

# 主論文

Suppressive effect of AMP-activated protein kinase on the epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelial cells

(網膜色素上皮細胞の上皮間葉転換に対する AMP 活性化プロテインキナーゼの抑制効果)

## [緒言]

増殖硝子体網膜症は、裂孔原性網膜剥離手術や眼外傷に続発する疾患であり、眼内に増殖膜が形成され、その収縮により難治な牽引性網膜剥離を来すことを特徴とする。網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium; RPE) 細胞はその増殖膜の主要な構成成分の一つであり、その遊走および異常な増殖が疾患の病態に関与する。

上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) は上皮細胞が間葉細胞の性質を獲得する過程である。胚発生などの生理的過程のみでなく、悪性腫瘍の転移や臓器の線維化などの病的状態にも関わる。EMT は増殖硝子体網膜症にも関わりとされ、RPE 細胞が EMT を経て  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) を豊富に発現する筋線維芽細胞となり、牽引力を持った増殖膜を形成する。故に、RPE 細胞の EMT 抑制が増殖硝子体網膜症の治療の標的の一つと考えられている。

AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMP-activated protein kinase; AMPK) は 1 つの触媒サブユニット ( $\alpha$ ) と 2 種類の調節サブユニット ( $\beta$  及び  $\gamma$ ) からなるプロテインキナーゼで、真核細胞における主要なエネルギーセンサーである。AMP が  $\gamma$  サブユニット上の Bateman ドメインに結合すると、 $\alpha$  サブユニット上のスレオニン残基 (Thr172) のリン酸化などを介して AMPK の活性化が引き起こされる。その結果、グルコースや脂質の代謝を介したエネルギー産生が亢進する一方、同化過程が抑制される。この機能とは別に、尿細管上皮細胞、乳癌細胞、肺腺癌細胞、気管支上皮細胞などの種々の細胞において、AMPK 活性化による EMT 抑制効果が報告されている。しかしながら、RPE 細胞における AMPK の影響に関してはこれまで報告がない。

今回、我々は AMPK 活性化が RPE 細胞の EMT に及ぼす影響につき検討した。

## [材料と方法]

### 細胞培養

培養ヒト RPE 株 ARPE-19 細胞 (American Type Culture Collection 社) を、10% 牛胎児血清を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium-nutrient mixture F-12 HAM (Sigma 社) で 37°C、5% CO<sub>2</sub> で継代培養した。

ARPE-19 細胞を腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor; TNF)- $\alpha$  及び形質転換増殖因子

(transforming growth factor; TGF)- $\beta_2$  の存在下に 48-72 時間培養すると、細胞形態が紡錘形に伸長し、遊走して重層化した細胞集塊を形成するとの既報があり、これを EMT 関連線維様集塊と名付けている。この現象を誘導し、in vitro における EMT モデルとして使用した。

#### 酵素結合免疫吸着アッセイ(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)

培地中の matrix metalloproteinase (MMP)-2 及び MMP-9、interleukin (IL)-6、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) を quantitative ELISA kit (R&D Systems 社) を用いて定量した。実験手法は販売会社のプロトコルに従った。

#### ウェスタンブロット

定型的な方法で行った。端的には、培養細胞の溶解液を作成し、10%ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲルで電気泳動後 polyvinylidene difluoride 膜に転写した。ブロッキング処理後に一次抗体反応、二次抗体反応を行い、発色法でバンドを検出した。得られたバンドは ImageJ software (National Institutes of Health) により解析した。

#### 免疫染色

ARPE-19 細胞を 8 ウェルチャンバースライドで培養し、各種刺激を加えた。4%パラホルムアルデヒドで固定、0.1% Triton X-100 で透過処理後、1%ウシ血清アルブミンでブロッキングした。Fluorescein isothianate 標識抗  $\alpha$ -SMA 抗体 (Sigma 社) 溶液で一晩インキュベートし、細胞核は 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で染色した。Zeiss LSM 780 confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss 社) により観察した。

