



MRP4 knockdown enhances migration, suppresses apoptosis, and produces aggregated morphology in human retinal vascular endothelial cells

田上, 瑞記

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5197

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005197>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	田上 瑞記
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 5197 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 23 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

MRP4 knockdown enhances migration, suppresses apoptosis, and produces aggregated morphology in human retinal vascular endothelial cells(ヒト網膜血管内皮細胞における MRP4 のノックダウンは細胞遊走の促進、アポトーシスの抑制、細胞凝集の増加をもたらす)

審 査 委 員

主 査	教 授	古瀬 幹夫
	教 授	松尾 雅文
	教 授	古森 孝英

学位論文の内容要旨

MRP4 knockdown enhances migration, suppresses apoptosis, and produces aggregated morphology in human retinal vascular endothelial cells

ヒト網膜血管内皮細胞における MRP4 のノックダウンは
細胞遊走の促進、アポトーシスの抑制、細胞凝集の増加をもたらす

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
眼科学
(指導教員：根木昭教授)

田 上 瑞 記

学位論文内容要旨

[緒言]

ATP-Binding cassette(ABC)トランスポーターは主として能動輸送を担う膜タンパク質である。脳血液関門においては P-glycoprotein(P-gp)/Abca1, Mrp4/Abcc4, Bcrp/Abcg2 が発現しており、異物排泄作用を通じて組織保護に寄与している。一方、網膜血液関門における ABC トランスポーターの発現については正常生体血管でのみ調べられており、臨床的に重要な網膜血管新生における役割は検討されていなかった。中でも、病的な網膜血管新生は糖尿病網膜症、未熟児網膜症など視機能を脅かす重篤な疾患の主因となるものであり、それらに対する ABC トランスポーターの発現の変化は今後の網膜疾患の薬物治療のターゲットとして非常に重要なものであると考えられる。

我々は過去に、免疫組織化学染色において脳血液関門と同様に上記 3 種類、P-glycoprotein(P-gp)/Abca1, Mrp4/Abcc4, Bcrp/Abcg2 が発現している事を示した。また、それらの病的新生血管における発現の変化について、酸素誘発網膜症の手法を用いて網膜病的新生血管を作成しその発現を調査したところ、 Mrp4/Abcc4 に関して正常網膜血管での発現と比較し明らかに病的新生血管における発現の減弱が認められた。本研究では、培養ヒト網膜血管内皮細胞(Human Retinal Endothelial Cells:HRECs)を用いて MRP4 の血管新生における役割について調べることを目的とした。

[方法]

HRECs に対して、vascular endothelial growth factor (VEGF)を濃度(0,0.1,1,2nM)を振り分けて刺激しその mRNA 及びタンパク発現の変化を、Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)及びウエスタンブロット法を用いて調査した。次に、siRNA 法を用いた遺伝子のノックダウンを行い、loss of function 実験を行った。まず初めに、MRP4 siRNA もしくは control siRNA をリポフェクタミンを用いてトランスフェクションを行いそのノックダウン効率を調査した。その後トランスフェクションを行った細胞において、5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU)測定を用いた細胞増殖アッセイ、transwell chamber assay における細胞遊走アッセイ、マトリゲルを用いた tube-formation assay、血清除去によるアポトーシス誘導下での cleaved-caspase3 による免疫染色を行った。また、ノックダウン後の細胞間接着能について VE-Cadherin を用いた免疫染色により評価した。

[結果]

HRECs に対する VEGF 刺激実験の結果として、刺激開始後 6 時間では MRP4 の発現は RT-PCR において有意な変化を認めなかったが、刺激開始後 24 時間時点においてはその発現が減少を見せた。尚、24 時間時点ではウエスタンブロット法においてタンパク質レベルでも MRP4 の発現減少を認めた。次に siRNA を用いて MRP4 の遺伝子ノックダウン実験を行った。トランスフェクション後 24 時間における MRP4 ノックダウン効率は、コントロールと比して 84%の遺伝子ノック

ダウンを得た。尚、タンパク質レベルにおいても 48 時間、72 時間の双方で MRP4 の発現減少を確認し得た。

MRP4 ノックダウンを行った HRECs において、細胞増殖能については有意な変化が認められなかったが、細胞遊走は有意に増加し、cleaved-caspase3 陽性細胞は著明に減少していた。tube-formation assay における tube like structure の総長については有意な変化はなかったが、MRP4 ノックダウン細胞では強い細胞の凝集像が観察された。また、細胞凝集時における VE-Cadherin の発現はコントロールと比して変化はなかった。

[考察]

今回の報告では、まず VEGF 濃度依存性に MRP4 の発現減少が起こる事を同定した。これは我々の既報において、酸素誘発網膜症における病的新生血管で MRP4 の発現が低下する知見と一致している。なぜならば、病的新生血管は低酸素刺激が刺激となり VEGF が up regulate するによって発生するものであり、VEGF の濃度が高い新生血管部で MRP4 の発現が低下しているからである。

血管新生において血管内皮細胞の増殖と遊走は重要なステップである。ヒト冠動脈平滑筋細胞やヒト樹状細胞においては MRP4 の阻害はむしろ血管新生を抑制する作用を示すが、血管内皮細胞におけるその役割は知られていない。今回の我々の知見においては、MRP4 ノックダウンは細胞増殖は大きな変化を認めなかったが、一方で細胞遊走能の有意な増加を示した。しかしながら、その詳細なメカニズムについては不明である。それらの現象のメカニズムに対する我々の仮説は、cAMP と Prostaglandins E2 の関与である。MRP4 は cAMP と Prostaglandins E2 の細胞内から細胞外の能動排泄も司っており、MRP4 ノックダウンを行うことで細胞内外の cAMP や Prostaglandins E2 の濃度変化が起こり、細胞増殖能や細胞遊走能に影響を与えている。既報においても、Prostaglandins E2 の上昇は血管内皮細胞の増殖、遊走ともに促進すると報告されており、cAMP に関してもその上昇が血管内皮細胞の遊走と関連すると報告されている。

