

令和 2 年 4 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11457

研究課題名(和文) 網膜色素上皮細胞とマイクログリアの相互作用と眼内増殖膜への影響に関する研究

研究課題名(英文) The effect of the interaction between retinal pigment epithelial cells and microglia on the proliferative membrane

研究代表者

高橋 枝里 (Takahashi, Eri)

熊本大学・病院・講師

研究者番号：60622602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：マイクログリア(MG)は脳、網膜に局在する免疫担当細胞で、サブタイプで炎症性刺激への反応性と貪食能が異なる。本研究ではMGのサブタイプにおける分泌性サイトカインの種類について検討を行い、アレイの結果、C1VC-1、C1NC-2 / 、TIMP-1、sICAM-1、MIP-1、MIP-3 の分泌を認め、これらはサブタイプとIL-4によって変化した。また、1回膜貫通型受容体であるCD44について解析するとタイプ1とタイプ2のCD44発現について解析をするとタイプ1とタイプ2どちらもCD44の発現を認めたが、タイプ1ではCD44は何らかの修飾をつけているかバリエーションが異なる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症細胞が分泌する生理活性物質は増殖因子やサイトカイン、ケモカインなど多岐にわたるが、現在臨床の場で使用されている生物学的製剤はTNF- α やVEGF など単一の因子を標的としており、多くは継続的な投与や再燃などの課題が残る。マイクログリアを標的として制御を試みることは、生理活性物質の分泌そのものを制御することであり、複雑なシグナルのクロストークを抑制する可能性があり、有効な治療戦略となると考える。

研究成果の概要(英文)：Microglia are a kind of immune cells specifically located in the brain and retina. The ability of response to some inflammatory stimuli depends on their subtype. In this study, we performed the cytokine array and found that microglia secreted C1VC-1, C1NC-2 / 、TIMP-1, sICAM-1, MIP-1、MIP-3. Further, we focused on the cell surface receptor, CD44 which is associated with homing in lymphocytes. We found that both subtype 1 and 2 microglia expressed CD44. Interestingly, it is suggested that CD44 in type 1 microglia is modified or has different variant type compared to type 2.

研究分野：眼科

キーワード：マイクログリア 炎症

1. 研究開始当初の背景

増殖硝子体網膜症は外傷や裂孔原性網膜剥離を契機として網膜上・網膜下増殖膜が生じ、この増殖膜が収縮することで牽引性網膜剥離が生じる予後不良の疾患である。外傷や裂孔を介して硝子体中へ網膜色素上皮細胞が散布され、網膜色素上皮細胞が硝子体中に含まれる様々な増殖因子や炎症性サイトカインにより活性化され、上皮間葉転換が誘導されることが増殖膜の形成の一因であると考えられており (Connor TB, et al. J Clin Invest. 1989、Casaroli-Marano RP, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999、Saika S, et al. Lab Invest. 2004)。当研究室においても硝子体刺激により網膜色素上皮細胞において上皮間葉転換に関連する TGF- β 1-Smad 2/3 のシグナル経路が活性化することを確認している (Takahashi E, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2016)。我々はヒト培養網膜色素上皮細胞 (ARPE-19) において、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF- α) がヒアルロン酸受容体 CD44 を介して上皮間葉転換を誘導することを見出し、網膜色素上皮の上皮性には ERM タンパク質ファミリーである merlin が重要な役割を担う一方、間葉系の性質の獲得・維持には moesin の活性化が重要であることも報告している (Takahashi E, et al. J Biol Chem. 2010、Takahashi E, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015)。