#### [結果]

##### TNF- $\alpha$ / TGF- $\beta_2$ 共刺激により ARPE-19 は細胞集塊を形成した

既報にある EMT 関連線維様集塊を誘導するため、各種濃度の TNF- $\alpha$  及び TGF- $\beta_2$  で ARPE-19 細胞を刺激した。結果、TNF- $\alpha$  または TGF- $\beta_2$  単独刺激では細胞集塊の形成は殆どみられなかったが、TNF- $\alpha$  及び TGF- $\beta_2$  のいずれも 5 ng/ml 以上で刺激すると、強い線維様集塊形成が観察され、顕微鏡一視野あたりの細胞集塊形成数は有意に増加した。

##### AICAR は細胞集塊形成を阻害した

AMPK 活性化による RPE 細胞の細胞集塊形成への効果を確認するため、AMPK 活性化剤である AICAR、及びその阻害剤を用いて実験を行った。その結果、TNF- $\alpha$  / TGF- $\beta_2$  共刺激の 1 時間前に 1 mM の AICAR を加えることにより、細胞集塊の誘導は有意に抑制された。AICAR の阻害剤である dipyrindamole 及び 5'-amino-5'-deoxyadenosin は、有意に

AICAR の抑制効果を打ち消した。

#### AICAR は EMT を抑制した

EMT 関連タンパクをウエスタンブロット法により定量評価した。結果、TNF- $\alpha$  / TGF- $\beta_2$  共刺激により E-cadherin の発現が低下し、AICAR はその発現低下はを有意に回復させた。また、fibronectin の発現は TNF- $\alpha$  / TGF- $\beta_2$  共刺激により有意に上昇し、その発現上昇は AICAR により抑制された。また、 $\alpha$ -SMA の免疫染色を行った結果、TNF- $\alpha$  / TGF- $\beta_2$  により ARPE-19 の  $\alpha$ -SMA は発現が上昇し、AICAR によりその発現は抑制された。

#### AICAR は MMP-2、MMP-9、IL-6、VEGF の発現上昇を抑制した。

TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、MMP-2、MMP-9、IL-6、VEGF などの様々な因子が増殖硝子体網膜症の病態に関わると報告されているため、培地中の MMP-2、MMP-9、IL-6、VEGF を ELISA 法で定量評価した。その結果、これらのいずれも TNF- $\alpha$  / TGF- $\beta_2$  により有意に発現上昇がみられ、その上昇は AICAR の前処置により抑制された。

#### AICAR は mitogen-activated protein kinase を抑制したが、Smad 経路を抑制しなかった。

TNF- $\alpha$  は様々な生理活性を持つ炎症促進サイトカインであり、その下流の経路の一つが mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路である。MAPK 経路は RPE 細胞の増殖、遊走に関与すると報告がある。また、TGF- $\beta$  は、主に Smad 経路を介して EMT や、眼科領域では増殖硝子体網膜症などの眼内線維性疾患に関わるとされる。そこで、AICAR の作用に関わるシグナル経路を探るため、MAPKs (ERK、JNK、p38) 及び Smad2/3 のリン酸化をウエスタンブロット法により定量評価した。結果、TNF- $\alpha$  / TGF- $\beta_2$  により ERK、JNK、p38 のいずれもリン酸化が促進され、AICAR はほぼ完全にこれらのリン酸化を抑制した。Smad2/3 も同様に TNF- $\alpha$  / TGF- $\beta_2$  共刺激によりリン酸化が促進されたが、これらは AICAR により抑制されなかった。

#### MAPKs 阻害により細胞集塊形成は抑制された。

MAPKs の RPE 細胞集塊形成との関連を調べるため、ERK 阻害薬 FR180204、JNK 阻害薬 SP600125、p38 阻害薬 SB203580 を用いて実験を行った。TNF- $\alpha$  / TGF- $\beta_2$  共刺激の 1 時間前に各阻害薬を培地に加えると、ARPE-19 細胞の集塊形成は、濃度依存性に有意に抑制された。

