

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861646

研究課題名(和文) 補体活性化抑制因子産生の偏奇に係る分子機序の解明によるAMDの斬新な早期診断法

研究課題名(英文) Development of new detection method of AMD through the unbalance of compliment factors

研究代表者

米田 一仁 (Yoneda, Kazuhito)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00347460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：補体活性化抑制因子CD46, CD55, CD59について輸入人眼球での発現を免疫染色学的に検討し、AMD病態との対応付けを実施し、シース化合物の薬理効果をEx Vivoで評価する実験系を確立した。GRAファミリーに属する複数の化合物が腹腔由来のMpsからのLPS刺激によるTNF産生を抑制すること、RPEからのIL-6産生に対しては全く抑制作用を示さないことが判明した。新規病態診断技術の開発として後眼部炎症疾患を有する患者血清を採取し、補体活性化抑制因子などの動態を解析し、53のサイトカイン並びに8つの補体活性化抑制因子のなかで診断に有用と思われるものとして、10種類の分子種の選択が終了した。

研究成果の概要(英文)：To develop a new method of early detection of AMD, we did immunohistochemistry of various compliment factors in the human donor eyes that include both normal eyes and AMD patients eyes. We also developed the new Ex Vivo evaluation method of the pharmacological effects of some seed chemicals. We found the new effect of GRA family chemicals that downregulated the TNF production of the LPS stimulated macrophages. In addition, we also analysed the serum from some kinds of posterior ocular inflammation disease patients including AMD about 53 kinds of cytokines and 8 kinds of complement inhibitory factors. We choose ten useful parameter cytokines to develop the new early detection method of AMD.

研究分野：眼科

キーワード：加齢黄斑変性 補体 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

AMD の発症に関わる遺伝子多型の多くが補体活性化の抑制に関わる分子である (Science, 2005, 3 報, Invest Ophthalmol Vis Sci(以下 IOVS), 2006, 5 報など)。Drusen など網膜下病変には補体成分が含まれる (FASEB J, 2000, Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, J Immunol 2008)。また、補体活性化には酸化脂質など酸化ストレスが関与し (J Biol Chem, 2009, Nature, 2011)、AMD 病態進展を左右する。

一方、Mps の相転移に関しては、申請者らは、細胞内チオールレドックス均衡に着目し、炎症早期には酸化型 Mps (M2a) が炎症巣に局在し、機能的相転移を経て還元型 Mps (M1) への相転移し組織破壊が起こり、低酸素状態や局在 TGF β により誘導される酸化型 Mps (M2b) 主流へと再度、病態像の質的変換が起こり組織再構築に進むことを報告した (Int Immunol など 7 報、総説: 感染・炎症・免疫、2011 年など)。Mps 機能が可塑的に変換することで病態像が変化するという独創的な理論を世界で最初に提唱したものである。申請者らは、本理論を眼科領域に応用し、ヒト結膜アレルギーや花粉症制御などを確認し (IOVS 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 の誘導や移入で網膜下組織の線維化が抑制できることを報告し (IOVS. 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た。申請者らは、TGF β 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 array を用いて網羅的に解析し COL1A, COL3A1, FN1, FOXC, SNAI1, WNT5A, 5B, VEGF ARNA などの選択的な up-regulation を確認している。細胞変性の一つの EMT 抑制候補 miRNA として miRNA 205, 200abc, 141 などを選定している。同時に、補体抑制因子として細胞ストレスに防御的に働く Clusterin の遺伝子発現が抑制されることを確認している。この Clusterin は、補体抑制作用以外にもタンパク凝集や変性補体成分の蓄積にも係り、AMD 早期病態における Drusen 形成に係わる可能性が高い。以上のように、独創的な本研究概念の検証のための不可欠な予備検証は相応に進んでいると確信する。Mps の機能的集団の解析については共同研究者の長年の実績をフルに活用する。

2. 研究の目的

多くの組織炎症においては、補体活性化と局所浸潤 Mps が炎症の遷延化に関与する。慢性炎症病態を、補体活性化の抑制機構の破綻と局所浸潤 Mps の機能的可塑性 (細胞の機能が局所環境要素により動的に変化すること) から明らかにし、全く新しい医療手段を提供することが全体構想である。下図が AMD に係わる全体構想で囲みの中が今回の

申請課題の対象である

3. 研究の方法

() RPE 細胞変性に伴う細胞表面および分泌型補体抑制因子の発現の解析。

() 補体活性化抑制系の破綻による RPE の POS 貪食能変化、Mps の相転移および機能変性などの機能変化ならびに RPE 細胞変性に関わる遺伝子・miRNA の解析。

() 酸化脂質等の酸化ストレスによって惹起される補体活性化抑制系の破綻による RPE/Mps からの補体成分、補体活性化抑制因子産生能の変化および ROS 貪食能の変化の解析。

