

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791842

研究課題名(和文) 加齢黄斑変性症における自己抗体バイオマーカーの探索と発症増悪機序の解明

研究課題名(英文) Autoantibody profile of Age-related macular degeneration

研究代表者

諸星 計(MOROHOSHI, KEI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：60598415

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)：加齢黄斑変性(AMD)は脈絡膜新生血管(CNV)からの滲出液や出血により、黄斑部網膜が不可逆的障害を受け視力低下をきたす疾患であり、その病態には自己抗体による局所炎症の関与が示唆されている。本研究では、マスマスペクトル解析によりpyruvate kinase M2(PKM2)やaldolase Cといった代謝酵素に対する新規自己抗体を同定し、さらに患者由来IgGがそれら酵素活性を濃度依存性に阻害することを確認した。また、マウスモデルもAMD患者同様の自己抗体プロファイルを呈し、CNV部位におけるPKM2の発現増強が認められたことより、PKM2はAMD治療の新たな分子標的になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Age-related macular degeneration (AMD) is currently the leading cause of blindness and recent studies have indicated that autoimmunity, in particular, anti-retinal/choroidal autoantibodies affects the development of AMD. In this study, several novel autoantibodies to metabolic enzymes, including pyruvate kinase M2 (PKM2), aldolase C and glutamine synthetase, were identified by mass spectrometry (LC-MS/MS) and antigen microarray in the sera of AMD patients and IgGs purified from the patients inhibited activity of those enzymes in a dose dependent manner. Moreover, mice with laser-induced choroidal neovascularization (CNV) demonstrated a similar autoantibody profile to AMD patients and increase of PKM2 expression with strong IgG deposition was observed in the CNV lesion. Hence, our data suggested that anti-PKM2 IgG antibody could be a candidate biomarker for AMD and a potential molecular target for novel therapeutic strategies of the disease.

研究分野：眼科学

キーワード：加齢黄斑変性 自己抗体 バイオマーカー 自己免疫 血管新生

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration; AMD) は、網膜の中心部分である黄斑部分に障害をきたす進行性・非可逆性疾患であり、現在のところ本国での中途失明原因疾患の第4位であるが、さらなる高齢化社会を迎える日本でも今後患者数増加が見込まれている。AMD は主に dry 型と wet 型に分類され、前者は drusen と呼ばれる特徴的な眼底所見が見られるものの、視力障害などの自覚症状が認められないことが多いが、後者は脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization; CNV) からの浸出液や出血が網膜に直接障害を与えることにより、不可逆的な視力障害をきたす治療困難な AMD である。進行予防としては抗酸化ビタミンなどのサプリメントの摂取、臨床的治療としては主に CNV に対する光凝固術や光線力学的療法、CNV 発生促進因子である VEGF の阻害剤の硝子体内注射が行われているが、いずれも視力維持を目的とした消極的治療法であり、明らかな視力回復を期待できる有効な治療法は未だ確立されていない。予後診断に有用な臨床的バイオマーカーも同定されていない。

多くの大規模スタディーにより、AMD は環境的因子と遺伝的因子の両方が関係している多因子性・多遺伝子性疾患と認識されているが、2003 年に補体系の制御因子のひとつである complement factor H の一塩基変異多型と AMD 発症リスクとの関連が数多く報告され、その発症・進行には免疫系、中でも自己免疫の関与の重要性が示唆され始めている。実際に、AMD 患者血清には drusen の構成物質である CEP に対する抗体が有意に高値に認められ、抗 CEP 抗体産生を誘導したマウスは、dry AMD に類似した眼病変を発症することが報告されている。しかし一方で、これまで疾患特異的自己抗体を包括的に探索した報告はない。

このような背景のもと、申請者らは、antigen microarray 法を用いて網羅的に自己抗体をスクリーニングすることにより、AMD 患者はアポトーシス関連分子であるホスファチジルセリンに対する高い抗体価を示す (オッズ比 44.3) ことを報告し、さらに、眼組織由来抗原を加えたカスタム microarray チップを作製し、自己免疫網膜炎患者血清における自己抗体プロファイルを明らかにし、その有用性を報告した。そこで本研究ではマスペクトル分析により新規 AMD 特異的眼組織由来抗原を同定し、それら抗原・抗体の病態への関与を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本国の AMD 患者血清中の自己抗体プロファイルを明らかにし、疾患の発症・増悪に関与している因子 (バイオマ-

