

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15638

研究課題名(和文) 網膜色素上皮細胞の放出する細胞外微粒子による網膜下炎症環境の破綻

研究課題名(英文) Breakdown of homeostatic regulation of subretinal inflammation by extracellular vesicles released from retinal pigmental epithelial cells

研究代表者

羽室 淳爾 (Hamuro, Junji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：80536095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性(AMD)の先制医療につながる独創的医療の基盤技術開発と言う目的を一部達成した。網膜下組織の恒常性維持には、網膜色素上皮細胞(RPE)やマクロファージ(Mps)が担う自然炎症系が重要な役割を果たす。『RPEの細胞機能変性によるRPEとMps系との情報ネットワークの破綻』をAMD早期病態の本質と捉え、補体活性化抑制因子産生やMpsからの炎症増悪因子TNFαの産生抑制が酸化変性RPEにおいて破綻していることやRPEの遊離する細胞外微粒子(extracellular vesicles: EVs)が本破綻に関係することを解明し、萎縮型AMDに係る新しい分子標的を明確化した。

研究成果の概要(英文)：The new approach to develop the pioneering pharmaceuticals to prevent the progression of AMD pathogenesis were proposed. The degenerated RPE are turned out to lose the physiological homeostatic regulatory activities such as to control the overactivation of alternative pathway of complement activation by the decreased production of complement activation inhibitory factors and the loss of the inhibition of proinflammatory TNFα by Mps. These breakdown of physiological functions of RPE is mainly due to the interaction with Mps infiltrated into subretina. The EVs, detected as CD63 positive microvesicles released from RPE was strikingly increased when RPE was cocultured with Mps and these EVs mediated some of the dysfunctions of RPE in subretinal microenvironments. The interactions were analysed both in murine and human co-culture systems. These findings may suggest the new molecular target for the design of th drug for AMD.

研究分野：免疫学

キーワード：エクソソーム 網膜色素上皮細胞 マクロファージ 補体活性化抑制因子 加齢黄斑変性症 miRNA

1. 研究開始当初の背景

萎縮型AMDの早期病態に見られるドルーゼン蓄積の機序は未だ解明されていない。申請者らは、RPEがTGF β /TNF刺激で、特有のmicro-RNA (miRNAもしくはmiR)を細胞外に放出することを見出した。RPEからの細胞外微粒子の放出は、従前、殆んど知られていない。細胞内では上皮間葉系移行 (EMT) に伴うmiR141, miR200a, miR200b, miR200c, miR205の変動を確認し、他細胞での知見 (Gregory PA, *Cell Cycle*. 2008, Gregory PA, *Nat Cell Biol*. 2008 など) との整合性を確認した。ごく最近、Mpsの亜集団の機能変化 (M1/M2) をmiRNAが起こすことが報告された (日本癌学会, 2013, 横浜)。以上の知見などより、変性RPEから放出される、エキソゾーム含有のmiRNAやタンパク成分が脈絡膜下浸潤Mpsの機能を低下させて、結果、ドルーゼン形成に寄与すると考え、本研究を発案するに至った。

2. 研究の目的

加齢黄斑変性 (AMD) の先制医療につながる独創的医療の基盤技術開発を目的とする。網膜下組織の組織恒常性維持には、内因性危険信号を感知する網膜色素上皮細胞 (RPE) やマクロファージ (Mps) が担う自然炎症系が重要な役割を果たす。『RPEの細胞機能変性によるRPEとMps系との情報ネットワークの破綻』をAMD早期病態の本質と捉え、「変性RPEやMps亜集団の遊離する細胞外微粒子 (extracellular vesicle: EV) の双方向的作用によりMpsやRPEが機能の低い亜集団に変換され、結果、網膜下における恒常性維持が進まずドルーゼン形成に至るとする新しい回路の存在を検証し、萎縮型AMDに係る新しい分子標的を明確化し、AMDの先制医療の創薬基盤技術として新分野の開拓に資する。

3. 研究の方法

変性RPE細胞内miR並びに分泌型miR、エキソゾームの種類を同定を先ず実施する。miRNA ArrayならびにExoscreenを用いる。

次いで、RPE変性因子oxLDL, TGF β /TNFにより分泌型miR産生機能がどう変化するか検討する。機能的に重要なmiRを決定するために、RT-PCRにより発

