

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670759

研究課題名(和文) エネルギー応答を指標とする角膜内皮障害の創薬標的と早期診断基盤技術の開発

研究課題名(英文) Metabolic Plasticity in Cell State Homeostasis and Differentiation of Cultured Human Corneal Endothelial Cells as A New Target for Drug Development

研究代表者

外園 千恵 (SOTOZONO, CHIE)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30216585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：培養ヒト角膜内皮細胞亜集団がエネルギー代謝を異にすること、幹細胞様増殖性亜集団が解糖系代謝に偏り、細胞相転移(CST)細胞でPyruvate Lactate経路が高進する。成熟分化細胞ではミトコンドリア依存性のOXPHOSが主たるエネルギー代謝経路となることが判明した。培養ヒト角膜内皮細胞の分化度は主としてCD44の発現強度と逆相関し、成熟分化段階ではCD44発現は陰性化し未分化細胞では強陽性である。ビルビン酸も乳酸も成熟分化細胞の比率に負相関し、未分化CST細胞の構成比に正相関する。アミノ酸代謝においても亜集団間に階層性が認められた。成熟分化細胞ではSer, BCAAの消費が高い。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found the way, using the culture supernatants, to discriminate SPs in chCECs in terms of their secretory metabolites, and found that the CST SPs exhibited the disposition to the anaerobic glycolysis instead of mitochondria-dependent OXPHOS. The study on the secretory metabolites assigned the chCEC SPs distinct in the expression levels of surface CD44 antigen. Transition from oxidative metabolism into glycolysis is a prerequisite for reprogramming to the pluripotent state. Conversely, redirection of pluripotency into defined lineages requires mitochondrial biogenesis and maturation of efficient oxidative energy generation. The reduction of glycolysis might be triggered by downregulation of the cMyc pathway. Our novel findings provide evidence of a possible link between metabolic regulation in the corneal endothelium and the development of more effective targeted therapies to treat patients with bullous keratopathy, including FECD.

研究分野：眼科学

キーワード：角膜内皮細胞 エネルギー代謝応答 解糖系 ミトコンドリア 代謝リモデリング miRNA 細胞相転移

1. 研究開始当初の背景

感覚器障害に対する医療の提供は高齢社会である本邦の喫緊の課題である。感覚情報の8割は視覚経由で入り個の尊厳の礎を成す。視覚機能維持に不可欠な角膜内皮細胞機能不全患者の占める割合は視覚不全患者の60%を超える。角膜内皮機能不全の細胞分子病態の解明が世界的に殆ど進んでいない由縁の大きなUnmet Needである。

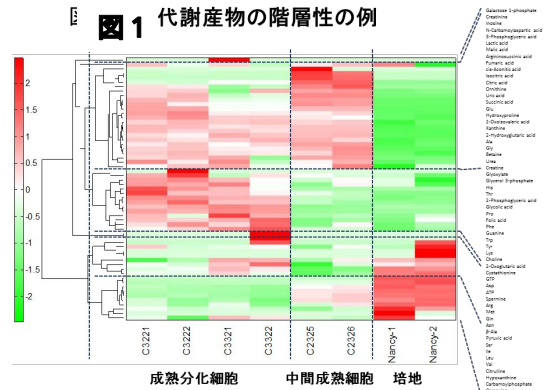
ヒト角膜内皮細胞に特異的なエネルギー代謝経路が存在するのか否かの研究は殆ど無い。申請者らは本研究課題に並行する事業で、培養ヒト角膜内皮細胞が増殖特性や細胞表面形質の異なる細胞機能集団に選別されることを見出した(特許出願済)。申請者らは、細胞特性の異なる細胞亜集団が、培養角膜内皮細胞(cHCEC)に存在すること、cHCECが幹細胞様未分化増殖性細胞、中程度分化低増殖性細胞、老化休止期細胞、非増殖性成熟分化細胞の少なくとも4種以上から構成され、これら亜集団分画が培養の微小環境に依存して動的可塑性を示すことを世界で初めて見出している。代謝リモデリングを誘導する分子機構も代謝リモデリングの結果、どのような細胞機能が制御されるかは、当該分野を超えて、癌研究の世界ですら端緒に就いたところである。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト角膜内皮機能不全を従前全く顧みられなかった細胞のエネルギー代謝不全や偏奇の視点から解釈し、病態解釈あるいは本態機能に対する見方を転換しようとするものである。角膜内皮細胞機能を単純なバリアー機能、ポンプ機能と言った狭義の視点を超えて生命活動に組み込まれた高度機能の一環としての働きの視点から見直し、加齢性疾患の医療に斬新な視座を提供するものである。

