

網膜色素上皮細胞におけるネクローシスによる
血管内皮増殖因子の分泌に関する研究

氏名 波多野 誠

所属 山口大学大学院医学系研究科

情報解析医学系専攻 眼科学分野

令和2年1月

目次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	1
3. 目的	2
4. 方法	3
1) 対象	3
2) 方法	3
3) 解析	5
5. 結果	5
6. 考察	16
7. 結語	17
8. 謝辞	18
9. 関連論文との関係性	18
10. 参考文献	18

要旨

ネクロシスは、細胞膜の破裂および細胞内容物の放出をもたらす細胞死の一つであり、網膜に無菌性炎症を引き起こす。今回我々はヒト RPE 細胞から調製した壊死細胞溶解物(NLR)が健康な網膜色素上皮(RPE)細胞からの血管内皮増殖因子(VEGF)の産生に及ぼす効果を調べた。NLR は RPE 細胞からの VEGF の放出を著しく増加させ、その効果は NF- κ B シグナル伝達経路およびカスパーゼ-1 の阻害剤の影響を受けないのに対し、複数受容体型チロシンキナーゼ阻害剤である nintedanib によって減衰された。extracellular signal-regulated kinase(Erk)および signal transducer and activator of transcription 3(Stat3)のリン酸化は NLR によって誘導され、nintedanib により阻害された。一方で Erk および Stat3 シグナル伝達経路の阻害剤は NLR 誘導の VEGF 分泌に影響しなかった。さらに、nintedanib は、マウスの脈絡膜血管新生の発生を抑制した。したがって、我々の結果は、RPE 細胞の壊死溶解物が健康な RPE 細胞からの VEGF 分泌を誘導し、その効果が受容体チロシンキナーゼシグナル伝達によって媒介されることを示した。つまり、健康な RPE 細胞による VEGF 分泌が、無菌性炎症および病理学的血管新生に関連する網膜疾患の潜在的な治療標的であることを示唆している。

研究の背景

炎症は外的要因や内的要因に対する初期反応であり、臓器や組織の恒常性に寄与する。損傷を受けた細胞または壊死した細胞から放出される細胞内容物は、danger signal のとして機能し、自然免疫系の活性化に関連するさまざまな疾患の病因となる [1, 2]。細胞損傷または壊死によって誘発される病原体のない炎症は無菌性炎症と呼ばれ、糖尿病網膜症や加齢性黄斑変性症(AMD)を含むいくつかの網膜疾患の一因となると考えられている [3, 4]。無菌性炎症にはインフラマソーム依存性、あるいは NF- κ B を介したインフラマソーム非依存性のシグナル伝達経路の活性化が主に関係しており、結果としてさまざまな細胞からサイトカインおよびケモカインが放出される [5-7]。一方で、接着斑シグナル伝達もまた、G タンパク質共役受容体や受容体チロシンキナーゼ(RTK)によって引き起こされるシグナル伝達を介して無菌性炎症に関与している [8-10]。

網膜色素上皮は網膜の最外層であり、網膜色素上皮(RPE)細胞には、視細胞の興奮性の維持や血液網膜関門の形成など、多くの重要な機能を有する [11]。RPE 細胞は、網膜の恒常性と炎症、壊死、アポトーシスを含む病的状態への反応に寄与するさまざまな成長因子も産生および放出する [12, 13]。損傷した RPE 細胞に対する炎症反応は、AMD の初期段階でのドルーゼン合成の初期イベントであり [14]、RPE 細胞のネクロシスが

AMD の細胞障害を増悪している[4]。壊死性 RPE 細胞により調整した培地は、健康な RPE 細胞およびマクロファージにおいて炎症性遺伝子発現を誘導する[15]。我々はこれまでに、RPE 細胞を用いて内因性の IL-1 α が danger signal として健康な RPE 細胞に働きかけ、炎症性サイトカインの放出を促すことを報告した[16]。

我々はその研究の過程において、炎症性サイトカインだけでなく血管内皮成長因子 (VEGF) も同様に、壊死した RPE 細胞が健康な RPE 細胞に働きかけることで VEGF の産生を促すことを発見した(図 1)。

VEGF は生理的には正常な血管系の発達を調節し、組織の恒常性に寄与する[17]。また、病的な外部刺激に応答してマクロファージおよび内皮細胞などの細胞から分泌または発現が誘導されることが示されている[18]。VEGF 発現は、extracellular signal-regulated kinase(Erk), Jak(Janus kinase)-Stat(signal transducer and activator of transcription), および PI3K(phosphoinositide 3-kinase)-Akt シグナル伝達経路により調節されることが示されており、それらは RTK によって活性化される[21, 22]。眼組織においては、VEGF は網膜および脈絡膜の血管系の生理学的調節に関与している[19]。AMD, 糖尿病黄斑浮腫などの網膜疾患において、VEGF は病態に関与した重要な分子であり、それを中和する抗体療法である抗 VEGF 薬がそれらの疾患で第一選択薬である[20]。眼組織においては、血管内皮細胞, グリア細胞, マクロファージ, および RPE 細胞などが、虚血による低酸素誘導性因子に制御されることによって VEGF を産生, 分泌していることが知られている[19]。一方で、眼組織においては RTK の活性化に始まる Erk, Jak-stat, PI3K などのシグナル伝達経路による VEGF の制御については未知である。

今回の研究では、RPE のネクロシスによる新たな VEGF 産生経路, 複数受容体型チロシンキナーゼ(RTKs)阻害剤である nintedanib を用いることによる NLR 誘導性の PE 細胞からの VEGF 分泌の抑制効果, さらにはマウスにおけるレーザー誘導性脈絡膜新生血管(CNV)モデルを用いた nintedanib による CNV 形成の抑制効果について検討した。

目的

RPE 細胞のネクロシスは AMD の後期の炎症の結果として発生する[15, 16]。本研究の目的はヒト RPE 細胞から調製した壊死細胞溶解物が、健康な RPE 細胞からの VEGF 分泌に対してどのような影響を示し、どのようなシグナル経路を伝達しているか、あるいはそれらのシグナル経路が治療ターゲットとなり得るかというものである。

方法

1) 対象

ヒト培養 RPE (ARPE-19) を用いて *in vitro* における各検討を行った。ARPE-19 は American Type Culture Collection (マナッサス, バージニア州) から入手した不死化ヒト RPE 細胞である。10% ウシ胎児血清 (FBS), ペニシリン (100 U/mL) およびストレプトマイシン (100 μ g/mL) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 F12 (DMEM-F12) (Invitrogen-Gibco, ロックビル, メリーランド州) を用いて, 5% CO₂, 37° C の加湿下で 100 mm 細胞培養皿で維持し, 5~7 日ごとに継代した。コンフルエンスに達した後, トリプシン-EDTA を添加し, 培養皿から分離し, 1:3 または 1:4 に希釈し継代した。実験には 20-25 継代の細胞を用いた。 *In vivo* の検討には, 山口大学大学院医学研究科の動物倫理委員会によって承認された日本 SLC (静岡県) が提供する C57BL/6J マウス (雌, 8 週齢) の個体を用いた。本研究における動物実験は山口大学医学部動物実験指針を遵守して施行した。

