

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09775

研究課題名(和文) 線維柱帯細胞のエクソソームを介したシュレム管内皮細胞への影響

研究課題名(英文) Effects of exosomes from trabecular meshwork cells on Schlemm's canal endothelial cells

研究代表者

高橋 枝里 (Takahashi, Eri)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：60622602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：線維柱帯(TM)細胞はエクソソーム分泌し、TGF-betaとコラーゲン刺激で間葉系性質を獲得したTM細胞は、コントロールのエクソソームと異なるmiRNA(exomiRs)を内包し、間葉系TM細胞のエクソソームではmiR-23a-5pが低下し、miR-3942-5pとmiR-7515が上昇した。miR-7515 mimic導入シュレム管内皮(SCE)細胞は、VEGFA、VEGFR2、PECAM、Tie2発現の増加を示した。緑内障で線維柱帯におけるエクソソーム局在を電子顕微鏡で確認した。エクソソームmiR-7515はSCE細胞のリプログラミングに重要である可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障は眼圧低下が現在唯一の治療であるが、緑内障点眼薬の多剤使用、頻回の手術によっても眼圧が制御できず失明に至る症例は多く、日本では失明原因第一位である。眼圧の制御には房水循環の機序の解明と、その機序に基づいた効果的な眼圧低下薬の開発が必要である。本研究は細胞間情報伝達物質であるエクソソームに注目し、房水中のエクソソームを解析し緑内障特異的なエクソソームmiRNAを同定し、初めて、線維柱帯細胞のエクソソームmiRNAがシュレム管内皮細胞に影響を及ぼすことを明らかにした。エクソソームの役割を解明することで、新たなバイオマーカーの可能性や新規治療の開発につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：Trabecular meshwork (TM) cells secreted exosomes and exosomes from mesenchymal TM cells stimulated by TGF-beta and collagen included the different miRNA with control exosomes. miR-23a-5p was down and miR-3942-5p and -7515 were upregulated in exosomes from mesenchymal TM cells. miR-7515 mimic increased VEGFA, VEGFR2, PECAM, Tie2 expression in Schlemm's canal endothelial (SCE) cells. Further, we showed exosomes localization at TM with glaucoma by an electron microscopy. ExomiR-7515 may be important for reprogramming in SCE cells.

研究分野：眼科学

キーワード：緑内障 線維柱帯細胞 シュレム管内皮細胞 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは、脂質、タンパク質、microRNA (miRNA) などの多くの情報を含むエンドソーム由来の細胞外小胞 (EV) で、エクソソーム中の成分は、分泌する細胞の種類や微小環境によって異なり、体循環によって遠隔にある異種細胞に到達し取り込まれることで情報を伝達し、癌化、血管新生など様々な病態に関連すると考えられる。

眼科領域では、アストロサイトや網膜色素上皮細胞から放出されるエクソソームが血管新生に関与する報告があるが、臨床研究ではサンプルが得にくい、サンプル量が少ないなど、エクソソーム研究が困難であることから報告は非常に少ない。Dismukeらは、房水 (AH) からエクソソームを分離する方法を報告したが、エクソソームが緑内障の病態に関連しているかの研究はまだ始まったばかりである。

2. 研究の目的

房水は約90%が房水流出主経路から排出される。この主経路は線維柱帯—シュレム管—上強膜静脈であるが、線維柱帯ビームを覆う線維柱帯 (TM) 細胞は線維柱帯の弾性や食食に関与し房水流出抵抗に重要な役割を果たす。線維柱帯に隣接するシュレム管、シュレム管内皮 (SCE) 細胞に関してその制御はまだわからないことが多い。

緑内障における TM 細胞は間葉系性質を獲得していることが多く報告されている。特に房水に含まれる TGF-beta が大きく関与するとされている。また、線維柱帯における細胞外マトリクスの蓄積や組成の変化も緑内障における特徴の一つである。我々は以前、TGF-beta は Integrin-associated matrix が TM 細胞の間葉系性質に重要であることを報告した。

