

令和 4 年 4 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16213

研究課題名（和文）眼球疾患におけるAIM関連食作用機構の役割の解明

研究課題名（英文）The role of AIM-associated phagocytosis in ocular diseases.

研究代表者

谷口 香織 (Taniguchi, Kaori)

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・特任助教

研究者番号：30746920

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：AIMは死細胞等の内因性異物除去を担う事から、末梢組織恒常性維持の要と言える。本研究では中枢神経系同様に血液網膜関門(BRB)で守られた環境である眼球におけるAIMの機能解明を試みた。AIMは主に房水産生部位の毛様体で検出された。血中からBRBを透過したAIMの一部はミクログリアへ取り込まれ、一部は色素上皮へと移行している様子から、房水中へ浸透する事すなわち眼球組織恒常性維持への寄与が示唆された。未だ十分な機能解明には至っていないが、加齢や網膜変性等の病態モデルにおいても、AIMが眼球の異物除去を担うことを示唆する結果が得られた。今後AIM過剰発現系等と組み合わせた検討が必要であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、末梢組織恒常性維持の要であるAIMによる内因性異物除去機構が、BRBにより守られた環境である眼球組織においても機能するか検証し、種々の眼球疾患制御へと発展させることである。本研究により今回得られた結果はAIMの眼球組織恒常性維持への寄与、さらには加齢や網膜変性等の病態モデルにおける異物除去機能を示唆するものである。今後の研究により眼球におけるAIM機能の全容が解明されれば、従来の対症療法を主とした治療法に対し、「内因性物質であるAIMによる異物除去」という眼球疾患制御への新たなアプローチの提案が可能となる。この点において社会的にも学術的にも非常に有意義なものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：AIM is a key molecule for clearance of self-pathogens by phagocytic system in peripheral tissue. In the present study, we sought to investigate the role of AIM in ocular tissue, which is restricted region by blood-retinal barrier (BRB) like the CNS. AIM was mainly detected in ciliary body, and passed through BRB. A portion of AIM derived from blood was incorporated by microglia, and majority of AIM migrated into pigment epithelium in the ciliary body. These results suggest AIM secretion into aqueous humor and that AIM possibly contribute to the ocular tissue homeostasis. Although the complete mechanisms still remain elusive, aged or retinal degenerative animal models also demonstrated that AIM probably governs clearance of self-pathogens including debris and dead cells within ocular tissue. Further studies using ocular disease models combined with AIM injection or AIM-overexpression system are warranted for investigation of precise mechanisms.

研究分野：分子生物学

キーワード：自己由来異物 眼球疾患 貪食細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体では死細胞、癌細胞、変性タンパク質、炎症性 DAMPs、終末糖化産物 (AGE)、酸化脂質などの生体由来の老廃物 (異物) が常時産出されている。これらは生命活動に伴い生涯産生され続けるため、生体機能の恒常性維持は食細胞機構によるそれら異物の除去に大きく依存する。除去機構の働きが不十分であれば、異物は蓄積され続け、やがて二次的に惹起される炎症・線維化から生体機能の破綻、すなわち疾患の発症を招くと考えられる。

Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM) はシステイン残基を豊富に含む、約 40 kDa の血中タンパク質であり¹、組織マクロファージにより産生・分泌され、IgM 五量体と結合し安定化された状態で循環している²。腎疾患をはじめとする種々の疾患発症を機に、IgM から遊離した AIM は死細胞等の内因性異物と結合し、食細胞による選択的且つ効率的な除去を促す働きをする事から、AIM は末梢組織の恒常性維持の要と言える^{3,4}。しかしながら、中枢神経系同様に血液網膜関門 (BRB) により守られた環境である眼球組織においても、AIM による食細胞の制御機構が機能しているかは未だ不明である。

(2) 眼球は加齢に伴う機能劣化が顕著に表れる器官であり、特に加齢に伴い罹患率が増加する緑内障と加齢黄斑変性は中途失明の原因となる代表的疾患とされる。

緑内障は網膜神経節細胞の細胞死を特徴とする神経変性疾患である。病態基盤として眼圧上昇が知られているが、その主因は線維柱帯への異常物質の付着による房水流出抵抗の増大と考えられている。疫学的知見として、自己由来異物であるアミロイド β が原因物質とされる進行性神経変性疾患であるアルツハイマー病患者では、健常者と比較して緑内障発症率が顕著に高い事が挙げられる。

加齢黄斑変性は、網膜色素上皮細胞 (retinal pigment epithelium; RPE) 内に蓄積された老廃物が、細胞外へ排出・蓄積される事で形成されるドルーゼンを特徴的所見とする。

此のように、これらの疾患発症には共通して自己由来異物の蓄積が関与していることを示す知見が数多く報告されている。

<引用文献>

- ① Miyazaki et al., 1999 J Exp Med 189, 413-422
- ② Arai et al., 2013 Cell Rep. 3: 1187-1198
- ③ Maehara et al., 2014 Cell Rep. 9: 61-74
- ④ Sugisawa et al., 2016 Sci Rep. 6: 35251

