

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 22 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592580

研究課題名(和文)加齢黄斑変性における網膜色素上皮細胞の危機感知機能の解析

研究課題名(英文)The molecular basis of danger signal perception by retinal pigment epithelium (RPE) cells in the pathogenesis of age-related macular degeneration

研究代表者

羽室 淳爾(Hamuro, Junji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80536095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Mps亜集団の選択的枯死誘導剤GRA化合物によるTNF産生阻害、新規HDAC阻害剤によるRPEの線維化阻害効果を明らかにし、両化合物も併用によるRPE/Mps亜集団間の炎症Vicious回路遮断の可能性を示した。本回路で分泌されるmiRを同定し危険感知応答の新側面を明らかにした。CFH, CD46, CD59, Clusterin、新規補体活性化抑制因子CTRP6のヒト後眼部組織における発現様式を解析し、AMD患者由来の眼球での特徴的な発現を見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, the detailed roles of the inducer of selective apoptosis in activated macrophages in inhibiting the production of TNF-alpha and of the new HDAC inhibitor in inhibiting the TNF-alpha-induced fibrosis of RPE cells were investigated. The synergy between TNF-alpha and the HDAC inhibitor in the blockade of the formation of the vicious inflammatory cycle between RPE cells and the subpopulation of macrophages was indicated. The new molecular mechanism in danger perception mediated by miRNA secreted from RPE cells was first clarified, and the secreted miRNA was found to possibly propagate the degeneration of RPE cells in a paracrine manner. The classical and newly discovered regulators of complement activation, i.e., CFH, CD46, CD59, clusterin, and CTRP6, were found to be produced upon TNF-alpha triggered inflammatory stimuli on RPE cells. The characteristic features of the expression of these regulators in human anterior eye tissues were confirmed immunohistologically.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：網膜色素上皮組織 局所危険感知 組織線維化 活性化マクロファージ亜集団 マイクロRNA 補体活性化抑制因子 炎症増悪回路

## 1. 研究開始当初の背景

1) 報告者は、細胞内のチオールレッドクス (icGSH) 均衡 (還元型グルタチオン GSH vs 酸化型グルタチオン GSSG) に着目し、糖尿病、炎症性腸疾患などのモデルにおいて、炎症早期には NOS2<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>の酸化型マクロファージ (Mps) が炎症巣に局在し、機能的相転移を経て NOS2<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL10<sup>-</sup>の還元型 Mps/Th1 免疫応答の局在により組織破壊が起こり、低酸素状態や局所 TGF $\beta$  により誘導される酸化型 Mps 主流へと病態像の質的な変換が起こり組織再構築に進むこと、病態像に即した時空間特異的治療介入の必要性を報告した (*Int Immunol*, 2002, 2 報, *Mol.Immunol*,2002, *Int. Immunopharmacol*. 2002, *Eur J Immunol*.2002, 2003, *J Immunol*. 2003 など)。Mps 機能が可塑的に変換することで病態が変化するとする独自の理論を世界で最初に提唱した (総説:羽室, *Ann Rev 免疫*, 1999, 2001, *炎症・免疫・感染*, 2011)。喘息モデルでも同様の知見を得る (*Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007) とともに、TGF $\beta$  による線維化誘導が icGSH 状態の還元型への傾斜で抑制されることも検証した (*FEBS Lett*. 2009)。加齢黄斑変性 (AMD)、2 型糖尿病、高脂血症や肥満に代表される加齢性疾患・生活習慣病において、脂肪組織炎症の病態に Mps 機能の可塑的な相転移が深く係ることが明らかになり、脂質が生体内における内在性危険シグナルとして機能すること、これらの疾患を「危機に対処する自然免疫系の破綻」と捉える新しい概念が提唱されている (Suganami ら 2010)。