本研究では、正常の TM 細胞と緑内障における間葉系性質を獲得した TM 細胞では分泌するエクソソームの性質が異なり、これらを取り込んだ SCE 細胞に異なる作用を及ぼすのではないかと考え、この仮説を解明することで、新たな房水流出経路制御の解明と新たなメカニズムの眼圧降薬の開発を目的とし行った。

3. 研究の方法

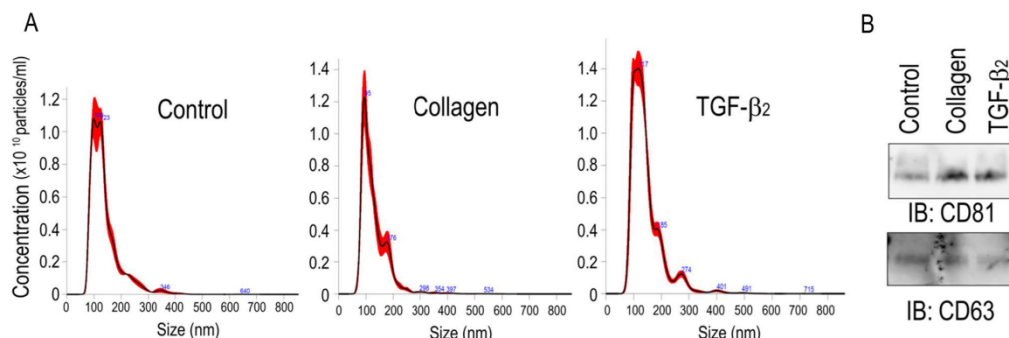
TM 細胞由来エクソソームの単離と miRNA array 解析 : TM 細胞と SCE 細胞はカニクイザルの摘出眼より単離し、実験に使用する際はエクソソーム除去 FBS を用いて行った。細胞培養液から Exo-Quic を用いてエクソソームを抽出し、単離した EV はナノ粒子トラッキング解析で粒子径を測定した。ExomiR アレイは Filgen 社で Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 Array で行った。miRNA のターゲット予測は miRGate を用い、Cytoscape software を可視化に用いた。miRNA array で同定された miRNAs は GO 解析、KEGG 解析で pathway 解析を行った。

線維柱帯細胞由来エクソソームが SCE 細胞へ及ぼす影響 : 同定した miRNA の mimic は RNAiMax を用いて細胞に導入した。Mimic 導入後 SCE 細胞から RNA を NucleoSpin RNA を用いて抽出し、PrimeScript RT-PCR kit と StepOnePlus Real-time PCR system で quantitative RT-PCR を行った。

ヒト線維柱帯におけるエクソソーム発現と miRNA 発現の検討 : Kahook dual blade を用いた眼内トラベクトミー中に採取したヒト線維柱帯サンプルを用いて、電子顕微鏡で構造を、蛍光顕微鏡でエクソソームマーカーの発現を確認した。また、miRNA の発現は in situ hybridization を行った。

