

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04352

研究課題名(和文)細胞干渉を介在する細胞外分泌微粒子EVsによる角膜内皮細胞変性制御

研究課題名(英文)Cell to Cell Interactions Orchestrated by Exosomal MiRNAs

研究代表者

木下 茂(Kinoshita, Shigeru)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30116024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：培養ヒト角膜内皮細胞を前房内に注入する世界初の再生医療が臨床的に角膜移植を凌ぐ長期に亘る臨床効果を確認した(New Engl J Medicine, 2018)。本再生医療の成功は、多数の不均質な細胞亜集団が存在するヒト角膜内皮細胞の培養系において亜集団を識別する技術確立し、内皮間葉系移行の生じない脱分化法を確立し小型で細胞密度が高い亜集団の高効率培養を樹立したことに基づく。規格細胞のエネルギー代謝はミトコンドリア依存性酸化的呼吸に傾斜し、TCA経路に係るミトコンドリア偏在代謝酵素は全て規格細胞で高進し、脱分化細胞の分化破綻に核局在AcetylCoAの偏在が役割を果たすことが想定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確認された臨床効果に優れる培養ヒト角膜内皮規格細胞のミトコンドリア機能の解析やエネルギー代謝特性の明確化は、細胞注入再生医療全般に対し新しい方向性を示唆するものである。解糖系の代謝酵素の高進やグルタミンの細胞内取り込みにより代謝系のリプログラミングが引き起こされることで脱分化細胞からの分化の破綻が生じるとの考え方は学術的にも新しい。臨床効果の劣る非規格細胞における子の分化破綻機構に、ミトコンドリア内ではなく細胞質や核内に存在するAcetylCoAがEpigenetic多遺伝子発現に係り非規格細胞の形質発現を制御するとの考え方は国際的にも全く新しい知見である。

研究成果の概要(英文)：Corneal endothelial dysfunction such as bullous keratopathy (BK), Fuchs' endothelial corneal dystrophy (FECD) can be restored only with corneal transplantation. We have recently developed a cell-injection therapy using cultured human corneal endothelial cells (chCECs) (New Eng J Med. 2018). Cultured HCECs have an inclination towards cell-state transition (CST). The expression of miRNAs are essential in the regulation of many cellular processes closely linked to CST in chCECs. In this current study, we present the first finding that the lowered miRs in pathogenic tissues may induce the groups of exosomal miRs reliant on the depolarized CD44⁺~⁺ pathogenic HCECs. IFN- γ , IL-17, and PDGF-bb could affect the prognosis of keratoplasty. MiRNAs secreted into the aqueous humors (AH) may regulate the expression of cytokines in the neighboring HCECs. Also, the functional metabolites in the AH of BK patients were identified by LC-MS and GC-MS.

研究分野：眼科学

キーワード：再生医療 角膜内皮細胞 脱分化 ミトコンドリア エピジェネティクス 代謝リプログラミング 細胞同調 miRNA

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

角膜の機能不全の中で、視覚機能に重要な透明性維持に不可欠な角膜内皮細胞機能の不全患者の占める割合は60%を超える。現在、唯一の治療法は角膜移植とされる。角膜移植では、内皮細胞密度が移植後経時的に低下し、再手術を余儀なくされる場合が頻発する。角膜内皮機能不全疾患の細胞分子病態への理解は国際的にも殆ど進んでいない。(1)成熟分化角膜内皮細胞の細胞生物学的形質と生体組織での機能的対応、(2)存在の不明瞭な角膜内皮体性幹細胞からの機能性成熟細胞への分化過程、(3)細胞培養における易相転移性(相転移:細胞老化・上皮間葉移行(EMT)・線維化などに関連する機能変化)、(4)疾患病態の細胞特性を惹起する病因学的因子の実態解明など、多くの課題が未解決である。生体組織内と相同の培養細胞が作成出来なかったことに起因する。

申請者らは、EMT化による細胞脱分化を伴う過程には、幹細胞様前駆細胞生成など不均質な細胞亜集団の形成と、それに伴う当該不均質細胞間に細胞間相互作用のあること、本細胞間相互作用にmiRNA(miR)や細胞外微粒子(EV)たる Exosomeが関与する可能性を見出し、本研究を展開した(図-1)。

