

学位論文（博士）

HIF-1 α -dependent regulation of angiogenic factor expression
in Müller cells by mechanical stimulation

（機械的刺激下でのミュラー細胞の HIF-1 α 依存的な
血管新生因子発現の研究）

氏名 緒方 惟彦

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 眼科学講座

令和 6 年 11 月

目 次

1. 要旨	2
2. 研究の背景	3
3. 目的	3
4. 方法	4
1) 方法	4
2) 解析	6
5. 結果	6
6. 考察	7
7. 結語	9
8. 謝辞	9
9. 参考文献	9
10. 図	15

1. 要旨

機械的刺激は、細胞、組織、器官における様々な生物学的プロセスを制御するとともに、様々な疾患の発症に寄与する。網膜は、眼圧、網膜出血、浮腫等によって機械的刺激を受けている。機械的刺激に対する反応は網膜の網膜色素上皮細胞およびミュラー細胞で研究されている。前者の細胞は、網膜における生理的および病理的な血管新生に重要な役割を果たす血管内皮増殖因子(VEGF)の発現が機械的刺激下で増加することが明らかになっている。今回、我々はヒトミュラー細胞における血管新生因子の発現に対する機械的刺激の影響を調査した。I型コラーゲンでコーティングしたチャンバーでミュラー細胞を培養し、それらに周期的伸展刺激を加えたところ、mRNA レベルおよび蛋白質レベルで VEGF および低酸素誘導因子-1 α (HIF-1 α)の発現が増加した。さらに、mRNA レベルでアンジオポエチン 1(ANG1)の発現が減少した。前者の VEGF の発現は HIF-1 α 阻害剤である CAY10585 により阻害された。そして、RNA シークエンス(RNA-seq)により、血管新生関連経路の遺伝子発現が伸展刺激下のミュラー細胞において上昇することが示された。以上の結果から、機械的刺激が HIF-1 α に依存してミュラー細胞で VEGF 産生を誘導する可能性が示された。これは、HIF-1 α が糖尿病網膜症、加齢黄斑変性、網膜静脈閉塞症などの疾患の潜在的な治療ターゲットであることを示唆している。

2. 研究の背景

ミュラー細胞は網膜の主要なグリア細胞であり、他の網膜を構成する細胞の機能的および構造的安定性を維持する役割を担っている[1, 2]。ミュラー細胞は網膜血管周皮細胞やアストロサイトとともに、血液網膜関門の形成および血管内皮細胞の透過性調節に関与する[3-5]。ミュラー細胞は伸展刺激に感受性が高く、 Ca_2^+ などの因子の取り込みの増加や c-Fos などの転写調節因子の活性化を通じて、他の網膜を構成する細胞の生存に関与する[6]。

機械的刺激は、細胞の移動や代謝、炎症や血管新生などの多くの生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たす[7-10]。機械的刺激に対する反応は多様な細胞で研究されており、Yap や Src などの機械センサーおよびシグナル伝達蛋白質によって媒介される[11-14]。

網膜色素上皮細胞を含む眼の細胞で、機械的刺激により VEGF の発現増加することが分かっている[15, 16]。糖尿病網膜症における網膜出血や網膜浮腫、増殖組織による牽引などの網膜への機械的刺激は、網膜を構成する視細胞やミュラー細胞を含む細胞の生存に影響を与える可能性がある。これらの刺激は、ミュラー細胞による過剰な VEGF 依存性血管新生を誘発する[17-19]。各細胞で VEGF 発現を制御する分子機構は異なる。例として、血管内皮細胞では Yap と一過性受容体電位 (TRP) イオンチャネルファミリーが、網膜色素上皮細胞では転写因子の HIF-1 α がそれぞれ関与している[20-23]。後者の HIF-1 α は、機械的刺激が加わった骨格筋において血管新生の誘導に関与しており[24]、VEGF-A 遺伝子のプロモーター領域に直接結合することが分かっている[25]。これらの報告は、ミュラー細胞を含む網膜を構成する細胞において機械的刺激が血管新生因子の発現に関与していることを示唆している。しかしながら、これまでに、ミュラー細胞における機械的刺激の影響は十分に検討されていない。

我々は今回、機械的刺激を受けたミュラー細胞の遺伝子発現を測定したところ、血管新生因子の VEGF の発現増加および ANG1 の発現減弱が生じることを発見した。さらに、機械的刺激下のミュラー細胞での、これらの遺伝子発現には、HIF-1 α が関与することが分かった。この結果は、HIF-1 α が機械的刺激を生じる網膜疾患の潜在的な治療標的であることを示唆している。

3. 目的

糖尿病網膜症、加齢黄斑変性、網膜静脈閉塞症において、ミュラー細胞は網膜浮腫や出血、増殖組織の牽引などによって機械的刺激が加わっており、網膜における新生血管や血管リモデリングを誘導する可能性がある。本研究は、ミュラー細胞における機械的刺激による血管新生因子発現と経路を調査することを目的とし、*in vitro* のモデルであるストレッチアッセイを用いて検討した。

4. 方法

1) 方法

細胞培養

ヒトミューラー細胞株(MIO-M1)は、兼子裕規博士(名古屋大学, 愛知県)のご厚意により提供された。細胞は 10 cm のシャーレに播種され, 10%ウシ胎児血清(Gibco), 1%抗生物質・抗真菌剤(Gibco)および 2mM L-グルタミン(Gibco)を添加したダルベッコ改変イーグル培地(D6429, Sigma-Aldrich)で 37°C, 5% CO₂ 下でコンフルエントに達するまで培養した。

ストレッチアッセイ

MIO-M1 細胞を, I 型コラーゲン(IAC-50, Koken)でコーティングされたフレキシブルシリコンチャンバー(SC-0044 または SC-0040, Strex)に播種し, コンフルエントに達するまで培養した。HIF-1 α 阻害剤である CAY10585(Abcam)を添加した培養培地に細胞を暴露する場合は, 事前に細胞をリン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄を行った。CAY10585 は, 10 μ M で培養細胞における HIF-1 α の蓄積を阻害し, HIF-1 α 標的遺伝子の発現を著しく抑制する[23, 26]。CAY10585 への曝露を継続しながら, 伸展装置(STB-1400, Strex)を使用して最大 24 時間の周期的な伸展を行った。伸展刺激は, 伸長率 0~10%, 周波数 0.5 Hz で行われた。すべての実験は, 37°C, 5% CO₂ 下で 3 回以上繰り返され, 同様の結果が得られた。