(2) 報告者は眼科領域においても酸化型/還元型 Mps 理論を応用し、ヒトにおける結膜アレルギーや花粉症制御などを確認し (*Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003, 2004, 2009, *Transplant*. 2007, *J Allergy Clin Immunol*. 2007 など)、また、AMD モデルマウスにおいて還元型 Mps の誘導や還元型 Mps の細胞移入で網膜下組織の線維化が抑制できることを報告し (*Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010)、「マクロファージ機能の相転移制御」概念の眼科医療領域への応用の蓋然性を検証してきている。連携研究員として予定した古泉、丸山、関山の転出の関係で申請課題の研究は 24 年度後半から本格化した。2 年弱の期間で、国際学会での口頭発表採択 2 件、ポスター発表 3 件、眼科専門国際誌掲載 1 件、執筆中 1 件まで進めることができた。懸案であった補体、補体抑制因子のヒト眼球における動態と AMD 病態の対応に係る免疫組織学的な研究、補体活性化抑制因子の発現動態に及ぼす低分子化合物の検定も進めることができた。

## 2. 研究の目的

世界に先駆け提唱した「組織炎症における Mps 機能の相転移制御」概念に基づき、脂質蓄積の著明な網膜下組織に焦点を当て、Mps 相当機能を有する網膜色素上皮細胞 (RPE)

機能の相転移制御法を模索する。

- ① RPE と脈絡膜浸潤 Mps 間の双方向的相互作用により遷延化する網膜下組織炎症を AMD 病態の本質と捉え、相転移による RPE の食能低下に係る分子病態の視軸から解析する。枯死細胞の食能を介して組織恒常性を保つ RPE の基本機能が如何なる局所微小環境因子により食能低下に繋がるかを解明する。
- ② 相転移に係る分子標的を明らかにすることで本変換の特異的制御法を考案し AMD の革新的医療の礎を切り拓く。

## 3. 研究の方法

- ① Mps の機能多様性と可塑性同様の相転移が RPE にも存在するかを検証し食能低下と対応付ける。
- ② 網膜下のドルーゼン構成成分が RPE/Mps の相転移に関与するか否か検討する。ドルーゼンは本疾患の早期 biomarker であり、脂肪滴や補体成分などを多量に貯留する。これら貯留成分により RPE/Mps が酸化型、還元型のどの形質に変換されるか検定する。脂質成分の関与としては LDL、飽和脂肪酸などを中心に、補体系関与の可能性を確認する。
- ③ Mps 相当の RPE の機能的可塑性に係る MCP-1、IL-33 の役割の検証を行う。RPE/Mps の相転移を特異的に制御する化合物を探索する。本変換制御のために、PPAR $\gamma$  活性化剤、HDAC 阻害剤、活性化 Mps 選択的枯死阻害剤などを用いる。
- ④ RPE の相転移を抑制する分子標的を見出す。相転移を特異的に制御する手法を確立するため、Mps と RPE の共培養系を駆使する。HDAC 阻害剤、細胞内グルタチオン (GSH) 制御剤、活性化 Mps 亜集団の選択的枯死誘導剤、PPAR $\gamma$  活性化剤を活用して探索系を最適化しリード化合物を確定する。よって、ドルーゼン貯留、脈絡膜新生血管 (CNV) 形成、RPE の上皮間葉系移行 (EMT) を抑制し、斬新な予防治療法の提供につなげる。平成 25 年度には世界で始めてとなる「RPE 機能の相転移制御」に係わる新規化合物の探索にも着手し、創薬標的としての妥当性の評価を実施する。