ーカー) を探索する。また、マウスモデルを用いて、自己抗原・抗体の病態への関与を解明し、最終的には診断・治療タイミングや治療効果の判定におけるバイオマーカーの臨床的有用性を検証し、AMD 特異のカスタムチップの開発と、抗原特異的な新しい治療薬開発につながるトランスレーショナルな知見を明らかにすることを目標とした。具体的には研究期間内に以下のことを明らかにすることを目的とした。

- (1) 眼組織・drusen 由来蛋白を2次元電気泳動し、患者血清由来 IgG 抗体と western blotting を行った後に、AMD 患者特異的スポットに含まれる蛋白をマスペクトル解析することにより、新規疾患特異的自己抗原・抗体を同定する。
- (2) 上記マスペクトル解析にて新規同定し用いて、AMD 患者血清自己抗体プロファイルを明らかにし、病期 (dry・wet) との相関を検討する。
- (3) 上記手法にて作成したアレイチップを用いて、代表的 AMD マウスモデルである Ccl2(-/-)/Cx3cr1(-/-) や laser induced CNV モデルにおける自己抗体プロファイルを明らかにし、ヒト疾患との相違を比較検討する。また、同モデルの病変部における自己抗原・抗体関与を解明する。
- (4) 同定された自己抗原を免疫したマウスや自己抗体を移入したマウスを用いて、AMD の病態における自己免疫の役割を解明する。

3. 研究の方法

- (1) 眼組織由来抗原に対する AMD 患者血清中新規自己抗体の同定

Antigen microarray 法は、微量サンプルにて網羅的に自己抗体の抗体価測定が可能であるが、アレイチップにプリントする抗原の選定が非常に重要である。そこで、チップに加える新規 AMD 患者特異的抗原同定のため、網膜・色素上皮・脈絡膜蛋白を2次元電気泳動後、患者血清より精製した IgG 抗体とウエスタンブロッティングを行ったのちに、AMD 患者特異的に出現したスポット内の蛋白を LC-MS/MS にて解析した。同定後は ELISA 法にて抗体価を定量し検証した。

- (2) AMD 疾患特異的アレイチップの開発
申請者らは同様の手法により自己免疫性網膜炎患者の自己抗体プロファイルを明らかにしてきたが、その多くの自己抗体が、AMD 患者血清中にも認められた。そこで、上記マスペクトル解析にて新規同定した抗原を加えることによりアレイチップの疾患特

異度を高めた。さらに、Ccl2(-)/Cx3cr1(-) マウスや laser induced CNV モデルマウスの自己抗体プロファイルとも比較することにより、AMD の病態へ深く関与する抗原・抗体を同定した。

(3) 実験的自己免疫性 AMD マウスモデルの作成

実験的自己免疫性ぶどう膜炎の誘導手法に準じ、アジュバンドを用いてマウスを強く candidate 抗原で免疫することにより抗原特異的抗体産生を促し、図 1 に示す機序により AMD に類似した病態の惹起を試みた。この研究においては抗原の選定と使用マウスの選択が重要であると考えられ、具体的には抗原は眼・神経組織特異的である蛋白が理想的であり、上記にて同定された pyruvate kinase M2 (PKM2) と aldolase C (ALDOC) を用いた。免疫後は各抗体価の上昇を確認し眼底所見・免疫組織学的検査にて網膜病変部の解析を行った。

