

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861637

研究課題名(和文) 加齢黄斑変性における能動的ネクローシスの役割

研究課題名(英文) Involvement of programmed necrosis in age-related macular degeneration

研究代表者

村上 祐介 (Murakami, Yusuke)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：50634995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性(AMD)患者の網膜には二本鎖DNA(dsRNA)が多量に存在し、病態への関与が示唆されている。本研究ではdsRNA網膜傷害モデルを用いて、網膜色素上皮細胞死ならびに視細胞死のメカニズムを検討した。形態学的な検討から、網膜色素上皮細胞死は主にネクローシスの所見を示すこと、視細胞死はアポトーシスとネクローシスが混在していることが明らかとなった。dsRNAによる網膜傷害は、ネクローシス誘導の鍵分子であるRIPK経路の阻害によって著明に抑制された。これらの結果から、dsRNAによる網膜傷害には、RIPK依存性ネクローシスの関与が重要であることが明らかとなった。

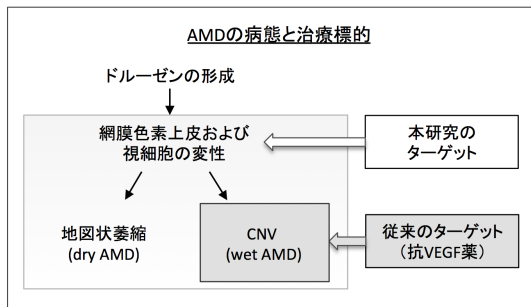
研究成果の概要(英文)：Double strand RNA (dsRNA) accumulates in the drusen of AMD patient eyes, and has been shown to be implicated in the development of the disease. Here we investigated the mechanisms by which dsRNA causes retinal degeneration in mice. Subretinal injection of dsRNA caused both apoptotic and necrotic photoreceptor cell death, while it mediated necrosis of the retinal pigment epithelium (RPE). These necrotic changes were substantially suppressed by RIP kinase inhibition. Thus, RIP kinase-mediated necrosis is crucial in dsRNA-induced retinal degeneration, and RIP kinase may be a novel therapeutic target for retinal degenerative diseases such as AMD.

研究分野：眼科学

キーワード：加齢黄斑変性 能動的ネクローシス RIPキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (AMD) は、欧米において中途失明原因の第一位を占め、我が国でも高齢化に伴い罹患者数が増加している。AMD の病態は、ドルーゼンの形成に始まり、網膜外層の変性や慢性炎症を経て、脈絡膜新生血管の形成 (滲出型 AMD) または地図状萎縮 (萎縮型 AMD) に至る。近年、滲出型 AMD に対して VEGF を標的とした薬剤が開発され、一定の効果が示されているが、視力改善が得られない症例も多い。また欧米で AMD の 90% を占める萎縮型 AMD に対しては、有効な治療法が無い。そのため、より早期の病変に対する治療法の開発が、AMD の視力予後改善に向けて重要な課題である。



網膜外層の変性、すなわち「**網膜色素上皮 (RPE) および視細胞の細胞死**」は AMD の重要な病理所見の一つであるが、その形態学的特徴や分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。細胞死は大きくアポトーシスとネクローシスに分類される。アポトーシスは細胞の収縮、核の濃縮・断片化などを特徴とし、主に caspase ファミリーの活性化を介して惹起される能動的な細胞死である。一方、ネクローシスは細胞および細胞内小器官の腫脹、細胞膜の破綻、内容物の漏出による炎症反応を伴い、従来受動的な細胞死と考えられてきた。しかし、近年の研究から**一部のネクローシスは Receptor-interacting protein kinase (RIPK) など特定の分子の活性化を介して能動的に誘導されることが明らかになってきている (文献 1)。**