3. 研究の方法

培養角膜内皮細胞に存在する幹細胞様未分化増殖性細胞、中程度分化低増殖性細胞、老化休止期細胞、非増殖性成熟分化細胞等少なくとも4種以上の細胞亜集団をモデル対象とする。これら亜集団間での代謝産物の階層的クラスタリング解析を実施した。



培養において分化に最も影響を与えているものとして、Rock 阻害剤、TGFβ受容体阻害剤、p38MAPK 阻害剤、EGF などがある。これらの添加の有無による培養環境の変動への適応戦略として上述に示した代謝応答がどのように偏譚するか検討した。同時に、培養上清中のアミノ酸組成の変化、抗酸化応答や分化を誘導する化合物などを含む培養微小環境、SASP、代謝産物などの働きについても予備検討を行った。上記2種の何れについて代謝物の網羅的検索のためにメタボローム解析を実施した。

代謝産物と培養ヒト角膜内皮細胞の亜集団間に乖離の射止められる SASP, PDGFββ産生との対応を解析した。

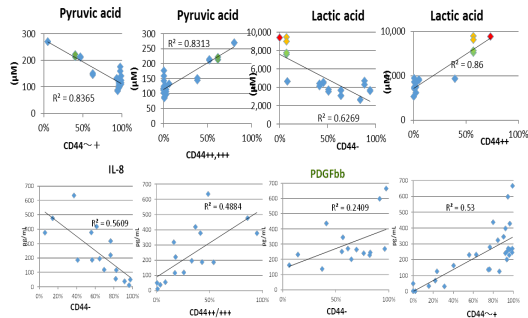
4. 研究成果

亜集団がGlu 代謝を含むエネルギー代謝を異にすること、幹細胞様増殖性亜集団がc-Myc を高発現することなどの知見を得た(昨年度報告済)。c-Myc は解糖系代謝の刺激作用に加え、Gln の細胞内取り込みとグルタミンリシスの促進作用が知られている(Davidson SM, *Cell Metab.* 2012)。本作用はグルタミナーゼ活性を抑制するmiRNA23a/b をc-Myc が抑制するためとされる(Gao P, *Nature.* 2009)。申請者の共同研究者は培養角膜内皮細胞亜集団間に見られる細胞間相互作用を分泌miRNA, (miR) や細胞外小胞体の分子動態の視点で解析中であるが、これらも代謝物を包含し、標的細胞に取り込まれて細胞の代謝機能を修飾する(Zhaoら, *Elife*, 2016)。

図-2 に示した CST 細胞で Pyruvate→Lactate 経路が高進するとの予備的観察を機能的に裏付ける。図-1 に示す代謝産物の階層的クラスタリング解析では、CST 細胞だけでなく成熟分化細胞と中間分化細胞の間にもエネルギー

糖代謝経路の一部に未知の乖離のあることが判明した。解糖能、ミトコンドリア呼吸、呼吸基質の利用割合についても今後解析予定である。エネルギー代謝系が亜集団間で乖離することは、Glycerol-3-phosphate, 2-Phosphoglyceric acid, Glycolic acid, Pro, Folic acid, Guanine は成熟分化細胞でのみ産生されていることでも確認された。

図-2 細胞の分化度とエネルギー代謝、サイトカイン産生



培養において分化に最も影響を与えているものとして、Rock 阻害剤、TGFβ受容体阻害剤、p38MAPK 阻害剤、EGF などがある。培養ヒト角膜内皮細胞は上述のように階層的に CST 状態をその分化度は主として CD44 の発現強度と逆相関する。成熟分化段階では CD44 発現は陰性化し、増殖性未分化細胞では強陽性である。図-2 に示すように、ピルビン酸も乳酸も成熟分化細胞の比率に負相関し、未分化 CST 細胞の構成比率に正相関することが明確である。CST 細胞で高産生される乳酸が SASP 産物の IL-8 産生を増強する可能性も推定されるが、分化細胞比率と正相関傾向のある PDGFβについては、CST の無い細胞から産生されるが、成熟分化細胞の前駆細胞からの産生も確認され亜集団間細胞の階層性は未だ不明確である。

