

論 文 要 旨

Intraocular expression and release of high-mobility group box 1 protein in retinal detachment

網膜剥離眼における
high-mobility group box 1 protein の発現と放出

有村 昇

【序論および目的】

High-mobility group box 1 protein (HMGB1)は体細胞の主に核に局在する非ヒストン DNA 結合蛋白であり、核内において転写調節に重要な因子として知られている。また、細胞表面にも存在し、神経系の発生に関連する神経細胞の軸索・神経突起伸長や、癌細胞の転移に関連する細胞遊走などを誘導すると考えられている。HMGB1 は分泌シグナル配列を欠く蛋白質であるが、マクロファージなどの免疫担当細胞や神経細胞などから外的刺激に応じて能動的に細胞外に分泌され、その他の細胞からも細胞死に伴って受動的に細胞外へ放出される。細胞外 HMGB1 は組織損傷と炎症を修飾する分子として注目されており、敗血症や関節リウマチなど種々の疾患の病態へ関与することが報告されている。視細胞の変性という網膜細胞死を病態の主体とする眼疾患である網膜剥離における HMGB1 の関与について検討した。

【材料および方法】

ラット胎仔網膜由来細胞株 R28 を用いて、網膜細胞死における HMGB1 の発現と放出について検討した。培養した R28 細胞株を過酸化水素(1mM)にて処理することで細胞死を誘導し、HMGB1 の発現を免疫染色にて評価した。また、培養上清中の HMGB1 を ELISA にて定量することで、細胞外への放出を確認した。動物実験委員会の承認を得て、ラット網膜剥離モデルを作成し、ラット剥離網膜における HMGB1 発現の経時的変化を免疫組織学的に検討した。網膜剥離後の典型的な視細胞死であるアポトーシスと HMGB1 発現の関連を検討するため、アポトーシス細胞が最大になる剥離後 3 日目のラット網膜を用いて、HMGB1 の免疫染色と TUNEL 染色との共染色を行った。ヒトの網膜剥離への HMGB1 の関与を評価するため、倫理委員会の承認を得て採取された網膜剥離患者硝子体を用いて、眼内液中の HMGB1 濃度と、網膜剥離に関連するケモカインとして既に知られている Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)濃度を ELISA にて測定し、統計学的解析を行った。ヒト網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 を用いてリコンビナント HMGB1 の細胞遊走活性について検討するため、migration assay を行った。また、HMGB1 の遊走活性に関連するシグナル蛋白として知られている extracellular signal-regulated kinase (ERK)のリン酸化をウエスタンブロットにて評価し、その阻害剤である U0126 を用いて、細胞遊走が抑制されるか検討した。

【結果】

R28 細胞株を、細胞死を誘導する酸化ストレス下に置くことで、核内 HMGB1 の発現上昇や細胞質での HMGB1 の発現増強が認められた。細胞死の結果、培養上清中の HMGB1 濃度は上昇し、網膜細胞において HMGB1 は細胞死に依存して細胞外へ放出された。ラット網膜剥離モデルにおいて核内 HMGB1 は3日目に発現上昇し、7日目で元の発現レベルへ戻るとともに、視細胞の崩壊に伴い網膜下への HMGB1 放出が認められた。同モデルでは剥離3日目に視細胞のアポトーシスが最大となるが、TUNEL 染色と HMGB1 免疫染色の共染色にて、アポトーシス細胞では核内 HMGB1 の発現上昇が認められず、逆に TUNEL 陰性の視細胞において HMGB1 の発現上昇は明瞭であった。網膜剥離患者硝子体では、HMGB1、MCP-1 ともに有意に高値を示し ($P < 0.001$ Mann-Whitney U 検定)、互いに相関した ($P < 0.001$ 単回帰分析、Spearman 順位相関係数)。リコンビナント HMGB1 は ARPE-19 に細胞遊走、ERK のリン酸化を誘導し、それらが阻害剤である U0126 にて抑制されることから、HMGB1 による細胞遊走は ERK のリン酸化を介したものであると考えられた。

【結論及び考察】

HMGB1 は網膜剥離後に主に視細胞の核内で発現上昇し、アポトーシス細胞ではそれが認められないことから、「核内」HMGB1 は網膜剥離というストレス下での視細胞の生存において重要な因子であることが示唆された。一方で、視細胞死に伴って細胞外へ放出される、「細胞外」HMGB1 は、網膜剥離における視細胞変性という危険を伝える眼内の危険信号 danger signal として機能している可能性があり、ヒト網膜剥離の病態へも関与するものと考えられた。放出された「細胞外」HMGB1 は眼内において細胞遊走を促進する可能性があり、網膜色素上皮細胞もその構成細胞となる増殖膜の形成に促進的に働いている可能性がある。増殖膜形成は、眼内の病的創傷治療反応とも言うべき増殖性変化の主体であり、著しく視機能を障害する、外科的処置を要する治療困難な病態である。「細胞外」HMGB1 は、眼内における細胞死とその後の生体反応に関連するメディエーターと考えられ、網膜剥離における増殖性変化への関連を今後さらに検討することで新規の治療標的となる可能性がある。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 68 号		学位申請者	有村 昇
審査委員	主査	金蔵 拓郎	学位	博士 (医学)
	副査	上村 裕一	副査	夏越 祥次
	副査	堀内 正久	副査	久保田 龍二