2) 方法

壊死細胞溶解物の調製

ARPE-19 細胞の壊死細胞溶解物 (NLR) は, 既報に沿って調製した [23]。ARPE-19 細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 1 回洗浄し, トリプシン-EDTA を添加した 3 分間後, 剥離した細胞を DMEM-F12 に回収し, PBS で 2 回洗浄し, DMEM-F12 1ml 中に 1×10^6 cells となるように調整した後, 液体窒素で急速凍結後に 37° C の水浴で解凍, それを 3 回繰り返した細胞懸濁液を 4° C で 20,000 \times g で 10 分間遠心分離し, 得られた上清を NLR として収集した。

炎症性サイトカインおよび成長因子分泌の定量

ARPE-19 細胞を 24 ウェルプレートで 100% コンフルエンスまで増殖させ, 無血清 DMEM-F12 で 24 時間培養した後, 500 μ L の NLR を添加し 24 時間インキュベートした。培養上清を収集し, 20000 \times g, 4° C, 5 分間の遠心分離にて破片を除去し, 続いて Bio-Plex ヒトサイトカインアッセイ (Bio-Rad, ハーキュリーズ, カリフォルニア州) を使用して NLR 添加による炎症性サイトカインおよび成長因子 (VEGF-A, FGF2, PDGF-BB) の分泌を調べた。さらに, NLR 添加による VEGF 分泌に対する阻害剤の効果を評価するために, ARPE-19 細胞を阻害剤の非存在下または存在下で 1 時間後, NLR に 24 時間暴露した。培養上清を収集し, 20000 \times g, 4° C, 5 分間の遠心分離にて破片を除

去し、ELISA 法を使用して VEGF-A 濃度を測定した。

ウエスタンブロッティング

ARPE-19 細胞を 60 mm 細胞培養皿で 100%コンフルエンスまで増殖させた後、無血清 DMEM-F12 で 24 時間培養した。NLR によって誘導されるパキシリンの発現やパキシリン, Erk1/2, Stat3, および Akt のリン酸化に対する nintedanib の効果を評価するために nintedanib の非存在下または存在下で 1 時間インキュベートした後に、NLR を追加し 24 時間インキュベートさせた。細胞を PBS で 2 回洗浄し、1% Nonidet P-40, 50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ジチオスレイトール, 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル, 1%プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む 300 μ L の溶液に溶解, 細胞溶解液をホモジナイズし, 20000 \times g, 4°C, 5 分間遠心分離し, 得られた上清を分析まで-80°Cで保存した。その後, 細胞溶解物(タンパク質 20 μ g)を β -メルカプトエタノールおよびラウリル硫酸ナトリウム(SDS)でサンプル化し, 10%ゲルでの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画し, 分離したタンパク質を電気泳動によりニトロセルロース膜に転写し, 膜の非特異的部位を 5%スキムミルク添加 PBS でブロックした後、各種一次抗体(1 : 1000 希釈)を加え 4°Cで 12~24 時間振盪した。膜は洗浄後, 室温で二次抗体(1 : 10000 希釈)と 1 時間, Enhanced chemiluminescence(ECL)試薬(GE Healthcare, リトル・チャルフォント, イギリス)と 5 分振盪させることで免疫複合体を検出した。免疫反応によって発現したバンドは ImageJ ソフトウェアを用いて解析した。

マウスにおけるレーザー誘導性 CNV モデル

レーザー誘導性 CNV は AMD に関連する損傷および炎症誘発血管新生のマウス実験モデルである [27, 28]。マウスをケタミン(90 mg/kg)およびキシラジン(10 mg/kg)の腹腔内注射により麻酔し, 右目の網膜に 532 nm の光波長, 75 μ m のスポットサイズ, 0.1 秒, 200 mW の出力でレーザー光凝固を施行した。マウスを 16 匹ずつ, 2 つのグループに無作為化し, 100 μ M の nintedanib またはジメチルスルホキシドのいずれかを含む PBS(2 μ l)を硝子体腔に注射した。7 日後にマウスを安楽死させて右眼を摘出, 氷上で 1 時間 4%パラホルムアルデヒドで固定した。脈絡膜フラットマウント製剤を PBS で洗浄し, 室温で 10 分間 100%メタノールに曝露し, 最初に PBS 中の 5%乾燥スキムミルクで室温で 1 時間, 次に CNV を評価するために Alexa Fluor 488 結合アイソレクチン B4(Invitrogen, カールスバッド, カリフォルニア州)を, VEGF 発現を評価するために抗 VEGF ウサギモノクローナル抗体(Abcam, ケンブリッジ, イギリス)を PBS で 100 倍

希釈で添加し、4° Cで24時間インキュベートした。VEGF免疫複合体を、PBSで100倍希釈したAlexa Fluor 568結合二次抗体(Invitrogen, カールスバッド, カリフォルニア州)と室温, 90分間インキュベートすることで検出した。次いで, 調製物をPBS中の50%グリセロールでマウントし, BZ-X710 蛍光顕微鏡(キーエンス)で検査した。CNVの面積は, ImageJソフトウェアを使用して測定された。

3) 解析

定量データは, 平均値±標準偏差, あるいは平均値+標準偏差として表示した。Bio-Plexヒトサイトカインアッセイおよびウエスタンブロッティングを3回実施し, ELISAを4回実施した。すべての実験を少なくとも3回繰り返した。統計分析はDunnettの多重比較検定またはstudent t検定で実施した。0.05未満のP値を統計的に有意と見なした。

結果

RPE細胞からの炎症性サイトカインおよび成長因子の分泌に対するNLRの効果

RPE細胞から作成した壊死細胞溶解物(NLR)が健康なRPE細胞からの炎症性サイトカインおよび成長因子の分泌を増幅するかどうかを調べた。NLRに曝露した細胞の培養上清中のIL-6, IL-8, MCP-1, VEGFの濃度は, NLRの非存在下でインキュベートした細胞の培養上清またはNLR単独のいずれと比較して有意に増加した。(図1)。

NLR:	-	+	+
RPE細胞:	+	+	-
IL-1 α	0.55 \pm 0.28	10.99 \pm 0.38	9.09 \pm 0.62
IL-1 β	0.01 \pm 0.02	1.19 \pm 0.16	1.51 \pm 0.12
IL-2	0.97 \pm 0.77	13.51 \pm 0.78	8.35 \pm 2.54
IL-4	ND	3.67 \pm 0.32	4.72 \pm 0.43
IL-5	0.16 \pm 0.06	0.52 \pm 0.11	1.12 \pm 0.07
IL-6	2.92 \pm 0.94 *	1014.29 \pm 68.19	55.09 \pm 7.45 *
IL-7	0.69 \pm 0.25	12.50 \pm 1.65	26.02 \pm 2.46
IL-8	12.41 \pm 10.9 *	30303.36 \pm 2277.69	184.72 \pm 26.11 *
IL-9	0.74 \pm 0.39	8.13 \pm 1.18	6.11 \pm 0.61
IL-10	1.14 \pm 0.36	11.61 \pm 1.84	5.68 \pm 0.83
IL-12	7.65 \pm 1.85	135.00 \pm 13.42	36.65 \pm 0.3
IL-13	0.43 \pm 0.21	7.44 \pm 0.68	4.46 \pm 0.17
IL-15	0.41 \pm 0.30	18.63 \pm 1.32	17.35 \pm 0.66
IL-17	0.62 \pm 0.60	6.05 \pm 1.61	4.67 \pm 1.31
Eotaxin	6.45 \pm 5.09	26.29 \pm 3.39	17.94 \pm 5.09
G-CSF	0.24 \pm 0.24	17.3 \pm 1.29	16.65 \pm 1.04
GM-CSF	0.60 \pm 0.25	18.42 \pm 2.63	12.26 \pm 4.36
IFN- γ	ND	66.85 \pm 6.98	93.83 \pm 3.89
IP-10	1.13 \pm 1.30	23.87 \pm 3.74	30.62 \pm 3.38
MCP-1	39.28 \pm 2.96 *	3444.83 \pm 721.20	174.18 \pm 3.82 *
MIP-1 α	0.27 \pm 0.31	1.95 \pm 0.09	2.13 \pm 0.22
MIP-1 β	0.14 \pm 0.18	12.97 \pm 0.46	11.74 \pm 1.95
RANTES	1.77 \pm 1.16	7.78 \pm 0.33	7.92 \pm 1.11
TNF- α	0.74 \pm 0.62	17.00 \pm 2.90	17.66 \pm 2.15
VEGF:	13.66 \pm 6.39 *	1400.78 \pm 116.92	78.73 \pm 24.12 *
FGF:	6.58 \pm 1.36	11644.89 \pm 420.77	15615.57 \pm 113.89
PDGF:	0.71 \pm 0.44	32.35 \pm 3.13	59.98 \pm 3.00

