

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462723

研究課題名(和文)自己免疫性網膜症の発症機序の解明

研究課題名(英文)Study on molecular mechanism causing autoimmune retinopathy

研究代表者

大黒 浩(Hiroshi, Ohguro)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：30203748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫機序で発症し、未だ有効な治療法が確立していないAIRには眼外臓器に腫瘍がみられるものと見られないものがある。さらに腫瘍のうちでは上皮由来の癌、悪性黒色腫、良性腫瘍によって本症が引き起こされていることが報告されているが、これらの詳しい病態および発症機序は不明である。そこで本研究課題では1)腫瘍の違いによる網膜特異抗原に対する自己抗体獲得機序の解明および2)腫瘍に寄らない網膜特異抗原に対する自己抗体獲得機序の解明

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular pathology in autoimmune retinopathy (AIR), regulatory mechanism of expressions of autoantigen causing AIR as well as what kinds of role of such autoantigen aberrantly expressed in malignant tumor cells or none tumor cells were examined. Recoverin was identified to be expressed in 30-70% of cancer tissues. We observed co-precipitation of G-protein-coupled-kinases (GRKs) and caveolin-1 with Rec from cell lysates of 293 or SSTW cells. Immunocytochemistry revealed that immunoreactivities toward recoverin within the cancer cells were almost identical to those toward GRKs and caveolin-1. The present data strongly suggests that aberrantly expressed recoverin should be involved in the GRK-dependent cellular regulation in cancer cells.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜 自己免疫性網膜症 リカバリン

1. 研究開始当初の背景

癌患者の一部に腫瘍組織と神経組織に共通抗原が生じるためこれらに自己免疫を獲得し、種々の神経障害を呈する paraneoplastic syndrome (PNS) が知られている。このうち癌関連網膜症では、同様な機序で網膜に対する自己免疫を獲得し、網膜色素変性様の進行性の網膜変性をきたす疾患で、現在のところ原因が不明で有効な治療のない難病である。これには肺癌等に随伴し、病理学的に視細胞が変性する狭義の癌関連網膜症 CAR (cancer-associated retinopathy) と、悪性黒色腫に随伴し、CAR とは臨床像が異なり、病理学的に網膜双極細胞が障害される悪性黒色腫随伴網膜症 MAR (melanoma associated retinopathy) の2種類がある。

CAR および MAR 患者の血清中には網膜に特異に発現し、視覚情報の処理機構に深くかかわる因子に対する自己抗体が検出され、これが網膜を特異的に傷害することで発症することが報告されている。CAR では網膜視細胞で明暗順応を制御する Ca^{2+} 結合蛋白質リカバリンなどの網膜抗原に対する自己抗体が、MAR ではヒト TRPM1 の変異が先天性停止性夜盲症の原因遺伝子で網膜 ON 双極細胞の活動を司るイオンチャネル TRPM1 に対する自己抗体の存在が報告されている。

応募者のこれまでに CAR における網膜自己抗体が網膜視細胞を傷害する分子メカニズムを明らかにするために詳細に検討を行い以下の知見を見出している(下図参照)。

1 抗リカバリン抗体と抗 HSC70 抗体が共通的に CAR 患者血清に見られ、それらが CAR の発症に相補的に係る (Invest Ophthalmol Vis Sci 1999, 40: 82-89.)。

2 抗リカバリン抗体と抗 HSC70 抗体ラットの硝子体注射することにより実験的 CAR モデルを作成できる (Invest

Ophthalmol Vis Sci 2001, 42:705-712.)。

3 抗リカバリン抗体が網膜視細胞に取り込まれ、リカバリンと結合することによりリカバリンの生理活性であるロドプシン活性化調節機構に異常をきたすことにより視細胞変性が起こる (Invest Ophthalmol Vis Sci 1999, 40: 82-89.)。

4 血清抗リカバリン抗体の産生に癌細胞におけるリカバリンの異所性発現が必須である (Cancer Res 2000, 60:1914-1920, Eur J Immunol 2001, 31:563-572.)。

さらにこれまでに我々の研究グループは、すでに CAR で見られる自己抗原であるリカバリンの異所性発現がほとんど全ての癌で約 10 - 40% 見られることや (Ophthalmic Research 2010; 43: 139-144) リカバリンが癌細胞内で特異な機能を有すること (Biochem Biophys Res Commun 2003; 300:669-673.) を合わせて見出している。従って **CAR 発症においては本来視細胞特異蛋白であるリカバリンが癌細胞に異所性発現することが引き金となり、上述のような血清抗リカバリン抗体による視細胞障害が生じる**という仮説を提唱し、我々の仮説はあとから海外の複数の研究グループの検討により確認されている。