Intraocular expression and release of high-mobility group box 1 protein in retinal detachment

(網膜剥離眼における high-mobility group box 1 protein の発現と放出)

High-mobility group box 1 protein (HMGB1)は主に核に局在する DNA 結合蛋白であり、核内において転写調節に重要な因子として知られる。また、細胞表面にも存在し、神経細胞の軸索伸長や、細胞遊走などを誘導すると考えられている。HMGB1 は免疫担当細胞や神経細胞などから外的刺激に応じて能動的に細胞外に分泌され、その他の細胞からも細胞死に伴って受動的に細胞外へ放出される。細胞外 HMGB1 は組織損傷と炎症を修飾する分子として注目されており、敗血症や関節リウマチなど種々の病態へ関与することが報告されているが眼疾患への関連は十分に検討されていない。網膜細胞死及び、視細胞変性を病態の主体とする眼疾患である網膜剥離における HMGB1 の関与について検討した。

ラット胎仔網膜由来細胞株 R28 の高濃度過酸化水素による酸化ストレス下での培養にて、細胞内 HMGB1 の発現増強が認められた。また細胞死の結果、培養上清中の HMGB1 濃度は上昇し、網膜細胞においても HMGB1 は細胞死に依存して細胞外へ放出されることが確認された。ラット網膜剥離モデルにおいて、核内 HMGB1 には経時的変化が認められ、3 日目に発現上昇し、7 日目で元の発現レベルへ戻るとともに、視細胞の崩壊に伴い網膜下への HMGB1 放出が認められた。同モデルで視細胞のアポトーシスが最大となる剥離 3 日目の TUNEL 染色と HMGB1 の共染色にて、TUNEL 陽性細胞では核内 HMGB1 の発現上昇は認められず、逆に TUNEL 陰性の視細胞において HMGB1 の発現上昇は明瞭であった。網膜剥離患者硝子体では、HMGB1、monocyte chemoattractant protein 1 濃度が共に有意に高値を示し ($P<0.001$)、互いに相関した ($P<0.001$)。リコンビナント HMGB1 はヒト網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 の細胞遊走と extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1/2 のリン酸化を誘導し、それらが MEK-1/2 阻害剤である U0126 にて抑制されることから、HMGB1 による細胞遊走は ERK-1/2 のリン酸化を介したものであると考えられた。

ラット網膜剥離後の視細胞では核内において HMGB1 の発現上昇が認められ、「核内」HMGB1 は網膜剥離というストレス下での視細胞生存に関連する可能性がある。一方で、視細胞死に伴って細胞外へ放出される「細胞外」HMGB1 は、眼内において細胞遊走を促進し、網膜色素上皮細胞の遊走により生じる増殖膜形成 (病的創傷治療反応) に促進的に働いているのかもしれない。「細胞外」HMGB1 は、眼内における細胞死とその後の生体反応に関連し、視細胞変性という危険を伝える眼内の危険信号 danger signal として機能している可能性が示唆された。

本研究は、HMGB1 という免疫学研究において最近注目される分子について、その眼科疾患への関与を検討した研究である。培養細胞、動物モデル、患者検体と多方面からの検討を行っており、網膜剥離の病態研究に新しい理論的枠組みを提供した点で興味深く、今後の検討を進めることで、より良い治療法の確立に寄与する可能性のある有意義な研究と言える。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 68 号		学位申請者	有村 昇
審査委員	主査	金蔵 拓郎	学位	博士 (医学)
	副査	上村 裕一	副査	夏越 祥次
	副査	堀内 正久	副査	久保田 龍二

主査および副査の5名は、平成21年7月14日、学位申請者 有村 昇君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めるとともに、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 網膜剥離(RD)の原因による HMGB1 発現の違いはあるか。ヒト検体において RD の成因の違いにより、HMGB1 のレベルに差があったか。

(回答) 検討した RD の中では、原因により硝子体中 HMGB1 の濃度に明らかな差は認められなかった。

質問2) 細胞外 HMGB1 を治療標的と考えた場合、具体的なアプローチはどのように考えているか。

(回答) HMGB1 抗体による阻害では網膜障害を生じ、細胞表面 HMGB1 の阻害は特に神経系においては有害である可能性がある。細胞外 HMGB1 のみを阻害する方法が望ましい。現在行われている硝子体手術により眼内を灌流する手術が細胞外 HMGB1 のみを除去する点では理に適っていると考えている。

質問3) 視細胞における HMGB1 の概日周期はラットに特別な現象か。ヒトではどうか。それは視細胞生存に関連するものか。また、視細胞特異的に認められる現象か。

(回答) ラットに限らず広く哺乳類で認められる現象であり、視細胞生存にも関連すると考えられる。ある種の細胞は、同様の HMGB1 の概日周期を有する可能性がある。