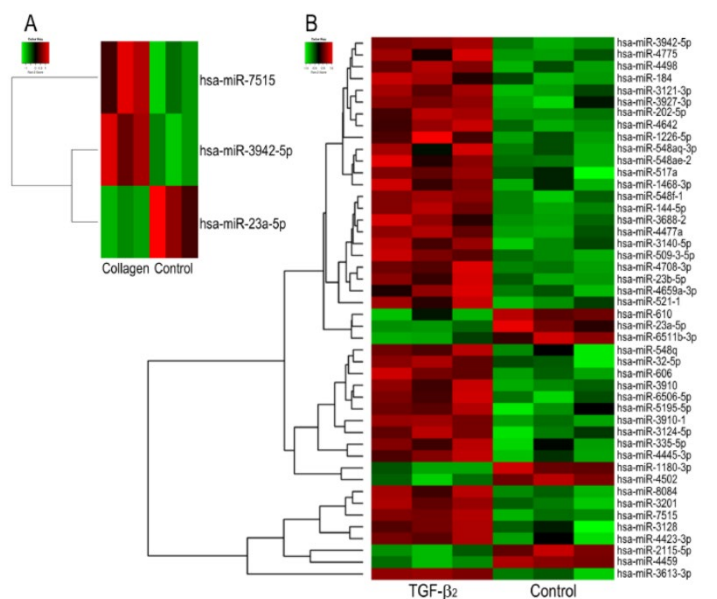
4. 研究成果

結果 1) TM 細胞培養液から Exo-Quic を用いて単離した EV はナノサイト解析によって粒子の平均サイズ分布はコントロール群では 104.1 ± 6.1 nm、Col-1 群では 128.9 ± 5.1 および 96.0 ± 2.8 、TGF-β2 群では 144.2 ± 2.3 および 106.5 ± 5.2 nm で、WB でエクソソームマーカーの発現を認め、エクソソームが単離されたと判断した。

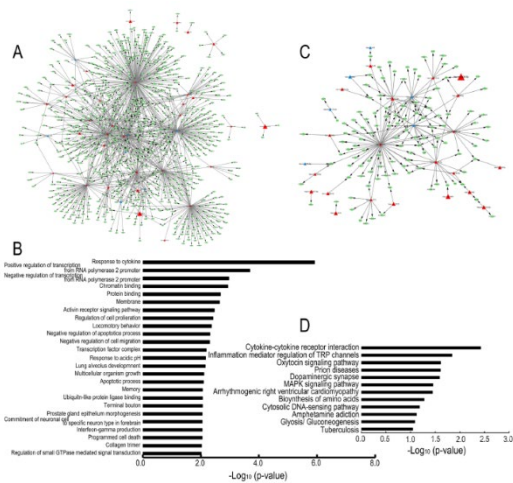


結果 2) 単離したエクソソームの miRNA array を行い、ヒートマップを作製した。TGF-beta 刺激、コラーゲン刺激下でのエクソソーム miRNA は TGF-beta で変化が多かったが、collagen 刺激で発現が変化していた miR-23a-5p、miR-7515、miR-3942-5p の 3 種類は TGF-beta と共通だった。

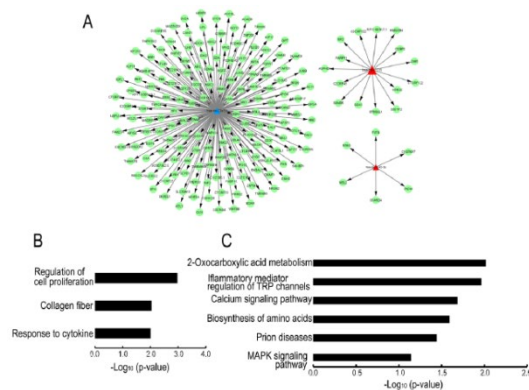
結果 3) TM 細胞由来 ExomiR の標的遺伝子ネットワークと機能解析：46 個の miRNA の標的遺伝子として 1440 個の遺伝子が予測され、これらのネットワークを連結すると、miR-7515 と miR-1468-3p はネットワークに構築されなかった。GO 解析、KEGG pathway 解析を行うと、各上位 3 位は GO 解析ではサイトカイン応答、RNA ポリメラーゼ 2 プロモーター転写の負の制御、タンパク結合で、KEGG 解析では、サイトカイン-サイトカイン受容体の相互作用、TRP チャネルの炎症メディエーター制御、オキシトシンシグナル経路だった。コラーゲン刺激ではネットワークの形成はなかった。関連したシグナル経路は、細胞増殖の制御、コラーゲントリマー、サイトカイン応答 (GO 解析)、2-オキソカルボン酸代謝、TRP チャネルの炎症メディエーター制御、カルシウムシグナル伝達経路、アミノ酸合成、プリオン病、MAPK シグナル伝達経路 (KEGG 解析) だった。