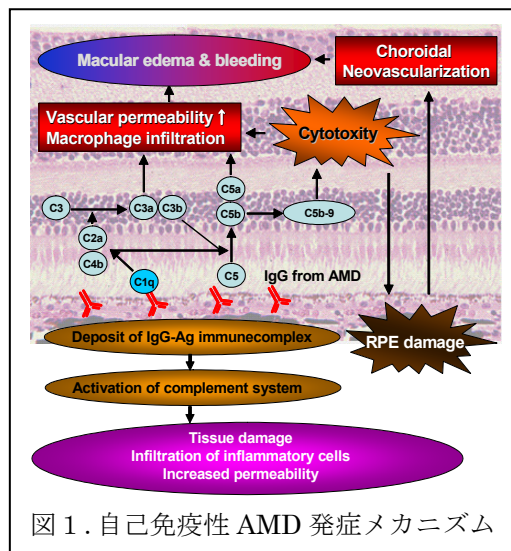


図 1. 自己免疫性 AMD 発症メカニズム

4. 研究成果

(1) マススペクトル解析による AMD 患者血清中における新規網脈絡膜抗体の同定
AMD 患者血清より精製した IgG を C57BL/6 マウスの網脈絡膜組織蛋白を用いて 2 次元 western blotting を行い、患者由来 IgG 特異的 blot に相当する gel spot 内蛋白をマススペクトル解析にて同定したところ、PKM2、ALDOC といった神経組織特異的解糖系酵素のほか、ケラチンなどに対する抗体が AMD 患者血清中に認められた。また、AMD 患者由来 IgG は PKM2、ALDOC の酵素活性を濃度依存的に阻害した。

(2) Laser-induced CNV マウスモデル・ヒト AMD における IgG 自己抗体プロファイルの解明

上記にて同定し抗原を加えたカスタムアレイチップとマウス・ヒト血清を用いて

antigen microarray を行ったところ図 2 のように laser-induced CNV マウス血清由来 IgG も、ヒト AMD 由来 IgG と同様の自己抗体プロファイルを示し、PKM2・ALDOC と強い反応性を示した (図 2)。

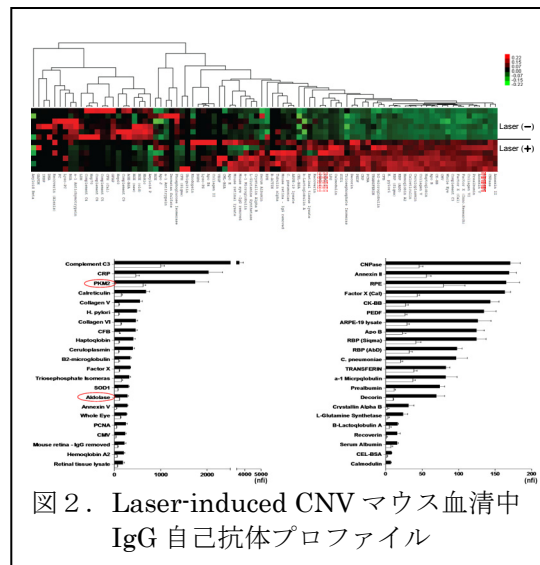


図 2. Laser-induced CNV マウス血清中 IgG 自己抗体プロファイル

また、AMD 患者は glutamine synthetase (GS) に強い血清反応性を示した。さらに wet AMD 患者では dry AMD 患者に比べ有意に高い抗体価が認められたことより、anti-GS 抗体はバイオマーカーとしての有用である可能性が示唆された (オッズ比 9.00、P=0.0004)。

(3) Laser-induced CNV マウスモデルにおける PKM2 の発現

ヒト・マウスともに強い血清反応性を示した PKM2 に着目し、その CNV 部位での発現を調べたところ mRNA/蛋白レベルとも、正常部位より増加しており、C1・C3 といった自己免疫反応に関与する補体や IgG の強い沈着が認められた (図 3)。

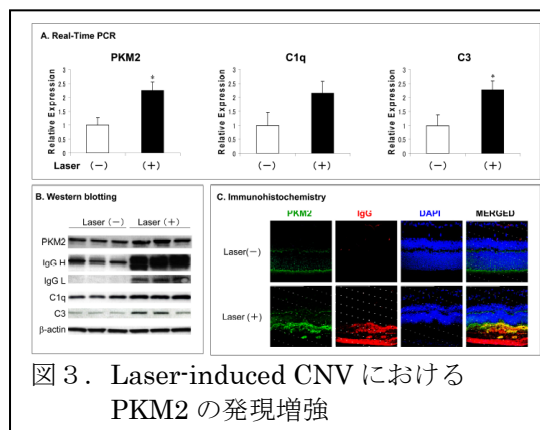


図 3. Laser-induced CNV における PKM2 の発現増強

(4) PKM2・ALDOC 能動免疫による自己免疫性マウスモデルの確立

PKM2 と ALDOC、コントロールとして BSA を抗原として CFA とともに C57BL/6 マウスに免疫し、70 日後に眼底検査と免疫組織学的検査にて、網膜障害を GFAP の発現増強に

て評価し同時に IgG の沈着を検討した。いずれのマウスも drusen や CNV による出血などの AMD 様眼底変化を呈することはなかったが、PKM2 にて免疫したマウスは強い IgG の沈着と GFAP の発現増強が認められたことより、網膜に対する何らかの組織障害が誘導された可能性が示唆された (図 4)。

