

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11463

研究課題名(和文)AMD擬似病態をin vitroで再構成する共培養系でのRPE/Mp相互作用解析

研究課題名(英文)Exosome mediated Innate/inflammatory cross talk between macrophages (Mps) and iPS-derived RPE cells: Proposal of new trait for the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD)

研究代表者

羽室 淳爾 (HAMURO, JUNJI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員教授

研究者番号：80536095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：組織炎症ではGlycolytic Mpsにより組織障害が起こる。随伴低酸素環境下でOXPHOS傾斜Mpsにリプログラムされ血管新生や瘢痕形成を招来する。Mps/RPE相互作用でIL-6, IL-8, MCP-1やVEGF産生が増強され、本作用の一部はMps産生TNF-により担われる。RPE Exosome Mps TNF- RPE MCP-1, IL-6, VEGFの炎症増悪回路について共培養由来ExosomeはVEGF産生増強には部分的寄与に留まり、全面的に依存するMCP-1, IL-6産生と異なる。ヒト共培養系で著明に産生が低下するRPE産生Exosome中のmiRNAを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

黄斑局所の恒常性維持に不可欠な網膜色素上皮細胞(RPE)とマクロファージ(Mps)系とのネットワーク破綻の一部を、RPE./Mps共培養系を用い深化させ、AMD擬似病態のin vitroでの再構成に成功した。RPEによるMps炎症惹起能の抑制(免疫特権の成立)、補体活性化抑制因子産生増強vs補体活性化因子産生抑制作用、抗血管新生作用を有するPEDF産生増強vs血管新生増強因子VEGF産生抑制という精妙な機能可塑性の破綻の分子機構の骨格を解明した。RPE/Mp間のパラクリンループ形成における細胞外小胞体粒子の寄与を明確にできたことは、加齢黄斑変性の先制医療に有益な独創的医療技術に繋がる。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of AMD is aggravated by chronic inflammation. Intact RPE down-regulates TNF- α production by choroid-infiltrating Mps, whereas degenerated RPE is devoid of this regulatory function. CD63+ exosome in co-cultures were detected by western blot or FACS analysis, in accordance with the elevated production of nanoparticles detected by Nonosight. The production of MCP-1, IL-6, IL-8 and VEGF from RPE were elevated in the co-culture with Mps, while that of TNF- α and PEDF were reduced. The modulation of these cytokines was not visible in the double chambered system isolated with 0.03 mm membrane filters, while those of PEDF, IL-8 and TNF were significant even in the double chambered system. These results, together with the similar results in the co-cultures of Mps with ARPE19, indicate the presence of cross talk between Mps and RPE cells in human systems. RPE secreted exosome displays a critical role in the triggering of a vicious inflammatory cytokine induction cycle.

研究分野：免疫学、炎症学、再生医療

キーワード：マクロファージ 網膜色素上皮細胞 加齢黄斑変性 エキソソーム miRNA 炎症性サイトカイン 血管新生抑制因子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1 . 研究開始当初の背景

AMD は視機能障害の重要な原因である。生活習慣の欧米化に伴い本邦でも急増している失明性眼疾患である。AMD を加齢性慢性炎症と捉え、黄斑局所の恒常性維持に不可欠な RPE の酸化ストレスによる機能破綻と Mps 系とのネットワーク破綻を病態の本質と捉えて研究を進めている。その経緯は、申請者が、「組織炎症病態は時空間的に質的変換を起こし、組織破壊による低酸素状態や局所産生 PDGF や TGFβによる組織再構築に進み、浸潤 Mps 機能が可塑的に転換することで炎症病態が経時的に変化するとする理論を世界で最初に提唱した(Int Immunol,2002、2 報、Mol.Immunol,2002, Int. Immunopharmacol. 2002, Eur J Immunol.2002, 2003, J Immunol. 2003 など) ことに始まる(総説：羽室、炎症・免疫・感染、2011 など)。本理論に準拠して、AMD モデルにおいて M1 型 Mps 誘導や M1 型 Mps 移入で網膜下組織の線維化が抑制できることを、園田らとの共同研究で報告した(IOVS, 2010)。脈絡膜浸潤 Mps の AMD 病態への係りは、古くより指摘され、最近一層注目されてきている(Forrester. *Nat Med.* 2003, Ambati, *Nat Rev Immunol.* 2013, Yang. *Sci Rep.* 2016, Devarajan G *Curr Eye Res.* 2016 ら)。また、CNV モデルでは急性期には M1、慢性期もしくは組織再構築段階には M2 に転換することが報告され(Cao, *Pathol Int.* 2011, Zandi , *Cell Rep.* 2015)、AMD においても、申請者らの先駆的知見の妥当性が検証された。しかしながら、Mps が RPE の機能の動的可塑性に果たす役割における分子機序に就いては全く不明で、申請者らは本課題に関して 26 年度より鋭意研究を開始した。

