

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09778

研究課題名（和文）角膜内皮細胞運命を規定する代謝リプログラミングの階層性と組織機能不全病態の解明

研究課題名（英文）Elucidation of hierarchical metabolic reprogramming to determine corneal endothelial cell fate and corneal endothelial dysfunction

研究代表者

丸山 悠子（Maruyama, Yuko）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・特任助教

研究者番号：60516003

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：培養ヒト角膜内皮細胞（chCECs）の成熟分化細胞と相転移細胞の亜集団間で、エネルギー代謝に有意な差を認めた。細胞におけるミトコンドリア機能差異と同様の差異が、健常人と角膜内皮機能不全患者の角膜内皮組織にも存在することを見出した。さらに環境因子であるmiR-184がミトコンドリアにおけるエネルギー代謝特性を変動させること、加えてmiR-184の標的であるCD44の発現割合の差によってmiR-184の機能が変化することが示唆された。以上の結果より、ミトコンドリア機能を細胞の本質的機能の指標として確立できることが判明し、ミトコンドリア代謝機能の偏奇が角膜内皮機能不全の病態である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感覚器障害に対する適正医療の提供は、超高齢社会である本邦の根幹的課題である。フックス角膜内皮ジストロフィ関連患者は欧米では300万人を超す。角膜内皮機能不全の分子病態解明への手立ては、臨床現場からも強く求められているにもかかわらず世界的に手探り状態である。その一因として、分子病態解析のモデル系が無かったことが挙げられる。本研究では、分化/成熟度の異なるchCEC亜集団で、ミトコンドリアエネルギー代謝系（基質特異性、代謝酵素依存性）に階層性が有ることを見出した。分化度の異なるchCEC亜集団の代謝リプログラミングの階層性破綻を角膜内皮機能不全の疑似モデルとして、新規分子標的の創案が可能となった。

研究成果の概要（英文）：We found significant differences in energy metabolism between subpopulations of mature differentiated and cell-state transition cells of cultured human corneal endothelial cells (chCECs). Similar differences in mitochondrial function in chCECs were found to exist in corneal endothelial tissue from healthy subjects and patients with corneal endothelial dysfunction. Furthermore, we suggest that miR-184, an environmental factor, alters mitochondrial energy metabolism, and that miR-184 function is altered by differences in the expression rate of CD44, a target of miR-184. These results suggest that mitochondrial function can be established as an indicator of essential cellular function, and that a deviation in mitochondrial metabolic function may be the pathogenesis of corneal endothelial dysfunction.

研究分野：眼科学、角膜内皮、緑内障 再生医療

キーワード：角膜内皮細胞 ミトコンドリア エネルギー代謝 miR-184

1. 研究開始当初の背景

感覚器障害に対する適正医療の提供は、超高齢社会である本邦の根幹的課題である。感覚情報の 8 割は視覚経由で入り、個の尊厳の礎をなす。フックス角膜内皮ジストロフィ (FECD) 関連患者は欧米では 300 万人を超す。角膜内皮機能不全の分子病態解明への手立ては、臨床現場からも強く求められているにもかかわらず世界的に手探り状態である。その一因として、分子病態解析のモデル系が無かったことが挙げられる。我々の所属するグループは、培養ヒト角膜内皮細胞 (cHCECs) の前房内注入再生医療により角膜内皮機能不全の修復に世界で初めて成功した (木下ら, *New Engl J Med.* 2018)。固より培養細胞は不均質であるが、再生医療には注入細胞の機能的均質性が不可欠である。体性細胞の脱分化による増殖性未分化細胞の確保と増殖後の再分化法の確立の過程で必然的に混在する分化/成熟度の異なる cHCEC 亜集団では、ミトコンドリアエネルギー代謝系(基質特異性、代謝酵素依存性)に階層性の有ることを見出している。分化度の異なる cHCEC 亜集団の代謝リプログラミングの階層性破綻を角膜内皮機能不全の疑似モデルとして、新規分子標的を創案する。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 生化学的指標を超える細胞機能特性評価の確立、(2) cHCEC 亜集団における代謝機能の階層性破綻の *Vivo* 病態との関連付け、(3) エネルギー代謝特性の変化と細胞競合現象との関連評価、(4) 環境因子 (分泌型 miRNA・Exosome) によるエネルギー代謝特性の変動の明確化、の 4 項目を目的とする。