網膜増殖硝子体網膜症における眼内の増殖膜では、アストロサイト、ミューラー細胞、マイクログリアなどのグリア細胞が局在することは知られているが、その役割についてはまだ議論の余地が多い (Pastor JC, et al. Prog Retin Eye Res. 2002)。マイクログリアの脳、網膜に局在する特有の免疫担当細胞で、形態を用いた活性・非活性の分類やマクロファージ様の M1、M2 の分類があるが、我々は、マイクログリアのサブタイプに注目している。このサブタイプはアルツハイマー型認知症マウスモデルでアミロイドの貪食能が異なり、また、脳梗塞における脳虚血モデルにおける障害細胞の貪食にも関連することが報告されている。これらの報告より、我々は網膜においてもサブタイプの違いにより、炎症性刺激への反応性が異なるのではないかと考え、軸索の断端の貪食能が異なることを見出した (Haga A, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016)。また、マイクログリアは各サブタイプでアルツハイマー病モデルでのアミロイド貪食能が異なり、脳梗塞モデルでの細胞毒性が違ふことが報告されており、マイクログリアの 2 面性 (神経保護、細胞毒性) を説明する鍵であることが考えられる。眼科領域でサブタイプの解析を行ったのは我々が初めてであり、様々な眼疾患でマイクログリアが担う役割について更なる解析が必要である。マイクログリアは網膜、視神経にも一部局在するが、炎症刺激により視神経を通じて脳より遊走すると考えられており、当研究室においても視神経損傷により障害部位、視神経乳頭、網膜内側へ増加することを確認している。

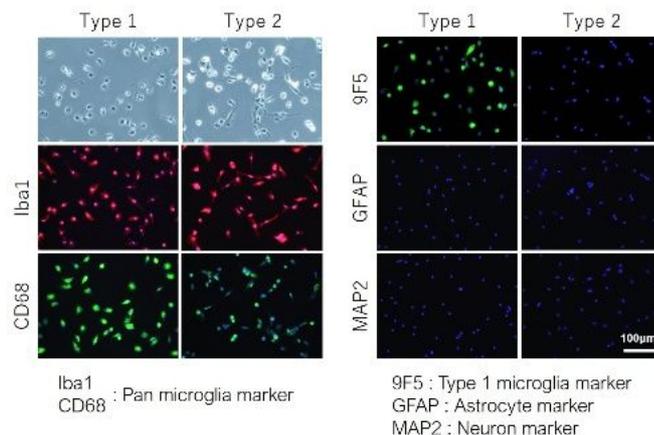
炎症部位では炎症組織に局在するマクロファージが様々な生理活性物質を分泌することで骨髄からの炎症性細胞の遊走や炎症部位での上皮間葉転換を誘導すると考えられており、網膜色素上皮における炎症が生じると炎症部位へとマイクログリアが遊走し、その結果、マイクログリアと網膜色素上皮の相互作用が生じ、増殖硝子体網膜症に関連するのではないかと着想するに至った。

2. 研究の目的

当研究はマイクログリアのサブタイプによる細胞毒性、神経保護の役割の違いを明らかにし、また、網膜色素上皮とマイクログリアの相互作用を解明し、増殖硝子体網膜症の病態を明らかにすることを目的とする。まず、マイクログリアの各サブタイプにおける遊走能の違いがあるのか、また、違いがある場合、どのタンパク質またはシグナル経路が制御するのかと検討する。その目的はマイクログリア特異的な経路を明らかにし、マイクログリアサブタイプを特異的に制御することで、マイクログリアを標的とした新たな増殖性疾患の治療薬の標的を見出すことである。

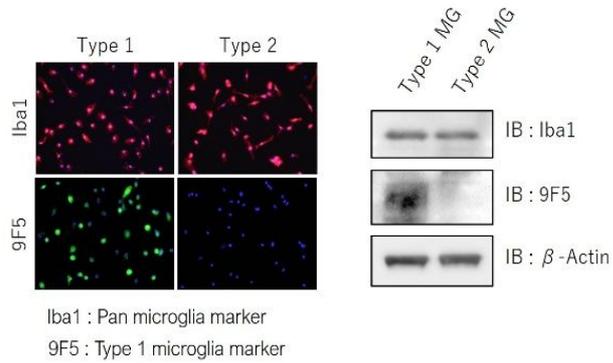
3. 研究の方法

マイクログリアの各サブタイプはラット脳より単離する。生後 1 - 3 日のラットを断頭後、脳を摘出、ピペティングで懸濁し混合グリア細胞をまず培養する。混合グリア細胞から、150rpm で振盪し 1 型マイクログリアを単離し、その後、2 型マイクログリアをトリプシン法で分離・回収し、それぞれを実験に用いる。この方法によって単離したマイクログリアはアストロサイトマーカー陰性、ニューロンマーカー陰性で、汎マイクログリアマーカー