研究代表者は米国留学中に、RIPK を介したネクローシスが網膜剥離ならびに網膜色素変性モデルにおける視細胞死に重要であり、RIPK を標的とした薬剤により著明な神経保護効果が得られることを報告した (文献 2, 3)。AMD におけるネクローシスの関与については明確な報告がないものの、剖検眼の形態学的解析では、網膜色素上皮細胞および黄斑部視細胞の腫脹や空胞化など、ネクローシスの存在を示唆する報告がある (文献 4)。これらの背景から、**AMD に対する新たな治療標的として RIPK 依存性ネクローシスに注目し、本研究を進めることとした。**

1. Vandenabeele P, et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 11: 700-714, 2010.
 2. Trichonas G and Murakami Y, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 107: 21695-21700, 2010.

3. Murakami Y, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 109: 14598-14603, 2012.
 4. Shelley EJ, et al. Arch Ophthalmol. 127: 483-492, 2009.

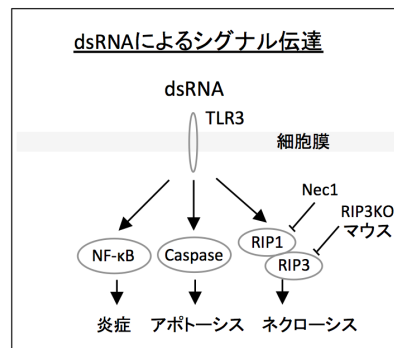
2. 研究の目的

AMD の病態への RIPK 依存性ネクローシスの関与を明らかとし、ネクローシスを標的とした新たな治療法開発を目指す。

3. 研究の方法

AMD 患者のドルーゼンには二本鎖 RNA (dsRNA) や脂質が多量に存在し、病態への関与が示唆されている。実際に dsRNA をマウス網膜下に注射あるいは過剰発現すると、網膜外層の地図状変性が起こることが報告されている (文献 5, 6)。

dsRNA は Toll-like receptor 3 (TLR3) に結合し、その下流で NF- κ B の活性化と炎症、caspase の切断とアポトーシス、RIPK の活性化とネクローシスなど様々な生体反応を誘導する。しかし dsRNA 網膜傷害の過程において、どの経路が重要であるかは明らかでない。



RIP1 と RIP3 は RIPK 活性化の鍵分子であり、互いに結合しリン酸化されることで安定化し、ネクローシス誘導複合体 (necrosome) が形成される。この RIPK の活性化は、RIP3 の遺伝子欠失または RIPK 特異的阻害薬である Necrostatin-1 (Nec-1) によって完全に阻害される。本研究では、主にこの 2 つの阻害法を用いて、dsRNA 網膜傷害における RIPK の役割について検討する。

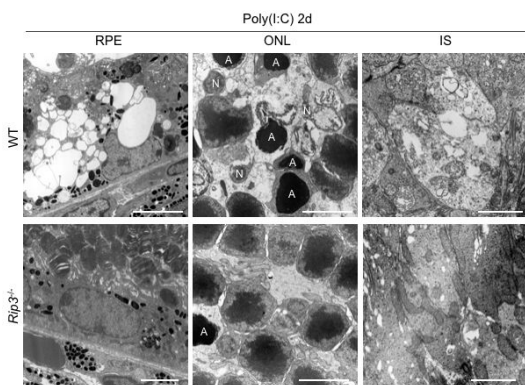
ネクローシスに陥った細胞では、細胞膜の破綻により様々な細胞内物質が放出される。細胞外に放出されたこれらのタンパク質は DAMPs と呼ばれ、炎症細胞を強力に活性化させる。本研究では、dsRNA 網膜傷害モデルにおける DAMPs の変化ならびにその炎症への関与について解析する。またヒト疾患における DAMPs の発現変化についても検討を行う。