質問4) RD では MCP-1 も高いということだが、MCP-1 とはどのようなものでどういう働きをするのか。

(回答) MCP-1 とは、monocyte chemoattractant protein 1、単球遊走因子である。眼内にマクロファージを遊走させる因子として働いていると考えられ、死細胞の除去の他、アポトーシスを促進するとの報告もある。

質問5) HMGB1 が網膜色素上皮細胞(RPE)の遊走を促進することの RD における意味は何か。

(回答) RPE は上皮でありながらマクロファージにも近い特性を持ち、貪食能を有する。細胞死後の debris の処理に関連するとともに、網膜障害後に増殖し、創傷治癒に関与するとも考えられている。増殖膜形成に関連した RPE の遊走には病的意味がある。程度によって、生理的・病理的意味を持つ可能性がある。

質問6) HMGB1 が単独で RPE の遊走能を高めるのか。

(回答) 受容体等についての阻害実験を行っておらず、また 1%FBS を含む培地において良い結果が得られたことから単独の作用とは断定できず、他の因子と協働して遊走能を高めている可能性も否定はできない。

質問7) Figure 1 で R28 は視細胞の細胞株か、RPE を含むのか。

(回答) R28 はラット発生期網膜由来であり、heterogenous な細胞であるが RPE は含んでいない。

質問8) Figure 1a では HMGB1 発現についてウエスタンブロットや mRNA レベルでの検討を行ったのか。

(回答) HMGB1 の細胞内局在や細胞外への放出を評価するために免疫染色による結果のみを示した。

質問9) Figure 2 に示されているマクロファージは形態的に判断したのか。

(回答) ED-1 (CD68) positive であることは確認した。本来はそれを示すべきであった。

最終試験の結果の要旨

質問 10) Figure 3 より核内 HMGB1 が survival に働くとも言えるが、アポトーシスの場合に HMGB1 発現が低下しているだけとは考えられないか。

(回答) Figure 2 で RD 後の HMGB1 発現上昇が RD におけるストレス応答に必要な転写に関連していると考え、細胞生存に関連する可能性があるとして述べた。HMGB1 が DNA 修復に関連するとの報告もある。

質問 11) Figure 4d で ELISA における定量では PVR 群で低いが、実際は放出されていると考えて良いか。

(回答) HMGB1 はヘパリン結合能を持っており、シンデカンなどのヘパラン硫酸プロテオグリカンが RD において増加しているとの報告がある。HMGB1 はそれらの ECM に結合することで、局所では高濃度に存在している可能性がある。

質問 12) Figure 5 で 200 ng/mL で遊走が減少しているのはなぜか。細胞死になっていなかったか。

(回答) 検討した範囲においては、100 ng/mL 以上では有意な増加を認めなかった。この dose において行った MTT assay では細胞死は起こっていないと考えられた。

質問 13) HMGB1 が MCP-1 と協働し、悪性サイクルを作るならば、増殖膜形成はそれを破綻させることにならないか。

(回答) 患者検体において HMGB1 と MCP-1 がパラレルに動く理由としてそのサイクルの可能性を述べた。実際には、RD においてマクロファージが HMGB1 を分泌しているかは不明である。

質問 14) シグナル蛋白について、MAPK 系と PI3K 系とのクロストークや MAPK 下流の因子などはどうであったか。

(回答) 文献的には HMGB1 による細胞遊走のシグナルについては ERK-1/2、及び、その下流に NF- κ B シグナルが関連するという報告がある。本研究では検討していないが、PI3K 系との関連も推測される。

質問 15) Figure 1 で細胞死を誘導するのに酸化ストレスを用いた理由は何か。ヒトの網膜剥離で酸化ストレスが関与する病態があるか。より低い過酸化水素濃度で誘導される酸化ストレスではどうか。

(回答) カタラーゼ等により視細胞死が阻害されるとの報告があり、網膜剥離の視細胞死でもその関連が考えられるが、ヒトを対象にした研究で証明されているわけではない。低濃度過酸化水素ではアポトーシスがより優位になるとすれば、HMGB1 発現は高濃度の場合より減少する可能性がある。

質問 16) RD 自体は炎症を伴う病気なのか。

(回答) 強い炎症は起こらないが、いわゆる sterile inflammation とされる反応は伴うと考えている。

質問 17) 一般に RD では、apoptosis、necrosis、autophagy などのどれが最も関与しているか。RD の necrosis による変化のみに HMGB1 が関与していると考えて良いか。

(回答) RD における autophagy については報告されていない。文献的には、網膜剥離には apoptosis と necrosis の両方が関与すると考えられている。HMGB1 の放出が認められたことから necrosis が RD 後の視細胞死の一形態として重要であると考えられる。

質問 18) 糖尿病網膜症でも増殖膜形成が起こるとされているが、HMGB1-RAGE 系の関与はあるか。

(回答) 文献的には、RAGE の ligand である AGE、S100 protein、amyloid β と共に HMGB1 の関与が示唆されているが、患者検体の ELISA による自験例では糖尿病網膜症では硝子体中 HMGB1 は高くない結果であった。測定法の差異も影響している可能性がある。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。