ー Iba1、CD68 陽性であることから、単離方法は適切であることがわかる。

マイクログリアの免疫染色には汎マイクログリアマーカーである Iba1、タイプ1マイクログリアの免疫染色には 9F5 抗体を用いる。タイプ1マイクログリアにおいて、9F5 陽性、Iba1 陽性を示し、タイプ2マイクログリアは 9F5 陰性、Iba1 陽性である (右図、Haga A, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci.2016)。

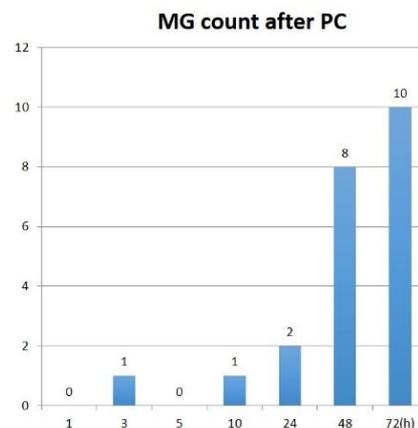
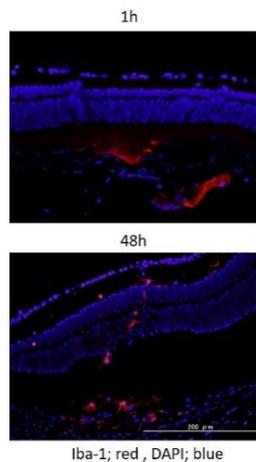


マイクログリアの網膜への遊走について、レーザー誘導脈絡膜新生血管モデルを用いて検討する。12 週齢の C57/BL6J マウスをケタミン・キシラジン混合液の腹腔注射により麻酔を行い、経瞳孔的にレーザーを網膜 1 象限に対し 1 発照射することで CNV を誘導し、経時的にマイクログリアの局在を免疫染色で確認する。ヒト増殖膜におけるマイクログリアの局在については手術サンプルを用いる。

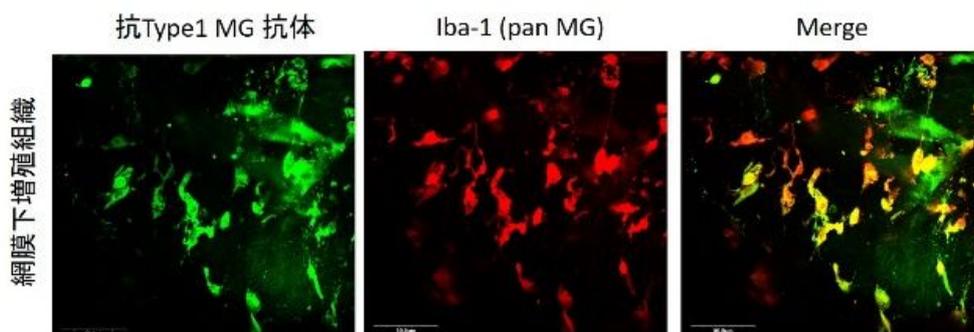
炎症部位へ遊走したマイクログリアが分泌するサイトカインや増殖因子が網膜色素上皮に作用するのかを検討するために、各サブタイプのマイクログリアの培養上清中に分泌する生理活性物質を ELISA や multiplex で解析する。同時に、マイクログリアが網膜色素上皮へ及ぼす影響も考え、各サブタイプが分泌する生理活性物質を同様に解析し、網膜色素上皮の活性化、上皮間葉転換誘導・維持の有無について、共培養システム等を用いて検討を行う。