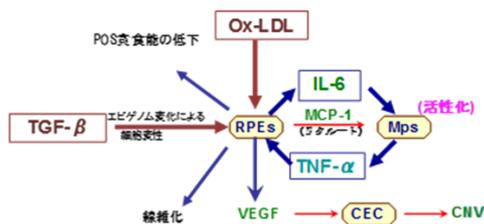
## 4. 研究成果

- ① RPE の細胞変性 (EMT、細胞老化、線維化) に係わる遺伝子発現の網羅的解析: TGF $\beta$  刺激によるヒト RPE の細胞変性 (EMT、細胞老化、線維化) に係わる遺伝子発現の変動を PCR アレイを用いて網羅的に解析し COL1A, COL3A1, FN1, SNAI1, WNT5A, WNT5B, VEGF などの選択的な up-regulation と補体抑制因子として細胞ストレスに防御的に働く Clusterin (Clu) の遺伝子発現抑制を確認した。細胞変性の一つの EMT の抑制候補 miRNA

として miR141、miR200a、miR200b、miR200c、miR205 を選定した。Clu はタンパク凝集や変性補体成分の蓄積にも係り、多くがエクソゾームに含まれて分泌され AMD 早期病態におけるドルーゼン形成に係わる可能性があり今後の重要な追跡対象とした。

- ② RPE と Mps との共培養系を用いた炎症増悪回路 (vicious cycle) の AMD 病態における意義の解明:

既に樹立しているマウス primary RPE/Mps を用いた共培養系において、大量の MCP-1, IL-6 (50ng/ml 以上) や VEGF が産生され、RPE からの IL-6 と Mps からの TNF- $\alpha$  による vicious cycle の存在を確認し 2013 年国際学会で口頭発表し、現在論文執筆中である。本増悪回路は酸化 LDL や TGF- $\beta$ 2 の添加によって IL-6 や VEGF 産生が増強されることも判明した。LDL では増強されない。高濃度の TGF- $\beta$ 2 が存在している眼内において、RPE が生活習慣病に関連する過酸化脂質に修飾されると食食能が低下し、CNV 形成が増強される可能性が推定される。本増悪回路の成立は抗 IL-6 抗体や抗 TNF- $\alpha$  抗体の添加により阻害されることも確認した。報告者は、下図に示す RPE と Mps の間の炎症増悪回路の存在を提唱した (未発表、一部は ARVO2013 口頭発表)。



- ③ 活性化 Mps 選択的枯死誘導剤 (GRA) や Mps の還元型 (M1) 偏倚剤 (SAG) による vicious cycle 制御:

RPE と Mps との共培養における vicious cycle 誘導環境で、細胞内 GSH のチオールレドックス偏倚状態が酸化型、もしくは還元型偏倚するかどうかを、ケモカイン受容体などの発現 (CX3CR1, CCR2, FasL, MGL-1 など) も含めて同定し、SAG, GRA による抑制を試みる。SAG は細胞内の酸化型グルタチオン(GSSG)を GSH に偏倚させ、Mps においては還元型 Mps (ほぼ M1 に類似) を誘導して IFN- $\gamma$  や IL-12 産生を促す。RPE の細胞内 GSH を誘導した還元型 RPE では IL-6 産生が抑制されることも確認した。Mps と RPE の双方に作用し、RPE-IL-6-Mps-TNF- $\alpha$ -RPE の vicious cycle を抑制出来る。GRA は TNF- $\alpha$  産生性の活性化 Mps のみを枯死させ結果 TNF- $\alpha$  産生を抑制するが、RPE への作用は皆無であった。双方の薬剤が異なる作用点を持つ事から、2 剤を併用出来る可能性も想定している。

- ④ 網膜色素上皮組織の線維化抑制:

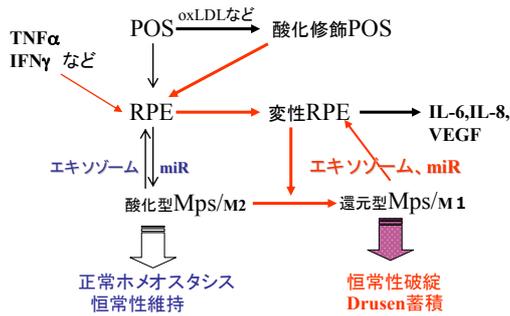
網膜色素上皮組織の線維化は眼内増殖性疾患に共通する重篤な病態で、線維化抑制という共通の治療法で複数の疾患を対象に治療介入できる。AMD、増殖性硝子体網膜症 (PVR)、増殖糖尿病網膜症 (PDR) は何れも加齢性疾患で、後天的なエピジェネティック遺伝子変化に起因する疾患病態と考えられる。その一つが RPE の線維化病態である。in vitro において HDAC 阻害剤 OBP801 に、TGF  $\beta$  +/-TNF による RPE の線維化抑制作用を見出した。抑制作用は強く 1 nM レベルと既存の HDAC 阻害剤 SAHA に比し 1000 倍以上活性が強いことが判明した。OBP 化合物の作用点が RPE にあること、肝の線維化抑制作用を有する SAG は GRA 化合物同様 Mps に作用することが判明した。OBP 化合物と GRA 化合物もしくは SAG との併用による RPE/Mps 亜集団間の炎症 Vicious 回路の遮断の可能性が示唆された。OBP は TGF  $\beta$  +/-TNF により誘導される網膜変性、線維化を抑制することを確認した。

- ⑤ RPE の危険感知応答としての miRNA 分泌の特性

萎縮型 AMD の早期病態に見られるドルーゼン蓄積の機序は未だ解明されていない。RPE が TGF $\beta$ /TNF $\alpha$  刺激で、特有の miRNA を細胞外に放出することを見出した。RPE からの細胞外微粒子の放出は、従前、殆んど知られていない。細胞内では上皮間葉系移行 (EMT) に伴う miR141, miR200a, miR200b, miR200c, miR205 の変動を確認し、他細胞での知見 (Gregory PA, Cell Cycle. 2008, Gregory PA, Nat Cell Biol. 2008 など) との整合性を確認した。ごく最近、Mps の亜集団の機能変化 (M1/M2) を miRNA が起こすことが報告された (日本癌学会, 2013, 横浜)。以上の知見などより、変性 RPE から放出される、エクソゾーム含有の miRNA が脈絡膜下浸潤 Mps の食食能を低下させて、結果、ドルーゼン形成に寄与すると考えるに至った。miR146 は TNF  $\alpha$  などにより惹起される炎症で産生される IL-6, IL-8, MCP-1 産生を抑制する (Kutty RK, Mol Vis. 2013)。TGF  $\beta$  による RPE の EMT 化においては ZEB1 $\rightarrow$ miR205 の経路を確認している (前述)。報告者は、左図に示す RPE と Mps の間の炎症増悪回路の存在を提唱した (未発表、一部は ARVO2013 口頭発表)。

以上の成果をもとに下記の作業仮説を作るに至った。『RPE の細胞機能変性による RPE と Mps 系との情報ネットワークの破綻』を AMD 病態の本質と捉え、「RPE 細胞の放出する細胞外微粒子による Mps の亜集団の変化 (M1/M2)」を追跡し、細胞外微粒子により Mps が食食能の低い亜集団に変換され、結果、恒常性維持に係る食食処理が進まず、ドルーゼン形成に至るとする新しい回路の存在を検証し、萎縮型

AMDに係る新しい分子標的を明確化し、創薬基盤技術として新分野の開拓に資する（下図参照）。



- ⑥ また、新しい補体活性化抑制因子 CTRP6 に係る研究も進めることができ、岩倉教授（東京理科大）グループとの CTRP6 遺伝子改変マウスを用いる共同研究を開始できるところまで進み得た。補体活性化因子 C3, C5, CFB、補体活性化抑制因子 CFH, CD46, CD55, CD59, Clusterin 並びに CTRP6, CTRP5 などに対する OBP の作用解析も実施した。ヒト眼球組織を用いてこれら補体抑制因子の後眼部組織における発現様式を免疫組織染色で解析し、正常人と AMD 患者由来の眼球での発現分布の差を RPE, ドルーゼン、黄斑部、辺縁部などで比較し、特徴的な差異を見出した。