現の再現性を確認後、標準miRを購入し、トランスフェクション法により機能再構築を行うと共に、抗当該miRによりmiR機能を抑制することで確認する。POS食食能力の変化との対応: 既に確立しているPOS食食系で実施する。必要に応じMFG-E8, ITGB5, MERKなどPSの直接、間接の受容体発現の変化を解析する (本項目については予定していたが本研究期間には実施できなかった)。RPEの産生するApoptotic Body, Microvesicle (MV)、エキソゾームによるMpsレドックス状態と機能変化: 3種のEVは遠心により、粗精製して用いる。米国輸入AMD患者眼球検体において特定miR, エキソゾームの分布の検定、特に、補体抑制因子CD46, CD55, CD59, クラステリン陽性エキソゾームの局在検定を実施する。

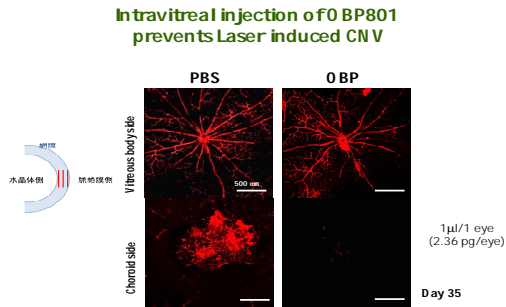
4. 研究成果

Mps亜集団の活性化に係り、AMD病態と直に対応する補体系の活性化抑制経路の破綻とAMD病態の対応に係る炎症経路の増悪に関する研究についてはMpsとRPEの共培養系において細胞外微粒子Exosomeの産生が著明に増強されるという全く新しい知見の発見など、着実に進展した。新規医薬品候補物質の有用性の実験的POC確立についても成功し、2年後の臨床研究を透視できる段階にきた。

Mps亜集団の活性化に係り、AMD病態と直に対応する補体系の抑制経路の破綻とAMD病態の対応に係る免疫組織学的な研究、補体活性化抑制因子の発現動態に及ぼす低分子化合物の検定も進展した。新規医薬品候補物質の有用性の実験的POC確立にも成功した。病態との対応が注目されているCFHと標的抑制分子を同じくする新しい補体活性化抑制因子CTRP6に係る免疫組織学的解析や薬物による発現制御の研究も、米国輸入AMD患者眼球検体進めることができた。

新規医薬品候補物質の有用性の実験的POC確立としては、TNF α /TGF β 何れもHDAC回路を直接、間接に修飾することでEMT高進、ECM産生増大回路を高進することで相加的にRPEの線維化を促進することが判明した。報文2報を執筆終了投稿

準備中である。TGF、TNF 併用における線維化に係る各種遺伝子の発現抑制が既存のHDAC 阻害剤 SAHA に比較し 1000 倍水準で高活性であることが判明した。また、新たに判明した LOX の強力な阻害作用に着目して、緑内障の創傷治癒促進作用の評価も開始した。レーザー照射による脈絡膜申請血管誘導モデル実験で本低分子化合物は CNV 形成を抑制し、SMA 陽性の線維化形成も抑制された。

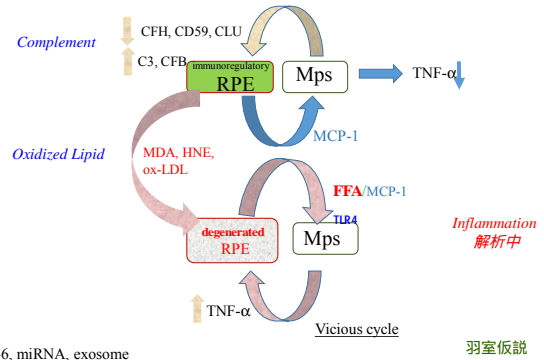


以上により、本事業において、血管新生、線維化組織形成、癒痕化などの病態を再現できる動物実験の構築、抗線維化形成の標的を早期、中期、晩期と系統的に差別化する実験系の構築、RPE の培養系の限界と有用性を見定め、新規低分子化合物の薬理特性の明確化の3点が終了した。AMD 病態進行の中で、RPE の epigenetic な調節機構の破綻を引き金とする組織線維化に注目している。HDAC (histone deacetylase) 阻害剤による線維化抑制への試みは、腎臓を中心に既に知られているが、未だ、臨床に繋がる結果は得られていない。実用の域に達する作用濃度で副作用の少ない化合物の見出されていないこと、病態対象が時空間的に明確にされていないために、医療ニーズとの間に乖離のあるためである。OBP801 は、RPE の線維化に対し極めて低濃度、投与量で有効性を示すとともに、組織線維化に係るものや前駆病変に係る複数の遺伝子に対し網羅的に抑制効果を示す世界で初めての化合物である。