(pg/ml)

図 1. RPE 細胞からの炎症性サイトカインおよび成長因子の分泌に対する NLR の効果

RPE 細胞を無血清培地で 24 時間インキュベートした後、NLR に 24 時間曝露し、培養上清を Bio-Plex ヒトサイトカインアッセイシステムを用いて分析した。平均 \pm 標準偏差(N=4)。

* P < 0.05: NLR に曝露した細胞上清との比較 (Dunnnett の検定)。

RTK シグナル伝達は RPE 細胞からの NLR 誘導性 VEGF 分泌に必要である

VEGF 発現は、RTK の活性化を通じて調節されることが示されている [21, 22]。したがって、RTK シグナル伝達が RPE 細胞からの NLR 誘導性 VEGF 分泌に寄与するかどうかを調べるために、複数受容体型チロシンキナーゼ(RTKs)阻害剤である nintedanib の効果を調べた。RPE 細胞からの NLR 誘導性 VEGF 分泌は、濃度依存的に nintedanib によって阻害された(図 2)。

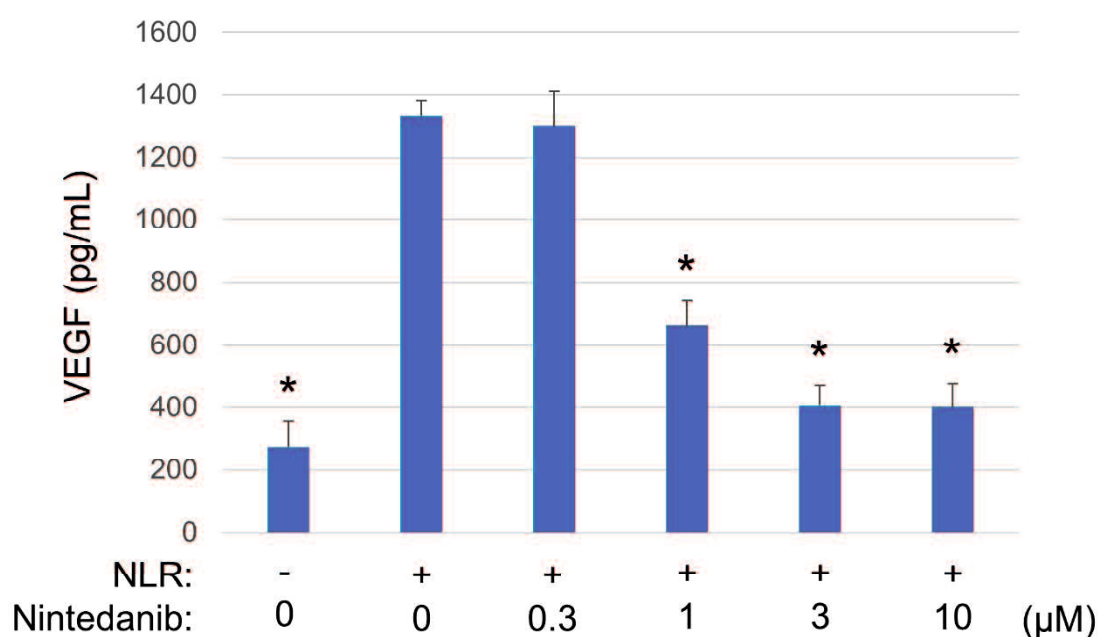


図 2. NLR による RPE 細胞からの VEGF 分泌に対する nintedanib の効果

RPE 細胞を無血清培地で 24 時間インキュベートした後、0.3~10μM の nintedanib と 1 時間インキュベートし、次に NLR の非存在下または存在下で 24 時間暴露し、上清中の VEGF 分泌を ELISA で測定した。平均±標準偏差(N=4)。* P < 0.05: NLR に暴露した細胞上清との比較 (Dunnett の検定)。

炎症性炎症のインフラマソーム依存性または非依存性経路は、RPE 細胞からの NLR 誘導性 VEGF 分泌に必要ではない

インフラマソーム依存性および非依存性のシグナル伝達経路は、無菌性炎症に寄与する [7, 25]。そのようなシグナル伝達経路が RPE 細胞からの NLR 誘導性 VEGF 分泌に役割を果たすかどうかを調べるために、NF-κB シグナル伝達をブロックする IKK-2 阻害剤とカスパーゼ-1 阻害剤(VX-765)の効果を調べた。NLR による RPE 細胞からの