本研究は 25 年度【26 年 3 月】で終了した。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

- Hatanaka H, Koizumi N, Okumura N, Kay EP, Mizuhara E, Hamuro J, Kinoshita S. Epithelial-mesenchymal transition-like phenotypic changes of retinal pigment epithelium induced by TGF- $\beta$  are prevented by PPAR- $\gamma$  agonists. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 53:6955-63, 2012（査読有）
- Kimura K, Yamada J, Mukai A, Hamuro J, Kinoshita S. The role of IL-6 and TNF- $\alpha$  in generating the vicious inflammatory cycle between macrophages and retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration, *in preparation*
- 羽室 淳爾. 自己炎症におけるマクロファージ機能の可塑性：酸化型・還元型マクロファージ再訪. 感染・炎症・免疫. 41:125-139, 2011（査読無）

〔学会発表〕（計 6 件）

- Yamada J, Kimura K, Mukai A, Hamuro J, Kinoshita S: The role of IL-6 and TNF- $\alpha$  in generating the vicious inflammatory cycle between macrophages and retinal pigment

epithelium in age-related macular degeneration. ARVO2014. Orland. FL. U.S.A. 2014.5.6

- Mukai A, Asada K, Toda M, Yamada J, Hatanaka H, Yamagishi T, Nagata K, Ueno M, J.Hamuro, S.Kinoshita: The role of cell to cell interaction through extracellular microvesicles, miRNA and exosome in deregulated functions of RPE and macrophages. ARVO2014. Orland. FL. U.S.A. 2014.5.6
- Ueno M, Asada K, Toda M, Hagiya M, Okumura N, Koizumi N, Hamuro J, Kinoshita S: The integral analysis of senescence-associated secretory pathway and microRNA secretion of cultured human corneal endothelial cells relating to their functions, cell senescence, and epithelial-mesenchymal transition. ARVO2014. Orland. FL. U.S.A. 2014.5.6
- Asada K, Toda M, Ueno M, Ujihara K, Mukai A, Hagiya M, Okumura N, Koizumi N, Hamuro J, Kinoshita S: Distinct energy metabolism between cultured mature human corneal endothelial cells and their phenotype transitioned cells. ARVO2014. Orland. FL. U.S.A. 2014.5.6
- Toda M, Ueno M, Ujihara K, Asada K, Nakamura T, Hagiya M, Okumura N, Koizumi N, Hamuro J, Kinoshita S: Identification of differentiated mature cultured human corneal endothelial cells and their distinct cell propensity from other immature subpopulations. ARVO2014. Orland. FL. U.S.A. 2014.5.6
- Yamada J, Hatanaka H, Asada K, Nakada K, Hamuro J, Kinoshita S: The Role of Cell Senescence, Epithelial-Mesenchymal Transition, and Fibrosis in the Generation of Vicious Inflammatory Cycle Between Macrophages and Retinal Pigment Epithelium. ARVO2013. Seattle. WS. U.S.A. 2013.5.6
- 堀内稔子, 山田潤, 篠宮克彦, 大石美香子, 横井則彦, 羽室淳爾, 川崎諭, 北澤耕司, 木下茂. レバミピド点眼が細胞内グルタチオンに及ぼす影響及びその作用機序の検討. 第 38 回日本角膜学会総会, 宜野湾, 2014.1.31
- 木村健一, 山田潤, 羽室淳爾, 木下茂. 結膜上皮のグルタチオン量判定による眼表面の酸化ストレス評価法. 第 13 回日本抗加齢医学会総会, 横浜, 2013.6.28

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

[その他]

無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

羽室 淳爾 (HAMURO, junji)

京都府立医科大学 特任教授

研究者番号：80536095

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

山田 潤 (YAMADA, jun)

明治国際医療大学 教授

研究者番号：80351352