

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11485

研究課題名(和文) 傷害網膜における組織再構築に関わる細胞間シグナルの解明とその制御機構の探索

研究課題名(英文) A study for intercellular signals and their control mechanisms involved in tissue remodeling in injured retina

研究代表者

福島 美紀子 (Fukushima, Mikiko)

熊本大学・病院・非常勤診療医師

研究者番号：10284770

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)：網膜再生治療の臨床応用に向けた基礎研究として組織再構築に関わる細胞間シグナルとその制御機構を明らかにするため、傷害モデルを用いた眼内生理活性分子の探索、組織瘢痕に関わる細胞増殖、分化転換の制御、色素上皮細胞-血管内皮相互作用について検討を行なった。傷害網膜では炎症性サイトカインであるインターロイキン-6ファミリーの発現上昇が幹細胞分化に影響を与えていることを示し、抗炎症薬によるグリア抑制効果を明らかにした。組織瘢痕抑制に関しては上皮-間葉細胞分化転換におけるDNAメチル化阻害剤の効果を示した。さらにエクソソームを介した網膜色素上皮細胞の血管内皮への細胞シグナルを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治網膜疾患に対する新たな治療戦略のひとつとして網膜移植再生治療が期待されている。一方、対象となる疾患の病態は多彩であり、傷害された組織を再構築し機能を回復させるに十分な治療技術となるには、まだ克服すべき課題がある。実際の移植再生治療を必要とする網膜疾患は組織傷害が進行し神経細胞のみならず組織全体が機能不全に陥った状態にある。神経細胞が機能を発揮するためには、神経系のみならず脈管系、免疫系の生体システムが関与する幹細胞の支持環境を宿主網膜に誘導する必要がある。本研究は組織再構築に関わる細胞間シグナルに着目したもので網膜移植治療の臨床応用に向けた多岐の課題を打破するための一石となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study was related to the intercellular signals involved in tissue remodeling and its control mechanism as a basic research for the clinical application of the retina regeneration therapy. It was possible to suppress glial differentiation of neural stem cells transplanted as well as the expression of CNTF belonging to an inflammatory cytokine by a non-steroidal anti-inflammatory agent administered in the retinal injury animal model. Then the effect of DNA methylation inhibitors on epithelial-mesenchymal cell transdifferentiation was shown to suppress tissue scarring. It was suggested an indirect inhibitory effect of the inhibitor on the COL1A2 promoter. Furthermore, we demonstrated that RPE cells stimulated with different growth factors secreted their exosomes with different effects on the angiogenic response of human umbilical vein endothelial cells. We suggested the exosomes was a cell signal to vascular endothelium of retinal pigment epithelial cells for tissue remodeling.

研究分野：眼科学

キーワード：眼発生・再生医学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病網膜症や加齢黄斑変性症は本邦の失明原因の上位にあり、患者数は増加の一途にある。その発症、進展のメカニズムに関しては分子レベルでの病態解析から VEGF 阻害薬に代表される新しい治療の開発により視機能喪失のリスクは飛躍的に改善しつつある。しかしながら、既に重篤な状態に陥り、機能喪失した網膜疾患に対する有効な治療法は現時点ではない。

(2) 難治網膜疾患に対する新たな治療戦略のひとつとして、幹細胞を用いた網膜移植が試みられている。すでに本邦でも高橋らにより iPS 細胞を用いた加齢黄斑変性症に対する色素上皮シート移植が臨床応用され、移植治療の有効性、安全性が検証されつつあり、難治網膜視神経疾患への応用も試みられている。一方、対象となる疾患の病態は多彩であり、傷害された組織を再構築し機能を回復させるに十分な治療技術となるには、まだ克服すべき課題がある。

(3) 実際の移植再生治療を必要とする網膜疾患は組織傷害が進行し、神経細胞のみならず組織全体が機能不全に陥った状態にある。すなわち網膜移植再生治療において移植された神経細胞が機能を発揮するためには、代償性増殖の1つであるグリオーシス、血管のアポトーシス制御を含め、神経系のみならず脈管系、免疫系の生体システムが関与する幹細胞の支持環境を宿主網膜に誘導する必要がある。この観点から成人脳の障害後に生じる神経再生においてグリア反応、血管誘導を制御する薬物を用いた治療が臨床応用されつつある。網膜再生移植治療の基盤研究として臨床応用可能な制御機構の解明が必須と考え本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