#### AICAR は mammalian target of rapamycin 経路を抑制した。

Mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路は細胞増殖の重要な調節機構であるとされる。AMPK 活性化が mTOR 経路を阻害することは既に知られた事実であるので、RPE 細胞

においても AICAR による mTOR 経路の抑制効果があるか、評価実験を行った。その結果、TNF- $\alpha$  / TGF- $\beta_2$  により Raptor や TSC2 の脱リン酸化を介して mTOR のリン酸化が促進され、その下流の 4E-BP1 や p70S6K のリン酸化が引き起こされた。AICAR は有意にこれらの変化を抑制した。

#### [考察]

今回、TNF- $\alpha$  / TGF- $\beta_2$  により誘導される EMT 関連細胞集塊の形成が、AICAR により抑制されることを示した。一般に EMT においては、E-cadherin の発現低下により細胞間の接着が減弱し極性を失い、細胞骨格を成すアクチンの再構築によって細胞は伸長し運動性が増加する。また、fibronectin などの細胞外マトリクスのリモデリングが亢進する。今回の実験では、TNF- $\alpha$  / TGF- $\beta_2$  による MAPK や Smad 系の活性化を介して ARPE-19 に EMT が誘導され、前述の変化が起きたと考えられた。

AICAR は細胞内に取り込まれた後にアデノシンキナーゼによりリン酸化されて ZMP に変換され、これが AMPK を活性化する。AICAR の細胞内への取り込みを阻害する dipyrindamole はほぼ完全に AICAR の抑制効果を阻害し、ZMP への変換を阻害する 5'-amino-5'-deoxyadenosin は約 50%阻害した。即ち、AICAR は少なくとも部分的には AMPK 活性化を介して、RPE の EMT を抑制すると考えられる。更に、AICAR による AMPK の活性化により mTOR 経路を抑制し、細胞増殖を抑えることも、細胞集塊形成抑制に重要であると推察される。

また、MMP-2、MMP-9、IL-6、VEGF についても AICAR の抑制作用がみられた。特に、MMP-9 は TNF- $\alpha$  / TGF- $\beta_2$  により顕著に発現が上昇し、AICAR によりほぼ完全に抑制されたことから、今回の病態モデルおよび AICAR の抑制効果に関して重要な因子である可能性がある。

TNF- $\alpha$  / TGF- $\beta_2$  により MAPKs 及び Smad2/3 のリン酸化が起きた。AICAR は MAPKs の抑制作用を示した。また、ERK、JNK、p38 の阻害剤によって ARPE-19 細胞の集塊形成は抑制された。即ち、ERK、JNK、p38 のいずれもが EMT 関連細胞集塊形成に重要であると考えられ、AICAR の抑制作用においてもこれらの抑制効果が重要であることが示唆される。一方で、Smad 系は TGF- $\beta$  を介する EMT の中心的役割を果たすとの報告があるにもかかわらず、今回の実験では AICAR は Smad2/3 は抑制しなかった。これを説明する理由として、Smad2/3 のリン酸化部位の違いが考え得る。TGF- $\beta$  は Smad2/3 の C 末端をリン酸化することで活性化するとされるが、MAPKs が Smad2/3 の middle linker region をリン酸化するとの報告がある。今回の実験では Smad2/3 の C 末端のリン酸化を検出する抗体を使用した。従って、RPE の細胞集塊形成には MAPKs による Smad2/3 の middle linker region のリン酸化が必要で、AICAR はこれを抑制している可能性が考えられた。

[結論]

TNF- $\alpha$ /TGF- $\beta_2$  共刺激により誘導される RPE 細胞の EMT 関連細胞集塊の形成が、AICAR による AMPK 活性化により抑制された。増殖硝子体網膜症など、RPE の EMT が主たる病態である疾患に関して、AICAR が新たな治療薬または予防薬の候補となり得ることが期待される。