2. 研究の目的

本研究は、生命活動に伴い生涯産生され続ける生体由来の異物の蓄積が、加齢に伴う生体機能劣化や種々の疾患原因となるとの考えに基づき、異物除去を担う食作用機構の亢進による生体機能の恒常性維持を目指すものである。特に加齢に伴う機能劣化が著しい眼球に焦点を当て、異物蓄積が原因と考えられる眼球疾患と食作用機構制御の中心的機能を果たす血中タンパク質 AIM との関係解明を試みる。本研究により AIM が眼球組織恒常性維持へ寄与する事が明らかとなれば、「内因性物質 AIM による自己由来異物除去」という眼球疾患制御へ向けた新たなアプローチの提案が可能となり、将来的には、疾患予防や原因療法開発への発展を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 眼球における AIM 存在の検証

野生型マウス (C57BL/6J) 眼球を採取し、4% PFA に浸漬固定した。スクロース置換後、OCT compound で包埋凍結し、凍結切片を作製した。作製した切片を用いて免疫組織化学的解析により AIM 存在部位の検証を行った。

(2) 血中 AIM の眼球組織内への透過検証

AIM 欠損マウス (AIMKO) 左眼窩静脈叢へ 1 mg/mL の組換え AIM (rAIM) 溶液あるいは PBS (-) を 100 μ L 投与した。2 時間後、マウスをへパリン化し、PBS 灌流による脱血を行った。右眼球を採取し、免疫組織化学的解析により血中 AIM の眼球組織内への透過を検証した。

(3) メチルニトロソ尿素 (N-methyl-N-nitrosourea; MNU) 網膜変性モデル

MNU (10 mg/mL) を 60 mg/kg 単回腹腔内投与し、投与後 1, 3, 7, 10 日目に眼球を採取した。対称群は、非投与群あるいは PBS (-) を 60 mg/kg 単回腹腔内投与したものとした。動物を安楽死させた後に眼球を摘出し、各解析方法に適した処理を行なった。(使用動物: C57BL/6J, ICR, AIMKO (C57BL/6J), AIMKO (ICR) 7-8 週齢)

(4) rd8 網膜変性モデル

C57BL/6N マウスは *Crb1* 遺伝子に 1 塩基欠損変異 (retinal degeneration 8; rd8) があり、網膜において局所的な視細胞変性を生じる事が知られている。rd8 変異を持つ C57BL/6N と AIMKO (C57BL/6J) を交配し、rd8/AIMKO マウスを作製した。解析には rd8 変異ホモ接合体を使用した。

4. 研究成果

(1) 野生型マウス (WT) の健全な眼球における AIM 存在の有無について免疫組織化学的解析により検証したところ、房水産生部位である毛様体に AIM の存在を確認した。それらは主に血管 (CD31) 内部と一部のミクログリア (Iba1) で検出された (図 1)。

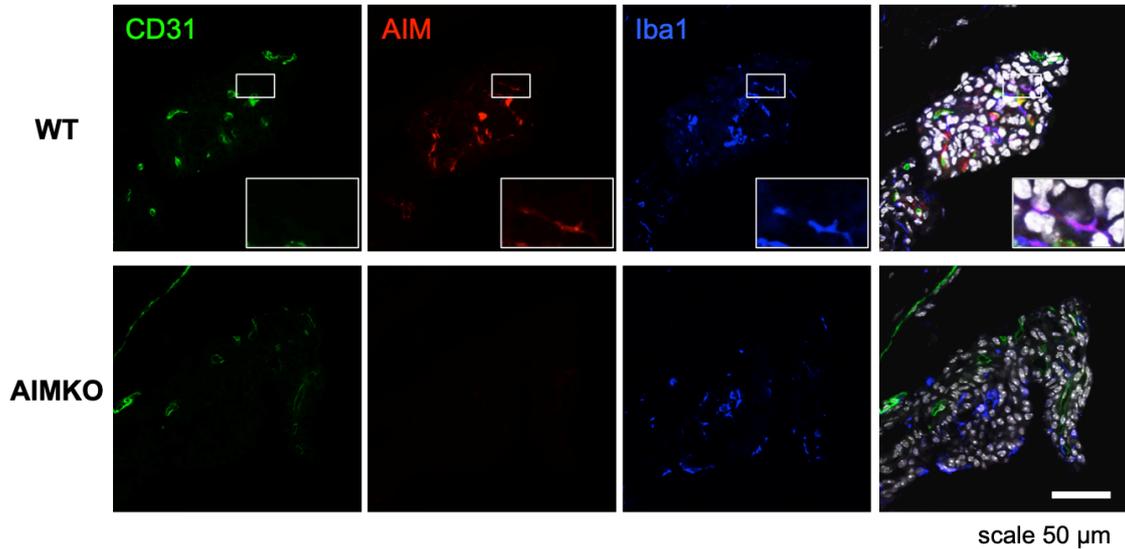


図 1. 毛様体における AIM 局在部位

さらに AIMKO を用いた rAIM 静脈投与実験により、血中 AIM の眼球内への取り込みの可能性について検証した結果、AIM は血中から BRB を透過する様子が示された (図 2)。その一部はミクログリアへ取り込まれ、一部は色素上皮 (P-cad) へと移行している様子から、血中 AIM は房水中へ浸透する可能性があると考えられる。これらの結果は、AIM が眼球の組織恒常性維持へ何らかの寄与する可能性を示唆するものである。

