

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09805

研究課題名(和文) 網膜下線維化における網膜色素上皮を起点とした補体系経路の新たな作用機構の解明

研究課題名(英文) A new mechanism of the complement system pathway derived from the retinal pigment epithelium in subretinal fibrosis.

研究代表者

木村 和博 (Kimura, Kazuhiro)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60335255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：滲出型加齢黄斑変性(nAMD)は、脈絡膜から発生する新生血管の破綻により、視機能に影響をきたす疾患である。網膜下線維化組織は新生血管退縮後に形成され、視機能に影響を及ぼす。網膜下線維組織の形成には、局所炎症を伴う網膜色素上皮細胞(RPE)の上皮間葉系移行(EMT)が寄与する。補体は、生体防御、局所炎症で重要な働きをする。本研究では、RPEにおいてTGF- β 2が誘導するEMTにおいて、補体C5、マトリセルラー蛋白質のThrombospondinの発現が上昇し、 α -レチノイン酸受容体アゴニストによりこれらの発現亢進が有意に抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

nAMDでは網膜下線維組織形成がnAMDの長期的な視力障害の原因の1つである。RPEを起点としたEMT形成、組織収縮に伴い補体C5の発現上昇を見出したことから、補体が網膜下線維組織形成に関与する可能性を示唆した。同時に、マトリセルラー分子のThrombospondinの発現量も亢進することから、新たな細胞外基質の関与を明らかにした。今回の研究結果は、網膜下線維組織形成の新たな分子機序を示唆することから学術的意義は高い。これらの結果は、網膜下線維組織形成のみならず、他の難治性増殖性網膜硝子体疾患の予防、治療に対して新たな標的および指針を与えるものであり、社会的な意義の高い成果である。

研究成果の概要(英文)：Neovascular age-related macular degeneration (nAMD) is a disease that affects visual function due to the disruption of neovascular vessels arising from the choroid. Subretinal fibrotic tissue forms after neovascular regression and affects visual function. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) of retinal pigment epithelial cells (RPE) with local inflammation contributes to the formation of subretinal fibrous tissue. Complement plays an important role in biological defense and local inflammation. In the present study, the expression of complement C5 and the matricellular protein thrombospondin was upregulated in TGF- β 2-induced EMT in RPE, and their increased expression was significantly suppressed by α -retinoic acid receptor agonists.

研究分野：増殖性網膜硝子体疾患

キーワード：網膜硝子体疾患 線維化 網膜色素上皮 補体 レチノイン酸シグナル 細胞外基質

1. 研究開始当初の背景

滲出性加齢黄斑性 (nAMD) は、脈絡膜新生血管 (CNV) がその本態であり、抗 VEGF 薬治療が第一治療選択となり、一定の治療効果がえられるようになってきた。一方で、二次的に形成される網膜下線維組織が、抗 VEGF 薬の効果不良や視力予後不良の一因であることが明らかとなってきた。つまり如何にして網膜下線維組織形成を抑制するかが視機能維持に重要であり、線維組織形成阻害を標的とした特異的な治療法の開発がアンメットメディカルニーズである。組織に起こる創傷治癒過程の一つである線維化には、大きな組織損傷や慢性炎症のもと種々の因子や細胞が関与している。中でも、傷害組織において、 α -平滑筋型アクチン (α -SMA) などの分子マーカー発現、I 型コラーゲン (Col1) などの細胞外基質 (ECM) の異常な分泌・発現などを特徴とした筋線維芽細胞の出現、活性化が線維化に寄与する。特に、上皮細胞が、筋線維芽細胞への変化する現象を上皮 - 間葉系移行 (EMT) という。患者から採取した網膜下組織の組織学的検討では、EMT を起こした RPE、線維芽細胞、およびマクロファージなどの炎症細胞群とコラーゲンを中心とした細胞外基質を認めることが報告されている。さらに、RPE は局所炎症の制御、増悪に寄与している。網膜下線維組織による網膜障害を抑えるには、常在細胞の RPE の EMT 及びそれを取り巻く微小環境における炎症を効率よく制御することが重要である。

