

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月26日現在

機関番号：82643

研究種目：若手（B）

研究期間：平成22～23年度

課題番号：22791703

研究課題名（和文）：加齢黄斑変性サルの網膜色素上皮細胞における分子細胞生物学的解析及び新規治療法の探索

研究会題名（英文）：Molecular cellular biological analysis and new drug development using retinal pigment epithelial cells isolated from aged macular degeneration monkeys.

研究代表者：池 在龍（Chi Zai Long）

独立行政法人国立病院機構 東京医療センター（臨床研究センター）

分子細胞生物学研究部・研究員

研究者番号：30567459

研究成果の概要（和文）：黄斑部にドルーゼンをともなう加齢性黄斑変性カニクイザルの網膜色素上皮細胞を初代培養し、健常な細胞との比較を行った。電子顕微鏡による細胞接着構造、貪食作用、オートファジー、遺伝子発現が比較され、疾患細胞において様々な異常が観察された。

研究成果の概要（英文）：Retinal pigment epithelial cells were isolated and cultured from aged cynomolgus monkeys with drusen. RPE cells from affected monkeys were compared with normal. Tight junction of RPE cell, phagocytosis, autophagy, and gene expression were analyzed. Significant change was observed in RPE cells from affected monkeys.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,800,000	540,000	2,340,000
23年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：

科研費の分科・細目：眼科

キーワード：細胞・組織、病理学、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性症は、米国において失明原因の第一位になっており、高齢化や生活様式の

欧米化が急速に進む日本においても増加傾向にある難治性眼疾患である。加齢黄斑変性の特徴の一つとして網膜の中心部にある視

力を司る黄斑部において、網膜色素上皮 (RPE) 細胞とブルッフ膜との間に、ドルーゼンと呼ばれる多形性物質が蓄積することである。また、加齢に伴う RPE 細胞の脂質化、ブルッフ膜の肥厚化、更に虚血性因子が加わることにより、脈絡膜から網膜に向けて血管新生が起こるとされている。周辺細胞を伴わない新生血管は破れやすく容易に出血を引き起こす。

その結果、網膜色素上皮剥離、網膜下出血、漿液性網膜剥離などを起こし、網膜の恒常性を著しく乱し、視力低下を招き、失明までに至る場合もある。黄斑変性に対する根本的な治療法はなく、脈絡膜における血管新生を抑える抗 VEGF 療法によって視力障害の進行を抑えているのが現状である。世界一の速度で高齢化が進む日本において、加齢黄斑変性症の原因解明と治療法の開発は急務である。

加齢黄斑変性症は、多因子疾患と考えられており、遺伝、習慣、環境因子等が複雑に関与している。環境因子としては青色光、習慣因子としては喫煙や肥満などが知られ、遺伝因子としては補体 H 因子 (Complement factor H, Haines JL et al. Science 2005)、補体 C3 (Yates JR et al. N Engl J Med. 2007)、HTRA1 (Dewan A et al. Science 2006)、LOC387715/ARMS2 (Rivera A et al. Hum Mol Genet 2005) の遺伝子多型との相関が報告されている。しかしこれらの遺伝子多型との相関は人種間で差があることが明らかになっている。当研究部では、霊長類医科学研究センターにおいて生後 2 年から黄斑にドルーゼンが観察されるカニクイザルの家系を発見し、眼底撮影、蛍光眼底造影、局所網膜電図などの臨床的解析に加え、病理組織学的解析、連鎖解析などを行ってきた (Umeda et al,

Inv Ophthalmol Vis Sci Umeda et al, 2005 ; FASEB J 2005)。

2. 研究の目的

本研究は黄斑変性の発症と密接に関係する網膜色素上皮細胞の生理機能に注目し、疾患および健常個体の初代培養を行い、遺伝子発現、プロテオーム、細胞接着機能、貪食機能、代謝機能、分泌機能等を解析し、発症機序の解明を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

黄斑変性症カニクイザルの網膜色素上皮細胞の解析

1) 疾患と健常個体の網膜色素上皮細胞をそれぞれ同じ数に計測し、マイクロプレートに播種する。一定の時間後の細胞数を Cell counting kit-8 (DOJINDO 会社名) を用いて測定する。

2) 細胞接着は網膜色素上皮細胞の特徴の一つであり、後眼部における神経網膜と脈絡膜のバリアとなって網膜の恒常性を維持する上で重要である。Zonula Occludens-1 (ZO-1) は細胞接着を担う主要な接着分子で、その抗体を用いて免疫染色とウェスタンブロッティングを行う。

3) オートファジーは酵母からヒトに至るまでほとんどすべての細胞に備えられた細胞内大規模分解機構・リサイクルシステムである。加齢黄斑変性症患者の網膜においてもオートファジー機能が 3 割ほど減少するとの報告がある (ARVO2009)。オートファジーのキータンパク質である LC-3 と Beclin-1 の抗体を用いて免疫染色とウェスタンブロッティングを行う。また、RT² Profiler™ PCR Array