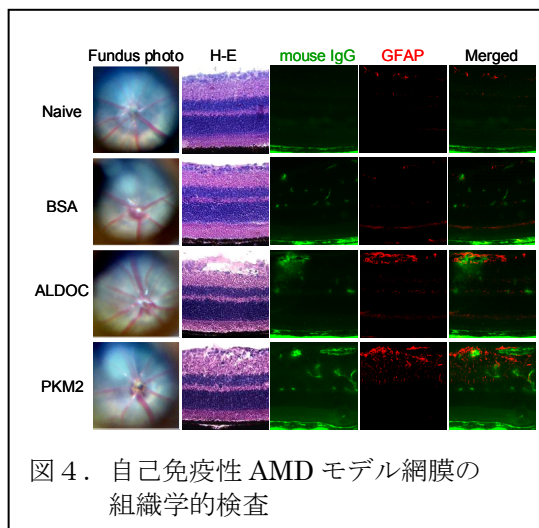


図 4. 自己免疫性 AMD モデル網膜の組織学的検査

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者は下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- 1) Ishida T, Shinohara K, Tanaka Y, Moriyama M, Morohoshi K, Shimada N, Yoshida T, Ohno-Matsui K. Choroid folds in eyes with myopic staphyloma. *Am J Ophthalmol*. 査読有 2015 Jun 4. doi:10.1016/j.ajo..
- 2) Paulus YM, Kuo CH, Morohoshi K, Nugent A, Zheng LL, Nomoto H, Blumenkranz MS, Palanker D, Ono SJ. Serum inflammatory markers after rupture retinal laser injury in mice. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*. 査読有 2015 Mar;46(3):362-8. doi:10.3928/23258160-20150323-11.
- 3) Ishida T, Moriyama M, Morohoshi K, Furuse Y, Fukuda T, Ohno-Matsui K. Polypoidal choroidal vasculopathy in a case with retinitis pigmentosa. *Int Ophthalmol*. 査読有 2013 Jun;33(3):305-8. doi: 10.1007/s10792-012-9657-7
- 4) Kuo CH, Morohoshi K, Aye CC, Garoon RB, Collins A, Ono SJ. The role of TRB3 in mast cells sensitized with monomeric IgE. *Exp Mol Pathol*. 査読有 2012 Dec;93(3):408-15. doi: 10.1016/j.yexmp.2012.09.008.

- 5) Fukuda K, Kuo CH, Morohoshi K, Liu FT, Ono SJ. The murine CCR3 receptor regulates both eosinophilia and hyperresponsiveness in IgE-mediated allergic conjunctivitis. *Br J Ophthalmol*. 査読有 2012 Aug;96(8):1132-6. doi:10.1136/bjophthalmol-2011-301399

- 6) Morohoshi K, Ohbayashi M, Patel N, Chong V, Bird AC, Ono SJ. Identification of anti-retinal antibodies in patients with age-related macular degeneration. *Exp Mol Pathol*. 査読有 2012 Oct;93(2):193-9. doi: 10.1016/j.yexmp.2012.03.007.

[学会発表] (計 3 件)

- 1) 山本樹里、諸星 計、大林雅春、星野真理、大野京子 「加齢黄斑変性における自己抗体の同定と病態への関与」 第 119 回日本眼科学会総会 2015 年 4 月 17 日 (札幌市)
- 2) 竹内弥生、石田友香、諸星 計、大野京子 「転移性脈絡膜腫瘍の swept source OCT 所見」 53 回 日本網膜硝子体学会総会 ・ 第 31 回 日本眼循環学会 2014 年 11 月 29 日 (大阪市)
- 3) Y. Paulus, C-H Kuo; K. Morohoshi; A. Nugent, LL Zheng, H. Nomoto, M. Blumenkranz, D. Palanker, SJ Ono "Serum Autoantibody Evaluation after Retinal Laser Injury in Mice" ARVO 2013 年 5 月 7 日 (Seattle 米国)

[その他]

ホームページ等

<http://tmdu-ganka.jp/index.php/kenkyu/kekanshinsei>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

諸星 計 (MOROHOSHI KEI)

東京医科歯科大学医学部附属病院 助教
研究者番号 : 60598415