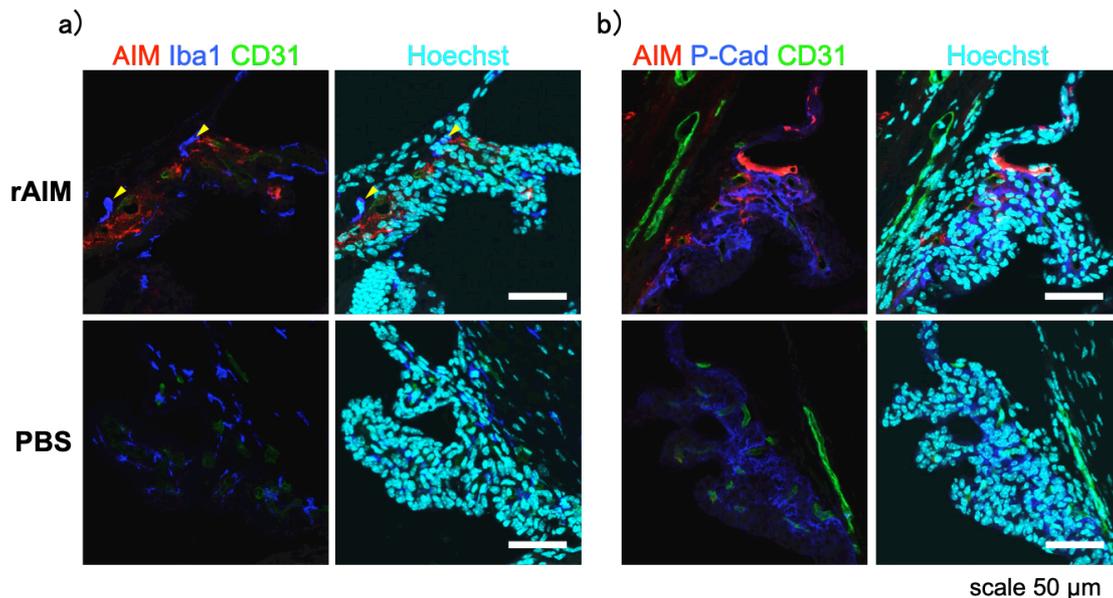


図 2. 血中 AIM の取り込み

a) ミクログリア b) 毛様体色素上皮細胞

(2) 次いで異物蓄積が期待される高齢個体を用いて眼球組織の形態変化について解析したとこ

る、AIMKO では網膜形成異常が検出された。主に死細胞貪食を担うミクログリアは、WT と比較して AIMKO で増加傾向にあった。さらに異物蓄積により損傷を受ける網膜色素上皮細胞 (RPE) について解析したが、その指標とされる多核化は両群間で同程度であった。

(3) そこでより明瞭に AIM 機能を検証すべく、内因性異物産生が亢進された状態と言える網膜変性モデルを用いた比較検討を試みた。先ず MNU 投与モデルによる解析を試みたが、劇的な網膜変性を呈し AIM 有無による差異の検証には不適當であった。より穏やかなモデルが望ましいと考え、次に限局的な網膜変性を生じる rd8 マウスを用いた解析を試みたが、AIM 有無による網膜変性の程度および発症頻度への影響は認められなかった。一方で、一部ミクログリアを含む細胞浸潤が水晶体囊赤道面から後部へかけて検出され、統計学的有意差には至らなかったものの、AIM 欠損下でより増加する傾向が見出された (図3)。さらに間接的に網膜変性との関与が報告されている高脂肪食負荷による検証も試みた。特に傷害を受けるとされる RPE に焦点を当て、RPE 層における脂質蓄積あるいはドルーゼン形成、血管新生等について検討をしたが、AIM 有無による明らかな差異は検出されなかった。

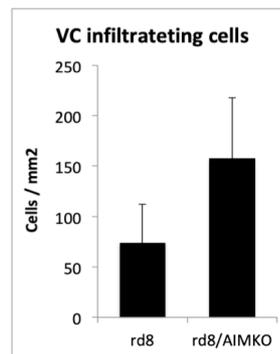


図3. 水晶体囊赤道面から硝子体腔内への細胞浸潤

n = 9, means + SEM

以上から AIM の眼球組織恒常性維持への寄与は示唆されるが、病態モデルの解析による機能解明は困難を極めるものであった。考えられる理由としては、異物蓄積による組織機能破綻が慢性的な傷害を基盤とする点、AIM 機構の代替機能の存在などが挙げられる。これらを踏まえて、病態モデルへの AIM 投与や AIM 過剰発現系と組み合わせた更なる検討が全容解明には必要であると考えられる。

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

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