VEGF の分泌は, IKK-2 阻害剤または VX-765 の影響を受けなかった(図 3)。

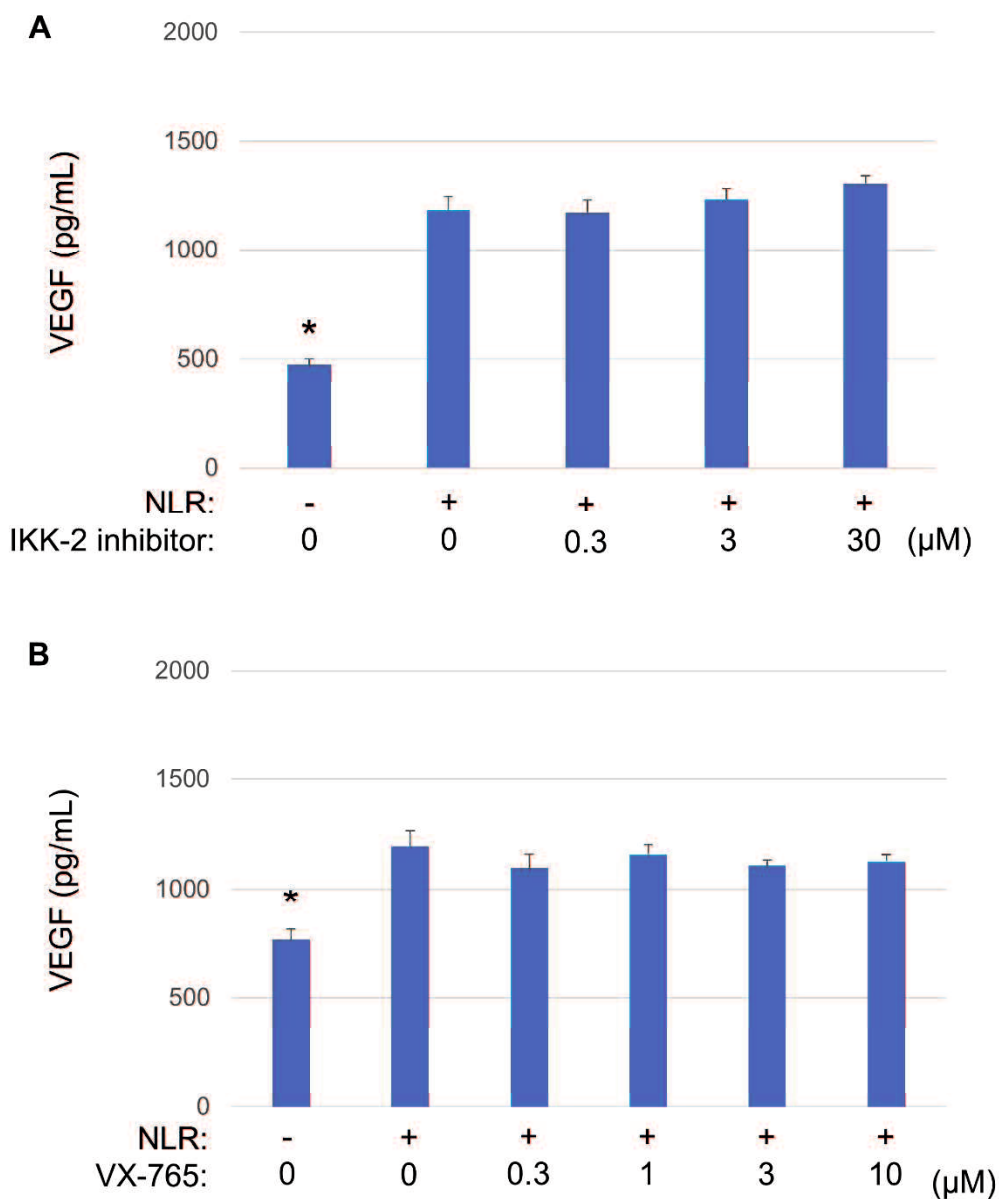


図 3. RPE 細胞からの NLR 誘導性 VEGF 分泌に対する IKK-2 阻害剤とカスパーゼ-1 阻害剤 (VX-765) の効果

RPE 細胞を無血清培地で 24 時間インキュベートした後, 細胞を IKK-2 阻害剤(0.3~30μM) (A) または VX-765(0.3~10μM) (B) に 1 時間インキュベートした後, NLR の非存在下または存在下で 24 時間暴露し, 上清中の VEGF 分泌を ELISA で測定した。平均+標準偏差 (N=4)。* P <0.05: NLR に暴露した細胞上清との比較 (Dunnett の検定)。

RPE 細胞の接着斑シグナル伝達に対する NLR の効果

接着斑シグナル伝達経路も無菌炎症に関係している [8]。したがって、NLR と nintedanib が RPE 細胞での接着斑関連タンパク質パキシリンの発現またはリン酸化に影響するかどうかを調べた。NLR がパキシリンの発現を増加させ、この効果が nintedanib によって減衰されることが明らかとなった(図 4A, B)。しかし、パキシリンのチロシンリン酸化は、NLR または nintedanib の影響を受けなかった(図 4A, C)。

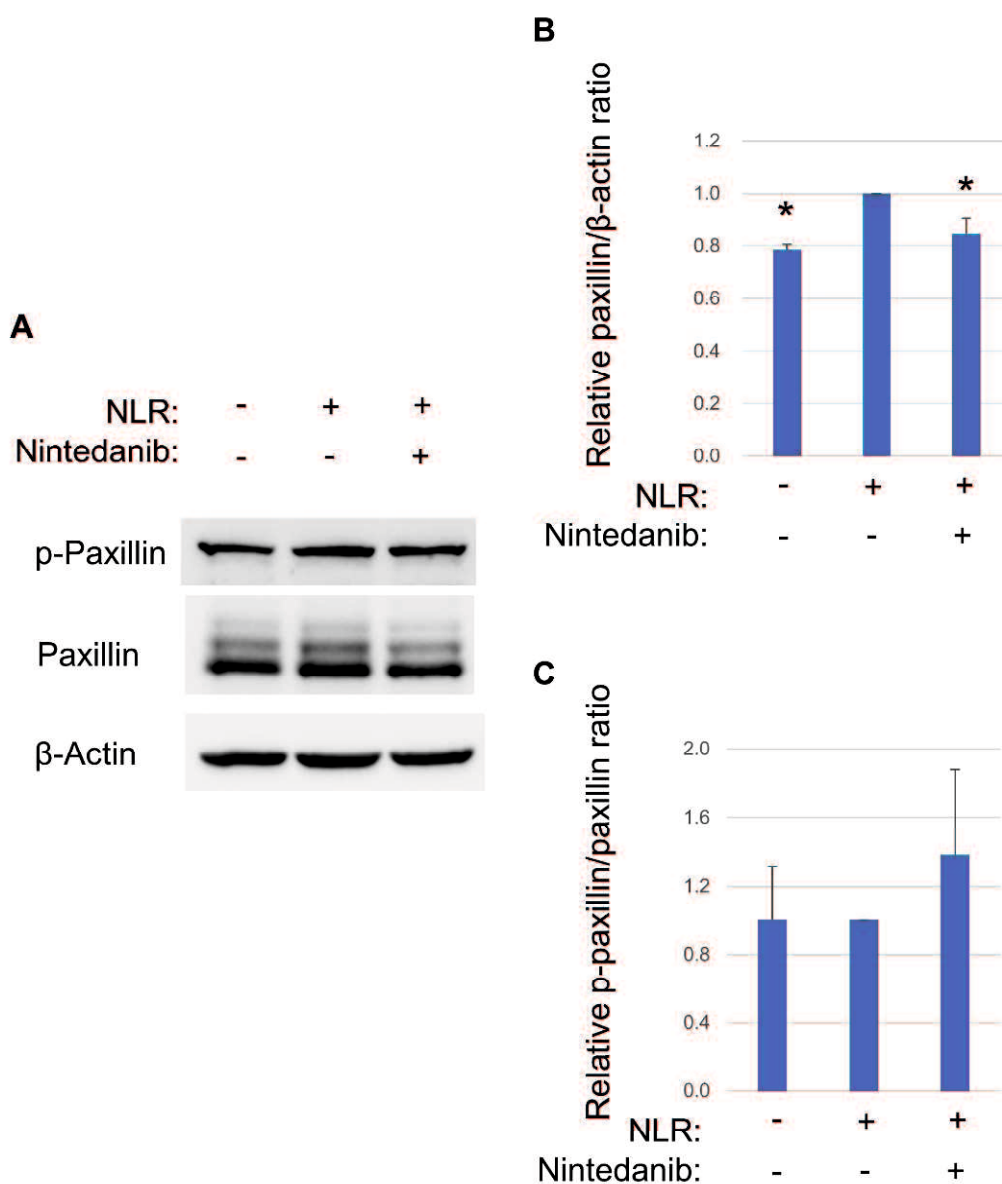


図 4. RPE 細胞におけるパキシリンの発現とリン酸化に対する NLR と nintedanib の効果

(A) RPE 細胞を無血清培地で 24 時間インキュベートした後, nintedanib (10 μ M) に 1 時間インキュベートし、NLR の非存在下または存在下で 24 時間暴露し、その細胞溶解物を回収、ウエスタンブロッティングで解析した。抗体はパキシリン, リン酸化パキシリン, β -アクチン(ローディング・コントロール)を用いた。 β -アクチンに対するパキシリン (B)、およびリン酸化パキシリン (C) の信号強度の相対比を示した。平均値+標準偏差(N=3)。