() AMD 患者検体 (RPE・Drusen・全房水・硝子体・血清など) に含まれる補体系関連産物 (C3/C5/C3a/C5a/補体因子 B/補体因子 H/補体因子 D) の発現動態および患者末梢血中の単球の M1, M2 偏奇 (polarization) の解析を行う。

併せ、脂質代謝系の攪乱 補体活性化抑制系の破綻 RPE/Mps の貪食機能の減弱経路を検証する。

さらに詳細に方法を記述すると、

(1) MDA や HNE などの酸化脂質による酸化ストレスで惹起される補体活性化抑制系の破綻による RPE 変性時の細胞表面

(CD55/CD59 など) 細胞質内 (Clusterin など) ならびに分泌型補体抑制因子 (CFD/CFH など) や CFB の発現を解析する。また、RPE 変性時の C3, CFB など補体成分や補体活性化抑制因子の産生能の変化、および錐体細胞外節 (POS) 貪食能など RPE の生理的機能の変化を解析する。

(2) 補体活性化抑制系の破綻による RPE の ROS 貪食能などの機能変化の分子基盤を RPE 細胞変性に関わる遺伝子・miRNA の網羅的解析により推定する。東レの 3Dgene やキアゲン社の細胞相転移に係わる PCR アレイを駆使する。miRNA についてはその作用標的遺伝子の推定を行う。推定された責任遺伝子、miRNA については遺伝子導入、ならびに、減殺の方法で機能の解析まで実施する (1 部は 26 年度に持ち越しの予定である) 。

(3) 酸化脂質による RPE, Mps からの補体成分、補体活性化抑制因子産生能の修飾とオート・パラクリン系を解する POS 貪食機能修飾の比較検体を実施する。蛍光標識牛由来 POS を用いる。対照としてビーズの貪食も検定する。

(4) AMD 患者検体 (RPE・drusen・全房水・硝子体・血清など) に含まれる補体系関連産物 (C3/C5/C3a/C5a/補体因子 B/補体因子 H/補体因子 D) の発現動態および酸化脂質マーカーの追跡を行う。26 年度研究のため、緑内障患者 (落屑緑内障を含む) の血清、前房水を収集する。以上の臨床検体の申請者の所属機関での確保については、京都府立医科大学倫理委員会の許可を得ているが、病態に密接に対応する検体を確保するため、ドイツ Erlangen 大眼科学教室 Ursula 教授、米国シ

アトル眼科銀行(Sight Life社)と連携する。

(5) 酸化脂質による RPE/Mps からの補体産生能の修飾とオート・パラクリン系を解析し、POS 貪食機能修飾の解析を行う。

(6) 補体抑制機構の破綻による Mps 亜集団の活性化の偏奇および機能変性を解析する。Auto MACS で Mps を精製し、脈絡膜浸潤 Mps 亜集団の同定は F4/80、CD11c、IL-10、Scavenger 受容体などの表面マーカー検定とともに MGL、Mincle、CCR2、CX3CR1、IL-1R などの発現を免疫組織染色で検討し、M1vs M2 の亜集団属性と対応させる。

(7) 必要に応じ TNF- α 、CCL2、IL-10、IL-6、NOS2、Arginase、FasL、MMP、PAI-1 などの発現も検討する。

(8) AMD 患者患者末梢血中の単球の偏奇(M1 vs M2)の解析を行う。対照は白内障患者検体とする。

(9) ドルーゼン構成成分が RPE/Mps の相転移に關与するか否か検討する。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 が変性するか検定する。脂質成分の關与としては LDL、飽和脂肪酸などを中心に、補体系關与の可能性を確認するためには C3 変換酵素複合体 C3b/Bb による RPE/Mps 活性化の關与を明らかにする。患者 ドルーゼン(独 Erlangen 大、米 Seattle 眼科銀行より受納)

(10) 組織浸潤の免疫組織化学的解析(患者組織)Mps の浸潤、補体成分の沈着の検出。

(11) 緑内障患者(落屑緑内障を含む)の血清、前房水を用いて AMD 患者での知見の主要点の比較検定:特に補体成分、補体活性化抑制因子の体内動態と病態の対応の検定。