cHCEC 亜集団をモデル対象とすると共に、Guttiae を有する角膜組織や落屑性緑内障患者の角膜組織を対照組織として用いる。細胞分化は、細胞内代謝応答の変化により代謝リプログラミングが惹起され、引き続きエピジェネティック(EpiG)修飾により多様な遺伝子の協奏的発現変動が随伴する(Daley ら, *Cell Metab.* 2015) (Moussaieff ら, *IBID.* 2016)。EpiG 修飾に係る酵素基質や補酵素は代謝産物であることも判明している。

我々が独自に保有する cHCEC 亜集団を少なくとも 3 種以上対象として、培養環境や眼前房環境への適応戦略の要に位置するエネルギー代謝の階層性の可塑性を明確にする。角膜機能不全患者病態に係る代謝産物や、miRNA (miR) を含む眼前房環境因子への組織適応応答と照合することで、分化機能破綻病態の修復を細胞内代謝経路の可塑性に求める世界初の試みである。病態の分子動態を、細胞分化・脱分化機能破綻におけるエネルギー代謝経路の環境適応戦略に求める。我々の Gr は、上述の cHCECs 亜集団はエネルギー代謝特性の異なる複数の細胞機能亜集団に選別されたとした (IOVS.57:4385,2016, IOVS.57:4452,2016)。細胞亜集団の存在と亜集団間のエネルギー代謝の違いに着目し、成熟分化細胞の主たるエネルギー代謝がミトコンドリア OXPHOS 系にあることから (IOVS.57:4393,2016, IOVS.57:5509,2016)、p53→miR→CD44 抑制→ミトコンドリア代謝/糖代謝といった、miR が果たす役割を明らかにする。

3. 研究の方法

前房水からの miRNA 抽出

角膜内皮機能不全 (水疱性角膜症:BK) 患者と白内障患者 (正常対照者:CAT) の前房水は同意の下、手術時に採取した。前房水は miRNeasy Mini Kit Serum/Plasma (QIAGEN) を用いて手順書通りに抽

出した。

細胞培養

ヒト角膜内皮細胞 (HCECs) の培養は手順書通りに行い、継代数 **P2~6**、および **cHCECs** が成熟した後 (播種後 **35** 日以降)、実験に使用した。いずれの細胞も **37°C 5% CO₂** の環境で培養した。

トランスフェクション

miR-184 mimic、**miR-184 inhibitor**、**control mimic**、**control inhibitor** はいずれも **Thermo Scientific** で購入した。トランスフェクション試薬には **DharmaFECT1 (Dharmacon)** を用い、それぞれ終濃度が **50 nM** になるように細胞に添加し、**37°C 5% CO₂** の環境で **72~96** 時間培養した。

細胞免疫染色

cHCECs を **4% PFA** で固定後、抗 **aconitase 2 (ACO2)** 抗体 (**abcam**)、抗 **isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2)** 抗体 (**abcam**) および抗 **pyruvate dehydrogenase (PDH)** 抗体 (**abcam**) を用いて細胞免疫染色を行った。

細胞外 Flux Analyzer (ミトコンドリア代謝)

cHCECs 内の代謝を **XFe24 細胞外 Flux Analyzer (Agilent Technologies)** を用いて測定した。**cHCECs** を **XF24 Flux Analyzer** に播種し、手順書に従ってミトストレステストを実施した。測定後に、細胞を **4% PFA** で固定し **DAPI (Dojindo)** で核染色を行い、播種細胞数を **Cell Insight (ThermoFisher Scientific)** でカウントし、補正した。