4. 研究成果

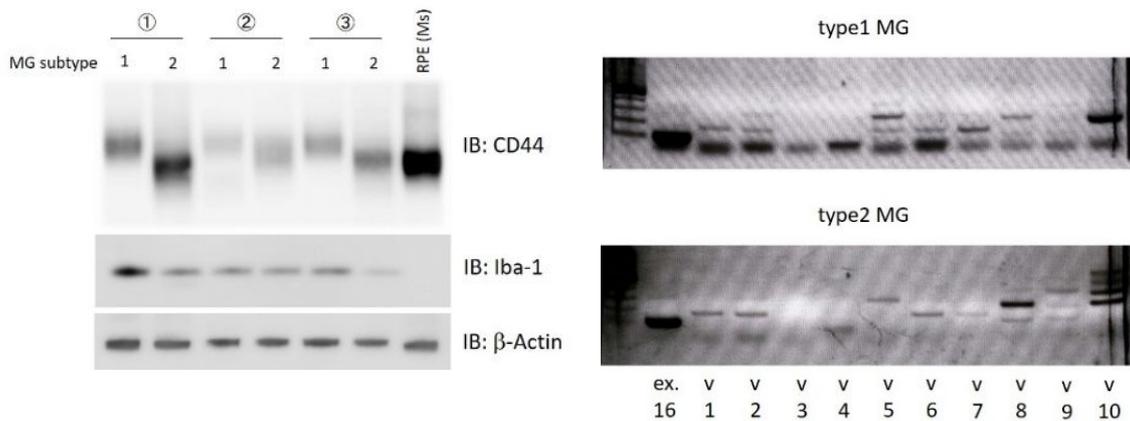
レーザー誘導脈絡膜下新生血管モデルを作成し、マイクログリアの局在について検討したところ、経時的に、また、照射早期にマイクログリアが網膜へ遊走することがわかった。



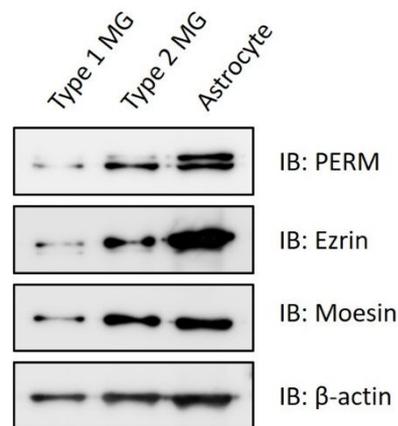
増殖硝子体網膜症における網膜下組織を採取し、速やかに固定した後、汎マイクログリアマーカー Iba1 (赤色) と抗タイプ1マイクログリア抗体 (緑色) を用いて免疫染色を行った。代表的な染色結果を下図に示す。抗タイプ1マイクログリア抗体は網膜色素上皮細胞でも陽性となるとされるが、Iba1 と共染することから、9F5 陽性細胞はタイプ1マイクログリアであると考えられる。また、9F5 陰性、Iba1 陽性細胞も認め、この細胞はタイプ2マイクログリアと考えられる。したがって、眼内の増殖膜にはタイプ1、タイプ2マイクログリアがともに局在していることがわかった。現在症例の集積を行っている。