ウェスタンブロッティング

培養および伸展刺激を加えた MIO-M1 細胞を, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, 100mM NaF, 100 μ M Na₃VO₄, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 0.25% SDS, 0.25% C₂₄H₃₉NaO₄, 1% Nonidet P-40 およびプロテアーゼ阻害剤カクテル(Nacalai Tesque)を含む溶液で溶解した。溶解物を 11,000 $\times$ g, 4°C で 10 分間遠心分離し, 得られた上清の蛋白質濃度を Pierce BCA 蛋白質アッセイキット(23227, Thermo Fisher Scientific)で測定した。蛋白質サンプルを 5-20% e-PAGE ゲル(Atto)にロードし, 20mA で 80 分間, SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画し, 分離した蛋白質を 0.45 μ m セルロース硝酸膜 (Cytiva)に転写した。メンブレンを, 5%スキムミルクを添加した 0.1% Tween-20 を含むトリス緩衝生理食塩水(TBS-T)中で, 4°Cで一晩振盪してブロッキングを行った。そして, 1 次抗体である, 抗 HIF-1 α ウサギポリクローナル抗体(ab51608, Abcam)または抗 β -チューブリンマウスモノクローナル抗体(TG074, Sigma-Aldrich)を加え, 4°Cで一晩振盪した。メンブレンを TBS-T で洗浄後, ウサギ(NA9340U, Sigma-Aldrich)またはマウス(NA9310V, Sigma-Aldrich) ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識二次抗体を加えて室温で 1 時間振盪し, 発光検出試薬(Chemi-Lumi One Super, Nacalai Tesque または PRN2235, Cytiva)に反応させ, ChemiDoc Imaging System(Bio-Rad)で画像化した。カラー画像はグレースケールに変換され, バックグラウンドが差し引かれ, Image J ソフトウェアを使用して蛋白質バンドの積分密度が測定された。HIF-1 α のデータは β -チューブリンのもので正規化され, 未処理細胞の対応する値に対して相対的に表された。

酵素免疫測定法(ELISA)

MIO-M1 細胞の培養培地の上清で、ヒト VEGF 用 ELISA(DVE00, R&D System)を用いて、VEGF を測定した。吸光度は、Multiskan FC マイクロプレートリーダーと Manager ソフトウェア(Thermo Fisher Scientific)を使用して測定した。VEGF 濃度は、VEGF 標準との比較によって決定した。

定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR)

MIO-M1 細胞から Sepasol RNA I Super G(09379-55、Nacalai Tesque)を使用して全 RNA を抽出した。抽出した RNA の 260/280 nm 吸光度比を NanoDrop Lite 分光光度計(Thermo Fisher Scientific)で測定し、すべてのサンプルが 1.8~2.0 で、十分な品質であることを確認した。RNA を、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(FSQ-301, Toyobo)を用いて逆転写し、cDNA を生成した。生成した cDNA を Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix(Q712-02、Vazyme Biotech)および StepOnePlus 機器(Thermo Fisher Scientific)を用いた定量ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)分析により増幅した。qPCR のフォワードプライマーおよびリバースプライマーはそれぞれ、VEGF-A(*hVEGF-A*, 1958402) は 5'-GCAGAATCATCACGAAGTGGT-3'または 5'-ACCAACGTACACGCTCCAG-3', ANG1(*hANG1*, 1669549)は 5'-AGCGCCGAAGTCCAGAAAC-3'または 5'-TACTCTCACGACAGTTGCCAT-3', PIGF(*hPIGF*, 1997001) は 5'-TGACATGGTTGTGCATCTGTT-3' または 5'-ACTCTATCAGTGGTGCTCCATAC-3', HIF-1 α (*hHIF1 α* , 1718012) は 5'-GAACGTCGAAAAGAAAAGTCTCG-3' または 5'-CCTTATCAAGATGCGAACTCACA-3', GAPDH(*hGAPDH*, 1955533) は 5'-CTGGGCTACACTGAGCACC-3' または 5'-AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'を用いた。VEGF-A, ANG1, PIGF および HIF-1 α の mRNA 量は、比較 CT 法によって計算し、対応するグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)mRNA 量で正規化した。

RNA シークエンス(RNA-seq)

Maxwell RSC Simply RNA Cell Kit(AS1390、Promega)を使用して細胞から全 RNA を抽出し、NanoDrop One 機器(Thermo Fisher Scientific)で濃度を測定し、Tapestation 4200 High Sensitivity RNA デバイス(#5067-5579、Agilent Technologies)で RINe (RNA Integrity Number 相当値)値を測定して純度を確認した。次に、製造元の指示に従って、NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina(E7770、New England BioLabs)を使用して RNA-seq ライブラリを準備した。簡単に説明すると、長さが約 200nt の RNA フラグメントを生成し、次に二本鎖 cDNA を合成して末端修復した。アダプターライゲーション産物は AMPure XP で精製し、c1000 Touch Thermal Cycler(Bio-Rad)を使用して PCR で増幅した。NEBNext Multiplex Oligos for Illumina(E6446、New England BioLabs)をバーコード配列として追加し、得られた産物を再度 AMPure XP で精製した。調製した各ライブラリの濃度は Qubit 2.0 Fluorometer(Thermo Fisher Scientific)を使用して測定し、サイズ分布は Tapestation 4200 D1000 デバイス(#5067-5582、Agilent Technologies)を使用して決定した。50 bp の cDNA 領域とインデックス配列は NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit V1.5(20028317、Illumina)を使用してシーケンスし、CLC Genomics

Workbench(GWB)22.0.1(Qiagen)を使用してデータ解析を行った。Illumina NovaSeq 6000 からの出力 BCL ファイルは、bcl2fastq v2.20.0.402 ツールを使用して fastq ファイルに変換された。fastq ファイルは GWB にインポートされ、GWB の Trim reads 2.6 ツールを使用して読み取りがトリミングされた。パラメータ設定は、3'末端の 1 bp を削除することを除いてデフォルトに設定された。トリミングされた読み取りは参照配列にマッピングされ、GWB の RNA-Seq Analysis 2.6 ツールを使用してタグカウントされた。パラメータ設定については、参照配列は別途設定され、発現値は TPM に設定され、ペアリードを 2 つとしてカウントは Yes に設定され、その他の設定はデフォルトであった。Human GRCh37(hg19) release-75 は、GWB 機能を使用して Ensembl からダウンロードされ、参照配列として、およびゲノム注釈に使用された。すべての TPM 値は 1 ずつ増加し、log2 変換され、結果の値は JMP Pro 15 ソフトウェアを使用して主成分分析、階層的クラスター分析および相関分析にかけられた。差次的に発現した遺伝子の機能エンリッチメント分析は、Metascape を使用して実行された。有意にエンリッチされた GO(遺伝子オントロジー)または KEGG(京都遺伝子ゲノム百科事典)用語 ($P < 0.05$, 偽発見率 < 0.01) は、階層的クラスタリングにかけられ、遺伝子間のカップ統計的類似性に基づいてネットワーク マップが生成された。ツリーを用語クラスターに配置するためのしきい値として、カップスコア 0.3 を使用した。

