

論 文 要 旨

TNF- α decreases VEGF secretion in highly polarized RPE cells but increases it in non-polarized RPE cells related to crosstalk between JNK and NF- κ B pathways

〔 TNF- α は JNK-NF- κ B クロストークを介して極性網膜色素上皮細胞の VEGF を減少させるが非極性網膜色素上皮細胞の VEGF は増加させる 〕

寺崎 寛人

【序論および目的】

網膜色素上皮細胞 (Retinal pigment epithelium cells, RPE) は、生体内で感覚網膜や脈絡膜の恒常性の維持に重要な役割をもつ。そのひとつに Vascular endothelial growth factor (VEGF) の分泌作用があり、RPE は基底膜側に VEGF を分泌し脈絡膜を栄養している。

加齢黄斑変性 (Age-related macular degeneration, AMD) は先進国における中途失明の主な原因のひとつで、その病態には慢性炎症が関与している。AMD は大きく Wet type と Dry type に分類され、Wet Type では脈絡膜から新生血管を生じるが、そこには脱分化した RPE と炎症性サイトカインの共発現が報告されている。既報では炎症性サイトカインは RPE の VEGF 分泌を促進させるので、この VEGF 分泌亢進は病態を更に悪化させる。一方で新生血管を伴わずに RPE や脈絡膜の萎縮が生じる Dry type では、その病態と炎症性サイトカインの関与は不明である。従来研究で用いられてきた RPE は、上皮の性質を失った、脱分化したものがほとんどであり (非極性 RPE)、その結果が生体での反応を反映しているかは不明であった。我々は、上皮の性質をもつ、すなわち極性をもつ RPE (極性 RPE) の培養系を確立しており、炎症性サイトカインに対する反応を非極性 RPE のそれと比較した。炎症性サイトカインには、RPE 周囲での存在が報告されている腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor, TNF- α) を選択した。

【材料および方法】

ブタから回収した RPE を培養した後、Transwell に播種し、2 週間以上培養したものを極性 RPE とした。非極性 RPE は、RPE を通常の 12well plate に播種し、コンフルエントしたものをを用いた。極性 RPE と非極性 RPE の形態学的解析を行い、上皮系・間質系のマーカーの発現や Tight junction-associated protein の発現を比較した。極性・非極性 RPE を TNF- α 刺激 (10ng/ml・24 時間) し、medium 中の VEGF 濃度を ELISA で測定・解析した。動物実験委員会の承認を得て、ラットの網膜下に TNF- α を投与し、RPE の VEGF 発現に与える影響を免疫染色で検討した。RPE の VEGF 分泌への関与が報告されている JNK 経路と NF- κ B 経路の阻害剤を用いて VEGF を測定し、それぞれの細胞における JNK・NF- κ B の発現を免疫染色・ウェスタンブロットで調べた。最後に JNK と NF- κ B 間に相互作用があることを調べるために NF- κ B 阻害剤を前投与した RPE に TNF- α 刺激を行い、JNK の発現を調べた。

【結果】

極性 RPE は光学顕微鏡では六角形の形状で色素を持ち、電子顕微鏡にて頂側に発達した微絨毛やタイトジャンクションを認めた。非極性細胞は、紡錘状で、色素が少なかった。極性 RPE では、RPE のマーカーである RPE65 の発現が強く、非極性 RPE では間質性のマーカーである α -SMA の発現を認めた。極性 RPE は基底膜側により多くの VEGF を分泌しており、その量は非極性 RPE の約 3.5 倍であった ($P<0.01$, Tukey-Kramer test)。TNF- α は非極性 RPE の VEGF 分泌を約 2 倍増加させたが、極性 RPE の VEGF 分泌は約 4 割減少させた (各々 $P<0.05$, $P<0.01$, Tukey-Kramer test)。ラットの網膜に VEGF の免疫染色を行うと、RPE の基底膜側に VEGF の強い染色を認めた。TNF- α の網膜下注射を行った 1 週間後の網膜では、RPE 基底膜側の VEGF の染色がコントロールと比べ弱くなっていた。また TNF- α に暴露した範囲の脈絡膜の面積は、コントロールに比べて有意に減少していた ($P<0.05$, Tukey-Kramer test)。TNF- α が RPE の VEGF 分泌に与える影響が細胞極性によって異なるメカニズムを調べるために、JNK と NF- κ B の阻害剤が RPE の VEGF 分泌に与える影響を調べた。JNK 阻害剤は極性 RPE の VEGF を減少させたが非極性 RPE には影響しなかった。一方 NF- κ B 阻害剤は極性 RPE では影響なかったが非極性 RPE では VEGF を増加させた。免疫染色・ウエスタンブロットでは、極性 RPE は JNK とその転写因子の c-Jun の発現が強く、NF- κ B の発現は弱かった。一方で非極性 RPE では NF- κ B の発現が強く、JNK と c-Jun の発現が弱かった。極性・非極性 RPE 共に TNF- α 刺激時の JNK の Activation は一過性であったが、NF- κ B 阻害下で TNF- α 刺激を行うと JNK の Activation が持続した。このことから極性 RPE における TNF- α の VEGF 抑制作用は、NF- κ B による JNK の抑制がメカニズムの一つであることが示唆された。

【結論及び考察】

TNF- α を含めた炎症性サイトカインは多くの細胞種において VEGF 発現を増加させると考えられている。極性の弱い RPE を用いた多くの報告でも TNF- α は VEGF 分泌を増加させるために、血管新生を亢進させる Wet AMD の原因のひとつと考えられていた。しかし、血管新生を伴わずに網脈絡膜の萎縮が生じる Dry AMD についてはその関与が不明であった。今回、生体の RPE に近い極性 RPE を用いることで TNF- α が極性 RPE の VEGF を減少させることが初めて分かった。正常な RPE が TNF- α に暴露すると脈絡膜の栄養に必要な VEGF が減少し、脈絡膜の萎縮が生じると考えられ、炎症性サイトカインが Wet AMD だけでなく、Dry AMD にも深く関与していることが考えられた。