* P < 0.05: NLR に暴露したが nintedanib を添加しなかった細胞上清との比較 (Dunnett の検定)。

RPE 細胞の Erk, Stat3, および Akt シグナル伝達に対する NLR の効果

VEGF 発現は, Erk, Jak-Stat, PI3K-Akt シグナル伝達経路によって制御されている [21, 22]。したがって, NLR と nintedanib が RPE 細胞の Erk1 / 2, Stat3, または Akt のリン酸化に影響するかどうかを調べた。NLR は Erk1 / 2 および Stat3 のリン酸化を誘導し、nintedanib はそれらのリン酸化を阻害した(図 5A, B)。NLR は Akt のリン酸化には影響しなかった(図 5C)。

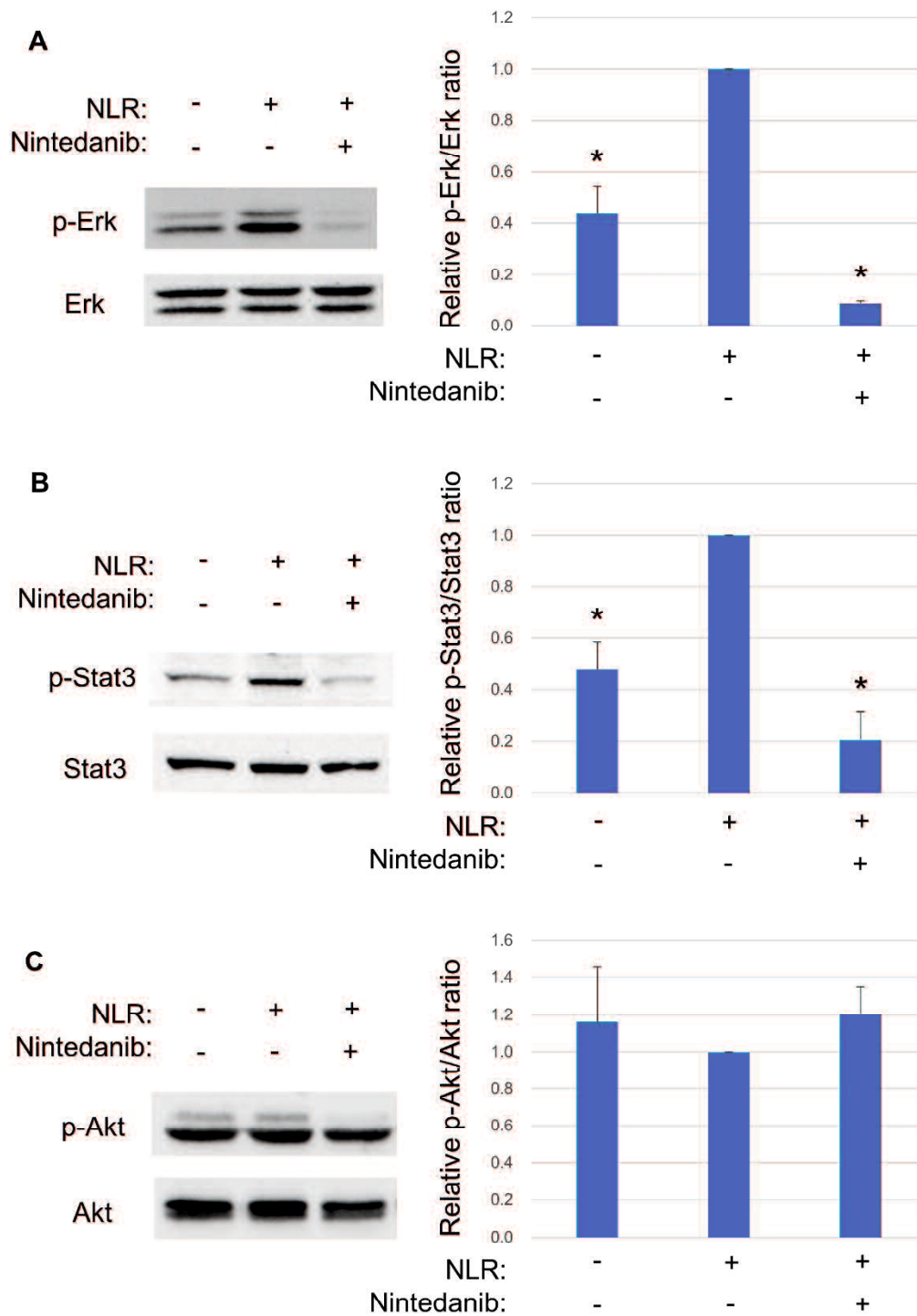


図 5. RPE 細胞の Erk1 / 2、Stat3、および Akt リン酸化に対する NLR および nintedanib の効果

RPE 細胞を無血清培地で 24 時間インキュベートした後, nintedanib (10 μ M) に 1 時間インキュベートし、NLR の非存在下または存在下で 24 時間暴露し、その細胞溶解物を回収、

ウエスタンブロッティングで解析した。抗体は Erk, リン酸化 Erk, Stat3, リン酸化 Stat3, Akt, リン酸化 Akt を用いた。抽出タンパク質におけるリン酸化タンパク質/総タンパク質の相対比を示した。平均値+標準偏差(N=3)。* P <0.05: NLR に暴露したが nintedanib 添加しなかった細胞上清との比較 (Dunnett の検定)。

RPE 細胞からの NLR 誘導性 VEGF 分泌に対する Erk および Jak-Stat3 シグナル伝達阻害剤の効果

NLR が RPE 細胞で Erk1/2 と Stat3 のリン酸化を誘導したことを考慮して(図 5A, 5B), NLR 誘導性 VEGF 分泌に対するそのようなリン酸化阻害剤の効果を調べた。NLR による RPE 細胞からの VEGF の分泌は, PD98059 または AG490 のいずれにも影響されなかった(図 6)。

