

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390441
 研究課題名（和文） 補体活性化を中心とした加齢黄斑変性の発症機序解明と新たな治療アプローチ
 研究課題名（英文） A novel therapeutic approach against age-related macular degeneration targeting complement activation pathway
 研究代表者
 大野 京子（OHNO KYOKO）
 東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・准教授
 研究者番号：30262174

研究成果の概要（和文）：加齢黄斑変性においては無秩序な補体活性化に伴う網膜下の慢性炎症が発症の重要な一因である。我々はヒト網膜色素上皮細胞(RPE)を用いて、加齢黄斑変性の前駆病変であるドルーゼン中に蓄積した Amyloid β ($A\beta$)が補体経路の制御因子にどう関与するかを調べた。その結果、 $A\beta$ は補体代替経路の抑制因子である H 因子、I 因子の両方と結合し、その結果、I 因子の機能を特異的に阻害すること、さらに $A\beta$ により刺激された RPE は MCP-1 を分泌し、これにより網膜下に集積したマクロファージとミクログリアが活性化後に産生された TNF- α と IL-1 β が RPE に作用し、その結果、補体代替経路の促進因子である B 因子の mRNA 発現が上昇することが分かった。

研究成果の概要（英文）：Chronic inflammation in subretinal space due to unregulated complement activation is considered to play an important role in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). In this project, we investigated how $A\beta$ that is accumulated within drusen affects the modulators of complement activation pathway. The results showed that $A\beta$ binds to both factor H and factor I, which are inhibitors of complement alternative pathway, and selectively inhibits the function of factor I. $A\beta$ -stimulated RPE cells produce monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and recruit macrophages and microglia into subretinal space. $A\beta$ -stimulated macrophages and microglia produce TNF- α and IL-1 β , which then act on RPE cells and induce an up-regulation of factor B (main activator of complement alternative pathway).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2008年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼科・7310

キーワード：加齢黄斑変性、網膜色素上皮、Amyloid β 、補体活性化、慢性炎症

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性(AMD)は先進諸国における高齢者の視覚障害の最大の原因であり、人口の高齢化に伴い益々増加傾向にある。AMDのうち、特に脈絡膜新生血管(CNV)を合併する滲出型AMDが重要であるが、AMDでCNVが生じる分子メカニズムについて完全には解明されていない。近年、滲出型AMDに対して血管新生促進因子VEGFの阻害療法が臨床応用されつつあるが、CNV発症後の治療では著明な視力回復は難しいため、AMDからCNV発生に至る分子機構を解明し、CNVの予防治療を確立することが必至である。AMD発症においては、網膜のホメオスタシスを維持している網膜色素上皮(RPE)細胞が重要な役割をしていると考えられる。我々はこれまで、生理的状態のRPEは血管新生促進因子であるVEGFと、RPE由来の血管新生抑制因子である色素上皮由来因子PEDFとともに高濃度に発現し、両者の間にバランスが保たれているために、血管新生は生じない。しかし加齢に加え、何らかの病的刺激によりRPEが病的状態に移行し、VEGFとPEDFのバランスが崩れることがCNVを惹起する引き金になることを示してきた(*J Cell Physiol* 2001, *BBRC* 2003)。しかし、AMD発症において何がRPEに作用する主たる病的刺激であるかは我々および国内外の研究でも明らかでなかった。

AMDの前駆病変として黄斑部のドルーゼンが知られているが、近年、ドルーゼン中に認知性疾患アルツハイマー病の原因物質 amyloid β ($A\beta$)の蓄積が明らかになった(*Johnson LV, et al. PNAS* 2002)。そこで我々は、ドルーゼン中の $A\beta$ がRPEに対する主たる病的刺激ではないかと考え、研究を行ったところ、ヒトRPEに $A\beta$ を負荷するとVEGFの発現が上昇し、PEDFの発現が低下した。さらに、 $A\beta$ を過剰に蓄積するneprilysinノックアウトマウスでは、 $A\beta$ 蓄積に続発してRPEの変性やbasal depositなど、ヒト早期AMDの眼所見を生体で再現することに成功した(*J Clin Invest* 2005)。以上の結果は、neprilysinノックアウトマウ