2 . 研究の目的

AMD の先制医療につながる独創的医療技術の開発を目標とする。黄斑局所の恒常性維持に不可欠な網膜色素上皮細胞(RPE) とマクロファージ(Mps)系とのネットワーク破綻の解明を、**RPE/Mps** 共培養系を用い深化させる。AMD 擬似病態の **in vitro** での再構成にも繋がる。RPE による Mps 炎症惹起能の抑制(免疫特権の成立)、補体活性化抑制因子産生増強 vs 補体活性化因子産生抑制作用、抗血管新生作用を有する PEDF 産生増強 vs 血管新生増強因子 VEGF 産生抑制という RPE の精妙な機能可塑性の破綻の分子機構の骨格を解明する。同時に、此の RPE/Mp 間のパラクリンループ形成における細胞外小胞体粒子(Evs, Exosome 含) の寄与と機能分担を解析する。構築される疑似病態再構成系の創薬評価系への適用可能性も検討する。研究目的は、Mps/RPE 間の細胞干渉を介在する分子はサイトカインか神経ペプチドか細胞外小胞体粒子(EV)か、また、病態に関与する酸化ストレスは、見出した細胞間干渉をどの様に攪乱するか、の 2 点に簡述される。

3 . 研究の方法

AMD 病態の *in vitro* 擬似モデルとして申請者は図-1 に示すネットワークを想定して研究を進めた。

() **RPE** の機能性分子の動態解析：補体活性化抑制因子 CD46, CD55, CD59、Clu (クラスチリン)、CFH など RPE の機能性分子の発現解析を実施する。() **RPE 機能を攪乱する Mps の**

亜集団の同定。() Mps/RPE 間の細胞干渉を介在する因子は何か。Exosome の働きは? : サイトカインなどの古典的因子か以外に、細胞外小胞体微粒子(EVs)の関与を解析する。CD63 陽性の Exosome の中に RPE の機能性分子が包含されて遊離され、RPE 細胞の機能が Mps との細胞干渉を介して、結果的に制御される可能性の有無を明確にする。() 炎症関連分子により異なる精妙な発現制御機構への酸化脂質関与の解明: Ox-

LDL, HNE, MDA などの酸化脂質の添加で共培養効果がどのように変化するか。遊離脂肪酸が変性 RPE から産生され Mps の TLR4 に作用するかなど、上記結果を照合しつつ主項目について実施し、図-1 の POC を確立する。() 本研究期間後のヒト系での実験系構築準備として、ヒト iPS 由来 RPE, ヒト単球細胞株を Mps に分化させたものを用いマウス系での知見の重要部分を確認する。

4. 研究成果

組織炎症では、貪食能を有し組織恒常性を維持する Mps が、組織炎症に伴う局所環境因子の変動により惹起される代謝リプログラミングを介し、Th1 を誘導する Glycolytic Mps に転換し組織障害が起こる。付随する低酸素環境下でミトコンドリア呼吸を中心とする OXPHOS 傾斜 Mps にリプログラムされ、血管新生や瘢痕形成病態を招来するという時空間的な自然炎症制御機構が働く。後者においては、羽室の提唱した酸化型 Mps, 今でいう M2 型の Mps が機能する。本研究で対照とする RPE との細胞干渉を担う Mps も M2 であることを共同研究者山脇らは確認済である〔未発表〕。図-2 に示すように 0.44 μ m の膜で仕切られたトランスウェルにおいて RPE と Mps の両細胞の接触を遮断した競売由系においても炎症性サイトカインや VEGF 産生の増強は認められる。このことは、膜透過性の分子により対照とする細胞干渉が担われていることを示す。また、注意深くデータを見つめると Mps が膜を隔てて下層で培養された方が反対の場合よりも、直接接触を伴う混合培養の時よりも共培養効果が大きいことが認められる。このことは上層に存在する RPE が産生する沈降性の因子が下層に存在する Mps, すなわち、RAW264.7 を効率よく刺激する可能性を示唆する。このことが、前述の両細胞間の細胞干渉、特に、RPE による Mps の機能修飾に RPE の産生する細胞外微粒子〔Extracellular Vesicles= EV〕あるいは、その中に含ま