補体は、生体に侵入してきた病原体に対して活性化され、病原体を破壊する免疫系の因子である。血中に多く含まれ、補体が無秩序に活性化すると、自己組織を攻撃し、臓器に障害を引き起こす。nAMD において、補体活性化経路の抑制因子である補体因子 H (CFH) の関与が報告されている。さらに、nAMD の関連や nAMD 患者の組織学的検討から、ブルッフ膜周囲への炎症細胞の浸潤や RPE での VEGF 発現亢進に加え、ドルーゼン内に局所炎症に関与する C3 を始めとした補体因子群の存在も報告されている。nAMD の血清中における C3a、C4a、C5a 補体因子群濃度と網膜下線維組織形成との相関も報告されている。また、補体自体は他の細胞で筋線維芽細胞への誘導作用があることも示唆されている。現状、RPE を含めて眼組織における EMT へ補体が関与している報告はない。そこで申請者は、加齢黄斑変性の網膜下線維組織形成過程において、網膜下での局所的な補体因子群の発現、分泌および蓄積が線維組織形成に関与する可能性を考えた。すなわち、補体因子が新たな線維化誘導因子として RPE に直接作用し、RPE の EMT を促進するとともに、一方で、RPE あるいは EMT をきたした RPE 自体が cell-autonomous に局所的な補体因子の分泌、発現をきたし、網膜下での局所炎症遷延化に寄与し、線維組織形成に関与しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、nAMD の長期的な視力障害に網膜下線維組織形成が原因の 1 つであるという考えに基づいている。本研究では、RPE を起点として補体因子群による網膜下線維組織形成の分子機構を明らかにし、網膜下線維性瘢痕形成、収縮を抑制する新たな網膜疾患治療薬の確立を目指す。

3. 研究の方法

網膜下線維組織形成、収縮では、EMT による RPE の筋線維芽細胞への分化がその病態に関与する。TGF- β が EMT において中心的な役割をはたすが、一方で網膜下での持続的な慢性

炎症も EMT 更には EMT をきたした筋線維芽細胞の活性化に寄与する。異常に活性化された補体因子群は、網膜下での慢性炎症への関与が示唆されているが、網膜下線維組織形成、収縮において RPE の EMT にどのように寄与しているか不明である。さらに RAR- 経路との関連性も検討する。そこで以下の研究計画を立て進めた。

(1) RPE における補体因子群 (C3, C4 等) の EMT 誘導作用の解析

初期培養したヒトあるいはマウス RPE を用いて、 α -SMA を始めとした EMT マーカーや FN 等の細胞外基質発現への影響を生化学的に検討する。さらに、主要な EMT 誘導シグナルである TGF- β シグナル経路との関連を明らかにするため、TGF- β による RPE の EMT 誘導時での補体因子群の相乗作用も検討する。

(2) EMT 転化した RPE への補体因子群 (C3, C4 等) による活性化機序解析

TGF- β 処理にて EMT 誘導した RPE に対する補体因子群の増殖、細胞死、細胞遊走能など細胞高次機能への作用を検討する。さらに、炎症性サイトカイン、増殖因子、細胞外基質、蛋白質分解酵素 MMP s の分泌、発現を検討する。

(3) RPE における補体因子群 (C3, C4 等) 刺激による標的分子の解析

EMT をきたした筋線維芽細胞ならびに RPE における補体因子群の下流で変動する遺伝子群を次世代シーケンサーにて網羅的に解析する。

(4) マウス網膜下癥痕形成モデルにて補体因子群の作用を in vivo で解析

補体因子群の阻害剤 (化合物、siRNA, 阻害抗体など) を用いて表現型を組織学的に検討する。さらに、下流の標的分子についても同様の検討を行う。

(5) EMT に関与する RAR シグナル経路と補体活性化経路間のクロストークの解析 RARs アゴニスト、補体因子群による作用機序、関連分子、シグナル経路等を解明する。同様に、マウス網膜下癥痕形成モデルにて相乗効果等を in vivo で検討する。