しかし、最近我々は良性腫瘍患者や全く全身に悪性腫瘍が無いにもかかわらず血清中に網膜自己抗体を有し、CAR および MAR 類似の網膜症の存在が明らかになってきた (Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2012)。また我々の研究グループは MAR ではなく CAR 患者の血清中にも血清抗 TRPM1 抗体を見出した (PLoS One. 2011; 6(5):e19911. Doc Ophthalmol 2011; 122: 191-197.)。以上のことから最近ではこれら血清中に抗網膜自己抗体を有する網膜症をまとめて **自己免疫性網膜症 (AIR: autoimmune retinopathy)** と呼ぶようになってきている。しかしながら同時にこれら

の知見は、AIR を理解するために以下の疑問が新たに湧いてきた。

①なぜ腫瘍の違い、癌、悪性黒色腫、良性腫瘍で類似のあるいは異なる網膜自己抗体ができるのか？

②なぜ腫瘍が無いにもかかわらず、網膜自己抗体ができるのか？

これらの2つの疑問はAIRを理解する上で最も重要であり、本研究課題で解決すべき研究課題である。

2. 研究の目的

従って、**自己免疫性網膜症 (AIR: autoimmune retinopathy) の発症機序を検討する目的で**、今回申請者らの研究グループは平成 25 年より 27 年までの 3 年間に

①なぜ腫瘍の違い、癌、悪性黒色腫、良性腫瘍で類似のあるいは異なる網膜自己抗体ができるのか？

②なぜ腫瘍が無いにもかかわらず、網膜自己抗体ができるのか？

に対する回答を出すためにすでに CAR および良性腫瘍で自己抗原として見出されているリカバリンと CAR および MAR で自己抗原として見出されている TRPM1 について以下の検討を行う予定である。

A) どのような癌、良性腫瘍にリカバリンや TRPM1 がどのような頻度で異所性発現するのか？

B) リカバリンや TRPM1 がどのような機序で癌に異所性発現するのか？

C) 癌に異所性発現したリカバリンや TRPM1 がどのような機序により自己免疫を獲得するのか？

D) 腫瘍に関係ない AIR の自己免疫を獲得の可能性の一つとして molecular mimicry (分子相同性) の可能性を検討する。

以上、上述の研究目的①②に対する答えを出すべく A - D) の 4 つの主要な研究課題について生化学的、分子生物学的及び組織学的手法を総合して明らかにしていく予定

である。

3. 研究の方法

①なぜ腫瘍の違い、癌、悪性黒色腫、良性腫瘍で類似のあるいは異なる網膜自己抗体ができるのか？

②なぜ腫瘍が無いにもかかわらず、網膜自己抗体ができるのか？

に対する回答を出すためにすでに CAR および良性腫瘍で自己抗原として見出されているリカバリンと CAR および MAR で自己抗原として見出されている TRPM1 について以下の検討を行う予定である。

A) どのような癌、良性腫瘍にリカバリンや TRPM1 がどのような頻度で異所性発現するのか？

B) リカバリンや TRPM1 がどのような機序で癌に異所性発現するのか？

C) 癌に異所性発現したリカバリンや TRPM1 がどのような機序により自己免疫を獲得するのか？

D) 腫瘍に関係ない AIR の自己免疫を獲得の可能性の一つとして molecular mimicry の可能性を検討する。

以上上述の研究目的の答えを出すべく 4 つの主要な研究課題について生化学的、分子生物学的及び組織学的手法を総合して検討した

4. 研究成果

外科手術で得られた種々ヒトの癌において約 6 - 7 割にリカバリン異所性発現が見られ、悪性度の低いもので頻度が高かった。2) リカバリン異所性発現をもたらす機序およびその意義

ヒトリカバリンモノクローナル抗体を用いた免疫共沈を行ったところ悪性腫瘍細胞の中でリカバリンが G-protein coupled receptor kinases (GRKs) と caveolin-1 と共沈することが確認された。これらのことはリカバリンがカベオリン系を介して自己免疫獲得や薬物抵抗性に関与する可能性示唆された。

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には下線)

〔雑誌論文〕(計18件)

Sawada K, Hiraoka M, Abe A, Kelly R, Shayman JA, Ohguro H. Prolonged Ocular Inflammation in Endotoxin-Induced Uveitis in Lysosomal Phospholipase A2-Deficient Mice. *Curr Eye Res*. 2017 42(4):611-616. (査読あり)

Kuniyoshi K, Hatsukawai Y, Kimura S, Fujino T, Ohguro H, Nakai R, Sunami K, Mishima SI, Sato T, Kusaka S, Suzuki Y, Shimomura Y. Acute Bilateral Photoreceptor Degeneration in an Infant After Vaccination Against Measles and Rubella. *JAMA Ophthalmol*. 2017 (印刷中) (査読あり)

