

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861438

研究課題名(和文) 網膜色素上皮細胞による眼内ミエロイド細胞制御機構の解析と新規治療分子の検討

研究課題名(英文) Acquired phenotype of myeloid cells under retinal pigment epithelium mediated ocular condition

研究代表者

堀江 真太郎 (Horie, Shintaro)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40376744

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)：ヒト単球細胞株からマクロファージを誘導し、異なる環境下でのVEGFおよび各種炎症性サイトカイン、ケモカインの産生能を比較検討した。ここで炎症モデルとしてTh1Th2サイトカインや網膜色素上皮から恒常的に産生されるPGE2、糖尿病合併症と関連する終末糖化産物(AGEs)等を培養上清中に負荷し、マクロファージによる各種サイトカインやケモカイン産生能の比較検討を行った。PGE2刺激におけるTh2刺激以上のVEGF産生亢進とAGEsによるVEGFの高い産生能が示された。さらにAGEsによる炎症性サイトカインだけでなくケモカインの産生も強く誘導され、糖尿病網膜症等の病態形成への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Human monocyte cell line THP-1 was stimulated by PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate). PMA-stimulated THP-1 was used as differentiated macrophages in vitro. PMA-THP-1 cells were cultured with AGEs or various cytokines (M1 inducer: IFN- γ , M2 inducer: IL-4 & IL-13, RPE secreting cytokine: PGE2). ELISA or FACS was performed in order to measure cytokines and chemokines in the cell supernatants. Quantitative mRNA expressions were also examined by RT-PCR. VEGF was highly secreted by PMA-stimulated THP-1 in the presence of AGEs or PGE2. Furthermore, not only massive secretion of IL-8 but also multiple increased productions of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1, RANTES were induced by AGEs. In the presence of AGEs or PGE2, VEGF expression from macrophages is elevated. Furthermore, AGEs induces robust proinflammatory cytokines or chemokines productions, which indicates critical macrophage mediated ocular pathology triggered by AGEs.

研究分野：眼炎症

キーワード：ミエロイド細胞 マクロファージ 網膜色素上皮細胞 糖尿病網膜症 眼内環境

1. 研究開始当初の背景

近年、ぶどう膜炎だけでなく糖尿病網膜症や加齢黄斑変性症などの多くの網膜疾患において、炎症の関与が重要であるとみなされている。また、リンパ球以外にもミエロイド系細胞による自然免疫系の関与も重要であると考えられている。マクロファージは IFN や IL-4 などのサイトカインの刺激を受けて古典的活性化型 (M1) や選択的活性化型 (M2) などへサイトカイン依存的に多様な分化と形質を獲得することが知られる (Wynn TA et al. Nature 496:445-455 2013)。これまでの筆者らの研究では、マウスの脈絡膜血管新生モデルにおいてレーザーによって障害を受けた壊死細胞によって眼内浸潤マクロファージやミクログリアに認識され ARG1(+)VEGF(+)M2 マクロファージを誘導する可能性が示された (Liu J et al. PLoS One 16;8(8):e72935 2013)。このように炎症に伴い眼内に浸潤したマクロファージや眼内レジデントのミクログリアは、眼局所の病態に応じ特定の形質が誘導されると考えられるが、その詳細はいまだほとんど明らかでない。

2. 研究の目的

網膜疾患においてマクロファージなどミエロイド系細胞の病態形成への役割が注目されている。マクロファージはサイトカインの刺激を受けて古典的活性化型や選択的活性化型などの異なるタイプへ分化することが知られているが、生体局所の眼疾患においてミエロイド細胞がいかなる分化傾向を示し病態に関与するか不明な点が多い。こ

れまでの研究で網膜色素上皮細胞によるリンパ球などに対する制御機構があることが示されており、眼疾患の病態解明に重要であると考えている。本研究では以下の項目に重点を置いて研究を行いたい。1) 網膜色素上皮細胞によって誘導されるマクロファージなどミエロイド系細胞の分化傾向 2) ミエロイド系細胞をターゲットとする眼疾患のあらたな治療候補分子の選択と治療可能性の検討