4. 研究成果

滲出型加齢黄斑変性 (nAMD) は、脈絡膜から発生する新生血管の破綻により、視機能に影響をきたす疾患である。さらに、二次的に形成される網膜下線維化組織が視力予後に影響を及ぼすことが知られている。網膜下線維組織形成には、網膜色素上皮細胞 (RPE) が中心的な役割を果たす。同時に、線維性組織周辺に種々の炎症細胞浸潤をみとめることから、網膜下での局所炎症が線維化の病態に大きく寄与すると考えられる。生体防御、局所炎症で重要な働きをする補体は、病理組織学的検討や遺伝子解析などから、nAMD の発症、増悪に関与することが示唆されている。本研究の目的は、RPE を起点とし、網膜下線維化形成における炎症因子特に補体因子群との相互作用明らかにすることにある。申請者らは、線維化誘導因子の TGF- β 2 が初期培養したマウス RPE における細胞収縮、上皮間葉系移行 (EMT) を誘導し、レチノイン酸受容体 (RAR- α , β) がそれぞれの特異的な RAR- アゴニスト AM580, RAR- アゴニスト palovarotene を介するシグナルで抑制されることを明らかにしてきた。初期培養したマウス RPE を TGF- β 2 処理することにより、炎症関連因子である補体因子群において C5 が TGF- β 2 依存性に発現上昇することが明らかとなった。一方で、C3, C4, CFH などは有意な上昇は認められなかった。さらに RAR- アゴニスト AM580, RAR- アゴニスト palovarotene により C5 の発現亢進が有意に抑制されることを明らかにした。このことから、RPE において TGF- β 2 の下流で補体因子 C5 の発現亢進にはレチノイン酸シグナルが関与していることが示唆された。一方で、C5 処理にて RPE 細胞の増殖、細胞死、細胞遊走能には有意な効果は得られなかった。RPE の EMT についても、分子マーカーの発現等も観察さ