また、in vitro の実験系においては tube-formation assay も血管新生能を評価する指標であるが、今回の我々の検討では tube like structure の総長には有意な変化を認めなかった。しかしながら予期しない事に、tube-formation assay においてマトリゲル上の血管内皮細胞は、明らかにコントロール群と比較して強い凝集を見せた。これらはアポトーシスの減少と細胞遊走能の増加が主因と考えられたが、細胞内 cAMP の増加により細胞間接着能が VE-Cadherin を介した機序によって増加するという既報もあり、我々も VE-Cadherin の免疫染色をノックダウン群とコントロール群において比較したが明らかな差は認められなかった。

[結論]

今回の検討では、血管新生における MRP4 の興味深い役割を報告した。

中でも VEGF 依存性に MRP4 の発現が低下すること、MRP4 ノックダウンによって血管内皮細胞の遊走能、アポトーシス抵抗性が増す事が判明し、MRP4 は血管新生に抑制的な役

割を示す事が考えられた。これらの結果より MRP4 は網膜血管疾患において今後更なる検討を行う必要がある。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2164号	氏 名	田上 瑞記
論文題目 Title of Dissertation	MRP4 knockdown enhances migration, suppresses apoptosis, and produces aggregated morphology in human retinal vascular endothelial cells ヒト網膜血管内皮細胞における MRP4 のノックダウンは細胞遊走の促進、アポトーシスの抑制、細胞凝集の増加をもたらす		
審査委員 Examiner	主 査 古瀬 幹夫 Chief Examiner 副 査 古 森 孝 英 Vice-examiner 副 査 松 尾 雅 文 Vice-examiner		

（要旨は1, 000字～2, 000字程度）

ATP-Binding cassette(ABC)トランスポータースーパーファミリーは ATP 依存的能動輸送を担うトランスポーターであり、様々な基質の細胞膜透過に関わっている。Multidrug resistance protein 4 (MRP4, ABCC4)は ABCC サブファミリーに属し、内因性分子、生理物質、薬剤などの細胞外排泄を介して各組織の保護に働いている。正常の齧歯類の網膜においては、MRP4 の mRNA およびタンパク質は血管内皮細胞に特異的に発現しているが、血管形成におけるその役割はほとんど明らかでない。本研究では網膜血管内皮細胞の血管形成に関わる様々な性質における MRP4 の役割を調べるため、培養ヒト網膜血管内皮細胞(HREC)において siRNA による MRP4 の発現抑制（ノックダウン）を行い、その影響を解析した。

まず、外因性の血管内皮増殖因子(VEGF)刺激によって HREC における MRP4 の発現が VEGF 濃度依存的に減少することが明らかになった。2 nM の VEGF 刺激では、刺激なしと比較して 51% の mRNA 量減少を示し、この減少は統計学的に有意であった($P = 0.030$)。次に HREC において siRNA を用いた MRP4 のノックダウンを行ったところ、MRP4 ノックダウン細胞では、定量的リアルタイム PCR 法によりコントロールと比較して 84% の mRNA 減少が確認され、ウェスタンブロットにより MRP4 タンパク質の発現も十分に減少していることが確認された。そこで、この MRP4 ノックダウン HREC とコントロールの HREC について、血管形成に関わる細胞の性質として細胞増殖、細胞遊走、チューブ形成、血清除去によるアポトーシス誘導への応答を調べるアッセイを行い、MRP4 の発現抑制が及ぼす影響について解析した。細胞増殖アッセイでは、MRP4 ノックダウン細胞とコントロール細胞で同等であった($P = 0.320$)。遊走アッセイでは、MRP4 ノックダウン細胞はコントロール細胞に対して 31% の遊走増加を示した($P = 0.048$)。アポトーシスについては、MRP4 ノックダウン細胞ではコントロールと比較して、血清除去後 12 時間では 54% ($P < 0.001$)、24 時間では 27% ($P = 0.004$)、と cleaved-caspase3 陽性細胞は有意に減少していた。チューブ形成アッセイでは、MRP4 ノックダウン細胞は集簇してチューブに沿った異常凝集形態を呈した。以上の結果から、HREC において外因性の VEGF 刺激が MRP4 の発現を抑制すること、HREC における MRP4 ノックダウンは細胞の増殖には影響しないが、遊走を促進し、アポトーシスを抑制し、細胞凝集をもたらすことが明らかになった。

本研究において、MRP4 ノックダウンは網膜血管内皮細胞の遊走を促進する一方で増殖には変化を及ぼさなかったが、この結果は、細胞内 cAMP レベルの上昇によることが推察される。cAMP の細胞外輸送は MRP4 を介しており、*mrp4*^{-/-}細胞では著明な細胞内 cAMP レベルの上昇が認められ、cAMP の上昇は細胞の増殖・遊走に関連するという報告がある。cAMP が caspase-3 の活性化やアポトーシスを妨げることも知られていることから、アポトーシスの減少もまた同様に細胞内 cAMP レベルの上昇で説明可能である。

本研究は ABC トランスポーターについて、その網膜血管内皮細胞における役割を研究したものであるが、従来ほとんど知られていなかった MRP4 の網膜血管内皮細胞における役割について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。