3. 研究の方法

ミエロイド細胞として、単球細胞株である THP-1 を PMA の刺激をもとにマクロファージを誘導する。その後種々のサイトカインによる分化を行い、マクロファージを回収したのちに、定量 RT-PCR、培養上清の蛋白を ELISA 法、や FACS を用いた CBA によって分子発現の特徴を解析する。またミエロイド細胞と網膜色素上皮細胞との共培養下でミエロイド細胞を標的とする分子 (CD200Fc、ミノサイクリンを候補とする) を添加し、ミエロイド細胞の分子発現の変化を解析した。

4. 研究成果

ミエロイド細胞としてヒト単球細胞株である THP-1 を用い in vitro による研究の継続してきた。はじめに THP-1 に PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) 刺激を行い、ヒトマクロファージ細胞を誘導した。その上で眼内疾患および病態に類似した環境を作り出すため M1 サイトカイン (IFN-) や M2 サイトカイン (IL-4 および IL-13) および眼内主要サイトカインのプロスタグ

ランジン E2 (PGE2)、さらに糖尿病合併症の病態形成の重要な要因と考えられる終末糖化産物 (AGEs)を培養上清中に負荷し、各種サイトカインやケモカイン産生能を中心に検討してきた。さらに治療分子の検討を行うことを計画していた。具体的にはマウスレベルでマクロファージ由来の血管新生抑制の効果を過去に報告している CD200Fc を治療分子の候補として負荷した。蛋白測定として ELISA 法、遺伝子解析として定量的 PCR 法も試みた。PGE2 刺激では Th2 サイトカイン以上の VEGF 産生亢進や、AGEs によっても VEGF の高い産生能が示された。さらに AGEs による刺激では、IL-1 や IL-6 などの炎症性サイトカインだけでなく IL-8 や RANTES などのケモカインの産生も強く誘導されていた。これらのことから、眼内環境において高血糖に由来する AGEs がマクロファージなどのミエロイド細胞に対して血管新生に関与する VEGF や炎症性サイトカイン、ケモカインの発現を誘導していることが示された (Horie et al. ARVO 2015)。これに加えて治療分子の候補として CD200Fc による負荷を加え検討を行ったが、これまでのところ明確な抑制効果は確認できていない。しかしながら本分子に治療分子としての可能性は否定できないと考えられ、今後条件の最適化などによる更なる検討が必要であると考えられた。これらの一定の成果について国際学会での発表を経て英文雑誌への投稿を準備中である。

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 3件)

堀江 真太郎、大野 京子 最近の糖尿病黄斑浮腫の診療 週刊日本医事新報 査読無し 2016 No4786 p54

Kawashima Y, Noguchi Y., Takase H, Takahashi M, Horie S. Bilateral hearing impairment as the initial symptom of sympathetic ophthalmia. Am.J. Otolaryngol 査読あり 2015 vol.36 pp.606-610

堀江 真太郎 網膜色素上皮細胞による制御性T細胞の誘導と免疫治療の可能性 日本眼炎症学会誌 査読あり 2014 (16) p5-12

[学会発表](計 4件)

堀江 真太郎、諸星 計 糖尿病黄斑浮腫における En face OCT と毛細血管網の特徴 2016 10.8. 第22回 日本糖尿病眼学会総会 仙台国際センター(宮城県仙台市)

Horie S et.al. Evaluation of en-face OCT Images in Diabetic Macular Edema with Anti-VEGF treatment. ARVO 2016.5.2. Seattle (WA USA)

井出 光直、堀江 真太郎、諸星 計、大野 京子 糖尿病黄斑浮腫の抗 VEGF 治療における En face OCT の有用性の比較検討 2016 4.8. 第120回 日本眼科学会総会 仙台国際センター(宮城県仙台市)

Horie S et al. Character of PMA-Stimulated THP-1 Cells under Ocular Diabetic Condition. ARVO 2015.5.5. Denver (Colorado USA)

〔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：
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

堀江 真太郎 (HORIE SHINTARO)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40376744

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()