スがヒトAMD、特に早期AMDの有用な動物モデルであることを示すとともに、アルツハイマー病だけでなく、眼の疾患であるAMDにおいてもその発生原因として $A\beta$ がcriticalであることを初めて明らかにしたものである。

しかし解決すべき疑問が2つ残っている。1つは、 $A\beta$ はどのような機序でAMDの病態を惹起するののかということ、もう1つは、 $A\beta$ 蓄積だけではなぜCNVにまで至らなかったかということである。まずAMDを惹起する機序に関しては、最近の遺伝子解析の結果から、補体活性化の代替経路の抑制因子であるH因子(Klein RJ, et al. *Science* 2005, Haines JL, et al. *Science* 2005, Edwards AO, et al. *Science* 2005)や、代替経路の活性化因子であるB因子の遺伝子多型がAMD発生に強く関与することが明らかになり(Gold B, et al. *Nat Genet* 2006)、AMD発症にはC3bを中心とした補体活性化の代替経路のpolymorphismが重要であることが示された。しかし疾患の発症には、遺伝的背景に加えて環境因子が必須であるが、補体活性化における環境因子の役割に注目したアプローチは、殆どなされていない。 $A\beta$ はドルーゼン内でC3bやH因子など種々の補体蛋白やその制御因子と共存していること(Hageman G, et al. *PNAS* 2005)などから、我々は、 $A\beta$ はRPEに作用し、補体活性化の代替経路に影響することにより、遺伝的背景と相まってAMD発症を惹起するのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

$A\beta$ 蓄積からAMD発症を惹起する機序として、特に補体活性化に着目して研究を進めることにより、 $A\beta$ という環境因子をターゲットとした新たなAMD治療の可能性につなげようとするものである。

3. 研究の方法

ヒトRPEを分化誘導条件下で培養し、分化形質の発現が最大になった段階で

mRNA抽出、および培養上清を採取し、補体蛋白であるC3, C5, そして代替経路の制御因子であるB因子, D因子, H因子, I因子に対してリアルタイムPCRおよびWestern blottingを施行し、RPEにおけるこれら因子の発現および、細胞分化に伴う発現パターンの変化を調べる。

つぎにA β 負荷により、上記の補体関連因子の発現がどのように変化するかを調べる。

A β 負荷により補体関連因子に発現変化が誘導された場合には、RPE細胞が産生する成長因子やサイトカインによる二次的な影響についても検討する。一方、A β 負荷による補体関連因子の発現変化が蛋白レベルでのみ、みられた場合には免疫沈降法などを用いてA β と各補体因子との結合、および結合に伴う補体因子の分解をWestern blottingにて調べる。以上により、A β による補体関連因子の発現制御メカニズムを分子レベルで解明する。

ヒトRPE細胞において、内因性のC3b, および外部から過剰に添加したりコンビナントC3bが培養系で分解されて精製された分解産物であるiC3bをELISA法にて測定し、A β 負荷によりRPEにおけるiC3bの産生が阻害されるか検討する。C3bの分解が阻害されていることが示された場合には、さらに補体活性化抑制因子であるH因子, I因子に対しco-factor assayを施行してA β による影響を調べる。具体的にはH因子, I因子, C3bの各々をA β とPre-incubationした場合に、C3b分解が阻害されるか検討する。それにより、A β が補体活性化のどの因子に作用してC3b分解を制御するのかを明らかにする。

4. 研究成果

本研究により、ヒトRPE細胞は恒常的に補体

代替経路の主要な蛋白ならびに制御因子である、C3, C5, H因子, B因子, I因子を発現していることが示された。さらにRPE細胞の培養上清を用いたWestern blottingならびにELISA法にて上清中のC3, C5, iC3b, H因子, B因子, I因子の分泌が確認された。RPE細胞をA β で刺激すると培養上清中のiC3bの産生が低下することがELISA法により示された。

つぎに免疫沈降法でA β とH因子, I因子の結合を調べると、A β は両因子と直接結合していた。さらにco-factor assayにより、A β がH因子, I因子に及ぼす影響を調べると、A β とH因子をpreincubationしてもH因子の機能に影響はなく、C3bをiC3bに分解することができたが、A β とI因子をpreincubationすると、I因子の機能が阻害され、C3bをiC3bに分解できず補体活性化を抑制できなくなった。