2) 解析

平均+SEM として提示された定量データは、スチューデントの t 検定によりグループ間で比較され、P 値が 0.05 未満の場合、統計的に有意であると見なされる。

5. 結果

MIO-M1 細胞において伸展刺激は VEGF 発現を誘導する

ミューラー細胞は網膜の血管に隣接しているため、網膜浮腫や出血などの物理的刺激の影響を受けやすい[27]。本研究では、ミューラー細胞へ物理的刺激を加えることで血管新生を誘導する可能性を調査した。はじめに、MIO-M1 細胞に 12 時間または 24 時間の伸展刺激を加えて、RT-qPCR によって血管新生因子の発現を調査した。24 時間の伸展刺激を受けた MIO-M1 細胞では、VEGF-A mRNA の発現量が増加した(図 1a)。一方で、血管内皮細胞の安定化に寄与する ANG1 mRNA[28]の発現量は減少した(図 1a)。胎盤成長因子(PlGF)遺伝子の発現は、伸展刺激で変化しなかった(図 1a)。培養上清を ELISA したところ、24 時間の伸展刺激で MIO-M1 細胞からの VEGF 放出量が約 2 倍増加した(図 1b)。

MIO-M1 細胞において伸展刺激は HIF-1 α 発現を誘導する

VEGF-A 遺伝子の発現を制御する転写因子である HIF-1 α は、機械的刺激に反応することが分かっている[29]。本研究では、MIO-M1 細胞に伸展刺激を行い、HIF-1 α の mRNA および蛋白質の発現を RT-qPCR およびウェスタンブロッティングで調べた。24 時間の伸展刺激を受けた MIO-M1 細胞では、HIF-1 α mRNA の発現量が増加した(図 2a)。さらに、HIF-1 α 蛋白質の発現量も増加していることが明らかになった(図 2b)。

伸展刺激を受けた MIO-M1 細胞において HIF1- α 依存的に VEGF-A および ANG1 遺伝子発現が調節される

HIF-1 α の発現増加が MIO-M1 細胞において伸展刺激によって誘導される VEGF-A 遺伝子発現の増加に寄与するか調べるために、HIF-1 α 阻害剤 CAY10585 を投与して MIO-M1 細胞に伸展刺激を加え RT-qPCR で調査した。24 時間の伸展刺激によって MIO-M1 細胞で誘導される VEGF-A mRNA の発現量の増加は、CAY10585 によって抑制された(図 3)。一方で、ANG1 mRNA の発現量の減少も、CAY10585 によって抑制された(図 3)。PlGF mRNA の発現量は CAY10585 の有無にかかわらず伸展刺激の影響を受けなかった(図 3)。伸展刺激によって引き起こされる HIF-1 α mRNA の発現量の増加も薬剤によって抑制されることが確認できた(図 3)。

伸展刺激を受けた MIO-M1 細胞において HIF1- α 依存的に VEGF 放出が調節される

伸展刺激を受けた MIO-M1 細胞において、VEGF-A 遺伝子発現を誘導する HIF-1 α の役割が、蛋白質レベルでも明らかであるか調べるために、CAY10585 を投与して MIO-M1 細胞に伸展刺激を加え、ウェスタンブロッティングおよび ELISA で調べた。24 時間伸展刺激することによって MIO-M1 細胞で誘導される HIF-1 α 蛋白質の発現量の増加が、CAY10585 によって抑制された(図 4a)。次に、培養上清を ELISA したところ、24 時間の伸展刺激によって引き起こされる VEGF 放出量の増加も、CAY10585 によって抑制されることが明らかになった(図 4b)。

伸展刺激は MIO-M1 細胞における血管新生関連経路遺伝子の発現を増加する

最後に、24 時間伸展刺激を受けた MIO-M1 細胞と受けていない細胞の RNA-seq を行い、標的を絞った方法ではなく包括的に、このような刺激が遺伝子発現に与える影響を調査した。2 つの条件間で差次的に発現した遺伝子は、P 値 <0.05 を閾値として特定され、Metascape によって解析された。GO および KEGG 経路解析により、伸展刺激によって発現が増加した遺伝子の中で最も有意にエンリッチされた用語は、血管形態形成と走化性の調節であり(図 5a)、これらの用語は両方とも血管新生に関連していることが明らかになった。さらに、細胞外刺激への応答、ホルモンへの応答、DNA 結合転写因子活性の調節など、細胞外環境への応答に関連する用語が最も有意にエンリッチされた。エンリッチされた用語のネットワークマップも生成された(図 5b)。

6. 考察

我々は今回、*in vitro* で機械的刺激を模倣する伸展装置を用いて調査を行った。ヒトミューラー細胞において伸展刺激により、HIF-1 α の発現増加に依存して、血管新生促進因子である VEGF の発現が増加し、ANG1 の発現が阻害されることを発見した。さらに、機械的刺激を受けたミューラー細胞において血管新生関連経路に関与する遺伝子の発現を活性化することが RNA-seq により明らかになった。これらの結果は、伸展刺激を受けたミューラー細胞において EphA2 や Nrn1 などの他の血管新生因子が誘導されることを示した以前の研究結果と類似している[30]。低酸素下のミューラー細胞において HIF-1 α が VEGF 発現を活性化すること

が報告されている[31, 32]。本研究の結果は、機械的刺激を受けたミュラー細胞において HIF-1 α が VEGF の発現を誘導していることを示している。

HIF-1 α は、血管新生や解糖などの生物学的プロセスに関連するさまざまな遺伝子の発現を制御する転写因子で、低酸素状態によって発現が誘導される[33-35]。HIF-1 α は核内で HIF-1 β とヘテロ 2 量体を形成した状態で転写共役因子 p300/CBP に結合する[36]。この複合体は、VEGF や血小板由来増殖因子ファミリーのメンバーを含む標的遺伝子のプロモーター領域に存在する低酸素応答エレメント(HRE)に結合する[37]。血管内皮細胞において、せん断力は転写因子 NF- κ B 依存的な HIF-1 α の発現増加を生じる[38]。低酸素下では、様々な細胞型で NF- κ B の発現が誘導され、同様に HIF-1 α の発現増加を生じることが分かっている[39]。本研究では、伸展刺激によりミュラー細胞において VEGF 発現が増加し、この反応は HIF-1 α 依存的に生じており、HIF-1 α 阻害剤 CAY10585 によって抑制されることが示された。この結果は、VEGF 発現がミュラー細胞においても低酸素症や機械的刺激に反応して HIF-1 α によって先述と同様に制御されることを示唆している。伸展刺激によるミュラー細胞における VEGF および HIF-1 α 発現への影響は 24 時間後に初めて生じた。この結果は、慢性的な機械的刺激が加わることが網膜のミュラー細胞における異常な血管新生の誘導に必要である可能性を示唆している。