4. 研究成果

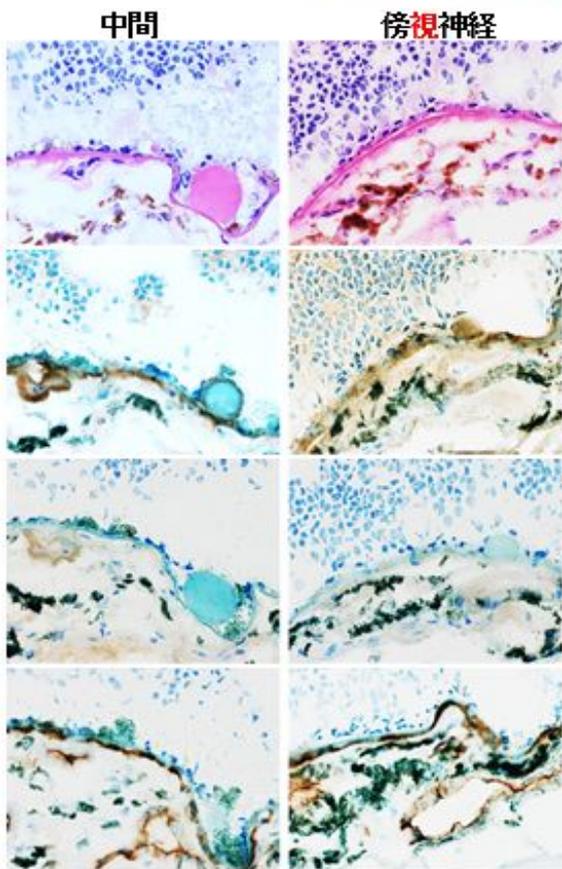
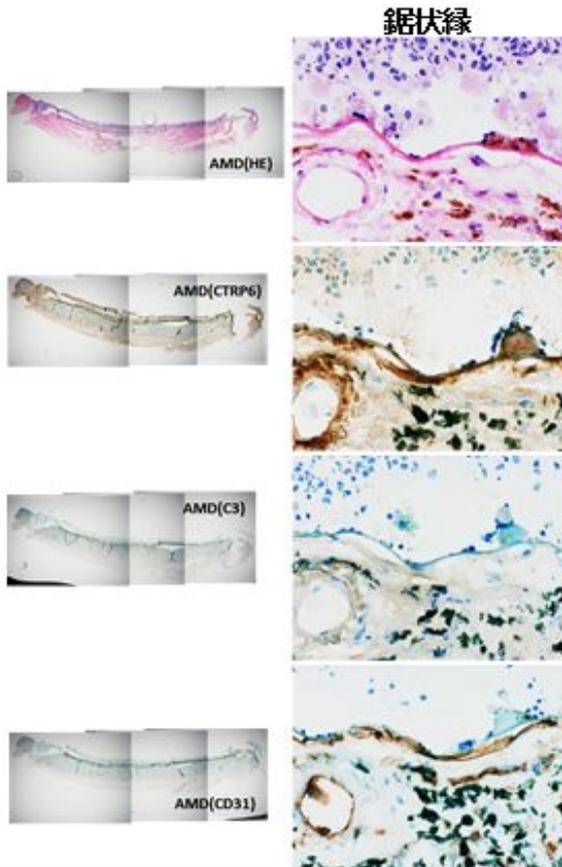
補体活性化抑制作用を有するクラスチリン発現抑制が TNF で惹起されることは確認したが、シズ化合物による抑制修復作用の確認には至らなかった。代わって、同じ補体活性化抑制因子であり RPE からの賛成が知られている CD46、CD55、CD59 について輸入人眼球での発現を免疫染色学的に検討し、AMD 病態との対応付けを実施し、シズ化合物の薬理効果を Ex Vivo で評価する実験系を確立することができた。初期の目的とはずれたが、ヒト眼球組織を用いての評価系を確立できた点は成果として大きい。上記 OBP 化合物、SAG 化合物については in vitro 培養系では、C3 の賛成抑制が認められたが、補体抑制因子として知られる CFH、CD46、CD55、CD59 などの産生増強作用は確認できなかった。抗炎症作用の可能性は認められたが、補体活性化抑制増強作用は認められず対象病態の選別に留意が必要である。また、加齢黄斑変性の発症に重要な網膜色素上皮とマクロファージの間の炎症増悪サイクルの抑制作用について検討した。GRA ファミリーに属する複数の化合物が腹腔由来の Mps からの LPS 刺激によ

る TNF 産生を抑制すること、RPE からの IL-6 産生に対しては全く抑制作用を示さないことが判明した。一方 OBP 化合物は RPE からの IL-6 産生抑制することを確認した。目的はほぼ達成できた。

新規病態診断技術の開発としては、後眼部炎症疾患を有する患者さんの血清を採取し、補体活性化抑制因子などの動態を解析し、病態との対応付けを試みた。53 のサイトカイン並びに 8 つの補体活性化抑制因子のうちから今後診断に有用と思われるものとして、10 種類の分子種の選択が終了した。具体的には、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、同時に、後眼部炎症性疾患を有する患者さんの血清を採取し、補体活性化抑制因子などの動態を解析し病態との対応を試みた。同時に人眼球組織を用いて、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、周辺部などに比較し、特徴的な差異を見出した。