Takahashi E. et al. *Sci Rep.* (2021)11:21942

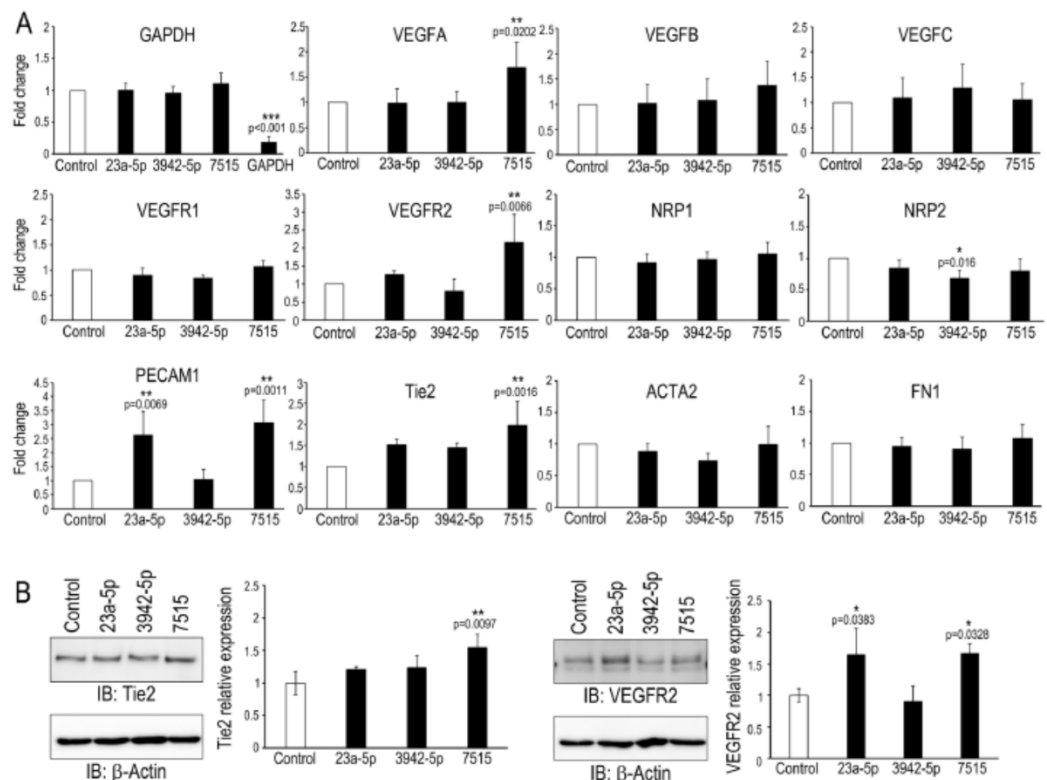


Takahashi E. et al. *Sci Rep.* (2021)11:21942



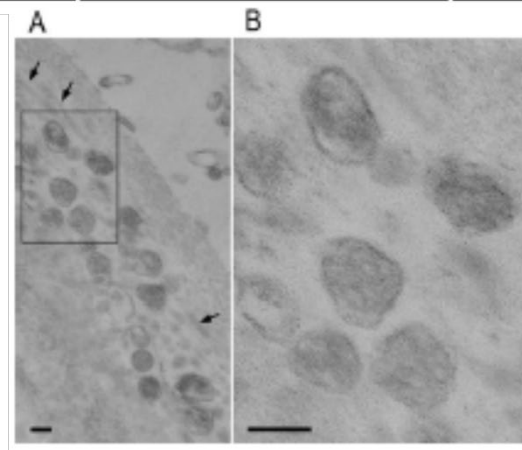
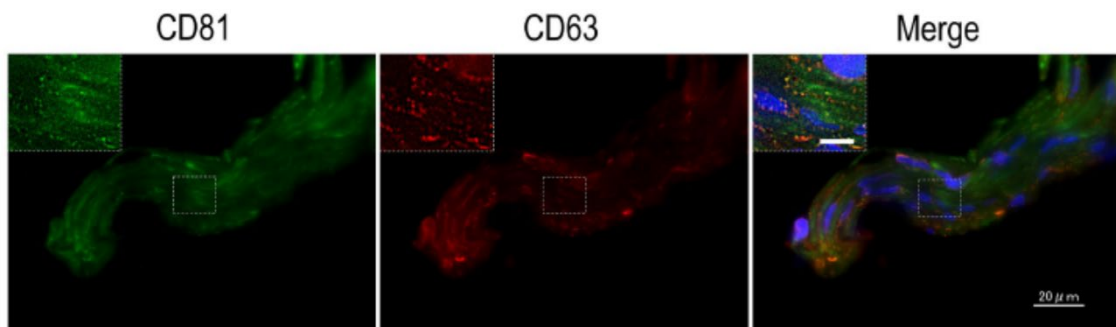
Takahashi E. et al. *Sci Rep.* (2021)11:21942

結果 4) 結果 2, 3 で同定した 3 種類の miRNA の SCE 細胞への影響を検討するために SCE 細胞における血管内皮-間葉転換 (Endo-MT) 誘導の有無について検討した。miRNA mimic を導入し、qPCR を行った。間葉系マーカーであるファイブロンネクチン、alpha-SMA の発現への影響はなく、血管内皮マーカー、リンパ管マーカーに関して、miR-7515 は VEGFA、VEGFR2、Tie2 の発現が上昇し、miR-3942-5p は NRP2 の発現を低下させた。PECAM は miR-23a-5p でも発現亢進を認めた。Tie2 と VEGFR2 に関しては、ウェスタンブロットでタンパク発現変化も PCR の結果との一致を認めた。



Takahashi E. et al. **Sci Rep.** (2021)11:21942

結果5) ヒト線維柱帯におけるエキソソームの解析：倫理委員会承認を受け、眼内トラベクロトミー術前に線維柱帯サンプルの採取に同意を得た患者から、術中に摘出した線維柱帯断片を固定し、免疫染色、電子顕微鏡で観察した。免疫染色ではエキソソームマーカーである CD81、CD63 の共染色を示す点状染色像を認め、電子顕微鏡では線維柱帯ビーム間に径がおよそ 100-120nm の内部が粗造な二重膜構造の粒子を認めた。



Takahashi E. et al. **Sci Rep.** (2021)11:21942

以上の結果より、TM細胞はエクソソームを分泌し、非刺激下では miR-23a-5p がリッチで、SCE細胞の PECAM 発現を促進した。TGF-beta やコラーゲン刺激により間葉系性質を獲得した TM細胞は miR-7515 を含んだエクソソームを分泌し、SCE細胞の VEGFA、VEGFR2、PECAM、Tie2 発現に関与し、これらの変化はシュレム管内皮細胞の発生や成熟に関連するマーカーで、シュレム管のホメオスタシスに関与することが示唆された。今後、さらにエクソソームマーカーの役割、バイオマーカーの検索を行うことで、緑内障予後診断や治療薬の開発につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi E, Saruwatari J, Fujimoto T, Tanoue Y, Fukuda T, Inoue T.	4. 巻 11
2. 論文標題 The effects of exosomes derived from trabecular meshwork cells on Schlemm's canal endothelial cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21942
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01450-9.	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋 枝里
2. 発表標題 緑内障におけるエクソソームとTGF- β の意義
3. 学会等名 第32回日本緑内障学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 枝里
2. 発表標題 北澤賞報告：房水循環におけるエクソソームmiRNA
3. 学会等名 第33回日本緑内障学会
4. 発表年 2022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	井上 俊洋 (Inoue Toshihiro) (00317025)	熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・教授 (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	藤本 智和 (Fujimoto Tomokazu) (50756426)	熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教 (17401)	

	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 協力者	猿渡 淳二 (Saruwatari Junji)	熊本大学・生命科学研究部薬物治療学分野・教授 (17401)	

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