

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293373

研究課題名(和文) 自然炎症制御を基軸とした網膜自己再生促進

研究課題名(英文) Retinal regeneration due to regulation of natural immunity

研究代表者

園田 康平 (Sonoda, Koh-Hei)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10294943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：3つのモデル動物を比較することで、IL-1aとIL-6産生能においてMincleとNLRsが重要であることを見いだした。これらが引き起こす自然炎症は、ミューラー細胞由来と思われる内在性の先祖帰り細胞を活性化させていた。これらの細胞を純化後にプロテオミクスで検討した結果、DRP-2、DRP-3のロングアイソフォームを特異的に発現していることを突き止めた。更にマウス網膜からミューラー細胞を単離培養しDRP-3、DRP-2を加えると細胞分裂能が増加したが、ネスチンの発現まで至る細胞は一部にとどまっていた。二つのタンパクが重要であるが、他の候補タンパクも存在し、それらとの相互作用が重要と考えている。

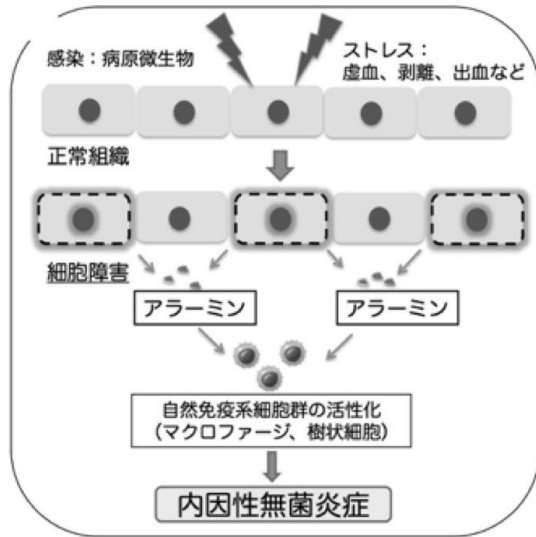
研究成果の概要(英文)：We found that Mincle and NLRs are critical in the process of natural immune response (IL-1a, IL-6 production) in the inflamed retina. During the regional inflammation, internal stem cells which modified muller glia cells were generated and activated. We purified these cells and analyzed specific proteins, and found DRP-2 and DRP-3 proteins (long isoforme) were elevated. Adding these factors into the cultured murine muller cells, they increased the proliferation ability and showed partial increase of nestin. We concluded these factors are critical for "inflammation" induced internal stem cells.

研究分野：眼科、免疫学、網膜硝子体疾患、ぶどう膜炎

キーワード：自然炎症 アラーミン 内在性幹細胞

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症、加齢黄斑変性、後眼部ぶどう膜炎、網膜剥離など各種網膜硝子体疾患は、失明に直結するため大きな社会問題となっている。生物製剤による治療や低侵襲手術が普及し、疾患予後は改善されたが、進行例や再発症例などの視機能は未だ芳しくない。何らかのブレイクスルーが必要と思われる。



2. 研究の目的

神経系である網膜の機能再生は通常困難で、失明または視機能障害を残す病態が多く存在する。研究の目的は、「網膜硝子体疾患に必然的に随伴する内因性炎症を適正制御することで、内在性幹細胞を活性化し、機能再生を行うこと」である。内因性炎症は創傷治癒機転の一翼を担い、「無菌状態で起こる炎症」とも言われる。自然免疫細胞群がアラミンと呼ばれるストレス分子を認識することで始まるが、免疫特権を有する眼球でこれまで殆ど解析されていない。眼球において、適正な内因性炎症により内在性幹細胞リプログラミングが始まることを明確にした上で、それを基軸とする新しい炎症制御・網膜機能再生治療の確立を目指すものである。