ANG1 は網膜の血管周皮細胞から主に分泌されており、生理的条件下では血管の安定化に寄与する[39-42]。そのため、ANG1 の発現が減少することにより網膜血管の不安定性をもたらす、網膜内および網膜下液の蓄積につながる可能性がある。本研究では、伸展刺激下のミュラー細胞において ANG1 遺伝子発現が減少し、この反応が CAY10585 によって抑制されていることから、HIF-1 α が ANG1 発現を負に制御することが示唆された。低酸素下の血管内皮細胞および急性脳梗塞後の脳組織において、HIF-1 α 発現増加による ANG1 の発現が低下する現象は以前に実証されている[43-45]。HIF-1 α は、逆 HRE (rHRE)に直接結合することで特定の遺伝子の転写抑制因子として機能する[46]。ヒト ANG1 遺伝子のプロモーター領域には、2 つの推定 HRE が含まれている[47]。低酸素下の網膜周皮細胞における ANG1 の発現増加は、これらの HRE および HIF-1 α ではなく HIF-2 α と関連していることが判明した[48]。HIF-1 α 発現および HIF-2 α 発現は、1 部の細胞タイプで相互に排他的であり、HIF-2 α の発現が抑制されると HIF-1 α の存在量が増加する[48]。したがって、伸展刺激下のミュラー細胞において、ANG1 遺伝子発現の低下は、HIF-2 α の枯渇も一部関与している可能性がある。実際に、伸展刺激に反応してミュラー細胞における HIF-2 α mRNA の存在量が大幅に減少することが RNA-seq データで明らかになった。

糖尿病性網膜症に加えて、AMD および網膜静脈閉塞症などの眼内で大量の VEGF が産生される疾患は、網膜の血管漏出、血管新生および炎症反応と関連している[49, 50]。ミュラー細胞は、糖尿病性網膜症に類似した増殖組織による網膜牽引および高血糖[51-54]、網膜静脈閉塞症に類似した低酸素 [55] に反応して VEGF を分泌する。よって、ミュラー細胞はこれらの疾患の治療において潜在的なターゲットとなりうる。

本研究の限界は、ミュラー細胞が生理的な配置でなく、ミュラー細胞への機械的刺激が水平方向のみであり、刺激が持続的ではなく断続的であったことなどが挙げられる。持続的な機械的刺激は、網膜色素上皮細胞を使用した他の研究で行われている[15, 23]。これらは、

網膜色素上皮細胞の下層に存在するドルーゼンによる持続的な物理的刺激をイメージして設定された。一方で、本研究で使用した、ミュラー細胞は、血管周皮細胞やアストロサイトとともに、血液網膜関門の形成に寄与していることから[1, 2]、周期的な機械的刺激をイメージして設定した。本研究は、生理学的条件下とは若干異なるが、機械的刺激下のミュラー細胞で、HIF-1 α がVEGFやANG1などの血管新生因子遺伝子の転写調節における重要なメディエーターとして関与していることを示唆している。CAY10585を含むHIF-1 α 阻害剤が標的遺伝子VEGFの発現を抑制することが報告されている[56]。さらに、いくつかのHIF-1 α 阻害剤はVEGF以外の血管関連因子にも関与している。例えば、CAY10585はエリスロポエチンの発現を抑制[26]、ビトレキシンはFOXO3aを活性化[57]、クリシンは可溶性インターロイキン-6受容体の発現を抑制[58]することで血管新生を抑制することがわかっている。また、今回、新たにCAY10585が機械的刺激下で低下するANG1の発現改善にも関与していることが分かった。このように、一部のHIF-1 α 阻害剤はVEGF以外の血管新生因子に関与することが判明してきており、糖尿病網膜症、加齢黄斑変性、網膜静脈閉塞症などの疾患治療への潜在的なアプローチとしてさらなる検討が必要と考えられる。

7. 結語

本研究では、ミュラー細胞において伸展刺激は、HIF-1 α を介して血管新生因子発現を促すことを示した。今後さらなる検討が必要ではあるが、HIF-1 α 阻害剤は糖尿病網膜症、加齢黄斑変性、網膜静脈閉塞症等の網膜疾患において、治療標的となる可能性が示された。

8. 謝辞

本研究にあたって、指導教官としてご指導を頂いた山口大学大学院医学系研究科眼科学講座教授 木村和博先生、同講座助教 芦森温茂先生、実験にご協力頂いた同講座技術補佐員 水野由香里氏、片岡彩加氏に対して、ここに深謝の意を表する。

9. 参考文献

- 1 Heier, J.S., Brown, D.M., Chong, V., Korobelnik, J.F., Kaiser, P.K., Nguyen, Q.D., Kirchhof, B., Ho, A., Ogura, Y., Yancopoulos, G.D., Stahl, N., Vitti, R., Berliner, A.J., Soo, Y., Anderesi, M., Groetzbach, G., Sommerauer, B., Sandbrink, R., Simader, C., Schmidt-Erfurth, U., 2012. Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 119, 2537–2548. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.09.006>
- 2 Hong, H.K., Park, Y.J., Kim, D.K., Ryoo, N.K., Ko, Y.J., Park, K.H., Kim, H.M., Woo, S.J., 2020. Preclinical efficacy and safety of VEGF-Grab, a novel Anti-VEGF drug, and its comparison to aflibercept. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 61, 1–9. <https://doi.org/10.1167/IOVS.61.13.22>
- 3 Bergh, H. van den, 2001. Photodynamic therapy of age-related macular degeneration History and principles. *Semin Ophthalmol.* 16, 181–200.
- 4 Kaiser, P., 2007. Verteporfin photodynamic therapy and anti-angiogenic drugs potential for combination therapy in exudative age-related macular degeneration. *Curr Med Res Opin.* 23,

477–87.

