

論 文 要 旨

Toxic effects of extracellular histones and their neutralization by vitreous in retinal detachment

網膜剥離における細胞外ヒストン毒性と硝子体による中和作用

川野 浩輝

【序論および目的】

細胞死に伴い放出される細胞内構成成分が、その後に引き続く無菌性炎症のトリガーになるという概念は 1990 年代ころから提唱され、Damage-associated molecular patterns (DAMPs) として注目されてきた。2009 年、敗血症において、死細胞から放出された核内でヌクレオソーム構造をなすヒストンが、内皮細胞死や血栓形成などの作用を引き起こす敗血症死の major mediator であり、治療の分子標的となりうると報告された。以降、ヒストンによるサイトカイン産生、血小板凝集、細胞傷害について多数の報告がされている。一方で網膜剥離 (RD) とそれに引き続く網膜傷害の細胞分子機序には不明の点が多い。そこで DAMP の一つとして注目されている細胞外ヒストンと RD の病態形成の関係について検討した。また、ヒストンはグリコサミノグリカンとの親和性をもち、眼内の硝子体は 99% の水とタイプ II コラーゲン、ヒアルロン酸などからなっている。そこで硝子体やヒアルロン酸がヒストンの毒性に影響している可能性についても検討した。

【材料および方法】

倫理委員会の承認を得て採取された患者硝子体液中のヒストン H3 を ELISA で測定した。その他の炎症性サイトカイン・ケモカイン濃度を CBA (Cytometric Bead Array) にて測定し、統計学的解析を行った。ラット網膜前駆細胞株 R28 に過酸化ストレスを加えて細胞死を誘導し、ヒストン H3 の放出について検討した。次に動物実験委員会の承認を得て、ラット網膜剥離 (RD) モデルを作成し、網膜剥離作成後 2 日目の網膜を採取し、ヒストン H3 の分布を免疫染色で評価した。続いてヒストンの眼内環境への影響について検討した。視細胞死に伴い放出されるヒストンが影響を与える網膜細胞として、ヒト網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 や R28 を用いて、ヒストンで刺激した時のサイトカイン産生の応答性を CBA や ELISA、細胞毒性については Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit や WST-assay や Calcein-AM and PI 染色を用いて検討した。ARPE-19 の IL-8 の産生については MAPK の ERK1/2、P-38、JNK pathways と、TLR (Toll-like receptor) 2 および TLR4 の inhibitor を用いて検討を行った。また網膜剥離におけるヒストン H3 の関与を検討するため、網膜下に抗ヒストン H3 抗体を投与し、剥離 2 日後、7 日後の網膜の外顆粒層の測定を行い、視細胞数の変化の評価を行った。ヒストンと硝子体の関係についての検討では、まずヒストンを豚眼から採取したブタ硝子体に滴下した際のヒストンの局在をウェスタンブロットで評価した。さらに、ブタ硝子体や、白内障手術等で使用されるヒアルロン酸製剤を用いることで、硝子体やヒアルロン酸存在下でのヒストンによるサイトカイン産生・細胞毒性について、CBA や ELISA、WST-assay にて検討を行った。また豚眼より網膜色素上皮細胞 (RPE) を採取し、同様の実験を行うことで、primary RPE cell についても検討した。

【結 果】

裂孔原性網膜剥離 (RRD) の患者硝子体中のヒストン H3 濃度は 30 ± 9.8 ng/ml と、黄斑円孔症例に比べ有意に高かった (One-way ANOVA with Scheffe's F test, $P < 0.05$) が、硝子体中の IL-6 や IL-8 濃度との相関はなかった。R28 に過酸化ストレスを加えて細胞死を誘導したところ、ヒストン H3 は細胞死に伴い細胞質中、続いて培養上清中で上昇していた。ラット RD モデルにおいて網膜下腔にヒストン H3 が存在しており、これらは視細胞外層由来と推測された。ARPE-19 をヒストンで刺激すると、 $10 \mu\text{g/ml}$ では IL-8 分泌濃度が 2.5 倍に上昇 (One-way ANOVA followed by post-hoc Dunnett test, $P < 0.01$) し、 $20 \mu\text{g/ml}$ 以上では細胞傷害性が認められた。また、IL-8 の分泌においては TLR4、ERK1/2、p-38 のシグナルを介していることを確認した。R28 をヒストンで刺激すると $50 \mu\text{g/ml}$ では Annexin V の増加があり apoptosis が見られることがわかった。ラット RD モデルにおいて、抗ヒストン H3 抗体を網膜下に注射したところ、外顆粒層の菲薄化の抑制が観察され (Student's *t*-test, $P < 0.01$)、RD においてヒストンが網膜細胞傷害に一定の役割を果たしていることが示唆された。

ヒストンをブタ硝子体混合メディウム内に滴下すると、凝集塊を形成した。滴下したヒストンが凝集塊に局在化していることをウエスタンブロットで確認した。そこで硝子体存在下でのヒストンの細胞毒性について Calcein-AM and PI 染色で検討したところ、ヒストンの細胞傷害性はこの凝集塊の部分に限局しており、その周囲には細胞傷害が無いことが確認できた。硝子体存在下でのヒストン刺激による ARPE-19 からの IL-6、IL-8 分泌は有意に抑制 (Student's *t*-test, $P < 0.05$) され、cell viability の上昇 (Student's *t*-test, $P < 0.05$) が認められた。ヒアルロニダーゼで硝子体を処理してからヒストンを滴下すると、凝集塊の形成が抑制され、細胞傷害の範囲が拡大しており、凝集塊形成にはヒアルロン酸が関与していることが示唆された。さらにヒアルロン酸を用いても硝子体と同様に、ヒストンによるサイトカイン産生抑制や、細胞傷害性に対する Cell viability の上昇が見られることを確認した (Student's *t*-test, $P < 0.05$)。また、R28 やブタ primary RPE cell においても、cell viability の上昇が観察された。

【結論及び考察】

近年 DAMP としての機能が注目されている細胞外ヒストンは、RD においては剥離により傷害された網膜細胞から放出される。このヒストンはサイトカイン産生や細胞毒性などの作用を持つため、眼内環境に影響を与えうるが、硝子体 (及びヒアルロン酸) によりこの毒性が限局・減弱化されている可能性を見出した。ヒアルロン酸は関節、硝子体、皮膚、脳などの細胞外マトリックスに広く見られる。硝子体 (及びヒアルロン酸) には DAMP として注目される細胞死ヒストンに対する防御網としての役割があることが示唆された。

(Laboratory Investigation 94, 569-585 (2014) 掲載)