図-1. MpsとRPE細胞干渉による組織恒常性破綻

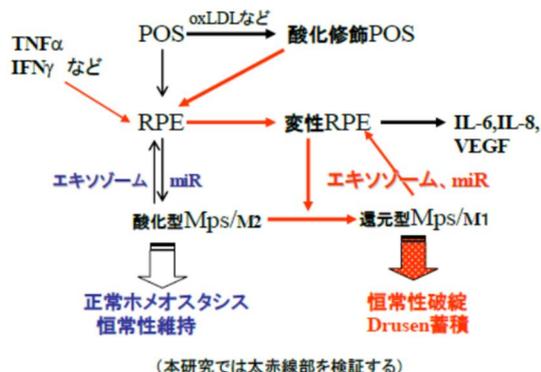
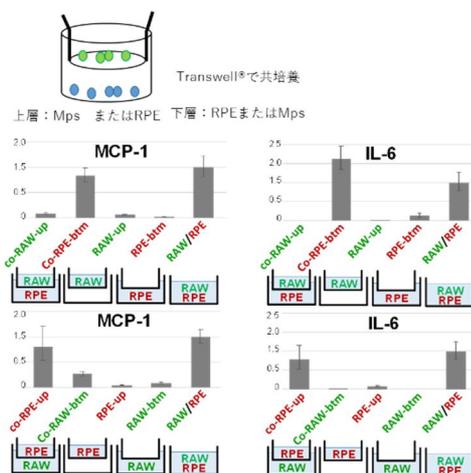


図-2. 非接触培養でも炎症性サイトカイン産生は増大



れる Eosomes (Exo)がこの細胞干渉の一端を担うのではないかと考察した所以である。

そこで、我々は、Exoの表面マーカーとして代表的なCD63に注目し、CD63陽性タンパクの分泌増強が共培養系においてその培養上清で確認されるかを検討した。本系が慢性炎症モデルである点を踏まえ、LPS0.1 μ g/mlでの刺激を実施した。

図-3. RPE and Mps 共培養ではRPEからのCD63⁺ exosome分泌増大

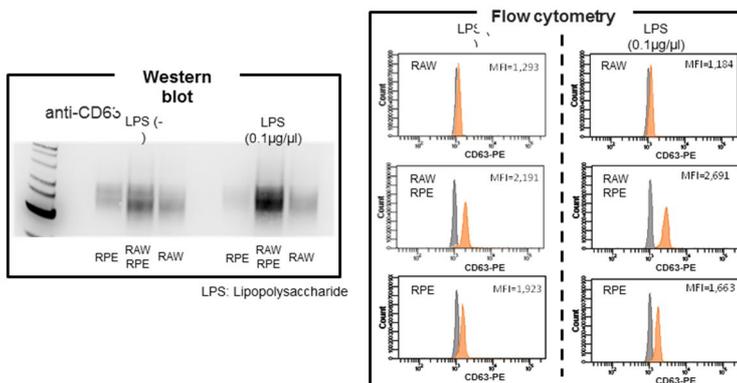
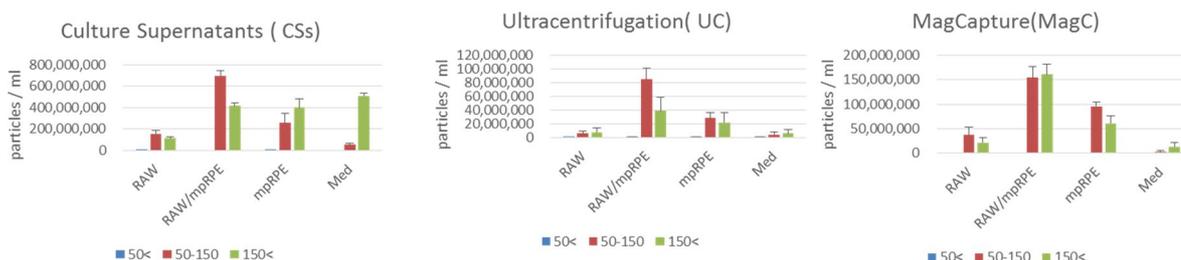


