauderdale)
- ⑬ S. Sonoda, M. Kitamura, C. Spee, S.J. Ryan, T. Sakamoto, R. Kannan, D.R. Hinton. Suppression of TGF- $\beta$ -Induced Upregulation of Connective Tissue Growth Factor by Ceramide in Human RPE Cells. ARV02010 Annual Meeting. 2010年5月2日. U.S.A, (Greater Fort Lauderdale)

- ⑭ 園田祥三, 北村 瑞, Ryan Stephen, Kannan Ram, Hinton David, 坂本泰二、培養網膜色素上皮細胞での CTGF 分泌における TGF- $\beta$  の作用に対するセラミドの効果、第 114 回日本眼科学会総会、2010 年 4 月 16 日、名古屋国際会議場（名古屋市）
- ⑮ 吉永就正, 有村 昇, 園田祥三, 竹之内和則, 野間 聖, 川原幸一, 橋口照人, 丸山征郎, 坂本泰二、NSAIDs による網膜色素上皮株における抗酸化タンパク質誘導、第 114 回日本眼科学会総会、2010 年 4 月 16 日、名古屋国際会議場（名古屋市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

園田祥三 (SONODA SHOZO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・  
助教

研究者番号：20325806