- 5 Parmeggiani, F., Gallenga, C.E., Costagliola, C., Semeraro, F., Romano, M.R., Dell’Omo, R., Russo, A., De Nadai, K., Gemmati, D., D’Angelo, S., Bolletta, E., Sorrentino, F.S., 2019. Impact of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on the efficacy of photodynamic therapy in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Sci Rep* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38919-7>
- 6 Wu, S., Lu, Q., Wang, N., Zhang, J., Liu, Q., Gao, M., Chen, J., Liu, W., Xu, L., 2017. Cyclic stretch induced-retinal pigment epithelial cell apoptosis and cytokine changes. *BMC Ophthalmol* 17. <https://doi.org/10.1186/s12886-017-0606-0>
- 7 Bissell, M., Glennhall, H., 1982. How Does the Extracellular Matrix Direct Gene Expression? *J. theor. Biol* 99, 31–68.
- 8 Ingber, D.E., Madrit, J.A., Jamieson, J.D., 1981. Role of basal lamina in neoplastic disorganization of tissue architecture (basement membrane/epithelial cell polarity/cell shape/immunofluorescence). *Medical Sciences* 78, 3901–3905.
- 9 Ingber, D.E., Wang, N., Stamenović, D., 2014. Tensegrity, cellular biophysics, and the mechanics of living systems. *Reports on Progress in Physics* 77.
- 10 Wang, N., 2017. Review of Cellular Mechanotransduction. *HHS Author Manuscripts* 50, 233002.
- 11 Elosegui-Artola, A., Andreu, I., Beedle, A.E.M., Lezamiz, A., Uroz, M., Kosmalska, A.J., Oria, R., Kechagia, J.Z., Rico-Lastres, P., Le Roux, A.L., Shanahan, C.M., Trepac, X., Navajas, D., Garcia-Manyes, S., Roca-Cusachs, P., 2017. Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell* 171, 1397-1410.e14.
- 12 Ge, J., Li, W., Zhao, Q., Li, N., Chen, M., Zhi, P., Li, R., Gao, N., Xiao, B., Yang, M., 2015. Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel. *Nature* 527, 64–69.
- 13 McMurray, R.J., Dalby, M.J., Tsimbouri, P.M., 2015. Using biomaterials to study stem cell mechanotransduction, growth and differentiation. *J Tissue Eng Regen Med* 9, 528–539.
- 14 Tamada, M., Sheetz, M.P., Sawada, Y., 2004. Activation of a Signaling Cascade by Cytoskeleton Stretch. *Dev Cell* 7, 709–718.
- 15 Farjood, F., Ahmadpour, A., Ostvar, S., Vargis, E., 2020. Acute mechanical stress in primary porcine RPE cells induces angiogenic factor expression and in vitro angiogenesis. *J Biol Eng* 14.
- 16 Yehoshua, Z., Wang, F., Rosenfeld, P.J., Penha, F.M., Feuer, W.J., Gregori, G., 2011. Natural history of drusen morphology in age-related macular degeneration using spectral domain optical coherence tomography. *Ophthalmology* 118, 2434–2441.
- 17 Lindqvist, N., Liu, Q., Zajadacz, J., Franze, K., Reichenbach, A., 2010. Retinal Glial (Müller) Cells: Sensing and responding to tissue stretch. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 1683–1690. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4159>
- 18 Schubert, H.D., 1989. Cystoid macular edema the apparent role of mechanical factors. *Prog Clin Biol Res.* 312, 277–91.

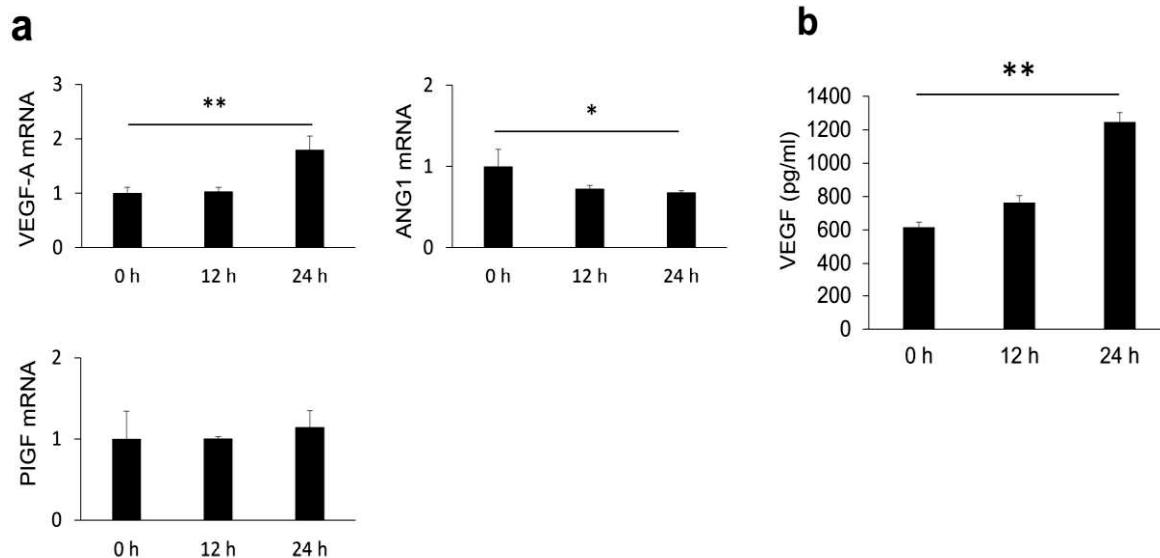
- 19 Eastlake, K., Banerjee, P.J., Angbohang, A., Charteris, D.G., Khaw, P.T., 2016. Limb Müller glia as an important source of cytokines and inflammatory factors present in the gliotic retina during proliferative vitreoretinopathy. *Glia* 64, 495-506. <https://doi.org/10.1002/glia.22942>
- 20 Ikeda, E., Aehent, M.G., Breier, G., Risau, W., 1995. Hypoxia-induced Transcriptional Activation and Increased mRNA Stability of Vascular Endothelial Growth Factor in C6 Glioma Cells. *J Biol Chem.* 270, 19761–19766.
- 21 Smani, T., Gómez, L.J., Regodon, S., Woodard, G.E., Siegfried, G., Khatib, A.M., Rosado, J.A., 2018. Trp channels in angiogenesis and other endothelial functions. *Front Physiol* 9.
- 22 Wang, X., Freire Valls, A., Schermann, G., Shen, Y., Moya, I.M., Castro, L., Urban, S., Solecki, G.M., Winkler, F., Riedemann, L., Jain, R.K., Mazzone, M., Schmidt, T., Fischer, T., Halder, G., Ruiz de Almodóvar, C., 2017. YAP/TAZ Orchestrate VEGF Signaling during Developmental Angiogenesis. *Dev Cell* 42, 462-478. e7.
- 23 Ashimori, A., Higashijima, F., Ogata, T., Sakuma, A., Hamada, W., Sunada, J., Aoki, R., Mikuni, M., Hayashi, K., Wakuta, M., Yoshimoto, T., Minamoto, A., Ko, J.A., Kimura, K., 2024. HIF-1 α -dependent upregulation of angiogenic factors by mechanical stimulation in retinal pigment epithelial cells. *Dis Model Mech* 17. <https://doi.org/10.1242/dmm.050640>
- 24 Milkiewicz, M., Doyle, J.L., Fudalewski, T., Ispanovic, E., Aghasi, M., Haas, T.L., 2007. HIF-1 α and HIF-2 α play a central role in stretch-induced but not shear-stress-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. *Journal of Physiology* 583, 753–766.
- 25 Forsythe, J.A., Jiang, B.-H., Iyer, N. V, Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., Semenza, G.L., 1996. Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Mol Cell Biol.* 16, 4604–4613.
- 26 Lee, K., Lee, J.H., Boovanahalli, S.K., Jin, Y., Lee, M., Jin, X., Kim, J.H., Hong Y.S., Lee, J.J., 2007. (Aryloxyacetyl amino)benzoic Acid Analogues: A New Class of Hypoxia-Inducible Factor-1 Inhibitors. *Journal of Medical Chemistry* 50, 1675-1684. <https://doi.org/10.1021/jm0610292>
- 27 Lai, D., Wu, Y., Shao, C., Qiu, Q., 2023. The Role of Müller Cells in Diabetic Macular Edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 64. <https://doi.org/10.1167/iovs.64.10.8>
- 28 Wang, R., Yang, M., Jiang, L., Huang, M., 2022. Role of Angiopoietin-Tie axis in vascular and lymphatic systems and therapeutic interventions. *Pharmacol Res* 182. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106331>
- 29 Kim, C.-H., Cho, Y.-S., Chun, Y.-S., Park, J.-W., Kim, M.-S., 2002. Early Expression of Myocardial HIF-1 α in Response to Mechanical Stresses. *Circ Res* 90. <https://doi.org/10.1161/hh0202.104923>
- 30 Yang, J., Liu, Z., 2022. Mechanistic Pathogenesis of Endothelial Dysfunction in Diabetic Nephropathy and Retinopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.816400>
- 31 Azzolini, C., Donati, S., Micheloni, G., Moretti, V., Valli, R., Acquati, F., Costantino, L.,