さらに、A β 刺激したRPE細胞は炎症細胞の主たる遊走因子であるMCP-1の発現をmRNAレベル、蛋白レベルともに上昇させた。その結果、遊走してきたマクロファージとミクログリアがA β により活性化されるとTNF- α , IL-1 β の産生をmRNAレベル、蛋白レベルともに発現上昇した。最後に、RPE細胞がこれらのTNF- α , IL-1 β で刺激されると、B因子の発現が上昇し、その結果、補体活性化を促進することが示された。

すなわち、ドルーゼン中に蓄積したA β は、RPEがドルーゼン中に産生した補体活性化の抑制因子と直接結合してその機能を阻害するとともに、炎症細胞由来のサイトカインを介してRPEにおける補体活性化の促進因子の発現を上昇させることにより、両者が相俟って網膜下の慢性炎症の持続を惹起することが明らかとなった。

以上の研究成果は、加齢黄斑変性の早期治療として補体系を標的とした分子治療の有効性を示すものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件) すべて査読あり

1. Shimada N, Ohno-Matsui K, Iseki S, Koike M, Uchiyama Y, Wang J, Yoshida T, Sato T, Peters C, Mochizuki M, Morita I. Cathepsin L in bone marrow-derived cells is required for retinal and choroidal neovascularization. *Am J Pathol* (in pres)
2. Nakanishi H, Yamada R, Gotoh N, Hayashi H, Yamashiro K, Shimada N, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Saito M, Iida T, Matsuda K, Tajima K, Yoshimura N,

- Matsuo F. A genome-wide association analysis identified a novel susceptible locus for pathological myopia at 11q24.1. *PLOS Genetics* (in press)
3. Nakanishi H, Hayashi H, Yamada R, Yamashiro K, Nakata I, Shimada N, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Ozaki M, Yoshitake S, Kuriyama S, Saito M, Iida T, Matsuo K, Masuda F, Yoshimura N. Single nucleotide polymorphisms in promoter region of matrix metalloproteinase 1, 2, and 3 in Japanese with high myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (in press)
 4. Wang J, Ohno-Matsui K, Yoshida T, Kojima A, Shimada N, Ichinose S, Sato T, Mochizuki M, Morita I. Amyloid- β upregulates complement factor B in retinal pigment epithelial cells through cytokines released from recruited macrophages/microglia: Another mechanism of complement activation in age-related macular degeneration. *J Cell Physiol* 220:119-128, 2009
 5. Nakanishi H, Yamada R, Gotoh N, Hayashi H, Otani A, Tsujikawa A, Yamashiro K, Shimada N, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Saito M, Saito K, Iida T, Matsuda F, Yoshimura N. Absence of association between COL1A1 polymorphisms and high myopia in the Japanese population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:544-550, 2009
 6. Wang J, Ohno-Matsui K, Yoshida T, Kojima A, Shimada N, Nakahama K, Safranova O, Iwata N, Saido TC, Mochizuki M, Morita I. Altered Function of Factor I Caused by Amyloid β : Implication for Pathogenesis of age-related Macular Degeneration from Drusen. *J Immunol* 181:712-720, 2008
 7. Kojima A, Nakahama KI, Ohno-Matsui K, Shimada N, Mori K, Iseki S, Sato T, Mochizuki M, Morita I. Connexin 43 contributes to differentiation of retinal pigment epithelial cells via cyclic AMP signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 366:532-538, 2008
- [学会発表] (計 件)
1. Kyoko Ohno-Matsui. The role of cathepsin L from bone-marrow derived cells in retinal angiogenesis. WOC 2010. 6.7.2010. Berlin, Germany
 2. 島田典明・大野京子・王 紀英・吉田武史・望月 學・森田育男. 脈絡膜血管新生におけるカテプシンL 発現細胞の免疫組織学的検討. 第 114 回日本眼科学会総会. 4.16.2010, 名古屋
 3. 王 紀英・大野京子・吉田武史・島田典明・森田育男・望月 學. アミロイド β による血管内皮前駆細胞の遊走促進作用及びその分子機序解明. 第 114 回日本眼科学会総会. 4.16.2010, 名古屋
 4. 森山無価・大野京子・森田育男・望月 學・玉田作哉・岸本拓哉・安田章夫. 強膜コラーゲンの紫外線光架橋に関する実験的解析. 第 114 回日本眼科学会総会. 4.16.2010, 名古屋
 5. 大野京子・王 紀英・島田典明・望月 學・森田育男・岸本拓哉・玉田作哉・安田章夫. 蛍光画像化による眼底アミロイド β の検出. 第 114 回日本眼科学会総会. 4.16.2010, 名古屋
 6. 大野京子. Amyloid β を標的とした加齢黄斑変性の発症機序の解明. 第 114 回日本眼科学会総会. 4.16.2010, 名古屋
 7. 大野京子. 慢性炎症性疾患としての加齢黄斑変性. 第 10 回眼炎症セミナー. 10.17.2009, 福岡
 8. 大野京子. 加齢黄斑変性は眼のアルツハイマー病か? 第 63 回日本臨床眼科学会. 10.10.2009, 福岡
 9. Kyoko Ohno-Matsui. Age-related macular degeneration -Alzheimer's disease in the eye? EVER. 10.2.2009, Slovenia
 10. 王 紀英・大野京子・吉田武史・島田典明・森田育男・望月 學. 加齢黄斑変性発症におけるアミロイド β と補体 B 因子の役割. 第 113 回日本眼科学会総会. 4.17.2009, 東京
 11. 島田典明・大野京子・王紀英・吉田武史・望月 學・森田育男. 脈絡膜血管新生におけるカテプシンL と骨髄由来細胞の関与. 第 113 回日本眼科学会総会. 4.16.2009, 東京
 12. 吉田武史・大野京子・王 紀英・島田典明・小島有里子・森田育男・望月 學. ヒト網膜色素上皮細胞における amyloid β 負荷時の MMP 関連因子の遺伝子発現変化. 第 112 回日本眼科学会総会. 4.18.2008, 横浜
 13. 王 紀英・大野京子・吉田武史・島田典明・森田育男・望月 學. 加齢黄斑変性発症におけるアミロイド β と補体 I 因子の役割. 第 112 回日本眼科学会総会. 4.18.2008, 横浜
 14. Kyoko Ohno-Matsui. Age-related macular degeneration -molecular mechanism and pathogenesis. 12th Alcon Ophthalmic Winter Symposium.