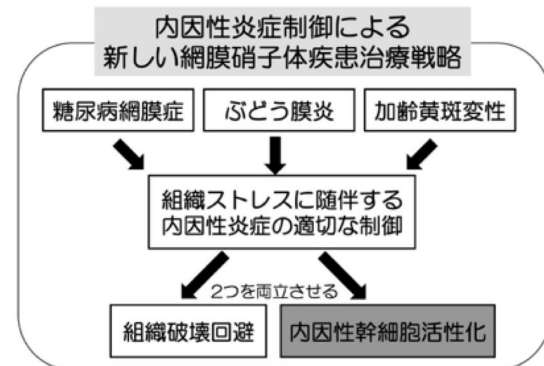
3. 研究の方法

「網膜剥離モデル」「実験的ぶどう膜炎モデル」「網膜下瘢痕形成モデル」の3つのマウス疾患モデルを使用する。特に慢性炎症期において共通に動く液性因子をスクリーニングする。スクリーニングされた因子について、組織障害抑制因子と内在性幹細胞誘導因子を絞り込む。最終的には、眼局所での自然免疫機構の炎症バランスを制御することで、内在性幹細胞による網膜再生誘導する新たな治療法の確立を試みた。

(1) モデル作成:

顕微鏡で直視しながらマウス網膜下に、毛様体扁平部から32G針を刺入し、ヒアルロン酸ナトリウムを網膜下に注入した(網膜

剥離モデル)。同系チオグリコレート誘導活性化型マクロファージを注入し、網膜下に瘢痕を形成させた(網膜下瘢痕形成モデル)。実験的ぶどう膜炎は、マウス足底部皮内に網膜抗原(IRBP)を免疫して作成した。



(2) スクリーニング:

作成したモデルマウスから抽出した眼組織におけるマクロファージ・好中球・primitive T細胞等の自然免疫細胞群のキネテクスをフローサイトメトリー(FACS)で解析した。さらに無菌炎症に関するアラミンを認識する pattern recognition receptors (PRRs): Toll-like receptors (TLRs), C-type lectin receptors (Mincle, DLEC9A), NOD-like receptors (NLRs), Absence in Melanoma (AIMs) などの発現を FACS にて検討した。

これら細胞分画を磁気ビーズで単離し、リアルタイム RT-PCR 法、2次元電気泳動法を用いて網羅的に遺伝子発現を解析する。特にその産生ケモカイン・サイトカインを中心にスクリーニングした。

網膜組織を抽出しその抽出液を ELISA、免疫プロット法を用いて内因性炎症に関するアラミン (HMGB-1, IL-1 α , S100proteins, AGEs, ATP, oxidized adducts など) の分泌発現を解析した。同時にタンパクビーズアレイシステムでケモカイン・サイトカインを網羅的に解析した。代表的 Th1 サイトカインである IFN γ , TNF α , IL-2, IL-12、代表的 Th2 サイトカインである IL-4, IL-10 を中心に解析し、さらに上流のサイトカインとして IL-27 およびそのレセプターの解析を行った。

(3) グルタミン酸刺激モデルでのプロテオーム解析

マウスでは、胎生 12 日で網膜細胞の分裂が終了する。既に網膜の分裂が終了した成体ラットにおいて、その感覚網膜を分離器官培養し低濃度のグルタミン酸を付加したところ、網膜に本来は存在し得ない分裂細胞が観察された。同時に神経外胚葉幹細胞特有の中間径フィラメントが発現し、それらはミュラー細胞と共局在していた。

さらにマウス感覚網膜細胞の分裂・分化誘導時における要となる因子を選びだすため、網膜からタンパク質を抽出し2次元電気泳動を行った。対照群とグルタミン酸付加群における2次元電気泳動像を比較し、有意差のあるタンパク質を質量分析法で同定した。同定されたタンパク質を、ウエスタンブロットで再度有意差を確認した。

ミユラー細胞の幹細胞分化への効率的手法の開発

効率的手法の開発には適切な *in vitro* 実験系が必要である。ミユラー細胞は網膜先駆細胞と遺伝子配列に類似性を持ち、幹細胞へ誘導可能であることが報告されていた。そこでマウス網膜組織からミユラー細胞を単離・培養した上で、幹細胞誘導を試みた。培養には血清を含まない細胞培養液を使用し、形質転換の可能性があるため継代は行わず、新たに単離したミユラー細胞を用いた。化誘導に關与する可能性があるタンパク質や因子を、単独ないし複数組み合わせ投与した。また候補因子の siRNA やブロッキング抗体を作製し、その誘導関与を確認した。評価にはイメージングサイトメーター (IN Cell Analyzer®) を使用し、経時的な形態学的変化や免疫染色による幹細胞分化の確認を行うと共に、コロニーアッセイでの定量を行った。

