

論文の内容の要旨

東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻

平成13年度博士課程 入学

氏 名：梅田 慎介

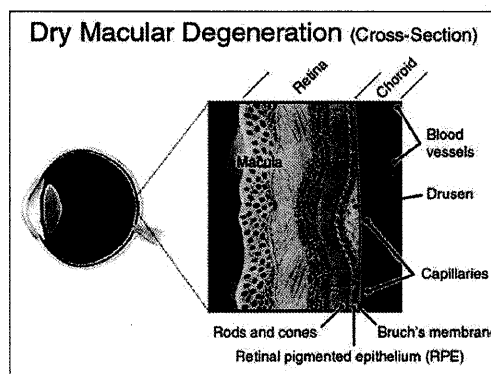
指導教員名：吉川 泰弘

論文題目： Primate models for age-related macular degeneration

(カニクイザル加齢黄斑変性モデルに関する研究)

加齢黄斑変性(Age-related Macular Degeneration : AMD)は、欧米では成人失明原因の第1位となっており、国内でも診断基準の確立とともに急増し、緑内障と並び糖尿病網膜症に次ぐ第2位となっている。決定的な治療法が存在しないため、高齢化社会におけるQOLの観点から大きな問題となっており、現在世界中でAMD発症に関与する遺伝子の分離が試みられている。

我々の眼に入った光は網膜上の1点に結像する。この点を中心とした直径約6mmの網膜領域を黄斑(macula)と呼ぶ。黄斑は我々が物体を注視したときに実際に光を感じとっている部位であり、黄斑の機能が障害されると重度の中心視力の喪失が引き起こされる。AMDではこの黄斑網膜の網膜色素上皮(Retinal Pigment Epithelium : RPE)下に多形



性物質がドーム状に沈着する(図)。この多形性物質はドルーゼンと呼ばれ、AMDの病態において最も重要視されており、特徴的な所見として診断にも用いられている。ドルーゼンの蓄積は周辺組織の萎縮、変性、さらには脈絡膜側から神経網膜内への血管新生を惹起し、これによる黄斑組織の破壊が視力障害を引き起こすものと考えられている。

AMD発症には喫煙や食生活、光への暴露量等の環境要因に加え、遺伝要因が関与している。近年、フルゲノムスキャンによりAMDへの感受性を決定する遺伝子の存在が複数報告されてき

ているが、いまだその同定には到っていない。これは、早期診断が困難で、患者の大家系を得ることが難しいため、通常の連鎖解析の手法が適用できないためである。そのため、これまで単一遺伝子による遺伝性の黄斑変性(Inherited Macular Degenerations : IMDs)の原因遺伝子(表)を同定し、AMD への関与を検討するという戦略がとられてきたが、いずれも否定的な結果に終わっている。またこれらの遺伝子を改変した AMD モデル動物の作出も試みられてきたが、黄斑は霊長類と一部の鳥類にしか存在せず、またげっ歯類とヒトでは生物学的時間が大きく異なるため、これらのモデルと AMD との表現型の類似は乏しく、いずれも AMD の病態を正確に反映したものとはなっていない。したがって、AMD の病態を詳細に解析するためには、霊長類をもちいたモデル動物の確立が不可欠と考えられる。そこで、本研究はカニクイザルの1家系にみつかった遺伝性黄斑変性について AMD モデルとして評価・確立を行った。また、従来から老齢ザルがドルーゼンを伴う黄斑変性を自然発症することが報告されており、これら加齢型のサル黄斑変性との比較も行った。本研究はこれら2種のカニクイザル AMD モデル(遺伝型モデルと加齢型モデル)について並行して解析を行い、AMD の病態解明、早期診断法の確立、治療法の開発を目指す。

Disease Symbol / Name	Gene	Locus	Gene description	
ABCA4	Stargardt disease	ABCA4	1p22	ATP-binding cassette transporter
CORD8	Recessive cone-rod	—	1q12-24	—
ARMD1	Age-related dominant MD	Hemicentin1	1q25-31	Immunoglobulin superfamily
DHRD	Malattia Leventinese	EFEMP1	2p16	EGF-containing fibrillin-like extracellular matrix protein 1
RHO	Dominant RP	Rhodopsin	3q22	Rhodopsin
STGD4	Stargardt-like MD	—	4p	—
STGD3	Stargardt-like MD	ELOVL4	6q14	Elongation of very long fatty acids protein
MCDR1	North Carolina type MD	—	6q14-16	—
CORD9	Recessive cone-rod	—	8p11	—
VMD2	Best's MD	VMD2	11q12	Bestrophin
CTRP5	Dominant MD, late onset	CTRP5	11q23	Small collagen secreted by RPE
CORD5	Dominant cone-rod	GUCY2D	17p13	Retinal-specific guanylate cyclase
TIMP3	Sorsby's fundus dystrophy	TIMP3	22q12-13	Tissue inhibitor of metalloproteinases-3

