

令和 5 年 4 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03844

研究課題名(和文)細胞間代謝干渉(同調、競合)によるヒト角膜内皮機能不全病態増悪回路の制御法開発

研究課題名(英文)Cell to cell interaction leading to metabolic interference trigger the aggravated degeneration of human corneal endothelial cells

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) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜のイオンチャンネルが選択的に発現制御され細胞内のpHが7.0～7.2の中性域に維持され、ミトコンドリアの酸化リン酸化が維持される。結果、内皮細胞内で乳酸濃度による浸透圧勾配が生じ、AQP-1チャンネルとの協奏作用で前房側への水排出が促進され、角膜実質組織の脱水和という臨床効果に繋がる可能性が判明した。患者前房水に検出された3-ヒドロキシ酪酸(HIB)とmiR-34a-5pの間に正相関が認められLasso解析においてmiR-34a-5pとHIBの間に相関が認められた。前房水中の代謝産物ならびにmiRNAが協奏的に角膜の透明性維持に機能することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題の達成は広く細胞医療・移植医療に大きな意義を有する。細胞変性の係る加齢性疾患病態の細胞機構を明らかにし革新的創薬概念に結び付く。その斬新性と独創性ならびに角膜内皮機能不全患者病態に直結する意義は高く評価されている。細胞間干渉がEVに包含されるmiRや代謝産物に担われる可能性への切込みも他細胞領域を含め独創的である。新しい学術領域を拓く。角膜移植同様、細胞品質の劣る細胞注入再生医療でも注入後3-5年経過すると角膜内皮細胞密度は次第に低下する。慢性的な角膜内皮細胞密度の低下がいかなる機構で起こるかについては、本研究により細胞間代謝干渉による細胞変性の増幅と病態増悪の新概念を提唱するに至った。

研究成果の概要(英文)：The miRs in aqueous humors (AqH) were classified into 2 groups: the expression in 1 group was either significantly reduced in neonate-derived tissues or remained almost constant. The miR-34a and -29 families were in the former group, whereas miR-184 and -24-3p in the latter. Secretions of VEGF, IL-6 and MCP-1 were all repressed in both mature CD44-/dull and degenerated CD44+++human corneal endothelial cells(hCEC), transfected with an miR-184 mimic. The metabolites, 3-hydroxyisobutyric acid (HIB) and 2-aminobutyric acid (AB) were decreased in the AqH of BK patients. The Lasso analysis identified the interplay between miR-34a-5p and HIB and between miR-24-3p and AB. HIB upregulated the cellular miR-34a expression, mitochondrial membrane potential and release of EV miR-184 in de-differentiated cultured hCECs. Metabolites and miRs in AqH may synchronize in ensuring the integrity of the hHCE tissues to maintain efficient dehydration from the stroma.

研究分野：眼科学、細胞生物学

キーワード：角膜移植 再生医療 細胞外小胞体 マイクロRNA 細胞競合 水泡性角膜症

1. 研究開始当初の背景

本研究課題は「細胞間代謝干渉（同調、競合）によるヒト角膜内皮機能不全病態増悪回路の制御法開発」である。細胞間の競合同調は、細胞集団が持つ基本的挙動である。発生・癌分野を中心に革新的な研究が展開されている（Leungら, *Nature*. 2012, Kajita, Fujitaら, *NatComm*. 2014, Nakamura, Igakura, *Nat Comm*. 2014 など）。機能と形質を異にする同種細胞間に、ミトコンドリア呼吸系に制御される代謝干渉のあることが、研究協力者である北大の藤田らによって報告された（Icardら, *BBA*. 2014, Konら, *Nat Cell Biol*. 2017）。従来、がん病態の分野に限局されていた概念を、細胞単層組織の再建を意図する細胞医療としての再生医療や角膜移植を含む組織移植の分野に初めて展開するものである。細胞競合・細胞同調の制御破綻ががんの発生・進展に深く関与する可能性が論じられている。c-Mycは解糖系代謝の刺激作用に加え、グルタミンの細胞内取り込みとグルタミナーゼ活性を抑制するmiR23a/bをc-Mycが抑制するためとされる（Gao P, *Nature*. 2009）。しかし、本概念で移植医療。再生医療における組織構築を説明しようとする試みは稀である。本研究は、申請者が世界で唯一有する複数の培養ヒト角膜内皮細胞（cHCECs）亜集団間の代謝特性の差異を活用し、角膜内皮機能不全病態を加齢に伴う変性細胞亜集団の形成と、引き続き細胞同調による細胞変性増幅の視点から解釈する新たな疾患増悪概念に基づく。細胞間代謝干渉の視点から細胞変性の拡大と病態増悪を解釈しようとする斬新かつ科学的合理性を有する研究である。脱分化増殖性細胞亜集団がc-Mycを高発現すること、p53誘導性のmiRNAによる細胞同調の統御下での細胞間相互作用などの知見を積み上げ本研究課題の発案に至った。申請者はcHCECs亜集団間に見られる細胞間相互作用をmiRNA包含細胞外小胞体（Evs）の分子動態の視点で解析中であるが、本EVsは代謝物のCargo機能を果たし、標的細胞に取り込まれ代謝機能を修飾する可能性が高い。