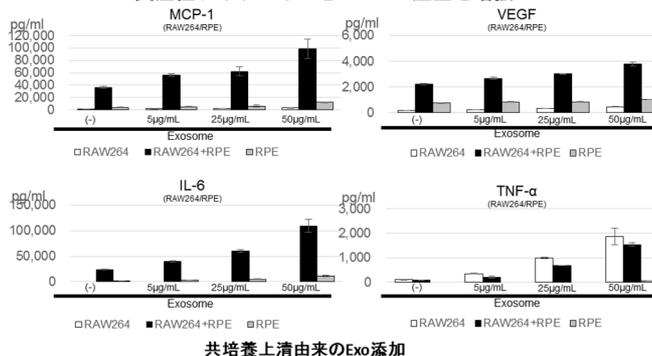
図-3に示すようにウエスタンブロットで共培養において、RPE 単独培養に比較して、確かにCD63陽性タンパクの飛躍的増大が確認された。なお、このことは、CD63陽性成分を選択的に染色してのFACS解析によっても明瞭に示された。染色によるシフトはRPE 単独の方がRAW264.7 単独よりもやや強かった。

図-4. RPEとMpsの共培養における細胞外小胞産生増強 (粒子分析解析)



単なる機能的効果でなくタンパク成分の産生増強が明らかになったので、次に、粒子分析解析装置 **Nanosight** (NTA : NanoTracking Analysis)技術) を用いて共培養により **Exo** を含む **EV** 産生の増強が認められるかを確認した。培養上清、超遠心により **Exo** を濃縮したものを **MagCapture** によりエクソソームの膜表面に存在するホスファチジルセリン (PS) にカルシウム依存的に結合する物質によりアフィニティー法を用いて **Exo** を濃縮したものを、何れにおいても、確かに、共培養系においてこれら細胞外小胞微粒子の粒径〔50-150 μ m〕に相当する画分が増強され、この点でも、両細胞間の細胞干渉が確認された。〔図-4〕

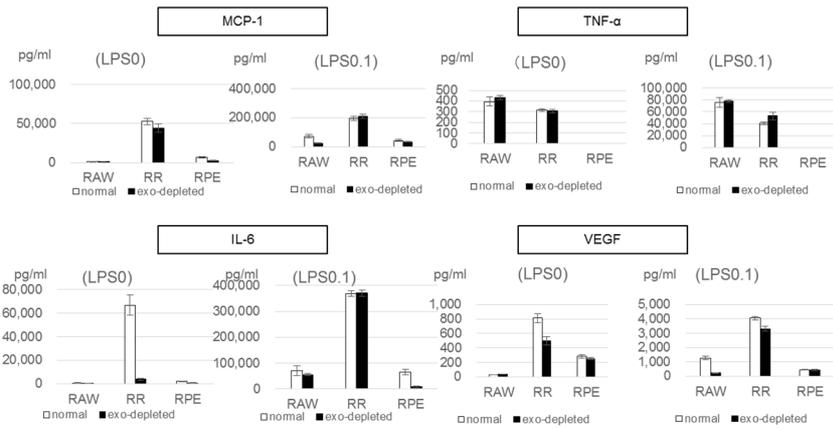
図-5. エクソソーム (Exo) は、濃度依存的に炎症性サイトカインとVEGFの産生を増強



そこで、次に共培養上清を超遠心により濃縮し半精製した **Exo** を培養系に添加することで、上記に観察した機能的細胞干渉が再現できるかを確認した。図-5に示すように、**MCP-1**、**IL-6**、**VEGF** 産生は添加 **Exo** 量依存的に再生増強が認められ、一方、**TNF- α** 産生抑制効果は添加 **Exo** 量依存的に **RAW264.7** からの産生増強が確認された。