5. Kaneko H, et al. Nature. 471: 325-330, 2011.
 6. Kleinman ME, et al. Mol Ther. 20: 101-108, 2012.

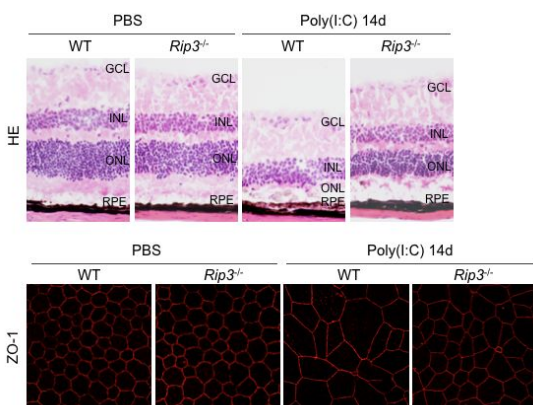
4. 研究成果

1) RIPK 依存性ネクローシスは dsRNA 網膜傷害の誘導に重要である

合成 dsRNA である poly I:C を WT マウスまたは RIP3 遺伝子欠失マウス (*Rip3*^{-/-} マウス) の網膜下に注入し、投与 2 日後に RPE ならびに視細胞の形態学的変化を電子顕微鏡で観察した。WT マウスでは、poly I:C 投与によって、RPE の細胞質の腫脹・膨化、細胞膜の破綻などが見られ、これらはネクローシスの特徴に合致していた。視細胞はアポトーシスとネクローシスが混在していた。一方、**Rip3**^{-/-} **マウスでは、poly I:C による RPE や視細胞のネクローシス性変化が著しく抑制された。**



次に poly I:C 投与 14 日目に眼球を摘出し、網膜の組織学的変化を解析した。WT マウスでは、poly I:C 投与によって網膜外層が著しく菲薄化した。Zo-1 のフラットマウント染色で RPE を評価したところ、RPE の減少と細胞の拡大を認めた。一方、**Rip3**^{-/-} **マウスでは、poly I:C による網膜外層傷害が抑制され、RPE の構造も有意に保持された。**



RIPK の特異的薬剤である Nec-1 を用いて同様の実験を行ったところ、*Rip3*^{-/-} マウスでの結果と同様に、Poly I:C による網膜外層傷害が有意に抑制された。

これらの結果から、**dsRNA による網膜傷害過程において、RIPK の活性化によるネクローシスの誘導が重要な役割を担っていることが分かった。**

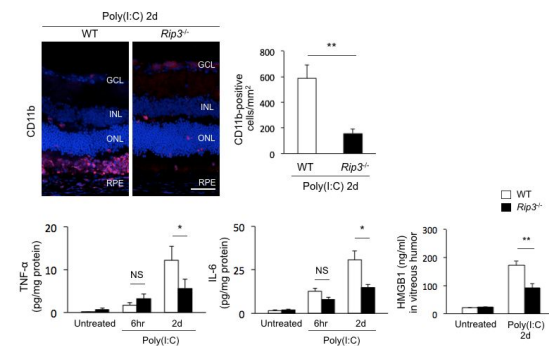
2) dsRNA 網膜傷害モデルにおいて RIPK は炎症を促進する

ネクローシスに陥った細胞は DAMPs を放出し、炎症を引き起こす。そこで dsRNA 網膜傷害モデルにおける RIPK 経路の炎症への関与について検討した。WT では、Poly I:C 投与 2 日後において、RPE 周囲を中心に CD11b 陽性のマクロファージの浸潤を認めた。一方、**Rip3**^{-/-} **マウスでは、RPE 周囲への炎症細胞の浸潤は著明に抑制された。**

炎症細胞の誘導に関わる炎症生サイトカインの発現変化を観察したところ、WT マウスの眼球では、Poly I:C 投与後 6 時間より TNF- α 、IL-6 の上昇を認め、2 日後にさらに発現が亢進した。一方、**Rip3**^{-/-} **マウスでは、投与 6 時間後のサイトカイン発現に変化はなかったものの、2 日後の TNF- α 、IL-6 の発現が低下した。**