網膜幹細胞の分化増殖能に影響を与える眼内因子の探索を行ない、疾患モデル、傷害網膜での網膜再生に影響を与える分子メカニズム、細胞間相互作用について明らかにする。傷害時後に生じるミューラーグリアの一過性の代償性増殖、その後構築されるグリオーシスについて比較検討する。また軸索進展、細胞増殖、グリオーシス、グリア分化、リプログラミングに影響を与える生体内で投与可能な薬物を探索し、その制御を試みる。

3. 研究の方法

(1) 網膜傷害モデルにおける炎症性サイトカインの発現と制御機構の解析

成体ラットにグルタミン酸受容体阻害剤 N メチル D アスパラギン酸 (NMDA) 硝子体内投与による網膜神経障害モデル、網膜光傷害モデルを作成し、傷害網膜内における IL-6 ファミリーに属する網毛様体由来神経栄養因子(CNTF)、IL-6 受容体構成分子である glycoprotein (gp)-130 の発現についてウェスタンブロット法を用いて経時的に調べた。非ステロイド抗炎症剤(NSAID)を傷害モデルラット腹腔内に投与し CNFT、gp130、グリア細胞線維性酸性タンパク質(GFAP)の発現制御効果について検討した。網膜傷害モデルを作製したのち、網膜傷害モデルに胎生 14 日マウス胎仔終脳より精製した神経前駆細胞を移植し、宿主網膜内における移植細胞の分化を免疫組織学的方法で観察した。

(2) 軸索進展に関わる薬物の探索

ラット成体網膜より Thy-1 抗体を用いたパンニング法により網膜神経節細胞を単離し、アデノシンによる神経突起伸長促進効果を見た。アデノシン受容体 A1、A2A、A2B、A3 サブタイプに対する特異的作動薬を添加し神経突起伸長、ELISA、ウェスタンブロット法を用いた Akt のリン酸化発現を見た。さらにラット視神経挫滅モデルを作成し *in vivo* での軸索再生効果について解析を行った。

(3) 線維芽細胞の形質転換に影響を及ぼすエピジェネティック制御の検討

ヒト線維芽細胞(HConF)培養上清中に DNA メチル化酵素阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC)を添加後、形質転換増殖因子(TGF)- β 2 を作用させ形質転換を誘導させた。5-aza-dC の形質転換制御を、ウェスタンブロット法を用いて α -SMA、fibronectin、type I collagen、Smad3、リン酸化 Smad3、Akt、リン酸化 Akt の発現、RT-PCR を用いて ACTA2、FN1、COL1A1 の発現を調べ検討した。ルシフェラーゼアッセイで 5-aza-dC の COL1A2 プロモーター発現の影響を見た。

(4) 網膜色素上皮細胞由来エクソソームの血管新生に対する影響

組織網膜幹細胞の候補である網膜色素細胞(RPE)のエクソソームを介した血管新生への影響を検討した。ヒト RPE (ARPE-19) に TGF- β 、腫瘍壊死因子(TNF)- α 、TGF- β + TNF- α で形質転換を誘導し、エクソソームを抽出、血管新生関連プロファイルを比較検討した。各エクソソームを血管内皮細胞 (HUVECs)へ添加し細胞増殖、Transwell migration assay、tube formation assay を行い血管新生作用について解析を行った。