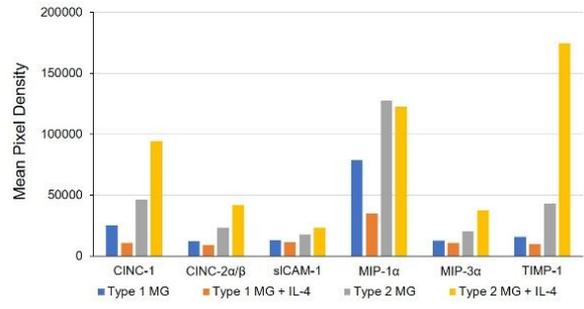
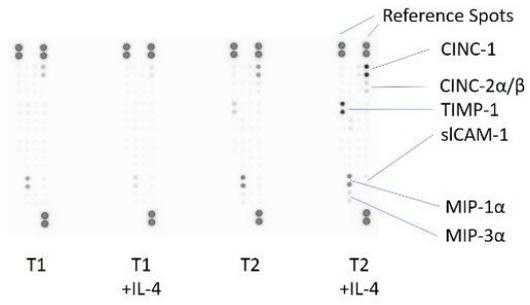
タイプ1、タイプ2のマイクログリアの遊走能に違いがあるか検討するために、我々はヒアルロン酸受容体 CD44 に注目した。ラット脳より単離したタイプ1、タイプ2マイクログリアにおいて CD44 の発現の違いについてウエスタンブロッティングを用いて検討した。網膜色素上皮細胞は CD44 の positive control として用いた。興味深いことにタイプ2とタイプ1マイクログリアはともに CD44 の発現を認めるが、バンドのシフトアップをタイプ1マイクログリアで認めた。CD44 は糖鎖付加など様々な修飾を受けること、また、多数のスプライシングバリエーションをもつ。スプライシングバリエーションは v1 から v10 まであり、v7、v8-10、v4-7、v6,7 といった選択的スプライシングにより様々な病態に関連することが知られている。そこで、各バリエーションのプライマーを用いてサブタイプにおける CD44 バリエーションの違いについて PCR 法によって検討した。バリエーションが異なることが示唆されたが、更なる検討が必要である。



次に、CD44 とアクチン細胞骨格との架橋タンパクである Ezrin/Radixin/Moesin(ERM)タンパク質ファミリーの発現について検討を行った。ERM タンパク質は protein kinase C や p38MAPK によるリン酸化を受け CD44 の細胞質内ドメインに結合し、細胞室外ドメインとヒアルロン酸との結合を強化するとされている。ウエスタンブロッティングの結果を右に示す。タイプ1に比較しタイプ2マイクログリアがエズリン、モエシタンパク質発現が高く、モエシンのリン酸化がより高かった。今後は CD44 の修飾やバリエーション、ERM タンパク質の関係を検討する予定である。



一方、網膜色素上皮細胞の上皮間葉転換の誘導や遊走とマイクログリアの関係を解析するために、単離したマイクログリア タイプ1、タイプ2それぞれが分泌するサイトカインを解析した。また、タイプ1とタイプ2はそれぞれ IL-4 に対する反応性が異なることから(Haga et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016.) IL-4 刺激による分泌サイトカインの違いについても同時に検討した。サイトカインアレイを行った結果、分泌がより高かったものは、cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC、好中球走化因子)-1、CINC-2 / 、tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP、メタロプロテアーゼ組織阻害剤)-1、sICAM (soluble intercellular adhesion molecule、可溶性細胞間接着因子)-1、MIP (macrophage inflammatory protein、マクロファージ炎症タンパク質)-1 、MIP-1 であった。タイプ1に比べタイプ2マイクログリアで CINC-1、CINC-2 / の分泌亢進が高く、好中球の遊走によりタイプ2マイクログリアが寄与することが示唆された。また、マクロファージの遊走に関連する因子とされる MIP-1 、MIP-3 に関してもタイプ2マイクログリアの分泌がタイプ1マイクログリアに比して亢進していた。これらの結果より、マイクログリアは炎症組織における炎症細胞の遊走に関連し、特にタイプ2マイクログリアがタイプ1マイクログリアに比べサイトカイン分泌能が高く、IL-4 刺激でより亢進しており、炎症におけるタイプ2マイクログリアの関与が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	福島 美紀子 (Fukushima Mikiko) (10284770)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授 (17401)	
研究分担者	猪俣 泰也 (Inomata Yasuya) (50452884)	熊本大学・医学部附属病院・助教 (17401)	削除：2017年10月19日
研究分担者	谷原 秀信 (Tanihara Hidenobu) (60217148)	熊本大学・熊本大学病院・病院長 (17401)	