ミトコンドリア膜電位測定

cHCECs のミトコンドリア膜電位測定には、**MT-1 MitoMP Detection kit (Dojindo)** を使用した。すべてのミトコンドリア染色には、**MitoBright LT Green (Dojindo)** を用いた。細胞を **37°C 5% CO₂** の環境で培養後、**4% PFA** で固定し、蛍光顕微鏡 (**BZ-9000, Keyence**) で観察した。取得した画像は **ImageJ** を用いて蛍光を数値化し、**MT-1/MitoBright LT Green** の比を求めた。

統計分析

データは、**3** 回以上測定の前平均±SD として表す。統計分析は、スチューデント **t** 検定を使用した。サンプルは、**P < 0.05** で有意に異なると見なした。

4. 研究成果

(1) 生化学的指標を超える細胞機能特性評価の確立

cHCECs において、分化成熟に影響を与える環境因子として、**ROCK** 阻害剤、**TGF-β** 受容体阻害剤、**EGF** などの添加物がある。細胞外 **Flux Analyzer** による **OCR (酸素速度)/ECAR (細胞外液酸性化速度)** 解析でこれら添加物の有無によりミトコンドリア機能、特に最大呼吸量が大きく変化し、成熟分化細胞を生成するために必要な添加物である **ROCK** 阻害剤を添加すると **OCR** は上昇し、添加培養すると成熟分化細胞割合が減少する **TGF-β** 受容体阻害剤、**EGF** を添加すると **OCR** が低下した。**cHCECs** 注入再生医療に用いる細胞の製法改善の指標にもなることが判明した。さらに、**cHCECs** の成熟分化細胞亜集団と相転移 (**CST**) 細胞亜集団の両者では **OCR** に有意な差を認めることが判明し、ミトコンドリア機能評価を細胞の本質的機能の指標として確立できることが判明した。

(2) cHCEC 亜集団における代謝機能の階層性破綻の Vivo 病態との関連付け

cHCEC 亜集団における **OCR** の差異と同様の差異が、健常人と角膜内皮機能不全患者の角膜内皮組織にも存在することを研究用ドナー角膜組織の **ex vivo** 組織培養を利用し見出した。一方、成熟分化細胞と **CST** 細胞では最大呼吸量に大きな差が存在するが、**Pyruvate** 添加でその差異が消失することを見

出している。両細胞間の代謝階層性がピルビン酸カルボキシラーゼ活性や TCA 経路に係る **isocitrate dehydrogenase1/2 (IDH1/2)**、**aconitase1/2 (ACO1/2)**、リンゴ酸デヒドロゲナーゼなどの代謝酵素異性体の細胞内局在の差異によることが判明した。同時に、代謝基質としてのグルタミンの要求性：**Anapleprosis** の異なることも判明した。

(3) エネルギー代謝特性の変化と細胞競合現象との関連評価

環境適応能力で勝る細胞が劣る細胞を能動的に排除する「細胞競合」の破綻が角膜組織の機能不全病態に係るか否かの検証のために高齢、若年双方の正常ドナー由来の角膜内皮組織と角膜内皮機能不全患者由来の角膜内皮組織のエネルギー代謝機能を細胞外 **Flux Analyzer** を用いて解析した。6 歳から 70 歳までの正常ドナー由来の角膜内皮組織 ($n=12$) の最大呼吸能には差はなかった。一方、角膜内皮機能不全患者由来の角膜内皮組織の最大呼吸能は同年代の正常ドナー由来の角膜内皮組織に比して有意に低下していた。この結果は、で明らかとなった **cHCECs** における成熟分化型細胞に比して、**CST** 細胞で最大呼吸能が有意に低下していたことに対応する。角膜内皮機能不全患者由来の角膜内皮組織と **cHCECs** の **CST** 細胞では共通して **miR34a**, **378** が低発現であること、**miR34a** はピルビン酸→乳酸経路を触媒する **Lactate Dehydrogenase A** を阻害することで、解糖系をミトコンドリア呼吸に偏奇させるとされていることと併せて、ミトコンドリア代謝機能の偏奇が角膜内皮機能不全の病態である可能性が示唆された。