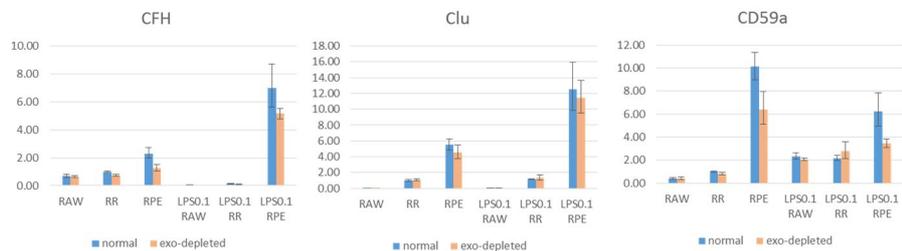
機能的細胞干渉に今一つ、補体活性化抑制因子の遺伝子発現抑制効果を我々は報告している。**Exo** 含有 **FBS** を用いた培地使用では補体活性化因子に係る効果が明確でなく、**Exo** 非含有の **FBS** の培養系を用いても検討した。炎症性サイトカイン、**VEGF** 産生増

図-6. EXO非含有FBSを用いて作成した培地での共培養効果



強、**TNF-α**産生抑制は上記同様に確認された〔**図-6**〕。また、**図-7**に示すように、補体活性化抑制因子 **CFH**, **Clusterin (Clu)** 並びに **CD59** の遺伝子発現も明確に確認された〔**図-7**〕。

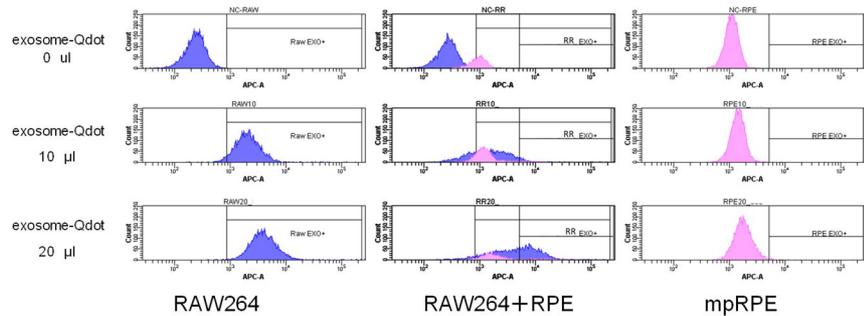
図-7. 細胞干渉による補体活性化抑制因子の遺伝子発現抑制



exo-depleted FBSでも通常のFBSと同様の効果

図-8. RPEの分泌するExoはMpsに選択的に取り込まれる

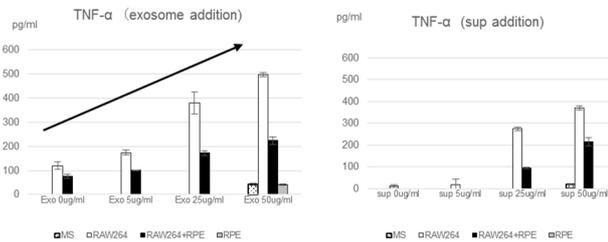
図-8には **RPE** の産生する **Exo** が **Mps** に選択的に取り込まれることを示す。



此の **RPE** 由来 **Exo** が確かに **Mps** に働いて、**TNF-α**を濃度依存的に産生することを**図-9**に示す。

以上のことより、**図**に示すように **RPE** → **Exosome** → **Mps** → **TNF-α** → **RPE** → **MCP-1, IL-6, VEGF** の経路で、細胞干渉による炎症増悪が生じるものと結論付けた。

図-9. Mps由来TNFαはRPE分泌Exoにより産生増強される



Cascade incorporating the observations in this study

RPE → Exosome → Mps → TNF-α → RPE → MCP-1, IL-6, VEGF

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yohei Ohtsuki, Atsushi Mukai, Eiko Ito, Morio Ueno, Shigeru Kinoshita, Chie Sotozono, and Junji Hamuro
2. 発表標題 Innate/inflammatory cross talk between macrophages (Mps) and iPS-derived RPE cells are mediated by exosomes secreted by RPE cells: Proposal of new trait for the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD)
3. 学会等名 ISEV2019 Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----