その他、表-1 に今迄に確認された主たる代謝関連特性を示す。

今一つ特記すべき事項として、「アミノ酸代謝において培養角膜内皮細胞亜集団間に階層性が認められたことがある。表-1 に示されるように、成熟分化細胞の培養上清では、Ser, BCAA (Ile, Leu, Val)の消費が高いことが判明した。

今後の方向

内皮細胞の環境適応を標的に、斯かる視点で研究を展開している例は国際的にも皆無である。前述のUnmet Needに応える医療創出のために、角膜内皮機能不全の細胞分子病態、就

中、**細胞分化における環境適応戦略としての代謝リプログラミングの階層性**の研究の深化が不可欠である。

表-1. 確認された代謝関連特性

	中間分化もしくはCST細胞	成熟分化細胞
解糖関連	・乳酸およびL/P比が顕著に増加 → より活発な嫌氣的解糖	・乳酸およびL/P比が比較的増加しない
TCA中間物質	・大部分が顕著に増加 → より活発な呼吸?	・大部分が比較的には増加しない
アミノ酸	Asn, Gln消費量が高い	BCAAやSer消費量が高く、Pro排出量が高い
核酸	Guanineは検出せず	・Guanineが特異的に検出
その他	・3-PGを特異的に検出	・2-PGを特異的に検出 ・Glycerol 3-phosphateが顕著に増加
関連形質	c-Myc発現, CD44発現, Glut1発現	miR34a高発現, CD44陰性, Glut発現

内皮機能不全患者の前房水で対照患者（白内障）患者のそれよりも発現量が著明低下しているmiRを報告者のグループでは、同定に成功している。また、これらのmiRは培養細胞亜集団によって細胞内へ吸収される程度が異なることも予備的に確認できている。成熟分化細胞と比較しCST細胞ではmiR34aが低下することを研究分担者上野らは見出ししている（上野、外園ら、IOVS、2016）本miR34aはPyruvate→Lactate経路を触媒するLDH-Aを阻害することで解糖系をOXPHOS系に偏奇させると想定されており、代謝産物のみならず、乳酸シャトル系やPDK1, PDH, LDHなど解糖系に係る酵素発現と活性についても解析が必要になる可能性も想定している。

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 2 件)

1. Metabolic Plasticity in Cell State Homeostasis and Differentiation of Cultured Human Corneal Endothelial Cells. Hamuro J, Ueno M, Asada K, Toda M, Montoya M, Sotozono C, Kinoshita S. Invest Ophthalmol Vis Sci, 57, 10, 4452-4463, 2016 (査読あり)
2. Concomitant Evaluation of a Panel of Exosome Proteins and MiRs for Qualification of Cultured Human Corneal Endothelial Cells. Ueno M, Asada K, Toda M, Nagata K, Sotozono C, Kosaka N, Ochiya T, Kinoshita S, Hamuro J. Invest Ophthalmol Vis Sci, 57, 10, 4393-4402, 2016 (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. ARVO2016, Seattle(USA), Metabolic plasticity in the cell-state homeostasis and differentiation of cultured human corneal endothelial cells. Junji Hamuro, Morio Ueno, Kazuko Asada,

Munetoyo Toda, Monty Montoya, Chie Sotozono, and Shigeru Kinoshita.2016.05.03.

2. ARVO2016, Seattle(USA)、Regulation of mitochondrial respiration under cell culture stress in human corneal endothelial cells. Shigeru Kinoshita¹, Morio Ueno², Kazuko Asada¹, Munetoyo Toda Kazue Nagata, Chie Sotozono, Nobuyoshi Kosaka, Takahiro Ochiya, and Junji Hamuro.2016.05.03.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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

外園 千恵 (SOTOZONO CHIE)

京都府立医科大学大学院、視覚機能再生外科学、教授

研究者番号：30216585

(2) 研究分担者

羽室 淳爾 (HAMURO JUNJI)

京都府立医科大学、特任教授

研究者番号：80536095

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()