本課題の達成は独り再生医療や視覚領域のみならず、広く細胞医療・移植医療に大きな意義を有する。同時に、細胞変性の係る加齢性疾患病態の細胞機構を明らかにし革新的創薬概念・技術提供に結び付く。細胞間代謝干渉の概念は細胞干渉の世界でも斬新なもので、そのPOC確立は、申請者が確立し、細胞の機能特性を仔細に解析してきた培養ヒト角膜内皮細胞(cHCECs)亜集団を駆逐することで初めて可能になる先端的な研究課題である。その斬新性と独創性ならびに角膜内皮機能不全患者病態に直結する研究課題の意義は国際的にも高く評価されている。更に、その細胞間干渉がExoに包含されるmiRや代謝産物に担われる可能性への切込みも他細胞領域を含め独創的である。新しい学術領域を拓く。

2. 研究の目的

1. 細胞変性に基づく細胞機能不全を特徴とする疾患病態の疑似モデルとしてのin vitro細胞培養、器官培養系を構築し、細胞外小胞体EVsを介する細胞間代謝干渉の疾患病態へ関与する鍵分子本体は何か明らかにする。

2. **細胞間代謝干渉**におけるイオンチャネル（AE2, Na⁺/K⁺ ATPase 異性体、Carbonicanhydrase (CA2,3,5), Monocarboxylate Transporters (MCT1,4)、SLC16 Family、Na⁺/H⁺Exchanger (NHE1), NBCe1、他のSLC蛋白の細胞質vsミトコンドリア内膜での選択的発現動態とNitrogen、Nicotinate、Nicotinamide、Arginine代謝の偏諱の対応等の解析を通じて角膜内皮細胞亜集団における細胞間、細胞内選択的発現の生理学的意義を解明する。同時に、組織恒常性維持に果たす代表的機能であるポンプ・バリアー機能と細胞質pHのミトコンドリア機能修飾との関連を解明する。細胞内pH、カチオン・アニオン平衡、乳酸排出による組織実質の水和調節と内皮細胞のエネルギー代謝の視点から本再生医療の臨床効果発現の科学的根拠に迫る。

3. **傍分泌作用を有するEVsおよびmiRNA (miR)による細胞間代謝干渉の分子実態を角膜内皮機能不全病態と関連付ける**。申請者らはヒト角膜内皮成熟分化細胞内で高発現するmiR

としてmiR-34aとmiR-378ファミリーを同定、同時にEV包埋型として相転移（CST）細胞から分泌されるmiR-23a、miR-184が標的成熟細胞で未分化細胞形質を誘導することを確認している。p53誘導性のmiRの低下を介するMYC誘導 CD44誘導 OXPPOS抑制経路での細胞競合と考え合わせるとこれらEVs産生が産生細胞の代謝特性とどのように係っているか？また、作用標的細胞のエネルギー代謝特性をどの様に偏奇させるか検討し代謝同調の分子機構の一端を明らかにする。

3. 研究の方法

試薬類、(ELISA), 定量PCR

試薬類やマウス系のマクロファージ（Mps）や網膜色素上皮細胞（RPE）との共培養系に用いる培地、初代網膜色素上皮（mpRPE）細胞の作成方法などは既に報告したものと同一である。Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA), 定量PCRによる細胞内、培養上清内miRの定量には3D-Gene Human miRNA Oligo Chips（東レ）を用いた。同時に免染で定量された、CD44, p53, c-Myc, MMP-2 の発現やRho A活性をmiR mimicsや inhibitorsの強制発現後のmiR発現量や細胞内pHとも対応付けた。

EVsの採取、濃縮と精製

採取培養上清をまず2000 g で10分間遠沈後 0.22 μ m filters で固形物を除去後100,000 g で90 分間超遠し得られたペレットを PBSで洗浄後再度, 100,000 g で90 分間超遠し ペレットを濃縮Exo, 上清をExoフリーCSsとして用いた。ExoはMagCapture Exosome Isolation Kit PS (Wako, Japan)を用いるTim4-affinity 法によっても別途濃縮した。

蛋白定量とCD63陽性EVs関連蛋白のWestern blotting

蛋白定量にはQubit[®] 2.0 Fluorometer(Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)を用いた。上清や濃縮Exoに含有される蛋白は 4–12% SDS-PAGEで分離後iBlot[®] 2 Dry Blotting System (Life Technologies)を用いてニトロセルロース膜に風プロットングした。CD9, CD63, CD81, HSP70 およびTSG1 の発現を当初検定しCD63、次いでCD9の発現が安定的に認められたので以降の実験ではCD63 をExoの指標として検定することとした。

前房水中のmiR, 代謝産物の定量

患者の前房水中の代謝産物ならびにmiRNAについて白内障患者のそれを対象に、生物統計学的解析として階層的クラスタリング、主成分解析とLasso 解析を実施した。代謝産物はGC/ MS, LC/MS双方で116の分子を検出し解析に用いた。

4. 研究成果

本研究の発端は、再生医療実現化の国家プロジェクトに採択され（2011-2016終了）、生体内組織と相同の細胞特性を有したcHCECs を得る世界初の技術を確立した（*IOVS*57: 4749,2016）ことに始まる。2019年度には医師主導試験を終了した。本革新的再生医療を国際的な標準医療に定着させるためには、画期的な脱水和、組織透明化と言う臨床効果を説明し得る先端科学に準拠した作用特性の解明が不可欠で有る。申請者は、2018年来疾患病態組織・培養における相転移（CST）細胞での細胞集団の異常を、EVsを介する細胞間相互作用の視点から検討し、本提案課題に取り組む科学的合理性を確認し本課題を提案した。病態組織・相転移細胞で発現変動するmiRの網羅的解析により双方において発現低下するmiR34a-5pと378a-3pを選択した。これらはP53によって発現が制御され、酸化ストレスによるmiR-34a発現抑制並びにC-Myc高進を介しCD44発現が高進され、Bcl-2, MMP2活性、更にはCD44の下流にあるミトコンドリア機能不全が惹起されることを確認した（図）。

イオンチャンネル、MCT1,4, SLC16ファミリー、NHE1, NBCe1、他のSLC 蛋白の細胞質 vs ミトコンドリア内膜での選択的発現動態が明らかになり、細胞内カチオン・アニオン平衡が保たれ、細胞内のpHが7.0~7.2の中性域に維持される。結果、細胞内解糖系が抑制され、ミトコンドリアのOXPHOS(酸化リン酸化)が維持される。

結果、OXPHOSの亢進との正相関が確認されている脱分化抑制性miR34aの低下とCD44の発現の抑制に繋がる。その結果、内皮細胞内で乳酸濃度勾配による浸透圧勾配が生じ、バリア機能保持ZO-1とAQP-1チャンネルの協奏作用で前房側への水排出が促進され、角膜実質組織の脱水和という臨床効果に繋がる可能性が判明した。

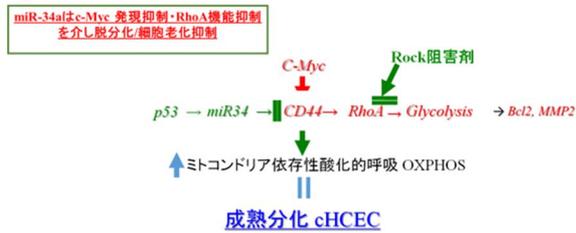
イオンチャンネルの選択的阻害剤やsiRNA導入によりNa⁺/K⁺-ATPase, Aquaporin 1, SLC4A11, NBCe1, NHE1やZO-1は全て分化成熟したcHCECs亜集団で高発現し、脱分化型では発現がほとんど認められなかった。一方、細胞特性を異にするcHCECs亜集団はエネルギー代謝特性を異にし、移植適合成熟分化細胞は、非適合の細胞とは代謝特性を異にする。その差異は、

酸化リン酸化/解糖系代謝、TCA/尿素回路代謝、ニコチンアミド、窒素代謝、グルタミン、アルギニン、セリン、分岐鎖アミノ酸代謝、など多くの代謝経路に及ぶことを明らかにした。興味深いことに成熟分化細胞ではミトコンドリア局在の代謝酵素アイソフォームが高進するのに対し脱分化未分化増殖性細胞では細胞質内のものが高進する(図)。

次に、細胞内miR34a-5p 378a-3pの低下でmiR23a、24、184などを包埋したEVsが分泌増強されることを確認し、これらEV miRが近傍周辺細胞に取り込まれ、その細胞同調作用で周辺細胞が変性するというVicious Cycle成立の可能性を確認した。酸化ストレスなどで発現低下するmiR-34aによる角膜内皮細胞の機能低下に対する防御応答としてmiR-184が作用することが判明した。事実、前炎症性サイトカインMCP-1, IL-6,や血管新生因子VEGF産生をmiR-184が抑制した。患者の前房水中の代謝産物ならびにmiRNAについて白内障患者のそれを対象に、生物統計学的解析として階層的クラスタリング、主成分解析とLasso解析を実施した。3-ヒドロキシ酪酸(HIB), 2-アミノ酪酸(AB)、分岐鎖アミノ酸とセリンは同一のクラスターに分類された。HIBとmiR-34a-5pの間に正相関が認められる(p=0.018)とともにLasso解析においてmiR-34a-5pとHIB, miR-24-3pとAB miR-34c-5pとserineの間に相関が認められた(p=0.041, 0.027, 0.009)。HIBは細胞内のmiR-34a発現やミトコンドリアの膜電位を高進し、脱分化した培養ヒト角膜内皮細胞からのmiR-184の遊離を高進することが判明し、前房水中の代謝産物ならびにmiRNAが協奏的に内皮組織の機能維持に働き角膜内皮実質の脱水の効率化に働き角膜の透明性維持に機能することが判明した(図)。角膜移植同様移入される細胞品質の劣った細胞注入再

作用機序の骨格

MiR-34aによるCD44発現制御とミトコンドリアのエネルギー代謝制御

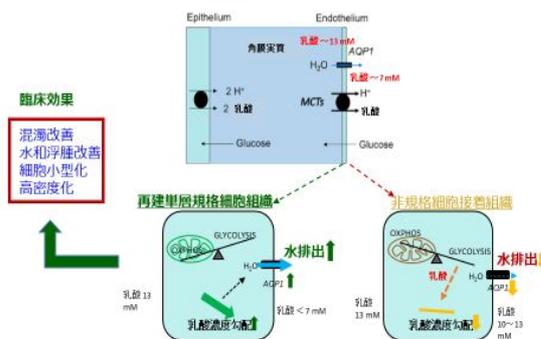


Hamuro et al. IOVS, 2022

臨床効果を説明する細胞機能特性

乳酸濃度勾配(浸透圧勾配)

→AQP1經由水排出→臨床効果



Deguchi H. et al. Unpublished data (in preparation)

生医療でも細胞注入後3 - 5年経過すると角膜内皮細胞密度は次第に低下し、再手術を余儀なくされる水準にまで低下する患者も存在する。この慢性的な角膜内細胞密度の低下がいかなる気候で起こるかについては、従前、全く科学的解釈も対応もされてきていなかったが、本研究により細胞間代謝干渉による細胞変性の増幅と病態増悪の新概念を提唱するに至った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Deguchi H, Yamashita T, Hiramoto N, Otsuki Y, Mukai A, Ueno M, Sotozono C, Kinoshita S, Hamuro J.	4. 巻 12
2. 論文標題 Intracellular pH affects mitochondrial homeostasis in cultured human corneal endothelial cells prepared for cell injection therapy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 6263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-10176-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ueno M, Toda M, Numa K, Tanaka H, Imai K, Bush J, Teramukai S, Okumura N, Koizumi N, Yamamoto A, Tanaka M, Sotozono C, Hamuro J, Kinoshita S.	4. 巻 237
2. 論文標題 Superiority of Mature Differentiated Cultured Human Corneal Endothelial Cell Injection Therapy for Corneal Endothelial Failure.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 267-277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajo.2021.11.012.	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 Hamuro J, Asada K, Ueno M, Yamashita T, Mukai A, Fujita T, Ito E, Hiramoto N, Toda M, Sotozono C, Kinoshita S.	4. 巻 63
2. 論文標題 Repressed miR-34a Expression Dictates the Cell Fate to Corneal Endothelium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci	6. 最初と最後の頁 22-34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.63.4.22	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 Yamashita T, Asada K, Ueno M, Hiramoto N, Fujita T, Toda M, Sotozono C, Kinoshita S, Hamuro J.	4. 巻 2
2. 論文標題 Cellular Interplay Through Extracellular Vesicle miR-184 Alleviates Corneal Endothelium Degeneration.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ophthalmol Sci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xops.2022.100212.	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 Ueno M., Yoshii K., Yamashita T., Sonomura K., Asada K., Ito E., Fujita T., Sotozono C., Kinoshita S. & Hamuro J.	4. 巻 3
2. 論文標題 The Interplay between Metabolites and MicroRNAs in Aqueous Humor to Coordinate Corneal Endothelium Integrity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Ophthalmology Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xops.2023.100299	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1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ueno M, Yamashita T, Asada K, Hiramoto N, Fujita T, Toda M, Sotozono C, Kinoshita S, Hamuro J
2. 発表標題 Cellular interplay through extracellular vesicle miR-184 alleviates corneal endothelium degeneration
3. 学会等名 ISER2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔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	上野 盛夫 (Ueno Morio) (40426531)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (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)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------