4. 研究成果

(1) 網膜傷害モデルにおける炎症性サイトカインの発現と制御機構

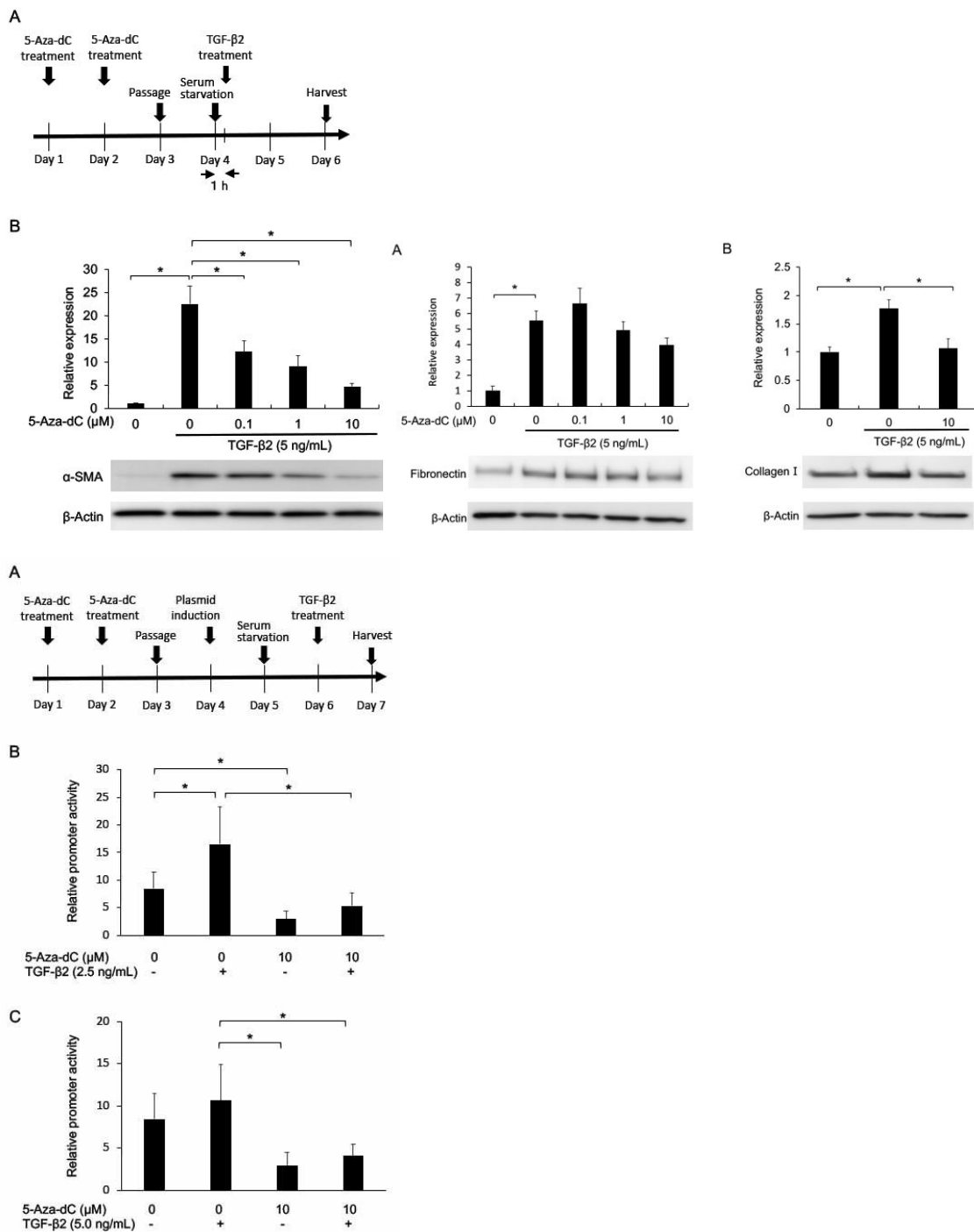
NMDA 投与後網膜内グリア細胞 (ミューラーグリア、アストロサイト、ミクログリア) において gp130 の発現上昇は傷害 8 時間、24 時間後に認められ、傷害後 1 週間まで有意に増加していた。NSAD の投与によりその発現は有意に抑制された。網膜内グリア細胞における CNTF の発現は傷害後 1 週間後に上昇するものの、NSAID の投与によりその発現は有意に抑制された。CNTF 陽性ミューラーグリアでは早期に nestin 陽性、時間とともに GFAP が共陽性となった。移植後網膜においても網膜内グリア細胞の CNTF の発現が長期に認められた。NSAID 投与により移植幹細胞のグリアへの分化が抑制されたもののニューロン分化の割合は不変であった。

(2) 軸索進展に関わる薬物の探索

受容体特異的作動薬のうち A3 受容体特異的作動薬投与のみ網膜神経節細胞の神経突起進展の促進、Akt リン酸化の発現増強が観察された。Akt 阻害投与により神経突起進展の促進効果は消失した。視神経挫滅モデルにおいても A3 受容体特異的作動薬の軸索再生の促進効果が有意に認められた。