MD: macular degeneration, RP: retinitis pigmentosa

(第1章)

遺伝型モデルでは、2歳前後から眼底検査により黄斑に多数の黄白色小斑を伴う変性が認められる。交配成績から、常染色体優性遺伝の疾患であると考えられた。臨床検査・病理組織検査の結果、黄斑にみられる小斑がドルーゼンであることが示され、加えて RPE 細胞内へのリポフスチンの蓄積等、AMD の初期段階と一致する所見を呈することが明らかになった。

原因遺伝子同定のため、IMDs 原因遺伝子のうち、ドルーゼンに類似する細胞外蓄積物を引き起こす5遺伝子(ABCA4, VMD2, EFEMP1, TIMP3, ELOVL4)(表)について、カニクイザルホモログをクローニングし、Single strand conformation polymorphism 法または Denaturing high performance liquid chromatography 法により遺伝子変異を検索した。さらに上記5遺伝子を含む13のIMDs原因遺伝子および遺伝子座(表)について本疾患との連鎖を解析した。結果、5遺伝子について疾患と関連する多型はみられず、13遺伝子及び遺伝子座全てについて疾患との連鎖は認められなかった。これらのことから、本モデルが新規遺伝子の変異による疾患であることが

示された。本モデルは初期 AMD と類似の所見を呈することが確認されたことから、原因遺伝子の同定によって AMD 発症に関与する遺伝子を明らかにできる可能性があるものと考えられる。

(第 2 章)

ドルーゼンは AMD 発症の最大のリスクファクターと考えられているが、その形成メカニズムについてはよく分かっていない。近年、免疫組織化学的手法によりドルーゼン内に IgG や活性化補体、その他炎症性タンパクが集積していることが示され、ドルーゼンの形成に慢性的な炎症が関与しているという報告がなされている。そこで、本章では免疫組織化学的手法および LC-MS/MS を用いて、遺伝型および加齢型モデルにみられるドルーゼンの組成を解析した。

始めに加齢型黄斑変性についての評価を行った。老齢カニクイザル(13-25 才)278 頭について眼底検査を実施し、32%の個体に黄白色小斑を伴う黄斑変性を認めた。病理組織検査の結果、これらの小斑に一致してドルーゼンないしは RPE 細胞の変性が認められ、AMD の初期段階と類似の所見を呈することが確認された。

ドルーゼンの組成について免疫組織化学的検討を行った結果、加齢型および遺伝型両モデルについてドルーゼン内に Amyloid P Component, Apolipoprotein E, C5, C5b-9, Vitronectin, MCP の集積を認め、補体系の活性化を伴う慢性的な炎症が起こっていることが示唆された。また、加齢型モデル疾患眼からドルーゼンを分離し、LC-MS/MS によるタンパク成分の同定を行った結果、Immunoglobulin gamma chain, Annexin, Crystallin など 60 のタンパクが同定され、その半数がヒトでの報告と一致するものであった(表)。