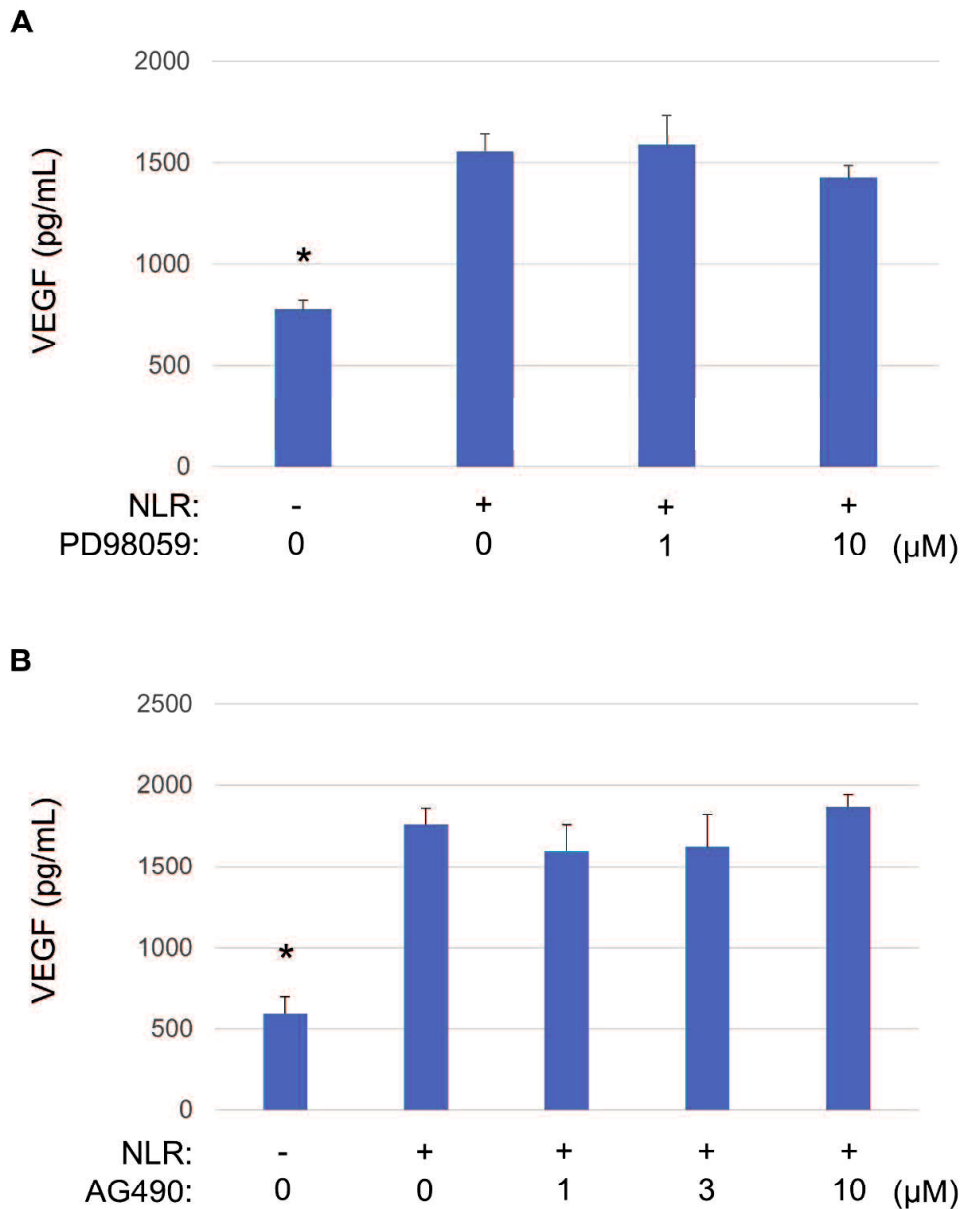


図 6. RPE 細胞からの NLR 誘導性 VEGF 分泌に対する Mek-Erk (PD98059) および Jak-Stat3 (AG490) シグナル阻害剤の効果

RPE 細胞を無血清培地で 24 時間インキュベートした後に、Erk キナーゼ(Mek)阻害剤 PD98059(1, 10 μM)または Jak 阻害剤 AG490(1~10 μM)に 1 時間インキュベート、次に NLR の非存在下または存在下で 24 時間インキュベートし、上清中の VEGF 分泌を ELISA で測定した。平均値+標準偏差(N=4)。* P < 0.05: NLR に暴露したが nintedanib 添加しなかった細胞上清との比較 (Dunnett の検定)。

CNV に対する nintedanib の効果

AMD の病理学的プロセスを模倣したマウス実験モデル[26]を用いて, CNV の発生に対する nintedanib の効果を調べた。そのマウス実験モデルでは脈絡膜, ブルッフ膜, および RPE 細胞が傷害, 破壊されることが示されている[27]。nintedanib の硝子体注射によって, アイソレクチン B4 で示された CNV の形成が減衰することが示された(図 7)。VEGF の発現は, コントロールと nintedanib の両方の条件下で CNV の発現と大きく重複する領域で確認されたが, 不連続であり面積の測定は困難であった(図 7A)。

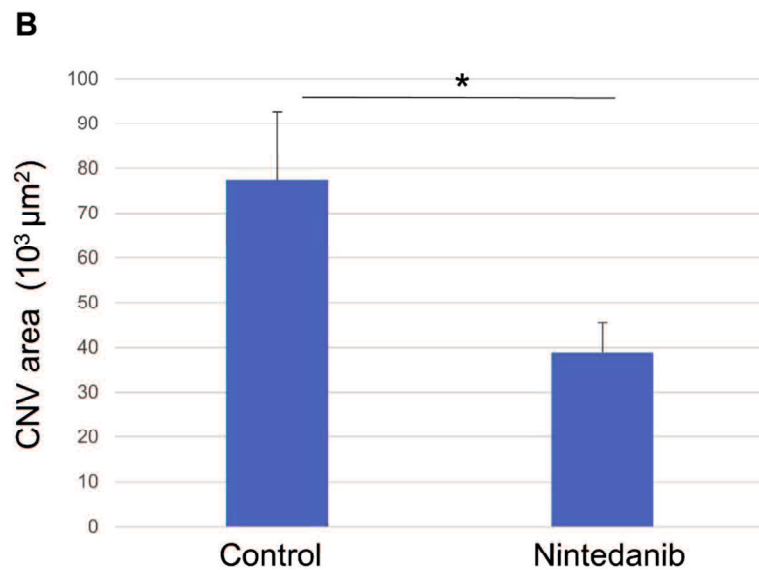
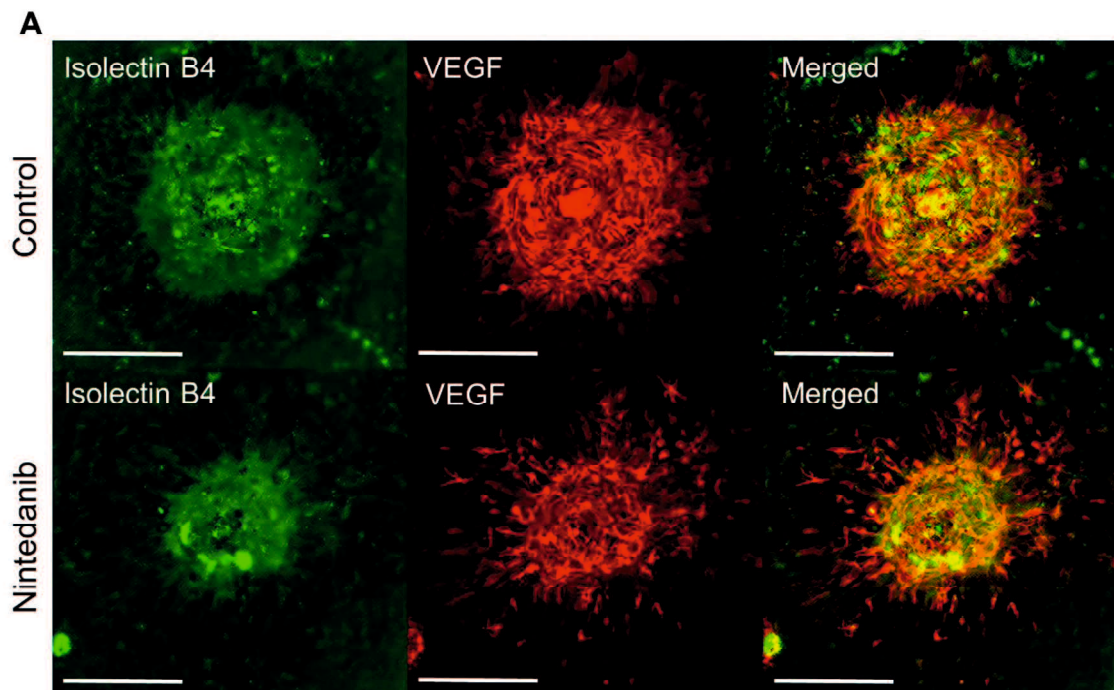