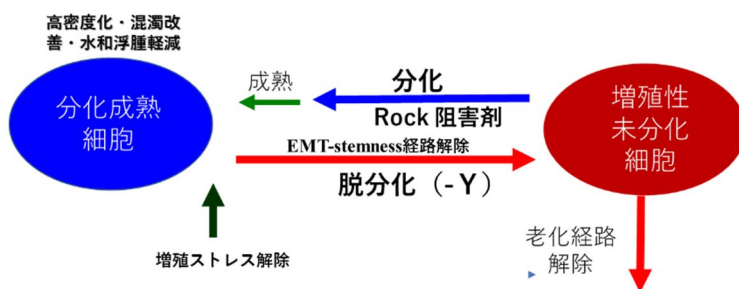


2. 研究の目的

本研究課題は、cHCEC に存在する細胞亜集団間の Exosome,含有 miR を介するパラクリンの細胞干渉の制御により、成熟分化形質を安定的に保持した HCEC の培養を可能にする技術基盤の確立と、本亜集団間細胞干渉を角膜内皮機能不全病態の *in vitro* 疑似モデルとして確立し、創薬を含む革新的医療技術創出のための基盤技術を提供することにある。図-2 に示す脱分化作用と分化の段階的進展の動力学的解析。

CD44 発現と下流の信号伝達系を介する pseudopodia 形成など細胞骨格構造の変化の対応付け、角膜内皮細胞機能不全患者の前房内微小環境の miR とサイトカインプロファイルとの関連付けによる解釈、などを主たる目的と為す。

図-2. EMT→老化経路を回避した分化成熟・機能性ヒト角膜内皮細胞の誘導



3. 研究の方法

次の3項目の研究方法については共通に用いる。1.不均質な cHCECs の確保, 2. MiR 及び Exosome の単離・同定, 3. 基本的細胞特性と細胞機能の評価法。

1. 細胞内 miR378 と病態との関連

miR378 mimic を cHCEC 亜集団の老化様細胞に導入すると分化度に逆相関して発現する。CD44 発現が低下し、SASP の発現も抑制される。miR378mimic や inhibitor 導入時の細胞培養上清中の Exosome の分子種を検索し、miR378 がパラクリンの作用によって同調細胞分化を起こすか、逆に細胞競合による細胞変性を惹起するか検定する。

2. 細胞内 miR34a の機能解析

今一つ cHCEC 亜集団間でその発現に特異的な偏奇を認めた細胞内 miR は miR34a である。MiR34a は成熟分化細胞亜集団でのみ発現が高く、CD44 の発現の強弱に拘わらず陽性の細胞では発現が認められない。本 miR はがん抑制遺伝子 p53 誘導性の miR として知られる。p53 は解糖系応答を抑制すること、成熟分化細胞は OXPHOS 系に偏奇しており、p53 発現から解糖系エネルギー代謝抑制に至る経路への miR34a の関与が推量される。

3.細胞外分泌型 miR 並びに Exosome 含有 miR の分子種解析

CD44 発現に逆相関して細胞外分泌型 miR184, 135 が低下することが判明している。また、相転移細胞では CD9 陽性や CD63 強陽性の Exosome が多量に分泌されるが、成熟分化 cHCEC では CD63 陽性の Exosome のみが分泌されることを見出している (IOVS, 57:4452-4463, 2016,)。CD44 発現の程度、すなわち細胞の分化度との関係で miR184, 135 の機能に遊離型、Exosome 包含型の何れが主として機能するか体系的に解析する。

4. 研究成果

1. 脱分化細胞の効率的な分化誘導による実用的培養技術の確立

多数の不均質な細胞亜集団が存在するヒト角膜内皮細胞の培養系において、上皮間葉系移行の生じない脱分化 分化法を確立し、生体内角膜内皮細胞に類似する小型の **CD44^{-/+}** 亜集団の高効率培養が可能となった。図-2 に示すように、**EMT** 回路経由での脱分化を増殖ストレスがかからない条件下で惹起させ、増殖性未分化細胞の老化細胞への経路を遮断することで、未分化細胞の **Rock** 阻害剤

による分化を効率良く行うものである。このことにより、上皮間葉系移行の生じない脱分化 分化法を確立し、生体内角膜内皮細胞に類似する小型で高密度の **CD44^{-/+}** 亜集団の高効率培養が可能となった。臨床効果に優れる本規格細胞のエネルギー代謝は、ミトコンドリア依存性の酸化的リン酸化に傾斜することが、産生代謝産物のプロファイル〔**図-3**〕並びにフラックスアナライザーによる **OCR, ECAR** 測定(**図-4**) で確認された。また、規格細胞では分岐鎖