- Ferrara, F., Borroni, D., Premi, E., Testa, F., Simonelli, F., Porta, G., 2021. Expression of Otx Genes in Müller Cells Using an In Vitro Experimental Model of Retinal Hypoxia. *J Ophthalmol* 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6265553>
- 32 Xin, X., Rodrigues, M., Umapathi, M., Kashiwabuchi, F., Ma, T., Babapoor-Farrokhran, S., Wang, S., Hu, J., Bhutto, I., Welsbie, D.S., Duh, E.J., Handa, J.T., Eberhart, C.G., Lutty, G., Semenza, G.L., Montaner, S., Sodhi, A., 2013. Hypoxic retinal Müller cells promote vascular permeability by HIF-1-dependent up-regulation of angiopoietin-like 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217091110>
- 33 Missiaen, R., Lesner, N.P., Simon, M.C., 2023. HIF: a master regulator of nutrient availability and metabolic cross-talk in the tumor microenvironment. *EMBO J* 42. <https://doi.org/10.15252/embj.2022112067>
- 34 Nakazawa, M.S., Keith, B., Simon, M.C., 2016. Oxygen availability and metabolic adaptations. *Nat Rev Cancer* 16, 663–673. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.84>
- 35 Schöenberger, M.J., Kovacs, W.J., 2015. Hypoxia signaling pathways: Modulators of oxygen-related organelles. *Front Cell Dev Biol*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00042>
- 36 Zolta'n Arany, Z., Huang, L.E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M.A., Franklin Bunn, H., Livingston, D.M., 1996. An essential role for p300CBP in the cellular response to hypoxia. *Cell Biology* 93, 12969–12973.
- 37 Wu, D., Zhang, R., Zhao, R., Chen, G., Cai, Y., Jin, J., 2013. A Novel Function of Novobiocin: Disrupting the Interaction of HIF 1 α and p300/CBP through Direct Binding to the HIF1 α C-Terminal Activation Domain. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062014>
- 38 Feng, S., Bowden, N., Fragiadaki, M., Souilhol, C., Hsiao, S., Mahmoud, M., Allen, S., Pirri, D., Ayllon, B.T., Akhtar, S., Roger Thompson, A.A., Jo, H., Weber, C., Ridger, V., Schober, A., Evans, P.C., 2017. Mechanical activation of hypoxia-inducible factor 1 α drives endothelial dysfunction at atheroprone sites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 37, 2087–2101. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309249>
- 39 D'Ignazio, L., Bandarra, D., Rocha, S., 2016. NF- κ B and HIF crosstalk in immune responses. *FEBS Journal* 283, 413–424. <https://doi.org/10.1111/febs.13578>
- 40 Carmeliet, P., Jain, R.K., 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>
- 41 Potente, M., Gerhardt, H., Carmeliet, P., 2011. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 146, 873–887. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.039>
- 42 Teichert, M., Milde, L., Holm, A., Stanicek, L., Gengenbacher, N., Savant, S., Ruckdeschel, T., Hasanov, Z., Srivastava, K., Hu, J., Hertel, S., Bartol, A., Schlereth, K., Augustin, H.G., 2017. Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation. *Nat Commun* 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms16106>
- 43 Gandin, C., Widmann, C., Lazdunski, M., Heurteaux, C., 2016. MLC901 Favors Angiogenesis and Associated Recovery after Ischemic Stroke in Mice. *Cerebrovascular*

