

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18848

研究課題名（和文）網脈絡膜の加齢による変化：加齢黄斑変性とアルツハイマー病の関連性の検討

研究課題名（英文）Age related chorioretinal change : The study of the relation between age related macular degeneration and Alzheimer's disease

研究代表者

桑山 創一郎（Kawayama, Soichiro）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：90831256

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病、他の神経疾患、正常患者の眼球から網膜を採取し、これをHE染色した。アミロイド前駆体タンパクおよび、アミロイド の発現の有無を確認した。染色標本において、黄斑部付近のドルーゼンの有無を検討した。また、アミロイド に対する抗体、Tau蛋白に対する抗体で染色し、局在の評価を行ったところ、ドルーゼンおよび、アミロイド の両者の発現を認めた。アルツハイマー病の老人斑にもアミロイド が局在していることから、加齢黄斑変性とアルツハイマー病との関連性が示唆された。網膜色素上皮細胞だけを分離し、これを染色することにより細胞密度を計算し、密度と加齢との関係性を検討した。有意差は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢黄斑変性は、ドルーゼンなどの前駆病変の発生を経て脈絡膜新生血管を伴う滲出型あるいは萎縮型へと移行する。光線暴露や喫煙などの酸化ストレスにより、ドルーゼンや沈着脂質に補体の活性化やアミロイド などの局在を認め、慢性炎症の関与が示唆されるが、発症機序は十分に解明されていない。アルツハイマー病の老人斑にも局在するアミロイド に注目し、加齢黄斑変性の病態との関連性に着目した。両疾患とも加齢、脂質代謝異常による神経変性疾患と考えられ、ヒト網脈絡膜および脳を組織学的に比較検討することで、アルツハイマー病のバイオマーカーとしての眼底変化を探索し、また、両者の共通病態を解明することを目指している。

研究成果の概要（英文）：Retinas were collected from the eyeballs of Alzheimer's disease, other neurological disorders, and normal patients and stained with HE. The presence or absence of expression of amyloid precursor protein and amyloid was confirmed. The presence or absence of drusen near the macula was examined in the stained specimen. In addition, when staining was performed with an antibody against amyloid and an antibody against Tau protein and localization was evaluated, expression of both drusen and amyloid was observed. Amyloid was also localized in the amyloid plaque of Alzheimer's disease, suggesting a relationship between age-related macular degeneration and Alzheimer's disease.

Only retinal pigment epithelial cells were isolated and stained to calculate cell density, and the relationship between density and aging was investigated. No significant difference was found.

研究分野：網膜硝子体

キーワード：加齢黄斑変性 網膜色素上皮 ドルーゼン アルツハイマー病 アミロイド

#### 1. 研究開始当初の背景

長寿医学研究所に保存されている患者の網脈絡膜において、形態学的な異常、タンパク発現の特徴、脂質代謝の異常を評価することにより、アルツハイマー病患者をはじめ高齢者の網脈絡膜の特徴を明らかにする。具体的には、加齢による網膜色素上皮の形態や密度の変化、ドルーゼンなどの沈着物の量、局在の検討、沈着物内に含まれるタンパクの同定をおこない、網脈絡膜中における AMD 関連タンパクおよびアルツハイマー病関連タンパクの発現を評価する。そして、ヒト網脈絡膜および脳を組織学的に比較検討することで、アルツハイマー病のバイオマーカーとしての眼底変化を探索し、また、アルツハイマー病と AMD の共通病態を解明する。

#### 2. 研究の目的

加齢黄斑変性(age related macular degeneration: AMD)は、網膜色素上皮内への加齢性のリポフスチン蓄積とブルッフ膜への脂質沈着に始まり、ドルーゼンなどの前駆病変の発生を経て脈絡膜新生血管を伴う滲出型 AMD あるいは萎縮型 AMD へと移行する。光線暴露や喫煙などの酸化ストレスの環境下で、ドルーゼンや沈着脂質に補体の活性化やアミロイド  $\beta$ 、抗体などの局在を認め、慢性炎症の関与が示唆されるが発症機序は十分に解明されていない。我々は、アルツハイマー病の老人斑にも局在するアミロイド  $\beta$  に注目し、AMD とアルツハイマー病の病態の関連性に注目した。両疾患とも加齢、脂質代謝異常による神経変性疾患と考えられ、ヒト網脈絡膜および脳を組織学的に比較検討することで、アルツハイマー病のバイオマーカーとしての眼底変化を探索し、また、アルツハイマー病と AMD の共通病態を解明する。

