

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名

梅田 慎介

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、先進国において主要な失明原因となっており、社会の高齢化が進むなか大きな問題となっている。しかし、現在のところ決定的な治療法は存在せず、病態の解明も進んでいない。その理由の1つとして、適切なモデル動物が存在しないことが挙げられる。黄斑は霊長類と一部の鳥類にしか存在しないため、AMDの病態を詳細に解析するためには霊長類モデルの確立が不可欠である。本論文は、カニクイザルにみられる2種の黄斑変性(遺伝型モデルと加齢型モデル)について、AMDの最大の特徴であるドルーゼン(網膜色素上皮(RPE)下への多型性物質の沈着)に注目して、AMDモデルとして評価・確立を行い、これらを並行して解析することにより、AMDの病態解明、早期診断法の確立、治療法の開発を行うことを目的としている。

第1章では、遺伝型モデルについての疾患評価と原因遺伝子の解析について述べている。臨床検査・病理組織検査により、疾患個体が2歳前後からドルーゼンやRPE細胞内へのリポフスチンの蓄積といった初期AMDに特徴的な所見を呈することを明らかにした。また交配試験から、本モデルが常染色体優性遺伝の疾患であることを示している。

原因遺伝子同定のため、ヒトで遺伝性黄斑変性を引き起こすことが知られている13遺伝子を候補遺伝子として、疾患個体における遺伝子変異検索と家系を用いた連鎖解析を行った。その結果、これらすべての遺伝子を原因遺伝子として除外し、本モデルが新規遺伝子の変異による疾患であることを示した。

これらのことは、遺伝型モデルが初期AMDモデルとして有用であり、その原因遺伝子の同定によりAMD発症に関与する遺伝子を明らかにできる可能性を示している。

第2章では、加齢型モデルについての疾患評価と、加齢型および遺伝型、両モデルにみられるドルーゼンの組成について解析を行っている。

老齢カニクイザル278頭について眼底検査を実施し、32%の個体に加齢型黄斑変性を認めた。病理組織検査では、ドルーゼンやRPE細胞の空胞変性等が認められ、初期AMDと

類似の所見が確認された。

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モデルともに、ドルーゼン内への各種の炎症性タンパクの集積を認め、ドルーゼン内で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明らかとなった。また、疾患眼からドルーゼンを直接分離し、LC-MS/MSによる網羅的組成解析を行い、**Immunoglobulin gamma chain, Annexin, Crystallin** など 60 のタンパクを同定し、その半数が AMD ドルーゼンと共通であることを示した。

以上の結果から、加齢型モデルについても初期 AMD モデルとしての有用性が示され、さらにこれらの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、網膜局所での補体活性化を中心とした慢性炎症を共通の形成基盤としていることが明らかとなった。

第 3 章では、この慢性炎症の成立に自己免疫が果たす役割について検討を行っている。ウェスタンブロット法により、加齢型モデルの疾患個体血清中に存在する網膜抗原に対する自己抗体をスクリーニングした。結果、半数の個体が分子量 **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い、疾患群において抗 **Annexin II** 抗体価の有意な上昇がみられることを示した。

これらのことは、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成立の端緒となっている可能性を示している。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 についても疾患特異的な自己抗体の同定・検出により早期診断が可能となることを述べている。

以上のように、本論文はカニクイザルにみられる遺伝型および加齢型黄斑変性を初期 AMD モデルとして確立し、特にドルーゼン形成のモデルとしての有用性を示し、さらにこれらを用いて AMD の自己免疫疾患としての側面を初めて明らかにした。今後の AMD 研究に極めて有益な動物モデルを提供したものであり、獣医学領域での貢献が評価される。よって審査委員一同は、本論分が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。