(3)線維芽細胞の形質転換に影響を及ぼすエピジェネティック制御の検討

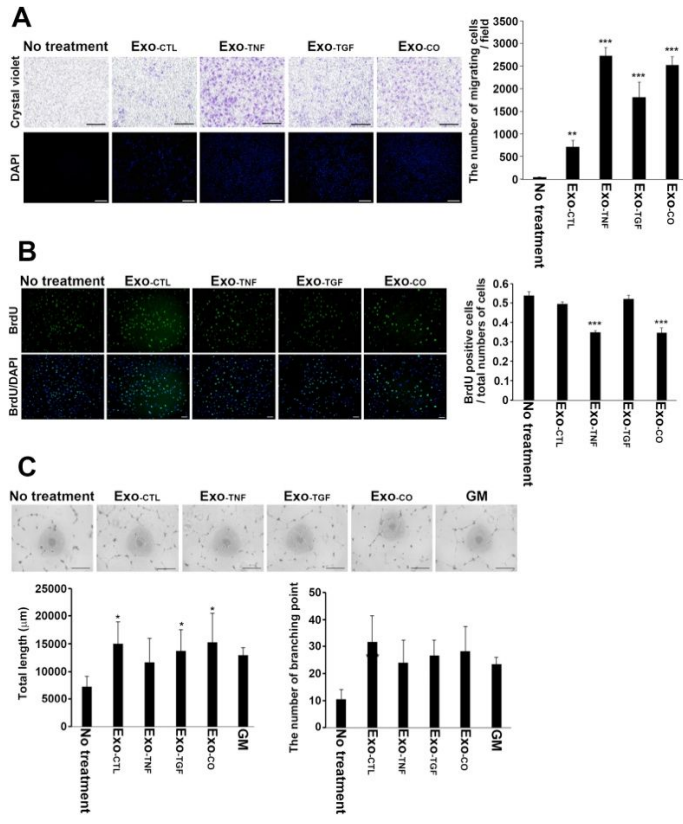
5-Aza-dC 前投与により TGF- β 添加による α -SMA、コラーゲン I の発現増強効果が有意に抑制された。Fibronectin の発現抑制は認められなかった。ルシフェラーゼアッセイでみた COL1A2 プロモーター活性は 5-aza-dC 添加により強力に抑制されることが明らかとなった。<Fig.1>



<Fig.1>

(4)網膜色素上皮細胞由来エクソソームの血管新生に対する影響

TNF- α 、TNF- α + TGF- β 添加で血管新生関連エクソソームの発現増強が認められた。増殖因子処理によるエクソソームの血管新生効果を検討した結果、増殖因子添加なしもしくは TGF- β 添加の ARPE-19 由来エクソソームでは HUVECs の tube formation の促進、TNF- α 、TNF- α + TGF- β 添加の ARPE-19 由来エクソソームでは HUVECs の増殖抑制が認められ、増殖因子の違いによりエクソソーム作用効果が異なることが明らかになった。<Fig.2>



<Fig.2>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Inoue-Mochita M, Inoue T, Kojima S, Futakuchi A, Fujimoto T, Sato-Ohira S, Tsutsumi U, Tanihara H.	4. 巻 293
2. 論文標題 Interleukin-6-mediated trans-signaling inhibits transforming growth factor- signaling in trabecular meshwork cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 10975-10984
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.003298.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakashima KI, Iwao K, Inoue T, Haga A, Tsutsumi T, Mochita MI, Fujimoto T, Tanihara H.	4. 巻 170
2. 論文標題 Stimulation of the adenosine A3 receptor, not the A1 or A2 receptors, promote neurite outgrowth of retinal ganglion cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp Eye Res.	6. 最初と最後の頁 160-168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exer.2018.02.019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tsutsumi-Kuroda U, Inoue T, Futakuchi A, Shobayashi K, Takahashi E, Kojima S, Inoue-Mochita M, Fujimoto T, Tanihara H.	4. 巻 170
2. 論文標題 Decreased MCP-1/CCR2 axis-mediated chemotactic effect of conjunctival fibroblasts after transdifferentiation into myofibroblasts.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp Eye Res.	6. 最初と最後の頁 76-80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exer.2018.02.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yonemura H, Futakuchi A, Inoue-Mochita M, Fujimoto T, Takahashi E, Tanihara H and Inoue T	4. 巻 25
2. 論文標題 DNA methyltransferase inhibitor suppresses fibrogenetic changes in human conjunctival fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Vision	6. 最初と最後の頁 382-390
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fukushima A, Takahashi, E, Saruwatari J, Tanihara H and Inoue T	4. 巻 22
2. 論文標題 The angiogenic effects of exosomes secreted from retinal pigment epithelial cells on endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep.	6. 最初と最後の頁 100760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100760	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	井上 俊洋 (Inoue Toshihiro) (00317025)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	
研究分担者	高橋 枝里 (Takahashi Eri) (60622602)	熊本大学・病院・講師 (17401)	
研究分担者	伊藤 康裕 (Ito Yasuhiro) (70380996)	熊本大学・病院・助教 (17401)	