新規病態診断技術の開発としては、RPE からの補体抑制因子 CTRP6 ならびに Clusterin の産生が Mps との細胞間相互作用により抑制される、逆に、炎症増幅回路に係る TNF 産生も RPE により抑制されることを世界で初めて見出した。これらは、

平成 28 年度に眼科の国際誌に掲載された。これらの知見に基づき、炎症回路の増幅、補体活性化抑制回路の破綻(下図参照)の双方に係る RPE 変性分子機構を明らかにすることで、この破綻機構を修復できる医療技術の創生に取り組んだ。

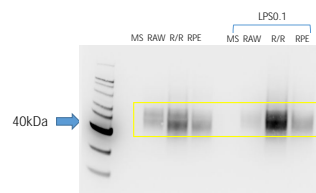
Distinct Paracrine Loops Between RPE and Mps



一方、Mps/RPE 間のパラクリン相互作用を担う分子本体にエキソゾームが関連していると想定し、その解析を実施した。LPS 0 のとき miR-3473a, miR-3473b, miR-3473c、LPS 0.1 のとき miR-3473a の上昇が安定的に認められ、これらの miRs が炎症増幅回路に関係し RPE の変性に係る可能性が示唆された。

これに関連して、Mps と RPE の共培養により CD63 陽性の Exosomes の産生が著明に増強されることも確認できた(下図)。この CD63 陽性 Exosomes 中に上記 miRs が含まれているか現在解析中であり、その確認をもって、標的遺伝子の同定に進みたいと考えている。

CD63陽性Exosomeの産生



LPS0 のとき、LPS0.1 のとき、ともに共培養でもっとも強く発現していた。
MS: 培地対照、RAW: RAW264 単独、RPE: マウス初代RPE細胞、R/R: 共培養培養24時間

今後、本知見の深化に努めるとともに、マウスの系だけでなくヒトの解析系構築に着手した。THP-1 細胞を PMA で刺激して Mps に分化させヒト ARPE19 細胞株と共培養

したところマウス系で確認したと同様、炎症性サイトカイン産生の相乗効果が確認できた(図)ので、本ヒトの系での Exosome 解析に進む。同時に iPS 由来のヒト RPE の活用も試みたいと考えている。



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1件)

1. Yamawaki T, Ito E, Mukai A, Ueno M, Yamada J, Sotozono C, Kinoshita S, Hamuro J. The Ingenious Interactions Between Macrophages and Functionally Plastic Retinal Pigment Epithelium Cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016; 57: 5945-5953.

〔学会発表〕(計4件)

1. 山脇敬博、伊東瑛子、山田潤、木下茂、外園千恵、羽室淳爾. Inflammatory vicious cycle between RPE and macrophages degenerates its phagocytic function. 第120回日本眼科学会総会 2016年4月8日、仙台、仙台国際センター
2. 山脇敬博、伊東瑛子、山田潤、木下茂、外園千恵、羽室淳爾. 加齢黄斑変性の炎症病態におけるマクロファージの関与. 第121回日本眼科学会総会, 2017年4月7日, 東京, 東京国際フォーラム
3. 山脇敬博、山田潤、伊東瑛子、外園千恵、木下茂、羽室淳爾. 加齢黄斑変性病態における RPE 局所炎症増悪と機能変性. 第8回 RRM Retina Research Meeting, 2015年10月31日, 東京, JPタワーホール
4. Takahiro Yamawaki, Eiko Ito, Jun Yamada, Shigeru Kinoshita, Chie Sotozono, and Junji Hamuro. Inflammatory vicious cycle

between RPE and macrophages degenerates its phagocytic function. The Annual Meeting of the Association for Research and Ophthalmology(ARVO), May2 2016, Seattle, USA

〔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
羽室 淳爾 (HAMURO JUNJI)
京都府立医科大学・大学院医学研究科
・特任教授
研究者番号: 80536095
- (2)研究分担者
()
研究者番号:
- (3)連携研究者
()
研究者番号:
- (4)研究協力者
山脇 敬博 (YMAWAKI TAKAHIRO)
伊東 瑛子 (ITO EIKO)
向 敦史 (MUKAI ATSUSHI)