Abe A, Hiraoka M, Ohguro H, Tesmer JJ, Shayman JA. Preferential hydrolysis of truncated oxidized glycerophospholipids by lysosomal phospholipase A2. *J Lipid Res*. 2017 58(2):339-349. (査読あり)

Ohkawa E, Hiraoka M, Abe A, Murata M, Ohguro H. Fluctuation of lysosomal phospholipase A2 in experimental autoimmune uveitis in rats. *Exp Eye Res*. 2016 149:66-74. (査読あり)

Oe C, Hiraoka M, Tanaka S, Ohguro H. Acute Retinal Necrosis Associated with Epstein-Barr Virus in a Patient Undergoing Immunosuppressive Therapy. *Case Rep Ophthalmol*. 2016 12;7(1):195-201. (査読あり)

Sawada K, Hiraoka M, Ohguro H. Effect of Antiglaucoma Medicine on Intraocular Pressure in DBA/2J Mice. *Ophthalmic Res*. 2016;55(4):205-11. (査読あり)

Onodera M, Yama N, Hashimoto M, Shonai T, Aratani K, Takashima H, Kamo K, Nagahama H, Ohguro H, Hatakenaka

M. The signal intensity ratio of the optic nerve to ipsilateral frontal white matter is of value in the diagnosis of acute optic neuritis. *Eur Radiol*. 2016 26(8):2640-5. (査読あり)

Hiraoka M, Abe A, Inatomi S, Sawada K, Ohguro H. Augmentation of Lysosomal Phospholipase A2 Activity in the Anterior Chamber in Glaucoma. *Curr Eye Res*. 2015 19:1-6. (査読あり)

Aoki H, Hiraoka M, Hashimoto M, Ohguro H. Systemic Cyclosporine Therapy for Scleritis: A Proposal of a Novel System to Assess the Activity of Scleritis. *Case Rep Ophthalmol*. 2015 5;6(2):149-57. (査読あり)

Watanabe M, Inatomi S, Umeda K, Ohguro I, Ohguro H. A simple method for evaluation of aqueous humor dynamics "A weight on-off test" in patients with glaucoma. *Med. Res. Arch*. 2015 1(3):22-39. (査読あり)

Hiraoka M, Abe A, Lennikov A, Kitaichi N, Ishida S, Ohguro H: Increase of lysosomal phospholipase A2 in aqueous humor by uveitis. *Exp Eye Res* 2014 ; 118 : 13-19. (査読あり)

Tanaka S, Watanabe M, Inatomi S, Umeda K, Yoshida K, Ohguro I, Ohguro H: Effects of several anti-glaucoma medications on the circadian intraocular pressure fluctuations in patients with primary open-angle glaucoma. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2014 ; 30(1) : 12-20. (査読あり)

Fujimoto K, Hiraoka M, Inatomi S, Ohguro H: Association of cryptogenic organizing pneumonia in bilateral anterior uveitis. *Case Rep Ophthalmol*

2014 ; 5(3) : 365-372. (査読あり)
Lennikov A, Hiraoka M, Abe A, Ohno S,
Fujikawa T, Itai A, Ohguro H : IkB
kinase-β inhibitor IMD-0354 beneficially
suppresses retinal vascular permeability in
streptozotocin-induced diabetic mice.
Invest Ophthalmol Vis Sci 2014 ; 55(10) :
6365-6373. (査読あり)
Machida S, Ohguro H, Ishida K, Suzuki
M, Kawagishi K. Recoverin-associated
retinopathy secondary to Warthin tumor
of parotid gland. Doc Ophthalmol. 2014
Oct;129(2):123-8. (査読あり)
Saito M, Saito W, Kanda A, Ohguro H,
Ishida S. A case of paraneoplastic optic
neuropathy and outer retinitis positive for
autoantibodies against collapsin response
mediator protein-5, recoverin, and
α-enolase. BMC Ophthalmol. 2014
16;14:5 (査読あり)
Nakazawa M, Suzuki Y, Ito T, Metoki T,
Kudo T, Ohguro H. Long-term effects of
nilvadipine against progression of the
central visual field defect in retinitis
pigmentosa: an extended study. Biomed
Res Int. 2013;2013:585729(査読あり)
Ohguro H, Ohguro I, Yagi S : Effects of
black currant anthocyanins on intraocular
pressure in healthy volunteers and
patients with glaucoma. Journal of Ocular
Pharmacology and Therapeutics 2013 ;
29(1) : 61-67. (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :

種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大黒 浩 (OHGURO HIROSHI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 30203748

(2) 研究分担者

阿部晃 (ABE AKIRA)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 70136927

平岡美紀 (HIRAOKA MIKI)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 80246983

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()