加齢黄斑変性患者の早期診断方法として新規分子標的を見出すべく、報告者は CTRP6 分子の患者病態との対応を解析してきている。この CTRP6 は本疾患分野で世界的に研究が未着手である。CFH 同様に補体代替経路による活性化を抑制することが、元東大医科研究〔現東京理科大〕に岩倉、村山らにより報告されている。CFH の 1 遺伝子多型が AMD 病態と対応することは国際的に認知されているが、国内の患者では必ずしも欧米のような対応は見られないとの報告もある。報告者らは CFH 同様の補体代替経路活性化抑制因子としての CTRP6 の存在と AMD 病態との対応付けにより加齢性疾患 AMD に対する新しい用の診断方法を創出しようとするものである。

次図に示すようにヒト眼球組織連続切片〔8 μ m〕を用いて、抗 CTRP6 抗体(ab36900)により免疫染色(酵素抗体法)を行い発現の局在を検討した。AMD 眼のドルーゼン内に確かにシグナルを検出した。また AMD 眼、正常眼ともに CD31 陽性の脈絡膜の血管内皮細胞もしくは週皮細胞にシグナルを検出した。形態学的にはドルーゼンとみなされるものの、CTRP6 シグナルが検出されないドルーゼンもあった。このことは、本 CTRP6 分子が新しい診断標的分子になりうる可能性を示唆する。今後、他の輸入眼球サンプルを用いて再現性を確認する。(新鮮組織・固定組織)とともに、他の補体関連因子の検出も行う。



考察と結論

欧米人に比較して日本人に多いとされる ARSM SNPs や、CFHSNPs (中でも、日本人に認められる部位) の産物が、補体活性化を抑制する経路 (CFH, CTRP6, クラスチリン) の機能

破綻を誘導する可能性が想定される。CFH の抑制作用の標的である補体の C3b・Bb 複合体は Mps を効率良く活性化するが、Mps 亜集団 M1, M2 の何れに傾斜させるかは不明であるが、貪食能の低下につながる。

本経路には、脂質代謝経路の関与した酸化ストレス産物が深く関与する。この酸化ストレスは、TGF β 産生を介しオートクリン的に RPE の機能変性 (細胞老化、上皮間葉移行、繊維化) を誘導する。この過程で RPE の極性が失われ、恒常性を維持した組織では apical, basolateral と極性を持って分泌される血管新生抑制因子 PEDF と血管新生誘導因子 VEGF の極性分泌が失われ、黄斑部血管漏出や網膜新生血管新生などの恒常性破綻につながると考えられる。輸入眼球由来の臨床検体やドルーゼン成分、視細胞外節などを酸化脂質 Mps - 補体系間の相互作用遮断に係る革新的創薬、診断技法の開発につなげる。

組織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, PVR, PDR という後眼部の重篤疾患に共通に大きな光明を提供する。対象患者数も我国だけでも 10 万人を越え、大いに期待される課題である。低分子化合物を用いる繊維化抑制の作用特性の分子レベルでの明確化は、これら加齢性疾患の早期診断技術の提供にも繋がる。

本経路には、脂質代謝経路の関与した酸化ストレス産物が深く関与する。この酸化ストレスは、TGF β 産生を介しオートクリン的に RPE の機能変性 (細胞老化、EMT) を誘導する。

この過程で RPE の極性が失われ、恒常性を維持した組織では極性を持って分泌される血管新生抑制因子 PEDF と血管新生誘導因子 VEGF の極性分泌が失われ、黄斑部血管漏出や網膜新生血管新生などの恒常性破綻につながると考えられる。今後、RPE の極性培養法も駆使して、この破綻機構を明らかにし、以降の新医療技術開発につなげたいと考える。欧米人に比較して日本人に多いとされる

ARSM SNPs や、CFHSNPs (中でも、日本人に認められる部位) の産物が、補体活性化を抑制する経路 (CFH、クラスチリン) の機能破綻を誘導する可能性が想定される。CFH の抑制作用の標的である補体の C3b・Bb 複合体は M ϕ を効率良く活性化する。今回、CFH 類似の作用点を有する CTRP6 のヒト患者組織での発現動態の一端が明らかにされたことは、補体抑制因子の機能破綻と AMD 病態の関連について新しい視点を追加すると考えられる。

AMD の早期病態に係わる加齢性要因としての危険感知機能の破綻の一端が明らかになり、miRNA, エキソソームと言った組織恒常性の破綻に係る危険感知応答の局面での本研究のさらなる発展は大いに期待される。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田 一仁 (YONEDA, Kazuhito)

京都府立医科大学 医学研究科 助教

研究者番号: 00347460

(2) 研究分担者

該当なし()

研究者番号:

(3) 連携研究者

該当なし()

研究者番号: