

令和元年6月6日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11292

研究課題名(和文) 癌関連網膜症発症機序における関連因子の細胞内ネットワークの検討

研究課題名(英文) Study of cellular network related factors causing cancer-associated retinopathy

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：癌関連網膜症(CAR)では腫瘍に異所性に発現した視細胞特異蛋白リカバリン(Rec)に対して自己抗体が産生され、視細胞を傷害すると考えられている。我々は先にこれらの機序にG蛋白共役受容体キナーゼ(GRK)およびカベオリン-1(Cav-1)の関与を示唆した。Cav-1の機能は腫瘍増殖・転移・薬物抵抗性の制御に関連することが報告されている。今回の研究ではヒト癌由来の種々のCell Lineでもカバリンの異所性発現が実際の様々な腫瘍細胞においても10-50%の頻度で発現していた。さらにRecをの発現有無のA549細胞を調整し、薬剤感受性を調べたところRecを発現したもののほうが高い感受性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リカバリンは視細胞内ではGRK1と共役し明暗順応の制御に関与するが、癌細胞では他のGRKおよびカベオリンと共役し、細胞増殖を制御する可能性を示唆した。また、カベオリン-1の機能として腫瘍増殖・転移・薬物抵抗性のシグナル伝達制御に関連する重要な因子であることが報告されている。これらの報告を踏まえると、本研究結果はリカバリンが腫瘍細胞中でカベオリンと共役し、薬剤抵抗性を制御することを強く示唆する。ゆえにリカバリンの存在は、原発癌に対する抗がん剤の効き目をあげると考えられる。また、カベオリンのように、将来的には各種腫瘍に対する予後マーカーとなりうる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cancer-associated retinopathy (CAR) is an ocular manifestation of a paraneoplastic syndrome whereby immunological reactions toward recoverin and other antigens aberrantly expressed in tumor cells is elicited. To elucidate the pathological role of the aberrantly expressed recoverin, we studied the recoverin expression levels in various malignant tumors and the effects of the expressed recoverin on the sensitivity to anti-cancer drugs. Recoverin expression levels were determined by immunohistochemistry with anti-human recoverin monoclonal antibody on multiple tissue arrays obtained from several cancers. In the presence of several anti-cancer drugs, cytotoxicity assay was performed using recoverin positive or negative A549 cells originated from human lung adenocarcinoma. Recoverin immunoreactivities were detected at approximately 10-40% of malignant tumor tissues. Cytotoxic effects by anti-cancer drugs were higher in recoverin-positive A549 cells as compared to recoverin-negative cells.

研究分野：眼科学

キーワード：リカバリン 癌関連網膜症 カベオリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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

〔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 :
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

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

[その他]
ホームページ等

(1)研究分担者

研究分担者氏名：阿部晃

ローマ字氏名：ABE AKIRA

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部・

職名：講師

研究者番号(8桁)：70136927

研究分担者氏名：平岡美紀

ローマ字氏名：HIRAOKA MIKI

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部・

職名：講師

研究者番号(8桁)：80246983

研究分担者氏名：日景史人

ローマ字氏名：FUMIHITO HIKAGE

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部・

職名：講師

研究者番号(8桁)：30837547

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。