れなかった。一方で、補体因子と相互作用し、免疫反応に寄与するマトリセルラー蛋白質の Thrombospondin が TGF- β 2 依存性に発現亢進することを見出した。本研究結果から、RPE を起点とした慢性炎症に補体成分 C5 さらにマトリセルラー分子の Thrombospondin が協調的に作用し、レチノイン酸シグナルと共同して網膜下線維組織形成に関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Aoki R, Mikuni M, Yoshimoto T, Iwamoto N, Ohta M, Ogata T, Yamada N, Kimura K	4. 巻 12
2. 論文標題 Simultaneous vitreoretinal surgery and sclerokeratoplasty for keratoglobus with intraocular hemorrhage and extensive corneal rupture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Case Rep Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 841-847
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000518289	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 Yamashiro C, Tokuda K, Kobayashi Y, Higashijima F, Yoshimoto T, Ohta M, Ogata T, Ashimori A, Kobayashi M, Hatano M, Uchi SH, Wakuta M, Kimura K	4. 巻 11
2. 論文標題 Benzalkonium chloride-induced myofibroblastic transdifferentiation of Tenon's capsule fibroblasts is inhibited by coculture with corneal epithelial cells or by interleukin-10	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 16096-16096
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-94852-8	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 Kobayashi Y, Tokuda K, Yamashiro C, Higashijima F, Yoshimoto T, Ohta M, Ogata T, Ashimori A, Hatano M, Kobayashi M, Uchi SH, Wakuta M, Kimura K	4. 巻 11
2. 論文標題 Inhibition of epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelial cells by a retinoic acid receptor- agonist	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 11842-11842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-90618-4	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 Kobayashi Y, Watanabe S, Ong ALC, Shirai M, Yamashiro C, Ogata T, Higashijima F, Yoshimoto T, Hayano T, Asai Y, Sasai N, Kimura K	4. 巻 14
2. 論文標題 Early manifestations and differential gene expression associated with photoreceptor degeneration in Prom1-deficient retina	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dis Model Mech	6. 最初と最後の頁 dmm048962
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dmm.048962	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 Yin S, Liu X, Kobayashi Y, Nishina Y, Nakagawa R, Yanai R, Kimura K, Miyake T	4. 巻 165
2. 論文標題 A needle-type biofuel cell using enzyme/mediator/carbon nanotube composite fibers for wearable electronics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosens Bioelectron	6. 最初と最後の頁 112287-112287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2020.112287	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 Shimura M, (other 17 persons), Kimura K, Sugimoto M, Yamashiro K, Suzuki Y, Hikichi T, Washio N, Sato T, Ohkoshi K, Tsujinaka H, Kusuhara S, Kondo M, Takagi H, Murata T, Sakamoto T; Japan Clinical Retina Study (J-CREST) group	4. 巻 104
2. 論文標題 Real-world management of treatment-naive diabetic macular oedema: 2-year visual outcome focusing on the starting year of intervention from STREAT-DMO s	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br J Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 1755-1761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bjophthalmol-2019-315726	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 Shimura M, (other 17 persons), Kimura K, Sugimoto M, Yamashiro K, Suzuki Y, Hikichi T, Washio N, Sato T, Ohkoshi K, Tsujinaka H, Kusuhara S, Kondo M, Takagi H, Murata T, Sakamoto T; Japan Clinical Retina Study (J-CREST) group	4. 巻 104
2. 論文標題 Real-world management of treatment-naive diabetic macular oedema in Japan: two-year visual outcomes with and without anti-VEGF therapy in the STREAT-DME study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br J Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 1209-1215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bjophthalmol-2019-315199	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8件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 木村 和博
2. 発表標題 網膜剥離を合併した角膜混濁を有する瘢痕期末熟児網膜症の成人例
3. 学会等名 内視鏡研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村 和博
2. 発表標題 眼皮膚白皮症に増殖糖尿病網膜症を発症した1症例
3. 学会等名 第30回New-VitQの会 in Miyazaki (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤田 智子, 安川 力, 松原 央, 今泉 寛子, 石川 裕人, 木村 和博, 寺崎 寛人, 三田村 佳典, 村上 智哉, 村田 敏規, 水澤 裕太郎, 竹内 大, 高村 佳弘, 向後 二郎, 大路 正人
2. 発表標題 多施設共同後ろ向き研究におけるポリープ状脈絡膜血管症の治療成績
3. 学会等名 第60回日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村 和博
2. 発表標題 網膜色素変性症におけるグリオース形成の分子機序解明と新規治療薬の開発
3. 学会等名 世界網膜の日 in 岩手 JRPS第25回研究助成授賞式 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村 和博
2. 発表標題 DME治療を科学する
3. 学会等名 奈良県立医科大学眼科同窓会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木 連, 波多野 誠, 緒方 惟彦, 湧田 真紀子, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 無硝子体眼の治療抵抗性糖尿病黄斑浮腫に対してt-PA硝子体注射が有用であった一例
3. 学会等名 第74回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 徳田 和央, 山城 知恵美, 小林 由佳, 波多野 誠, 小林 正明, 藏満 保宏, 寺西 慎一郎, 山田 直之, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 網膜前駆細胞活性化におけるピルビン酸キナーゼM2アイソフォームの機能
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 由佳, 山城 知恵美, 小林 正明, 波多野 誠, 徳田 和央, 柳井 亮二, 木村 和博
2. 発表標題 RAR- agonistによるsubretinal fibrosisの抑制作用
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020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
研究分担者	林 謙一郎 (hayashi kenichiro) (90238105)	大阪大学・大学院医学系研究科・准教授 (14401)	

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
---------	---------