Table 2. Protein components in monkey drusen

Protein	Accession No.	Protein	Accession No.
Actin, alpha 2	gi 4501883	Hemoglobin, beta	gi 4504349
Albumin	gi 4502027	<i>Hemoglobin, delta</i>	gi 70353
Aldehyde dehydrogenase 3	gi 283971	<i>Histone, H2A C</i>	gi 4504239
Aldehyde dehydrogenase 5	gi 105247	<i>Histone, H2A Z</i>	gi 4504255
Aldolase A	gi 4557305	<i>Histone, H2B F</i>	gi 10800140
Alpha-1-antitrypsin	gi 1703025	<i>Ig, alpha 2C</i>	gi 113585
Alpha-1B-Glycoprotein	gi 46577680	Ig, gamma 2C	gi 121043
Annexin V	gi 4502107	Ig, lambda	gi 87890
Apolipoprotein E	gi 4557325	Lactate dehydrogenase A	gi 5031857
ATP synthase alpha chain, mitochondrial	gi 4757810	Malate dehydrogenase 1	gi 5174539
Calmodulin 2	gi 4502549	Peptidylprolyl isomerase A isoform 1	gi 10863927
Calreticulin	gi 4757900	Phosphoglycerate kinase 1	gi 4505763
cAMP-dependent protein kinase inhibitor, beta	gi 14210480	Phosphoinositide 3-kinase, T96	gi 7434348
Cell adhesion protein SQM1	gi 105595	Plectin 1	gi 14195007
Ceruloplasmin	gi 4557485	Prostatic binding protein	gi 4505621
Clusterin	gi 4502905	Protease inhibitor 4	gi 21361302
<i>Collagen, alpha 1(VII)</i>	gi 627406	Pyruvate dehydrogenase	gi 4885543
Complement component 5	gi 4502507	Pyruvate kinase, M1 isozyme	gi 20178296
Complement component 9	gi 4502511	Ran-Binding Protein 2	gi 1709217
Creatine kinase B	gi 125294	Recoverin	gi 4506459
Crystallin, beta B2	gi 299263	Retinol-binding protein 3	gi 4506453
Crystallin, beta S	gi 345764	Structural maintenance of chromosomes 1-like 1	gi 30581135
Dystrobrevin, alpha isoform 8	gi 14916515	Transferrin	gi 4557871
Enolase 2	gi 5803011	Triosephosphate isomerase 1	gi 4507645
G3PDH	gi 7669492	<i>Tubulin, alpha 3</i>	gi 5174733
Glucose phosphate isomerase	gi 18201905	Ubiquitin and ribosomal protein L40	gi 4507761
Glutamate-ammonia ligase	gi 2144562	Ubiquitous mitochondrial creatine kinase	gi 10334859
Haptoglobin	gi 4826762	Vimentin	gi 14742600
Haptoglobin-related protein	gi 123510	Vitronectin	gi 72146
Hemoglobin, alpha 2	gi 4504345	14-3-3 protein beta/alpha	gi 4507949

The components consistent with those of AMD drusen are shown in bold letters. The components that belong to the gene families, other members of which were known to be constituents of drusen in AMD, are shown in italic letters. National Center for Biotechnology Information database accession and version numbers are listed.

以上の結果から、加齢型および遺伝型モデルにみられるドルーゼンが AMD ドルーゼンと共通する組成を有し、補体活性化を中心とした網膜局所での慢性炎症がその形成機序に共通して関与していることが明らかとなった。

(第 3 章)

ドルーゼン内において、補体系の活性化と Immunoglobulin gamma chain の沈着が認められたことは、網膜抗原に対する免疫反応が慢性炎症の引き金となっている可能性を示唆している。そこで、本章では疾患個体血清中の抗網膜自己抗体の存在について検討を行った。ウェスタンブロット法によるスクリーニングの結果、加齢型モデル疾患個体の半数が分子量 38, 40, 50, 60kDa のいずれかの網膜抗原を認識する自己抗体を 1 種以上持っていることが明らかとなった。これらの抗原タンパクを LC-MS/MS 解析し、Annexin II (38kDa), μ -Crystallin(40kDa)を同定した。さらにリコンビナントプロテインを作製し、ELISA 法により自己抗体価の測定を行った結果、疾患群において抗 Annexin II 抗体価の有意な上昇が認められた。抗 μ -Crystallin 抗体について有意差は得られなかったが、高い抗体価を示す疾患個体が散見された。

抗 Annexin II・ μ -Crystallin 抗体がどのように病態に関与しているのかについてはさらに詳細な検討が必要であるが、これらの網膜抗原に対する自己抗体の出現が網膜局所での慢性炎症を惹起している可能性が示唆された。また、疾患個体に特異的な自己抗体パターンが認められたことから、AMD について疾患特異的な自己抗体を同定・検出することにより早期診断が可能になるのではないかと考えられた。

本研究により、カニクイザルにみられる遺伝型および加齢型黄斑変性が AMD の最大の特徴的病変であるドルーゼンを呈し、AMD の初期段階に類似の所見を呈することが明らかとなった。さらに、これらのドルーゼンが AMD ドルーゼンに共通する組成を有し、補体活性化を中心とした網膜局所での慢性炎症がその形成機序に共通して関与していることが明らかとなり、AMD モデルとしての有用性が示された。

遺伝型モデルについては、Annexin II・ μ -Crystallin 等の特定の網膜抗原に対する自己抗体は検出されなかったが、本疾患は 2 歳前後という極めて早い段階で発症することから、網膜局所での慢性炎症の成立を促進し、早期にドルーゼン形成を引き起こす何らかのファクターが関与しているものと考えられた。本モデルの原因遺伝子同定により、ドルーゼン形成の基盤となる慢性炎症のメカニズムが明らかになることが期待される。また当該遺伝子は、AMD への関与が否定されている IMDs 原因遺伝子のいずれでもないことから、いまだ明らかとなっていない AMD のリスク遺伝子である可能性を有していると考えられた。