図 7. レーザー誘導性 CNV の形成に対する nintedanib の効果

(A) レーザー光凝固および $100\mu\text{M}$ の nintedanib または PBS(コントロール)の硝子体内注射の 7 日後に、マウス眼球からの脈絡膜フラットマウント標本を作成し、アイソレクチン B4 および VEGF に対する抗体で蛍光染色した。スケールバー: $200\mu\text{m}$ 。(B) アイソレクチン B で示された CNV の面積を測定した。平均値+標準偏差(N=16)。* $P < 0.05$ (student t 検定)。

考察

RPE細胞は多くの重要な機能を果たすが、その中でも VEGF の産生に注目した。VEGF の病理学的分泌は、血管新生だけでなく、眼の炎症も引き起こす可能性がある [29, 30]。AMD や糖尿病網膜症を含むいくつかの網膜疾患に関連する無菌炎症における RPE 細胞の病理学的活性化を調べるために、健康な RPE 細胞からの VEGF 分泌に対する RPE 細胞由来の壊死細胞溶解物の影響を調査した。NLR は RPE 細胞からの VEGF の分泌を著しく誘導し、健康な RPE 細胞が隣接する RPE 細胞の損傷または死に応答して VEGF 産生を増大することが示唆された。したがって、この反応は AMD や糖尿病網膜症などの網膜疾患における病理学的 VEGF 発現に寄与する可能性があると考えられる。

VEGF の発現は、血管新生や白血病において、RTK の活性化によって制御されることが示されている [21, 22]。そこで、我々は RPE 細胞からの NLR 誘導 VEGF 分泌に対する RTK 阻害剤である nintedanib の効果を調べた。nintedanib は、VEGF 受容体 1~3, FGF 受容体 1~3, PDGF 受容体 α および β の細胞内チロシンキナーゼドメインに結合する [31, 32]。nintedanib は濃度依存的に RPE 細胞からの NLR 誘導性の VEGF 分泌を阻害することがわかった、すなわち NLR 誘導性の VEGF 分泌は RTK シグナル伝達を介していると考えられた。一方、VEGF 発現は、Erk, Jak-Stat, および PI3K-Akt シグナル伝達経路によって調節されることも示されている [21, 22]。NLR は RPE 細胞における Erk1 / 2 と Stat3 のリン酸化を誘導し、これらの効果は nintedanib によって阻害されることを発見した。NLR による VEGF の分泌は、Mek-Erk または Jak-Stat3 シグナル伝達の阻害剤では減衰されなかった。すなわち、Erk1 / 2 と Stat3 のシグナル伝達経路は NLR による RTK 活性化の下流で活性化を受けるが、VEGF 産生に対しては直接的な関与はしていないことが考えられた。

無菌性炎症には 2 つの重要なシグナル伝達経路が関与しているといわれている。インフラマソーム非依存性のシグナル伝達経路では、NF- κ B の活性化により炎症が引き起こされる [25]。我々は以前、RPE 細胞において、NLR によって内因性の NF- κ B 阻害の作用をもつ I κ B- α がリン酸化および分解を受け、NF- κ B の核移行が誘導されることを報告した [16]。しかし、今回の実験で RPE 細胞における NLR 誘導性の VEGF 分泌が NF- κ B シグナル伝達をブロックする IKK-2 阻害剤によって減衰されないことを示した。インフラマソーム依存性シグナル伝達経路においてはカスパーゼ-1 の活性化が引き起こされる [7, 25]。しかし、今回の実験で RPE 細胞における NLR 誘導性の VEGF 分泌がカスパーゼ 1 阻害剤によって減衰されないことを示した。したがって、これらの結

果は、無菌炎症における RPE 細胞からの VEGF 分泌の増加が、典型的なインフラマソーム依存または非依存のシグナル伝達経路を介していないと考える。

接着斑シグナル伝達は、無菌性炎症[8], RTK シグナル伝達[33], および RPE 細胞からの VEGF 分泌[34, 35]にも関与している。パキシリンのチロシンリン酸化[36]およびパキシリン発現の増加[37]は、RPE 細胞における接着斑の活性化を反映すると考えられている。今回の実験では NLR が RPE 細胞のパキシリンのチロシンリン酸化に影響を及ぼさないことを示したが、パキシリンのセリン-トレオニンリン酸化も接着斑シグナル伝達に寄与する[38]ことを考えると、NLR がパキシリンのそのようなリン酸化を誘導する可能性は残っている。NLR は RPE 細胞のパキシリンの発現を増加させ、その効果は nintedanib によって減弱した。接着斑シグナル伝達が RTK 活性化の下流でトリガーされ、VEGF 分泌の増加に寄与したと考えられた。

VEGF は CNV の誘導に寄与する[39, 40]。レーザー誘発 CNV は、AMD に関連する損傷および炎症誘発血管新生のモデルである[27, 28]。このモデルでは、RPE 細胞はレーザー照射によって直接損傷を受ける[26]。RTK シグナル伝達[41, 42]と Erk, Jak-Stat3, PI3K-Akt 経路[43, 44]は、この実験モデルにおける CNV 形成に関与している。レーザー誘発 CNV モデルにおいて、nintedanib は血管新生の進展と VEGF の発現を抑制した。したがって、RPE 細胞における RTK シグナル伝達を介した NLR 誘導性の VEGF 分泌の増大は、この実験モデルにおける CNV 形成に関与していると考えられる。CNV 形成における、RPE 細胞のネクロシスによって誘導される RPE 細胞からの VEGF 発現の役割について、さらなる評価が必要である。

レーザー照射は、RPE 細胞を含む網膜細胞を破壊またはネクロシスを誘発し[45]、残存した無傷の RPE 細胞が壊死細胞の内容物に曝露されることが考えられる。IL-6, IL-8, MCP-1 などのいくつかのサイトカインが CNV に関与している[24, 46]。我々は NLR の中にこれらのサイトカインを含むことを示した (図 1)。したがって、レーザー照射により生じた壊死性 RPE 細胞の内容物が CNV 形成に影響したと考える。

結語

RPE 細胞から調製した壊死細胞溶解物が健康な RPE 細胞からの VEGF の分泌を刺激し、この効果が RTK シグナル伝達によって媒介され、下流の接着斑シグナル伝達もおそらく役割を果たしていることを示した。したがって、RTK 阻害剤を用いることにより RPE 細胞からの病的な VEGF 産生を抑制することは、網膜疾患に関連する無菌性炎症および血管新生の解消に対する潜在的な治療アプローチとなる可能性を示唆している。