さらにネクローシス由来の代表的な DAMPs である HMGB1 についても、WT マウスでは Poly I:C 投与 2 日後に硝子体内への放出が亢進しているのに対して、**Rip3**^{-/-} **マウスの硝子体では HMGB1 の放出が減少していた。**

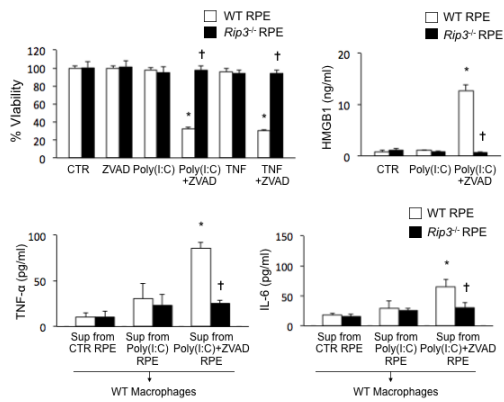
これらの結果から、**RIPK 経路は dsRNA 網膜傷害モデルにおいて炎症反応の誘導に関与していること、DAMPs の放出を制御していることが分かった。**



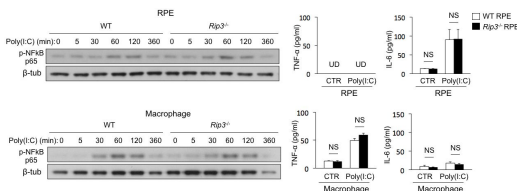
3) ネクローシス由来 DAMPs はマクロファージを活性化させ炎症を促進する

RIPK による炎症促進のメカニズムについてより詳細に検討するため、RPE とマクロファージの初代培養を用いて実験を行った。WT マウス由来 RPE 細胞を Z-VAD での Caspase 阻害下に Poly I:C で刺激すると、細胞死が誘導されたが、これは *Rip3*^{-/-} マウス由来 RPE 細胞では完全に救済された。また **Poly I:C+Z-VAD 刺激により培養上清中への HMGB1 の放出が亢進したが、これも Rip3**^{-/-} **欠失によって完全に抑制された。**

ネクローシス由来 DAMPs の炎症促進作用について検討するため、Poly I:C+Z-VAD 刺激後の RPE の培養上清を採取し、マクロファージに添加した。WT 由来 RPE 由来の培養上清 (Poly I:C+Z-VAD 刺激後) を添加すると、マクロファージからの TNF- α 、IL-6 の発現が亢進した。一方、**Rip3**^{-/-} **マウス由来 RPE 由来の培養上清を添加しても、マクロファージからの TNF- α 、IL-6 の発現亢進は見られなかった。**



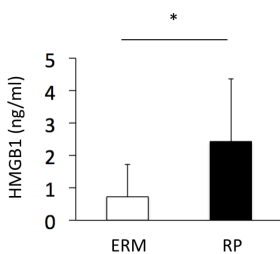
また Poly I:C による直接的な炎症促進作用に対する RIP3 の役割についても初代培養細胞を用いて検討した。Poly I:C による直接的な NF- κ B の活性化ならびに TNF- α 、IL-6 の発現亢進については、WT マウス由来・*Rip3*^{-/-} マウス由来の RPE、マクロファージで違いを認めなかった。



これらの結果から、**RIPK は DAMPs の放出を抑制することで、炎症を制御していると考えられた。**

4) 網膜変性疾患患者サンプルにおける DAMPs 発現の亢進

最後に手術時に採取した硝子体サンプルを用いて HMGB1 の発現変化について検討した。AMD 患者に対して硝子体手術を行うことは稀であり、別の網膜変性疾患である網膜色素変性 (RP) 患者の硝子体を用いて解析を行った。黄斑前膜 (ERM) を合併した RP 患者の硝子体と、特発性の ERM 患者の硝子体を用いて検討したところ、**RP 患者の硝子体では HMGB1 の発現が有意に亢進**していた。このことから、**ヒトの病態においてもネクロシスからの DAMPs の放出が起こっており、網膜の慢性炎症の誘導に関与している可能性**が考えられた。