#### 3. 研究の方法

(1) 網膜サンプルの確認。長寿医学研究所に保管してある網脈絡膜標本の状態を確認し、アルツハイマー病症例、他の神経疾患症例、正常患者がおおむね同じ数になるよう症例を抽出する。

(2) 組織の包埋、切片作製・ホルマウント標本作製。採取された標本を固定、脱水後眼球を視神経～黄斑部を含む後極部と周辺部に分けて包埋し、切片標本作製する。または固定後網膜、RPE(retinal pigment epithelium: RPE)-脈絡膜をそれぞれ分離し、脈絡膜は自家蛍光を観察するため大血管を除去した後脱水処理をすすめ、フラットマウント標本作製する。

(3) ドルーゼンの評価。HE 染色標本において、黄斑部付近のドルーゼンの有無を評価する。ドルーゼンの密度を黄斑部、アーケード血管内、周辺部にわけて検討する。

(4) アルツハイマー病関連蛋白質の染色・局在の評価。アミロイド  $\beta$  に対する抗体(6F3D)、Tau 蛋白に対する抗体(AT8)で染色し蛍光顕微鏡で観察する。あわせて APP(アミロイド前駆タンパク)、アポリポタンパク、補体などの免疫染色もおこなう。これらの蛋白質の発現の局在(網膜内のどの層に発現しているのか、RPE～ブルッフ膜内に存在するのか)およびドルーゼンとの関連(ドルーゼン内には他の部位と比較して多いか)を検討する。

(5) AMD 関連蛋白質の染色・局在の評価。GFAP(glial fibrillary acidic protein)、vimentin、CD31 など AMD 関連蛋白質においても同様に染色し、局在を評価する。

(6) 網膜色素上皮細胞密度の評価。RPE-脈絡膜標本において Cytokeratin あるいは ZO-1 を染色し、タイトジャンクションを可視化すると共に、Pharoidin と DAPI を用いてアクチンと核を染色、RPE の密度を評価し、RPE の密度と加齢、あるいは網脈絡膜疾患の有無、その程度などとの関連を検討する。

(7) AMD 関連蛋白とアルツハイマー病関連蛋白の評価、解析。すでに解析されている、脳標本のデータ(amyloid plaque)や生前の血液検査所見(血液中や髄液中のコレステロール、リポタンパク)と照らし合わせて、網脈絡膜中における AMD 関連タンパクおよびアルツハイマー病関連タンパクの発現と、アルツハイマー病や他の神経疾患における脳での特定のタンパクの発現と関連があるのかを検討する。

(8) AMD、アルツハイマー病の病態解明。得られたすべての結果および既報から、AMD およびアルツハイマー病の病態解明をめざす。

#### 4. 研究成果

- (1) 長寿医学研究所に保管してある網脈絡膜標本の中から、アルツハイマー病症例、他の神経疾患症例、正常患者がおおよそ同数になるように抽出し、眼球から網膜を採取した。
- (2) これを HE 染色し、アミロイド前駆体タンパクおよび、アミロイド  $\beta$  の発現の有無を確認した。染色標本において、黄斑部付近のドルーゼンの有無を検討した。
- (3) また、アルツハイマー病関連蛋白質、すなわちアミロイド  $\beta$  に対する抗体、Tau 蛋白に対する抗体で染色し、局在の評価を蛍光顕微鏡で行った。この結果、ドルーゼンおよび、アミロイド  $\beta$  の両者の発現を認めた。アルツハイマー病に出現する老人斑にもアミロイド  $\beta$  が局在していることから、これで加齢黄斑変性とアルツハイマー病との関連性が示唆された。
- (4) 網膜色素上皮細胞だけを分離し、これを染色した。染色されたものから細胞密度を計算し、密度と加齢との関係性を検討した。結果は有意差なしであった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------