1. 25. 2008, Fims-Laax, Switzerland
15. Shimada N, Ohno-Matsui K, Kojima A, Mochizuki M, Morita I. Inhibition of cathepsin L causes a reduced neovascularization in the retina and choroid. 2007 ARVO, 5. 6. 2007, Fort Lauderdale, USA
16. 王 紀英・大野京子・吉田武史・森田育男・望月 學. 加齢黄斑変性の補体活性化におけるアミロイド b の役割. 第 111 回日本眼科学会総会. 4. 19. 2007, 大阪
17. 小島有里子・大野京子・中濱健一・森 圭介・島田典明・吉田武史・森田育男・望月 學. 網膜色素上皮細胞におけるコネキシン 43 発現阻害による脈絡膜血管新生の退縮遅延. 第 111 回日本眼科学会総会. 4. 19. 2007, 大阪
18. 島田典明・大野京子・小島有里子・望月 學・森田育男. 網膜および脈絡膜血管新生におけるカテプシン L の関与. 第 111 回日本眼科学会総会. 4. 19. 2007, 大阪
19. 小島有里子・中濱健一・大野京子・望月 學・森田育男. コネキシン 43 の網膜色素上皮細胞分化への関与と脈絡膜新生血管における役割. 第 14 回日本血管生物医学学会学術大会. 12. 13. 2006, 東京
20. 吉田武史・大野京子・小島有里子・島田典明・望月 學・森田育男. ヒト網膜色素上皮細胞における Amyloid b 負荷時の血管新生関連因子の遺伝子発現変化. 第 14 回日本血管生物医学学会学術大会. 12. 13. 2006, 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 京子 (OHNO KYOKO)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：30262174

(2) 研究分担者

望月 學 (MOCHIZUKI MANABU)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：10010464
森田 育男 (MORITA IKUO)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：60100129

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