- Diseases 42, 139–154.
- 44 Levyj, A.P., Levy, N.S., Wegner, S., Goldberg, M.A., 1995. Transcriptional Regulation of the Rat Vascular Endothelial Growth Factor Gene by Hypoxia. *Journal of biological chemistry* 270, 13333–13340.
 - 45 Mandriota, S.J., Pepper, M.S., 1998. Regulation of Angiopoietin-2 mRNA Levels in Bovine Microvascular Endothelial Cells by Cytokines and Hypoxia. *Circ Res* 83, 852–9.
 - 46 Narravula, S., Colgan, S.P., 2001. Hypoxia-Inducible Factor 1-Mediated Inhibition of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Expression During Hypoxia. *J Immunol.* 166, 7543–8.
 - 47 Zhang, E.G., Smith, S.K., Baker, P.N., Charnock-Jones, D.S., 2001. The Regulation and Localization of Angiopoietin-1,-2, and Their Receptor Tie2 in Normal and Pathologic Human Placentae. *Molecular Medicine* 7, 624–635.
 - 48 Carroll, V.A., Ashcroft, M., 2006. Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α versus HIF-2 α in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or loss of von Hippel-Lindau function: Implications for targeting the HIF pathway. *Cancer Res* 66, 6264–6270. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2519>
 - 49 Bhutto, I.A., McLeod, D.S., Hasegawa, T., Kim, S.Y., Merges, C., Tong, P., Luty, G.A., 2006. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 82, 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.05.007>
 - 50 Jousen, A.M., Ricci, F., Paris, L.P., Korn, C., Quezada-Ruiz, C., Zarbin, M., 2021. Angiopoietin/Tie2 signalling and its role in retinal and choroidal vascular diseases: a review of preclinical data. *Eye (Basingstoke)* 35, 1305–1316. <https://doi.org/10.1038/s41433-020-01377-x>
 - 51 Eastlake, K., Banerjee, P.J., Angbohang, A., Charteris, D.G., Khaw, P.T., 2016. Limb GA. Müller glia as an important source of cytokines and inflammatory factors present in the gliotic retina during proliferative vitreoretinopathy. *Glia* 64, 495-506. <https://doi.org/10.1002/glia.22942>
 - 52 Vellanki, S., Ferrigno, A., Alanis, Y., Betts-Obregon, B.S., Tsin, A T, Tsin, Andrew T, 2016. High Glucose and Glucose Deprivation Modulate Müller Cell Viability and VEGF Secretion HHS Public Access. *Int J Ophthalmol Eye Sci* 4, 178–183.
 - 53 Wang, J., Xu, E., Elliott, M.H., Zhu, M., Le, Y.Z., 2010. Müller cell-derived VEGF is essential for diabetes-induced retinal inflammation and vascular leakage. *Diabetes* 59, 2297–2305. <https://doi.org/10.2337/db09-1420>
 - 54 Ye, X., Ren, H., Zhang, M., Sun, Z., Jiang, A.C., Xu, G., 2012. ERK1/2 signaling pathway in the release of VEGF from müller cells in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 3481–3489. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-9076>
 - 55 Kim, Y.J., Park, S.J., Kim, N.R., Chin, H.S., 2017. Effects of Histone Deacetylase Inhibitor (Valproic Acid) on the Expression of Hypoxia-inducible Factor-1 Alpha in Human Retinal

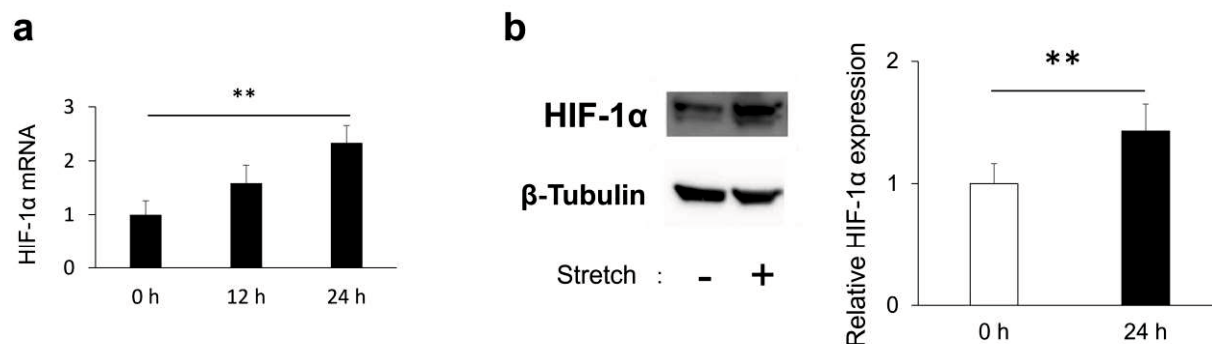
- Müller Cells. Korean J Ophthalmol 31, 80–85. <https://doi.org/10.3341/kjo.2017.31.1.80>
- 56 Xu, R., Wang, F., Yang, H., Wang, Z., 2022. Action Site and Clinical Application of HIF-1 α Inhibitors. Molecules 27. <https://doi.org/10.3390/molecules27113426>
- 57 Wang, J., Zheng, X., Zeng, G., Zhou, Y., Yuan, H., 2014. Purified vitexin compound 1 inhibits growth and angiogenesis through activation of FOXO3a by inactivation of Akt in hepatocellular carcinoma. Int J Mol Med 33, 441-448. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1587>
- 58 Lin, C.M., Shyu, K.G., Wang, B.W., Chang, H., Chen, Y.H., Chiu, J.H., 2010. Chrysin suppresses IL-6-induced angiogenesis via down-regulation of JAK1/STAT3 and VEGF: an in vitro and in ovo approach. J Agric Food Chem 58, 7082-7087. <https://doi.org/10.1021/jf100421w>

図 1



MIO-M1 細胞における伸展刺激による血管新生因子発現への影響。(a) 伸展刺激を表示された各時間受けた MIO-M1 細胞における VEGF-A, ANG1, PIGF mRNA 量を RT-qPCR で解析し, GAPDH に対する各 mRNA 量の相対比を示した。(b) MIO-M1 細胞に表示された各時間伸展刺激を与え, その培地の上清中の VEGF 濃度を ELISA で測定した。平均値±標準偏差(N=3)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: 伸展刺激 0 時間の群との比較(Student の両側 t 検定)。

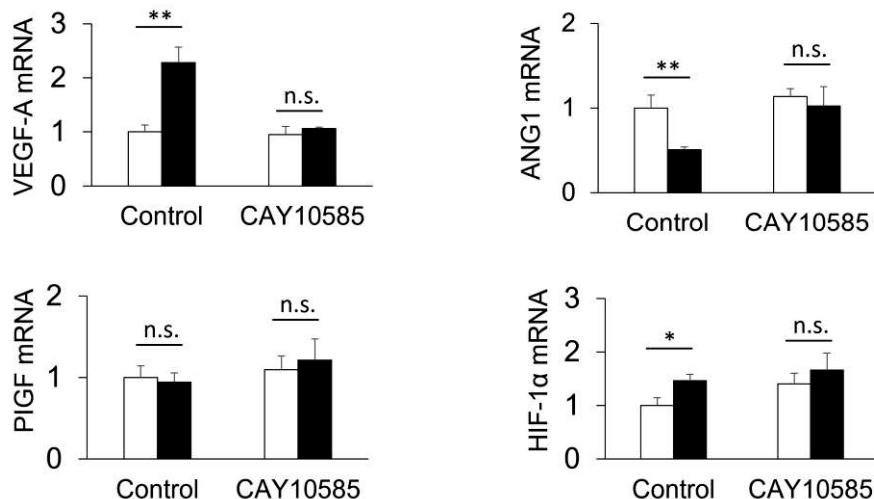
図 2



MIO-M1 細胞における伸展刺激による HIF-1α 発現への影響。(a) 伸展刺激を表示された各時間受けた MIO-M1 細胞における HIF-1α mRNA 量を RT-qPCR で解析し, GAPDH に対する各 mRNA 量の相対比を示した。(b) 伸展刺激を表示された各時間受けた MIO-M1 細胞における HIF-1α 蛋白量をウェスタンブロッティングで解析し, β-チューブリンに対する蛋白量の相対比を示した。平均値±標準偏差(N=3)。** $P < 0.01$: 伸展刺激 0 時間の群との比較(Student の両側 t 検定)。