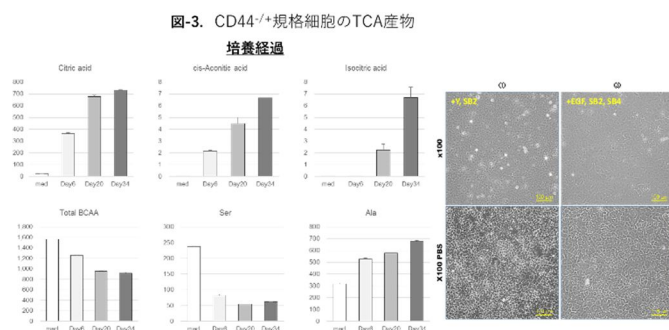


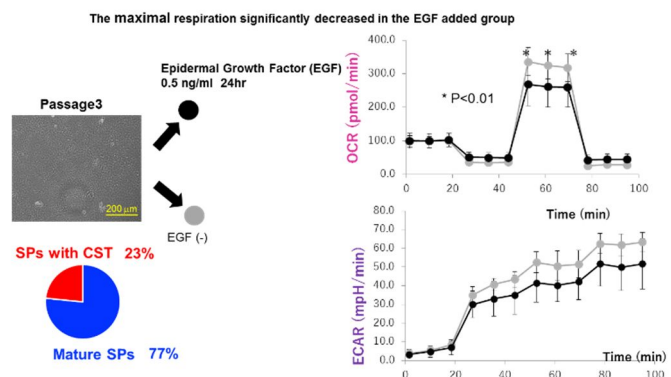
図-3. CD44^{+/+}規格細胞のTCA産物

アミノ酸やセリン代謝の高進が確認された。一方、解糖系の代謝酵素の高進やグルタミンの細胞内取り込みにより代謝系のリプログラミングが引き起こされることで臨床効果の劣る非規格細胞が生じる。本過程にミト

コンドリア内でなく細胞質や核内に存在する 代謝酵素により産生される核内 **AcetylCoA** が **Epigenetic** 多

遺伝子発現に係り非規格細胞の形質発現を制御すると想定している。ミトコンドリア 核の情報伝達による代謝 **Rewiring** の経路の全く新しい発見である。今後の再生医療に適用される細胞培養に大きなインパクトとなる。