謝辞

本研究にあたって、指導教官としてご指導を頂いた山口大学大学院医学系研究科眼科学講座教授 木村和博先生, 同講座助教 徳田和央先生, 実験にご協力頂いた同講座技術補佐員 水野由香里氏, 片岡彩加氏に対して, ここに深謝の意を表する。

関連論文との関係性

本研究は、著者執筆の関連論文 (Makoto Hatano, Kazuhiro Tokuda et al. Inhibitory effect of nintedanib on VEGF secretion in retinal pigment epithelial cells induced by exposure to a necrotic cell lysate. *PLoS One*. Vol.14 No.8: e0218632.) に基づいて, RPE 細胞のネクロシスが健常な RPE 細胞に与える影響, 特に血管内皮増殖因子の分泌について検討したものである。

参考文献

1. Matzinger P et al. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002; 296: 301–305.
2. Krysko O et al. Many faces of DAMPs in cancer therapy. *Cell Death and Disease*. 2013;4:1-7.
3. Feenstra DJ et al. Modes of retinal cell death in diabetic retinopathy. *J Clin Exp Ophthalmol*. 2013;4(5):298.
4. Murakami Y et al. 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(2):270.
5. Pandolfi F et al. Key Role of DAMP in Inflammation, Cancer, and Tissue Repair. *Clinical Therapeutics*. 2016;38:1017-28.
6. Schaefer L et al. Complexity of danger: The diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J Biol Chem*. 2014;289:35237-45
7. Duewell P et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464:1357-61.
8. Zeisel MB et al. Cross talk between MyD88 and focal adhesion kinase pathways. *J Immunol*. 2005;174(11):7393-7.

9. Kutikhin AG et al. Pattern recognition receptors and DNA repair: starting to put a jigsaw puzzle together. *Front Immunol.* 2014;5:343.
10. Schmid MC et al. Receptor tyrosine kinases and TLR/IL1Rs unexpectedly activate myeloid cell PI3k γ , a single convergent point promoting tumor inflammation and progression. *Cancer Cell.* 2011;19(6):715-27.
11. Simó R et al. The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier-implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010.
12. Murakami Y et al. Necrotic enlargement of cone photoreceptor cells and the release of high-mobility group box-1 in retinitis pigmentosa. *Cell Death Discov.* 2015;1:15058.
13. Remé CE et al. Apoptotic cell death in retinal degenerations. *Prog Retin Eye Res.* 1998;17(4):443-64.
14. Qin S et al. Inhibition of RPE cell sterile inflammatory responses and endotoxin-induced uveitis by a cell-impermeable HSP90 inhibitor. *Exp Eye Res.* 2011;93(6):889-97.
15. Hanus J et al. Induction of necrotic cell death by oxidative stress in retinal pigment epithelial cells. *Cell Death Dis.* 2013;4:e965
16. Liu Y et al. Necrosis-induced sterile inflammation mediated by interleukin-1 α in retinal pigment epithelial cells. *PLoS ONE.* 2015;10:1-17.
17. Bao P et al. The role of VEGF in wound healing. *J Surg Res.* 2010;153:347-58.
18. Nucera S et al. The interplay between macrophages and angiogenesis in development, tissue injury and regeneration. *Int J Dev Biol.* 2011;55:495-503.
19. Penna JS et al. Vascular Endothelial Growth Factor in Eye Disease. *Prog Retin Eye Res.* 2008;27:331-71.
20. Fogli S et al. Clinical pharmacology of intravitreal anti-VEGF drugs. *Eye (Lond).* 2018;32(6):1010-1020
21. Pagès G et al. Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene-A concert of activating factors. *Cardiovasc Res.* 2005;65:564-73.

22. Steelman LS et al. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*. 2004;18:189-218.
23. Rao DA et al. IL-1 and IL-1 are endogenous mediators linking cell injury to the adaptive alloimmune response. *J Immunol*. 2007;179:6536-46.
24. Kent D et al. Choroidal neovascularization: a wound healing perspective. *Mol Vis*. 2003;9:747-55.
25. Fleshner M et al. Danger Signals and Inflammasomes: Stress-Evoked Sterile Inflammation in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42:36-45.
26. Ambati J et al. Age-related macular degeneration and the other double helix. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:2166-9.
27. Chan-Ling T et al. Hematopoietic stem cells provide repair functions after laser-induced Bruch's membrane rupture model of choroidal neovascularization. *Am J Pathol*. 2006;168(3):1031-44.
28. Nussenblatt RB et al. Age-related Macular Degeneration and the Immune Response: Implications for Therapy. *Am J Ophthalmol*. 2007;144
29. Ortega-Gómez A et al. Resolution of inflammation: An integrated view. *EMBO Mol Med*. 2013;5:661-74.
30. Szade A et al. Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis. *IUBMB Life*. 2015;67:145-59.
31. Hilberg F et al. BIBF 1120: Triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. *Cancer Res*. 2008;68:4774-82.
32. Ledermann JA et al. Randomized phase II placebo-controlled trial of maintenance therapy using the oral triple angiokinase inhibitor BIBF 1120 after chemotherapy for relapsed ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29:3798-804
33. Howe A et al. Integrin signaling and cell growth control. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10(2):220-31.
34. Park GB et al. Cigarette smoke-induced EGFR activation promotes epithelial mesenchymal migration of human retinal pigment epithelial cells through regulation of

the FAK-mediated Syk/Src pathway. *Mol Med Rep.* 2018;17(3):3563-74.

35. Zhu J et al. Focal adhesion kinase signaling pathway participates in the formation of choroidal neovascularization and regulates the proliferation and migration of choroidal microvascular endothelial cells by acting through HIF-1 and VEGF expression in RPE cells. *Exp Eye Res.* 2009;88(5):910-8.

36. Kimura K et al. Attenuation of EMT in RPE cells and subretinal fibrosis by an RAR-gamma agonist. *J Mol Med (Berl).* 2015;93(7):749-58.

37. Kobayashi M et al. Suppression of Epithelial-Mesenchymal Transition in Retinal Pigment Epithelial Cells by an MRTF-A Inhibitor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019;60(2):528-37.

38. Schaller MD et al. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene.* 2001;20(44):6459-72.

39. Krzystolik MG et al. Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. 2002;120(3):338-46.

40. Kvant A et al. Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37(9):1929-34.

41. Kang S et al. Antiangiogenic effects of axitinib, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase, on laser-induced choroidal neovascularization in mice. *Curr Eye Res.* 2013;38(1):119-27.

42. Seo MS et al. Dramatic inhibition of retinal and choroidal neovascularization by oral administration of a kinase inhibitor. *Am J Pathol.* 1999;154(6):1743-53.

43. Izumi-Nagai K et al. Interleukin-6 receptor-mediated activation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) promotes choroidal neovascularization. *Am J Pathol.* 2007;170(6):2149-58.

44. Zhuang Z et al. Down-regulation of microRNA-155 attenuates retinal neovascularization via the PI3K/Akt pathway. *Mol Vis.* 2015;21:1173.

45. Yan YJ et al. Inhibition of Laser-Induced Choroidal Neovascularization by Hematoporphyrin Dimethylether-Mediated Photodynamic Therapy in Rats. *B Biol Pharm Bull.* 2017;40(12):2088-95.
46. Funatsu H et al. Aqueous humor levels of cytokines are related to vitreous levels and progression of diabetic retinopathy in diabetic patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2005;243(1):3-8.