

論文の内容の要旨

論文題目：リポフスチン構成成分 A2E の網膜色素上皮細胞及び
脈絡膜新生血管に及ぼす影響

指導教員 新家 眞教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 17 年 4 月入学
医学博士過程
外科学専攻
入山 彩

網膜加齢性色素、すなわちリポフスチンは脂質／蛋白複合体であり、加齢に伴い蓄積する蛍光色素を含み、細胞老化のバイオマーカーであると考えられている。リポフスチンはリソソームによって細胞内消化された異物の残余物質であって、その沈着は滲出型加齢黄斑変性(age-related macular degeneration;以下 AMD)に伴う脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization;以下 CNV)の発生 risk の増加に関与していると報告されている。滲出型 AMD は、CNV の発生を特徴とする進行性の疾患で、欧米では以前より中途失明の第一の原因である。本邦においても高齢化社会の進行に伴い患者数の増大が予測されている。従って CNV に対しての新規治療法の探索が長年行わ

れ、網膜光凝固、光線力学的療法などが開発されたが、どの治療法も自然経過に比べて視力低下を軽減するのみで、視力改善の程度は限られており、その治療効果は限定的であり、依然として AMD の治療は困難である。そのため、新規の治療標的分子を見出すためには、更なる病態の把握が必要である。

AMD の移行段階は加齢黄斑症 (age-related maculopathy: 以下 ARM) と呼ばれ、網膜色素上皮細胞 (RPE) の基底膜である、ブルッフ膜へのドルーゼンの沈着や RPE 細胞のリポフスチンの沈着といった RPE の加齢性的変化を特徴とする。一般にこのような加齢に伴う有害な沈着物が正常な RPE の機能に影響を及ぼすと考えられている。臨床研究よりこのリポフスチンの沈着が RPE の地図状萎縮に関係があると明らかにされている。臨床的には滲出型 AMD への伸展に關与しているかは実証されていないものの、黄斑部の RPE に豊富にリポフスチンが蓄積する事より、なんらかの因果関係の存在が疑われている。リポフスチンのような有害な沈着物の蓄積がどのように滲出型 AMD の発生に關与しているかについての更なる理解は強く求められているが、リポフスチンが CNV の伸展する過程にいかなる影響を及ぼすかの基礎的な分子メカニズムはほぼ解明されていない。

リポフスチンは脂質が豊富な視細胞外節が RPE に貪食される際に生じる副産物で、様々な物質の複合体から成っている。その中の有名な蛍光色素である A2E (N-retinyleidin-N-retinylethanolamin) は

ethanolamine と vitamin-A-aldehyde とが Schiff 基結合することによって生じ *in vitro* では リソソームの機能を阻害し、また cytochrome c oxidase を阻害し、界面活性剤として ATP-driven proton pump を阻害する事により正常な RPE の機能に影響を与えている事が明らかになっており、さらに、光感受性物質として、DNA の光障害を誘導する事が、これまでに明らかになっている。 *In vivo* では老化マウスや ABCR ノックアウトマウス Ccl2 ノックアウトマウス、 CX3CR1 ノックアウトマウスなどで、A2E の蓄積が認められるとの報告がある。しかしながら *in vivo* において A2E の蓄積がどのような作用を持つかはほとんど明らかになっていない。

そのため今回の検討では、A2E の脈絡膜新生血管発生過程における作用を検討するために、以下の実験を行った。

1.A2E の核内受容体に対する作用検討

まず、A2E は脂溶性が高いため、核内に移行し、核内シグナルを制御する可能性があると考え、Hec293T 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを用い各種核内受容体および転写因子の活性化に対する A2E の影響を検討した。その結果、A2E がレチノイン酸受容体(RAR)の転写活性を濃度依存性に活性化することを明らかにした。また、*in vitro* の結合実験で、A2E が RAR に直接結合する事を確認した。さらに、ヒト RPE 細胞株の ARPE19 細胞を用い A2E を負荷し RAR のターゲット遺伝子である、Novel Retinal Pigment Epithelial Cell Gene (NORPEG) や Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) の発現を

RT-PCR 法を用い検討した結果、A2E が mRNA レベルで NORPEG,SCD の発現の増強作用を有する事が明らかになった。また、RAR のリガンドである atRA を負荷した場合 24 時間、48 時間後ではこれらの遺伝子の発現が上昇するが、72 時間後以降ではこの発現の上昇が認められなくなる一方、A2E 負荷下では 96 時間後でもこれらの遺伝子の発現上昇が認められた。更に Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay を行い、A2E,atRA 共に負荷する事で、SCD のプロモーター領域のヒストン H4 のアセチル化が認められ、96 時間後に atRA 負荷では低下するが、A2E 負荷では持続する事を明らかにした。また、HPLC を用い、ARPE19 細胞に atRA を負荷した際に 72 時間後では検出できなくなる一方、A2E 負荷では 72 時間後でも細胞内に蓄積している事を明らかにした。

2. A2E による血管新生因子の発現制御

ヒト RPE 細胞株の ARPE19 細胞を用い A2E を負荷し血管新生因子の発現を ELISA, RT-PCR 法を用い検討した結果、A2E が mRNA 及び蛋白レベルで VEGF の発現の増強作用を有することを明らかとした。更に RAR α のアンタゴニストや RAR α をターゲットとした siRNA によりこの VEGF の発現の上昇は緩和された。このことにより A2E は ARPE19 細胞において RAR α を介し VEGF の発現を上昇させている事が明らかになった。

3. 動物モデルでの A2E の新生血管(CNV)への関与メカニズムの解明

In vivo では Brown Norway ラット網膜下に A2E を注入し choroid

／RPE 伸展標本を作成したところ、RPE の形は不整となり、個数の減少を認めた。また分化した RPE 細胞のマーカーである RPE65 の発現が A2E 網膜下注入眼では低下していた。これらの結果より A2E が RPE 細胞に対して細胞毒性を有する事が明らかになった。さらに、A2E 網膜下注入眼において RT-PCR 法で VEGF の RPE と脈絡膜での発現の増加を認め、弱凝固を用いたレーザー誘発性 CNV を作成し、A2E 投与眼では CNV が増強されることを確認した。この作用はレチノイン酸受容体のアンタゴニストの投与で抑制されることが明らかになった。

これらの研究結果をまとめると A2E が蓄積する事により RPE 細胞内で RAR の転写活性が構成的に上昇し、また VEGF といった血管新生促進因子の発現上昇が持続する事が明らかになった。また A2E が蓄積する事により RPE の表現型が変化し慢性的に血管新生を促進する状態となり CNV の形成が促されると考えられた。この A2E の血管新生促進作用は RAR α のアンタゴニストや RAR α の siRNA により減弱する事により RAR α が AMD 治療の新たな薬物治療ターゲットとなりうる事が示唆された。このように、我々の今回の研究においてリポフスチン構成成分である A2E の網脈絡膜, RPE に与える影響への理解が深まったと考えられる。今後の課題としては、RAR α は生体内で様々な機能を担っているため臨床応用には更なる検討が必要である事が挙げられる。また A2E の代謝経路を解明する事により ARM から滲出型 AMD へと病期の進行を防ぐ新たな予防医

療の可能性が考えられた。更なるリポフスチンの他の構成成分の確立やその作用の解明が AMD のより深い病態理解につながると考えられる。