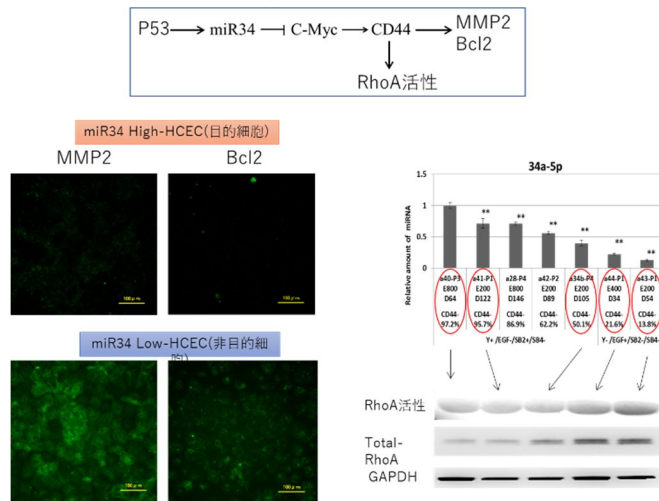
図-4. ミトコンドリア呼吸能と細胞亜集団



2. MiRNA34a 並びに 378a に機能とミトコンドリア機能

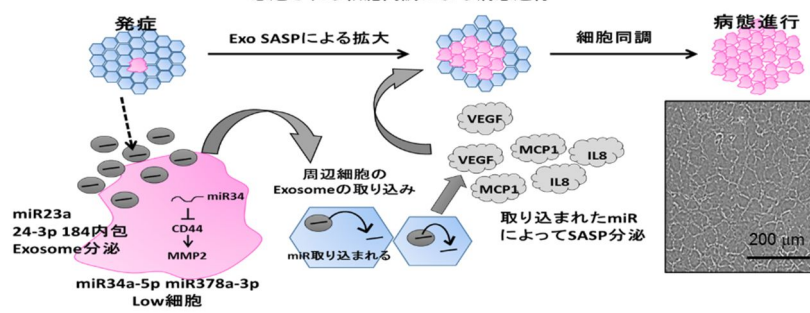
角膜内皮組織機能障害の代表的な疾患である水疱性角膜症は、角膜内皮細胞密度が大きく減少し細胞の形状が扁平で大きくなることで知られる。フックス角膜内皮ジストロフィー(FECD)では内皮細胞からデスメ膜後面へECMが沈積するGuttataの形成が知られております。cHCECsにおきましても、小型の敷石状の角膜内皮細胞形態とは異なる形態の細胞へのCSTが頻繁に引き起こされます。疾患病態組織・培養における相転移細胞での細胞集団の異常を、Exosomeを介する細胞間情報相互作用の視点から検討しました。病態組織・相転移細胞で発現低下するmicroRNAとして網羅的解析定量、RT-PCRによるバリデーションによりmiR34a-5pと378a-3pが選択されました。これらがなぜ発現減少し、発現減少によって何が引き起こされているか検討しました。miR34a-5pはP53によって発現が制御されます。本miRはC-Myc抑制を介しCD44発現を抑制しBcl-2, MMP2活性, 更にはCD44の下流にありますRhoA活性を抑制していることを確認した〔図-5〕。

図-5. miR34a-5pの作用と発現制御



本miRはC-Myc抑制を介しCD44発現を抑制しBcl-2, MMP2活性, 更にはCD44の下流にありますRhoA活性を抑制していることを確認した〔図-5〕。MiR34a-5p 378a-3pは培養ヒト角膜内皮細胞の産生するExosomeの量や質に影響を与えるのではないかとする視点で解析を進めました。細胞内miR34a-5p 378a-3pが低発現になればなるほど、その細胞からはSASPであるIL8, MCP1, VEGFがより多く分泌されることをEliza法により確認いたしました。パラクリン作用により周辺の細胞を老化させる可能性が推定されます。事実、細胞内のmiR34a-5p 378a-3pの低下でmiR23a,

図-6. 細胞内miR34a-5p, 378a-3pの低下により惹起される細胞同調による病態進行

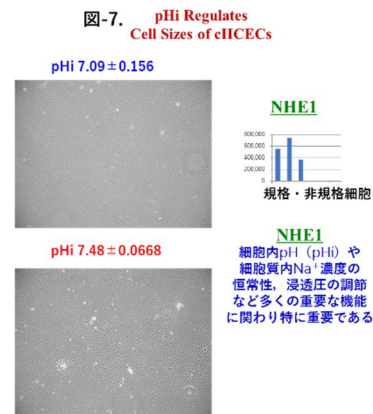


24、184などを包埋したExosomeが分泌増強され、パラクリン的に周辺細胞に取り込まれ、包埋miRの作用でSASPが増強され、そのSASPによって周辺細胞が老化変性する病態進行のVicious Cycleが起こる可能性を見出した〔図-6〕。

3. 細胞分化・疾患病態を規定する細胞競合、細胞協調-代謝リプログラミングの視点

本項目は当初計画には含まれず、研究途中で見出されたものであり、他のデータを省略し少し詳述する。我々は臨床効果に優れる規格細胞と上述のように脱分化後の分化に破たんが生じた非規格細胞の細胞機能の差異に関わる輸送タンパクやイオンチャンネルについて解析を進めた〔Hamuroら、IOVS, 2020年、in press〕網羅的プロテオーム解析の展開である。規格・非規格細胞をそれぞれ培養し、その細胞抽出物について質量分析を行いタンパク発現量を数値化した。発現量変化(Fold change)をもとに発現タンパクを3つの群に大別し、非規格細胞での発現量が2倍以上をGroup1、規格細胞での発現量が2倍以上をGroup3、両者に2倍以上差がないものをGroup2として分別し、Gene Ontology解析により機能的アノテーションをおこない、どのような生物学的な機能遺伝子が含まれているか

