

平成30年6月7日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20241

研究課題名(和文) 結膜EMZLにおけるRAS系の関与

研究課題名(英文) The Receptor-Associated Prorenin System Is Associated with the Molecular Pathogenesis of Human Conjunctival Lymphoma

研究代表者

安藤 亮 (Ando, Ryo)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：60399847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：組織レニン・アンジオテンシン系(組織renin-angiotensin system: RAS)および受容体結合プロレニン系(receptor-associated prorenin system: RAPS)は、糖尿病網膜症をはじめとする様々な眼疾患において血管新生などの病態に關与することを、我々はこれまでに報告してきた。本研究では、結膜節外辺縁帯B細胞性リンパ腫(EMZL)におけるRASおよびRAPSの病態への關与を検討した。その結果、組織RASおよびRAPSが結膜EMZLの病態形成に關与する分子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Extranodal marginal zone B-cell lymphoma (EMZL) is the most common subtype of conjunctival lymphoma though its molecular mechanisms of pathogenesis are largely unknown. Here, we attempted to explore the association of the renin-angiotensin system (RAS) and (pro)renin receptor [(P)RR] in the pathogenesis of conjunctival lymphoma. Surgically removed conjunctiva EMZL samples were used for gene expression, immunohistochemical and immunofluorescence analyses of (P)RR and RAS components. The present study suggests that activation of (P)RR and AT1R is associated with the pathogenesis of conjunctival EMZL by stimulating the production of FGF2 and MMPs.

研究分野：眼科学

キーワード：眼細胞生物学 レニン・アンジオテンシン系 結膜リンパ腫 (プロ)レニン受容体

1. 研究開始当初の背景

結膜は眼球表面を覆う組織であり、外界からの病原体に対する最初の防御機構である。これは結膜リンパ組織が担う免疫機構であり、病原体侵入に対して B 細胞、T 細胞、樹状細胞が遊走する。節外辺縁帯 B 細胞性リンパ腫 (EMZL) は非ホジキン B 細胞性リンパ腫の 7% でみられ、結膜リンパ腫では最も多くみられる組織型であるが、この EMZL は炎症が関与して誘導されることが我々の研究グループを含め、いくつか報告されている [Kase S et al. *Anticancer Res.* 2013]。

結膜リンパ腫は眼付属器における悪性腫瘍の中でも高い頻度で見られ、サーモンピンク色の隆起性病変として観察される。また近年我々の研究グループは、ヒト結膜 EMZL 組織において、主要な血管新生因子である血管内皮増殖因子 (VEGF) が発現していることを報告している [Kinoshita S et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014]。しかしその病態における分子機構はほとんど知られていない。

レニン・アンジオテンシン系 (RAS) は、生物が海から陸へと進化する過程で塩分と水分を体内に保持するために発達した循環ホルモンシステム (循環 RAS) であるが、臓器局所では細胞の分化・増殖など組織修復などの役割を担っている (組織 RAS)。

これまでに申請者のグループは、組織 RAS および組織 RAS の上流に位置する (プロ) レニン受容体が、眼組織における VEGF を介した炎症・血管新生の上流で網膜疾患の分子病態を制御していることを動物モデルで示し、受容体結合プロレニン系 (receptor-associated prorenin system: RAPS) という新たな病態概念を提唱してきた [Satofuka S, et al., *Diabetes.* 2009]。

(プロ) レニン受容体によるこの 2 つの作用 (組織 RAS の活性化および RAS 非依存型細胞内シグナル活性化) は眼組織のみならず腎臓や心臓などの病態モデルにおいても認められ、新薬であるレニン阻害薬 aliskiren が細胞内シグナルを阻害できないことから、(プロ) レニン受容体は生活習慣病における臓器保護のための共通の創薬ターゲットとして注目されている。

RAS の抑制が腫瘍の増殖や転移を効果的に抑制することが複数の実験モデルや臨床研究で示されており [George AJ et al. *Nature reviews Cancer.* 2010; Lever AF, et al. *Lancet.* 1998]、悪性腫瘍に対する治療標的として RAS は良い候補であると言える。また

組織 RAS の抑制は急性炎症モデルに効果を示したという報告がある。

さらに、最近我々は糖尿病網膜症患者より採取した臨床検体を用いた解析の結果、(プロ) レニン受容体は VEGF と同様に糖尿病網膜症における血管新生、つまり疾患の進行に關与する重要な分子であることを示した [Kanda A et al. *Diabetologia.* 2012]。先に述べたように、我々は結膜 EMZL には炎症が関与すること、VEGF が発現していることを示しており、EMZL においても RAS や RAPS が密接に關与していると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、外科的に切除された結膜 EMZL 組織を用いてレニン・アンジオテンシン系 (RAS) 及び受容体結合プロレニン系 (RAPS) 関連分子の発現を解析する。さらに、ヒト培養 B リンパ球細胞株を用いて、腫瘍性 B リンパ球における RAS や RAPS の機能や分子機構なども詳細に明らかにし、新たな治療法開発を試みる。

現在、結膜 EMZL の治療法は放射線療法、化学療法、外科手術が主である。放射線療法と化学療法はその効果は明らかであるが、副作用の面で大きな問題がある。また、手術による病巣部分の摘出を行っても再発する症例がある。患者の負担・医療費の削減などを考慮すると結膜 EMZL に対する治療薬の開発は重要である。結膜 EMZL における RAS およびその上流に位置する (プロ) レニン受容体の役割を明らかにすることで、これまでとは異なった視点からの新たな治療法の開発に結び付く可能性がある。