(4) 環境因子 (分泌型 miRNA・Exosome) によるエネルギー代謝特性の変動の明確化

環境因子 (分泌型 **miRNA**・**Exosome**) によるエネルギー代謝特性の変動の明確化のために前房水中の **miRNA** 特性を検討した。角膜内皮機能不全 (水疱性角膜症：**BK**) 患者と白内障患者 (正常対照者：**CAT**) の前房水中の **miRNA** を解析した。**BK** 群と **CAT** 群のそれぞれの前房水に高発現する上位 50 の **miRNA** を抽出し比較した。**BK** 群のみで抽出された **miRNA** は 24 種、**BK** 群と **CAT** 群の双方で抽出された **miRNA** は 73 種、**CAT** 群のみで抽出された **miRNA** は 24 種であった。**miR-184**, **miR-24-3p**, **miR-92b-5p** は **BK** 群と **CAT** 群の双方で抽出され、**BK** 群に比して **CAT** 群で有意に高発現であった。**cHCECs** 亜集団で、**CST** 細胞に比して成熟分化細胞で高発現している **miR34a** は、**BK** 群と **CAT** 群の双方で低発現であった。**miR-184**, **miR-24-3p**, **miR-92b-5p** は培養ヒト角膜内皮細胞の培養上清中でも高発現で、**miR-184**, **miR-24-3p** は **CST** 細胞に比して成熟分化細胞で有意に高発現であった。**miR-184** は培養上清から抽出した細胞外小胞 (**EVs**) 中でも高発現であった。

細胞間コミュニケーションにおいて **EVs** 含有 **miRNA** は効率的に働くとされている。**miR-184 inhibitor** が培養ヒト角膜内皮細胞亜集団のうち成熟分化細胞において、ミトコンドリア膜電位の脱分極を誘導し、生合成に係る **peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1- α (PDC1 α)**, **voltage-dependent anion channel 1(VDAC1)**, **mitochondrial transcription factor A (TFAM)** の発現を低下させることを確認した。

miR-184 は **CST** 細胞に比して、成熟分化細胞で有意に高発現であり、かつ培養上清から抽出した **EVs** 中でも高発現であったことから、**miR-184 mimic** が **cHCECs** 亜集団のうち、**CST** 細胞の性質を成熟文化細胞様に向上することができるのか検討を行った。**miR-184 mimic** を導入した **CST** 細胞では、ミトコンドリア膜電位を増加させた (図 1a)。このとき、ミトコンドリア機能に係る **ACO2**, **IDH2**, および **PDH** の分子発現の増加が確認された。さら

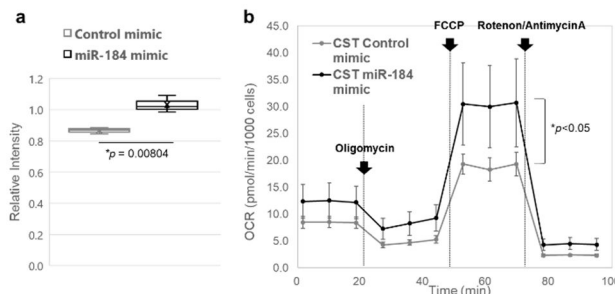


図 1. **miR-184 mimic** によるミトコンドリア代謝変動

に、エネルギー代謝機能を細胞外 **Flux Analyzer** を用いて解析したところ、**miR-184 mimic** 導入 **CST** 細胞では **OCR** が有意に上昇していた(図 **1b**)。一方で、**ECAR** に有意な差はみられなかった。いずれの結果でも、同じ **CST** 細胞でも **CD44** 発現の割合が高い細胞ほど、**miR-184 mimic** による効果がより得られる傾向がみられた。対して、**CST** 細胞の中でも **CD44** 発現が低い細胞では、**miR-184 mimic** 導入細胞で死細胞の増加が確認された。

これらの結果から、環境因子である **miR-184** がエネルギー代謝特性を変動させること、さらに **miR-184** の標的である **CD44** の発現割合の差によって、**miR-184** の機能が変化することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	上野 盛夫 (Ueno Morio) (40426531)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関