検討するとともに、**KEGG pathway** 解析により代謝特性の差別化を試みた。**GENE Ontology** 解析では非規格細胞でより多く発現しているタンパクには、**Exosome** に関連するものが多く、規格細胞でより発現しているタンパクの多くはミトコンドリア関連であることが判明した。次に、窒素代謝系に関わるアルギニンやグルタミン代謝経路の **pathway** 解析を行ったところ、炭酸脱水酵素 **CA** やグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(**GLUD**)やグルタミン酸アンモニアリガーゼ(**GLUL**)が細胞間で発現に差があることが判明しました。この **CA** のうち、細胞質に存在する異性体は非規格細胞で発現が高く、ミトコンドリアに存在する異性体 **CA5** は規格細胞で高発現であることを確認した。**CA5** はこミトコンドリアの膜に局在し、ピルビン酸と重炭酸イオンからオキザロ酢酸の合成、乳酸、ピルビン酸からのグルコース合成というミトコンドリアの2つの重要な反応系に重炭酸イオンを供給します。実際に、両細胞間で細胞内 **pH** に大きな差のあることも判明しました〔図-7〕。

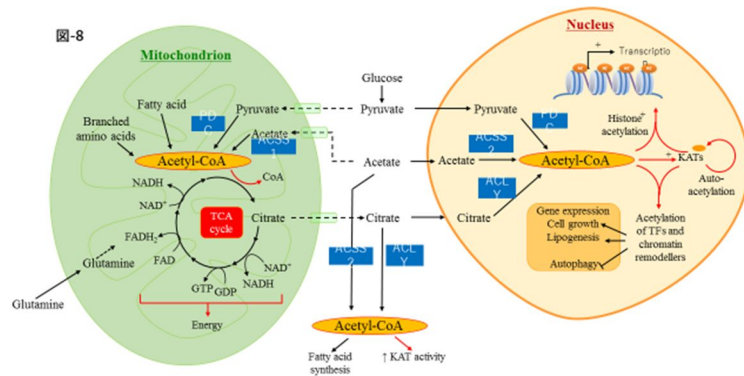


細胞の透明性維持水和に係るイオン輸送体タンパクの発現でも、ミトコンドリア膜透過に関与する **NHE1** や **SLC25A18**、水分子を選択的に透過させるアクアポリンタンパク **AQ1** は規格細胞で発現が高進し、このような選択的発現は新鮮角膜組織でも確認され、角膜組織の透明性維持機能との相関が示唆された。以上のように、細胞分化・疾患病態を規定する細胞競合、細胞協調-代謝リプログラミングの視点でのプロテオーム解析で見出された、規格細胞と非規格細胞で発現の相違が見られる炭酸脱水酵素や乳酸代謝関連酵素、イオン輸送タンパク等が、移入細胞で発現することが設定規格を充足する規格細胞が生体内で有効性を示す科学的論拠になると期待される。最期に、今一つ予定外の重要な発見を紹介する。ミトコン

表-1 代謝酵素のオルガネラ選択的局在

CST cHCECs	分化成熟 cHCECs	
ACLY	CS	ACLY, ATP-citrate lyase, CS, citrate synthase
ACO1	ACO2	Aconitase 1/2
IDH1	IDH2	Isocitrate dehydrogenase 1/2
MDH1	MDH2	Malate dehydrogenase
ME1	ME3	Malic acid enzyme1/3
ACSS2	ACSS1	Acetyl-CoA synthase short chain 1/2
ACAT2	ACAT1	Acetyl-CoA acetyltransferase 1/2
LDH	PDH	Lactate dehydrogenase, Pyruvate dehydrogenase
Cytosol/Nucleus	Mitochondrion	

ドリア呼吸系の基質要求性は規格細胞に比較し **CST** 細胞では **anaplerosis** が高進すること、規格細胞ではミトコンドリア内分岐鎖アミノ酸代謝に係る **BCAT2** や **BCKDH** の高進が確認された。興味あることに、**TCA** 経路に係るミトコンドリア偏在代謝酵素 **CS, ACO2, IDH2, MDH2, ME3** や **AcetylCoA** 産生に係る **ACSS1, ACAT1** は全て規格細胞で高進し、細胞質に遍在する **Isozymes** である **ACLY, ACO1, IDH1, MDH1, ME1** や細胞質や核内の **AcetylCoA** 産生に係る **ACSS2, ACAT2** は **CST** 細胞で発現が高進していた(表1)。このことは、培養ストレスと言う環境因子の影響下で産生される細胞質や核内の **AcetylCoA** が **Epigenetic** にヒストンのアセチル化に係り **CST** 細胞の形質発現を制御している可能性を示唆する。脱分化細胞の分化破綻に核局在 **AcetylCoA** の偏在が重要な役割をしていると想定している〔図-8〕。