安全性が確保された既存 RAS 抑制薬が結膜 EMZL への治療もしくは進行抑制・再発予防薬として効果が認められれば、大きな社会貢献となると予測される。また、(プロ) レニン受容体は、組織発生から炎症病態や血管新生、腫瘍増殖と幅広く關与することが明らかになってきたため、本研究計画の実施により多くの分野での研究が活性化され、我が国の基礎・臨床研究の発展に貢献することが予想される

3. 研究の方法

結膜 EMZL の病態形成における RAS および (プロ) レニン受容体の關与を明らかにするため、下記の実験を行う。

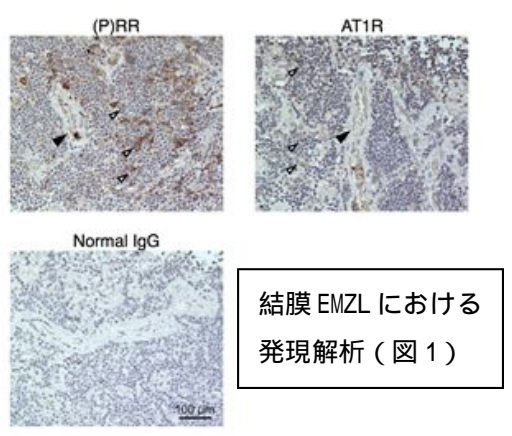
(1) 外科的に切除した結膜 EMZL を用いて、(プロ) レニン受容体および RAS 系関連分子 (プロレニン、アンジオテンシノーゲン、ア

ンジオテンシン変換酵素、アンジオテンシン II タイプ 1 受容体など)の発現を RT-PCR 法や免疫組織染色で確認する。

(2) ヒト B リンパ芽球 (IM-9 細胞など) を用いて、プロレニンおよびアンジオテンシン II 刺激による細胞内メカニズムを詳細に解明し、RAS や RAPS と疾患病態との関連を種々の解析により明らかにする。

4. 研究成果

結膜 EMZL 組織において、(プロ)レニン受容体を含む全ての RAPS 関連分子の遺伝子発現が確認し、さらに免疫組織染色を行った結果、(プロ)レニン受容体およびアンジオテンシン II タイプ 1 受容体の結膜 EMZL 組織に



おける局在を確認した。

また、蛍光組織染色を行った結果、(プロ)レニン受容体およびアンジオテンシン II タイプ 1 受容体は、異型 B リンパ球と血管内皮細胞の両方で検出され、それぞれ CD20 (B リンパ球マーカー) および CD31 (内皮組織マーカー) と共局在していた。さらにそれぞれのリガンドであるプロレニンとアンジオテシノーゲンとの共局在も確認出来た。

プロレニンの (プロ)レニン受容体への結合、およびアンジオテンシン II のアンジオテンシン II タイプ 1 受容体への結合は、多様な遺伝子発現を誘導し様々な疾患の病態に関与することが *in vivo* でも *in vitro* でも報告されている [Satofuka S, et al., *Diabetes*. 2009; Kanda A et al. *Diabetologia*. 2012]。しかし、B 細胞での報告はない。そこで IM-9 細胞にプロレニンまたは Ang II 刺激を行い、病態形成に関わると考えられる分子の遺伝子発現解析を行った。結果、プロレニン刺激により線維芽細胞増殖因子-2 が、Ang II 刺激によりマトリックスメタプロテアーゼ 2 などの遺伝子発現を有意に増加していた。さらに、結膜 EMZL 組織において、これら分子と (プロ)レニン受

容体およびアンジオテンシン II タイプ 1 受容体の共局在が確認された。

以上のことより、組織 RAS および RAPS の活性化が結膜 EMZL の病態形成に関与する分子であることが示唆された。結膜 EMZL における RAPS および RAS の病態メカニズムの解明は、疾患発症の原因・進行解明に繋がる可能性がある。また、それら分子を新規薬物治療のターゲットとして、今後の創薬研究において大きく貢献することが期待される。

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 3 件)

Murata M, Noda K, Kawasaki A, Yoshida S, Dong Y, Saito M, Dong Z, Ando R, Mori S, Saito W, Kanda A, Ishida S. Soluble vascular adhesion protein-1 mediates spermine oxidation as semicarbazide-sensitive amine oxidase: possible role in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Eye Res*. 2017, pp. 1674-1683. DOI:10.1080/02713683.2017.1359847

(査読有)

Dong Y, Dong Z, Kase S, Ando R, Fukuhara J, Kinoshita S, Inafuku S, Tagawa Y, Ishizuka ET, Saito W, Murata M, Kanda A, Noda K, Ishida S. Phosphorylation of alphaB-crystallin in epiretinal membrane of human proliferative diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol*. 2016, pp.1100-1105. DOI:10.18240/ijo.2016.08.03.eCollection 2016. (査読有)

Dong Z, Shinmei Y, Dong Y, Inafuku S, Fukuhara J, Ando R, Kitaichi N, Kanda A, Tanaka K, Noda K, Harada T, Chin S, Ishida S. Effect of geranylgeranylacetone on the protection of retinal ganglion cells in a mouse model of normal tension glaucoma. *Helvion*. 2016, pp.e00191 DOI: 10.1016/j.helivon.2016.e00191 (査読有)

[学会発表](計 1 件)

石塚タンエルダ、神田敦宏、加瀬 諭、安藤 亮、董 陽子、稲福沙織、田川義晃、野田航介、石田 晋. 結膜節外辺縁帯 B

細胞性リンパ腫におけるレニン・アンジオテンシン系の病態への関与、 第 119
回日本眼科学会総会、 2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://eye.med.hokudai.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 亮 (Ando, Ryo)
北海道大学・大学病院・医員
研究者番号：60399847

(2) 研究分担者

なし