4. 研究成果

3つのモデル動物を比較することで、IL-1a と IL-6 産生能において Mincle と NLRs が重要であることを見いだした。これらが引き起こす自然炎症は、ミユラー細胞由来と思われる内在性の先祖帰り細胞を活性化させていた。これらの細胞を純化後にプロテオミクスで検討した結果、DRP-2, DRP-3 のロングアイソフォームを特異的に発現していることを突き止めた。更にマウス網膜からミユラー細胞を単離培養し DRP-3, DRP-2 を加えると細胞分裂能が増加したが、ネスチンの発現まで至る細胞は一部にとどまっていた。二つのタンパクが重要であるが、他の候補タンパクも存在し、それらとの相互作用が重要と考えられた。

3年間の研究を通して、網膜内在性幹細胞が確実に存在し、自然炎症によって生じる因子によってこの発現コントロールが可能であることが明らかになった。特に特定因子である DRP-2, DRP-3 の同定までたどり着いたことは大きな成果であり、この因子カクテルを制御する創薬に今後結びつけたい。

本研究は、今後の網膜硝子体疾患の治療に道を拓く大きな前進であると考えている。

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4件)

1. Changes in metabolic proteins in ex vivo rat retina during glutamate-induced neural progenitor cell induction.

Tokuda K, Kuramitsu Y, Baron B, Kitagawa T, Tokuda N, Kobayashi M, Kimura K, Sonoda KH, Nakamura K.

Mol Cell Biochem;419(1-2):177-84, 2016

2. Up-regulation of DRP-3 long isoform during the induction of neural progenitor cells by glutamate treatment in the ex vivo rat retina.

Tokuda K, Kuramitsu Y, Byron B, Kitagawa T, Tokuda N, Kobayashi D, Nagayama M, Araki N, Sonoda KH, Nakamura K.

Biochem Biophys Res Commun ;463(4):593-9, 2015

3. Attenuation of EMT in RPE cells and subretinal fibrosis by an RAR- γ agonist.

Kimura K, Orita T, Liu Y, Yang Y, Tokuda K, Kurakazu T, Noda T, Yanai R, Morishige N, Takeda A, Ishibashi T, Sonoda KH.

J Mol Med;93(7):749-58, 2015

4. All-trans-retinoic acid inhibition of transforming growth factor- β -induced collagen gel contraction mediated by human Tenon fibroblasts: role of matrix metalloproteinases

Liu Y, Kimura K, Orita T, Teranishi S, Suzuki K, Sonoda KH :

Br J Ophthalmol 99(4) : 561-565, 2015

〔学会発表〕(計1件)

徳田 和央, 藏満 保宏, 中村 和行, 園田 康平 :

グルタミン酸による神経前駆細胞誘導時のラット網膜のタンパク質解析 .

第126回山口県眼科医会秋季総会並びに集談会, 山口県, 2015/11/01

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~eye/index.html>

<http://www.eye.med.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

園田 康平 (SONODA, Koh-Hei)
九州大学大学院医学研究院眼科学・教授
研究者番号：10294943

(2)研究分担者

木村 和博 (KIMURA, Kazuhiro)
山口大学医学研究科眼科学・講師
研究者番号：60335255

森重 直行 (MORISHIGE, Naoyuki)
山口大学医学研究科眼科学・講師
研究者番号：40346565

柳井 亮二 (YANAI, Ryoji)
山口大学医学研究科眼科学・講師
研究者番号：10346554

中村 和行 (NAKAMURA, Kazuyuki)
山口大学医学研究科生化学・教授
研究者番号：90107748

藏満 保宏 (KURAMITSU, Yasuhiro)
山口大学医学研究科腫瘍学・准教授
研究者番号：50281811

山崎 晶 (YAMAZAKI, Sho)
九州大学生体防御医学研究所・教授
研究者番号：40312946

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()