は規格細胞に比較し **CST** 細胞では **anaplerosis** が高進すること、規格細胞ではミトコンドリア内分岐鎖アミノ酸代謝に係る **BCAT2** や **BCKDH** の高進が確認された。興味あることに、**TCA** 経路に係るミトコンドリア偏在代謝酵素 **CS, ACO2, IDH2, MDH2, ME3** や **AcetylCoA** 産生に係る **ACSS1, ACAT1** は全て規格細胞で高進し、細胞質に遍在する **Isozymes** である **ACLY, ACO1, IDH1, MDH1, ME1** や細胞質や核内の **AcetylCoA** 産生に係る **ACSS2, ACAT2** は **CST** 細胞で発現が高進していた(表1)。このことは、培養ストレスと言う環境因子の影響下で産生される細胞質や核内の **AcetylCoA** が **Epigenetic** にヒストンのアセチル化に係り **CST** 細胞の形質発現を制御している可能性を示唆する。脱分化細胞の分化破綻に核局在 **AcetylCoA** の偏在が重要な役割をしていると想定している〔図-8〕。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hamuro J, Numa K, Fujita T, Toda M, Ueda K, Tokuda Y, Mukai A, Nakano M, Ueno M, Kinoshita S, Sotozono C.	4. 巻 61
2. 論文標題 Metabolites interrogation in cell fate decision of cultured human corneal endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci.	6. 最初と最後の頁 10-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Toda M, Yukawa H, Yamada J, Ueno M, Kinoshita S, Baba Y, Hamuro J.	4. 巻 60
2. 論文標題 In vivo fluorescence visualization of anterior chamber injected human corneal endothelial cells labeled with quantum dots	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci.	6. 最初と最後の頁 4008-4020
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto A, Tanaka H, Toda M, Sotozono C, Hamuro J, Kinoshita S, Ueno M, Tanaka M.	4. 巻 3
2. 論文標題 A physical biomarker of the quality of cultured corneal endothelial cells and of the long-term prognosis of corneal restoration in patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Biomed Eng	6. 最初と最後の頁 953-960
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kinoshita S, Koizumi N, Ueno M, et al.	4. 巻 378
2. 論文標題 Injection of Cultured Cells with a ROCK Inhibitor for Bullous Keratopathy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 N Engl J Med.	6. 最初と最後の頁 995-1003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Numa K, Tanaka H, Ueno M, Imai K, Hagiya M, Inatomi T, Okumura N, Koizumi N, Sotozono C, Kinoshita S
2. 発表標題 1.Four-year follow-up after injection of cultured corneal endothelial cells with a ROCK inhibitor for bullous keratopathy
3. 学会等名 AAO 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Morio Ueno, Keigo Yoshii, Tomoko Fujita, Asako Uehara, Kazuko Asada, Chie Sotozono, Shigeru Kinoshita, Junji Hamuro
2. 発表標題 Integral analysis of cytokines and miRNAs in the aqueous humor of bullous keratopathy patients to develop prognostic biomarkers
3. 学会等名 2018XXIII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 羽室 淳爾
2. 発表標題 Concomitant Evaluation of a Panel of Exosomes and MiRs Playing Roles in the Pathogenesis for Human Corneal Endothelial Dysfunction
3. 学会等名 Annual meeting-ISEV2017, Toronto, Canada,18-21, 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ueno M, Toda M, Yamamoto Y, Tanaka H, Numa K, Okumura N, Koizumi N, Imai K, Hagiya M, Inatomi T, Sotozono C, Teramukai S, Kinoshita S, Hamuro J,
2. 発表標題 2.Effectiveness of injecting differentiated subpopulations of cultured corneal endothelial cells for bullous keratopathy
3. 学会等名 2.Effectiveness of injecting differentiated subpopulations of cultured corneal endothelial cells for bullous keratopathy (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuko Asada, Morio Ueno, Mukai Atsushi, Munetoyo Toda, Shigeru Kinoshita, Chie Sotozono and Junji Hamuro
2. 発表標題 Cell to Cell Interactions Orchestrated by Exosomal MiRNAs between Pathogenic- and Non-pathogenic Corneal Endothelial Cells
3. 学会等名 Annual meeting-ISEV2019, Kyoto, Japan,24-28, April,2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 日本特願	発明者 木下茂、羽室淳爾、 外園千恵、上野盛 夫、戸田宗豊	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-032139	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	上野 盛夫 (Ueno Morio) (40426531)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	
研究 分 担 者	羽室 淳爾 (Hamuro Junji) (80536095)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員教授 (24303)	