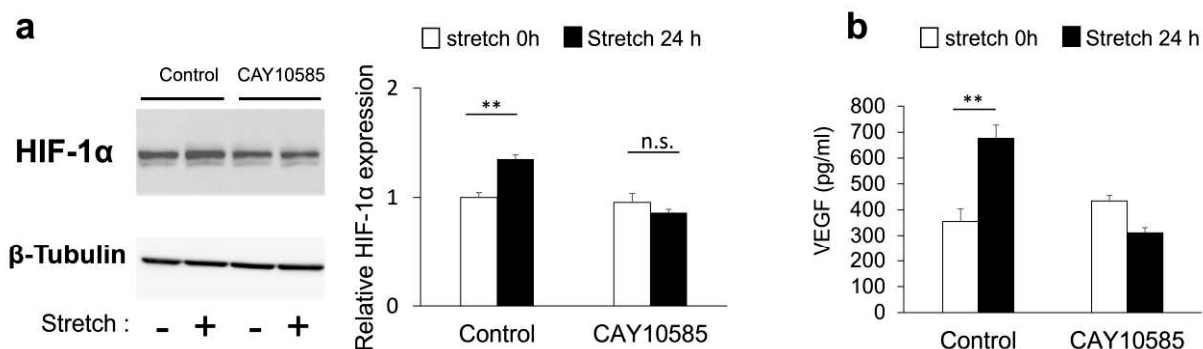
図 3

□ stretch 0h ■ Stretch 24 h



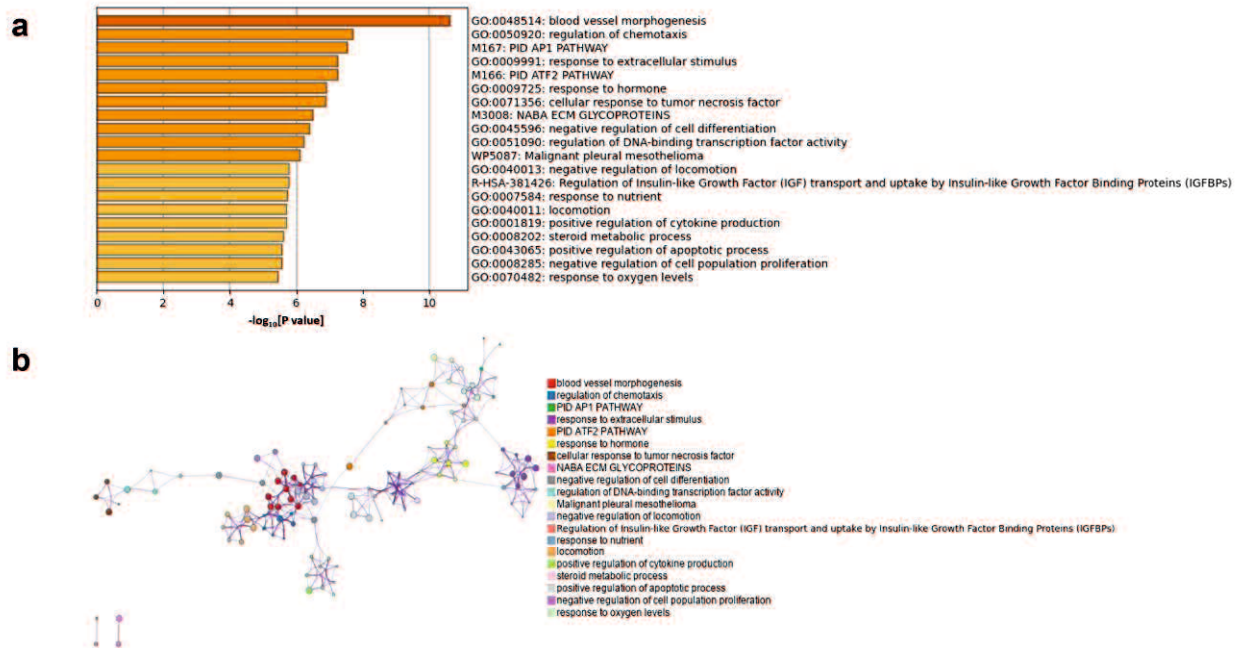
伸展刺激を受けた MIO-M1 細胞における HIF-1 α 阻害剤による VEGF-A, ANG1, PIGF および HIF-1 α 発現への影響。伸展刺激を表示された各時間受け, HIF-1 α 阻害剤で処理された MIO-M1 細胞における VEGF-A, ANG1, PIGF および HIF-1 α mRNA 量を RT-qPCR で解析し, GAPDH に対する各 mRNA 量の相対比を示した。平均値 $\pm$ 標準偏差(N=3)。n.s. 有意ではない, *P < 0.05, **P < 0.01 : 伸展刺激 0 時間の群との比較(Student の両側 t 検定)。

図 4



伸展刺激を受けた MIO-M1 細胞における HIF-1 α 阻害剤による VEGF 分泌への影響。(a)伸展刺激を表示された各時間受け, HIF-1 α 阻害剤で処理された MIO-M1 細胞における HIF-1 α 蛋白量をウェスタンブロッティングで解析し, β -チューブリンに対する蛋白量の相対比を示した。(b)(a)のように処理した細胞の培地の上清中の VEGF 濃度を ELISA で測定した。平均値 $\pm$ 標準偏差(N=3)。 n.s. 有意ではない, **P < 0.01 : 伸展刺激 0 時間の群との比較(Student の両側 t 検定)。

図 5



伸展刺激下の MIO-M1 細胞における遺伝子発現に対する影響の包括的な分析。(a)伸展刺激を 0 時間または 24 時間行った MIO-M1 細胞で RNA-seq 分析を行った。刺激を受けていない細胞と比較して刺激を受けた細胞で発現が増加した遺伝子を特定し ($P < 0.05$) , Metascape による機能エンリッチメント分析を行った。データは、各条件で 3 回以上繰り返され、同様の結果が得られた。(b)(a)で示されたエンリッチメントされた用語のネットワークマップ。ノードの色は、様々な機能に対応している。