結論

dsRNA 網膜傷害モデルにおいて、RIPK はネクロシスならびに DAMPs の放出を誘導し、網膜の変性・炎症を促進することが明らかと

なった。DAMPs の放出は網膜変性疾患患者の眼内でも亢進しており、炎症の誘導を介して病態を修飾している可能性がある。網膜変性疾患における細胞死は主にアポトーシスによって起こると考えられていたが、本研究を含めた我々の研究からアポトーシスのみならずネクロシスも病態に深く関わっていることが明らかとなり、RIPK 依存性ネクロシス経路は網膜変性疾患に対する新たな治療標的として重要と考えられた。

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)

1. Murakami Y, Matsumoto H, Roh M, Giani A, Kataoka K, Morizane Y, Kayama M, Thanos A, Nakatake S, Notomi S, Hisatomi T, Ikeda Y, Ishibashi T, Connor KM, Miller JW, Vavvas DG. Programmed necrosis, not apoptosis, is a key mediator of cell loss and DAMP-mediated inflammation in dsRNA-induced retinal degeneration. *Cell Death Differ.* 2014; 21: 270-7.
2. Murakami Y, Ikeda Y, Nakatake S, Tachibana T, Fujiwara K, Yoshida N, Notomi S, Nakao S, Hisatomi T, Miller JW, Vavvas DG, Sonoda KH, Ishibashi T. Necrotic enlargement of cone photoreceptor cells and the release of high-mobility group box-1 in retinitis pigmentosa. *Cell Death Discov.* 2015; 1: e15058.
3. Murakami Y, Ikeda Y, Nakatake S, Miller JW, Vavvas DG, Sonoda KH, Ishibashi T. Necrotic cone photoreceptor cell death in retinitis pigmentosa. *Cell Death Dis.* 2015; 6: e2038.

[学会発表](計4件)

1. dsRNA 網膜傷害モデルにおける RIPK 依存性ネクロシスの役割
村上祐介, 池田康博, 久富智朗, 納富昭司, 吉田倫子, Joan Miller, Demetrios Vavvas, 石橋達朗.
日本眼科学会. 東京. 2013 年 4 月 5 日.
2. Yusuke Murakami, Yasuhiro Ikeda, Toshio Hisatomi, Hidetaka Matsumoto, Miin Roh, Joan W. Miller, Demetrios G. Vavvas, and Tatsuro Ishibashi
Receptor interacting protein kinase promotes necrosis and enhances inflammation in dsRNA-induced retinal degeneration.
WOC, Tokyo 2014. Apr 2-6.
3. Murakami Y, Ikeda Y, Nakatake S, Tachibana T, Fujiwara K, Nakao S, Hisatomi T, and Ishibashi T.
Necrotic cone photoreceptor cell death in retinitis pigmentosa.
The 8th KCJ meeting, Fukuoka. 2015 Oct 17.

4. **村上 祐介**, 池田 康博, 中武 俊二, 立花 崇, 久富 智朗, 石橋 達朗.
AO-SLOによる網膜色素変性患者の錐体細胞密度の検討.
臨床眼科学会. 名古屋. 2015年10月23日.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計1件)

名称: Methods and compositions for preserving photoreceptor and retinal pigment epithelial cells.

発明者: Demetrios Vavvas, Joan Miller, George Trichonas, Yusuke Murakami

権利者: Massachusetts Eye and Ear Infirmary

種類: 用途特許

番号: 13/642,887.

取得年月日: 2012年10月23日

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 祐介 (MURAKAMI, Yusuke)

九州大学病院 眼科 助教

研究者番号: 50634995

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

ババス デメトリオス (VAVVAS,

Demetrios)