Autophagy (SA Bioscience) キットを用いてオートファジーのシグナルネットワークにおいて変動する遺伝子を探り、関与するシグナル伝達系を解明する。

4) 網膜色素上皮細胞は、老化し脱落する視細胞の外節を貪食作用により、細胞の中に取り込み分解することで微環境を守る。pHrodo™ 色素がついた大腸菌 pHrodo™ E. coliBioParticlesR conjugate for phagocytosis (Invitrogen) は細胞外では非蛍光性であるが、酸性下では明るい赤い蛍光を発し、細胞への非特異的結合から貪食作用を識別できる。この試薬を用いて網膜色素上皮細胞の貪食作用をタイムラップス顕微鏡 (Olympus, LCV-100) で観察する。

4. 研究成果

本研究では、(1) 疾患と健常カニクイザルの網膜色素上皮細胞の細胞生物学的解析を行い、疾患モデルの病理学的変化などの情報を得る。(2) 遺伝子発現解析を行い、発現分子の差から、細胞内の代謝経路の違いを探る。発現量の差は疾患に直接あるいは二次的に関与するものが含まれており、これらを整理し、追試することによって、発症に直接関与する分子機構を解明する。本研究で得られる情報はヒト加齢黄斑変性症の病態解明、予防・治療法の開発にも有用と考えられる。

DNA マイクロアレーを用いた遺伝子発現解析の実験によって、ヒト加齢黄斑変性に関与する補体やケモカインなどの免疫関連遺伝子の発現が大きく変動しており、同種の遺伝子についても上昇あるいは低下しているものが観察された。これらの遺伝子は個別に遺伝子改変マウスが作製されており、黄斑変性に特徴的な網膜の表現型が観察されている。本実験においてこれらの遺伝子の発現変動

幅が最も大きかったことは、疾患サルの網膜色素上皮細胞において、同様な代謝変化が起こっていると考えられる。

今回疾患3頭、健常3頭から網膜色素上皮細胞を培養し、疾患個体から重篤なものと軽傷なものを選別したが、遺伝子発現もこれに連動して変化することが明らかとなった。変動の大きかった補体やケモカインに対する阻害薬を硝子体投与した後にレーザー照射誘導型の網膜新生血管モデルを作製し、その影響を検証したが、顕著な結果は得られなかった。

また、当研究部ではこれまで医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターで発見された世界で唯一の若年性黄斑変性症カニクイザルの大型家系について、病理学的、分子生物学的研究を行い、補体抑制薬 (C3b, C5a) 阻害薬の効果を検証している。本研究は黄斑変性に密接に関係する網膜色素上皮細胞に注目し、疾患および健常個体の初代培養を行い、遺伝子発現、プロテオーム、細胞接着機能、貪食機能、代謝機能、分泌機能等を解析し、発症機序の解明に関して重要な情報を得ることができた。これらの内容については論文の投稿を準備中である。

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4件)

Chi Z-L, Yoshida T, Lambris JD, and Iwata T. Suppression of drusen formation by compstatin, a peptide inhibitor of complement C3 activation, on Cynomolgus monkey with early-onset macular degeneration. *Current Topics on*

Complement and Eye Disease, Advances in Experimental Medicine and Biology 2011;703:127-135

Shen X, Ying H, Qiu Y, Park J-S, Shyam R, Chi Z-L, Iwata T, Yue BYJT. Processing of optineurin in neuronal cells. The Journal of Biological Chemistry 2011;286:3618-29

Chi Z-L, Akahori, A, Obazawa M, Minami M, Noda T, Nakaya N, Tomarev S, Kawase K, Yamamoto T, Noda S, Sasaoka M, Shimazaki A, Takada Y, and Iwata T. Overexpression of optineurin E50K disrupts Rab8 interaction and leads to a progressive retinal degeneration in mice. Human Molecular Genetics 2010;19:2605-2615

Chi Z-L, Yasumoto F, Sergeev Y, Minami M, Obazawa M, Kimura I, Takada Y, and Iwata T. Mutant WDR36 directly affects axon growth of retinal ganglion cells leading to progressive retinal degeneration in mice. Human Molecular Genetics 2010;19:3806-3815

[学会発表] (計6件)

I. Kimura, H. Okamoto, Z.-L. Chi, M. Akahori, M. T. Suzuki, T. Iwata. Analysis of Colocalization of Rab8 and ERM Family in the Ocular Body. Association for Research in Vision and Ophthalmology May 2010

T. Iwata, Z.-L. Chi, M. Akahori, Y. Takada, N. Nakaya, S. Tomarev, Y. Sergeev. CHARACTERIZATION OF GLIA CELLS IN OPTN AND

WDR36 TRANSGENIC MICE 19th International Congress for Eye Research. July 2010

Chi ZL. Akahori M, Obazawa M, Minami M, Noda T, Nakaya N, Tomarev S, Kawase K, Yamamoto T, Noda S, Sasaoka M, Shimazaki A, Sergeev Y, Takada Y, Iwata T. Overexpression of mutant OPTN and WDR36 leads to a progressive retinal degeneration in mice. 50th American Society for Cell Biology. November 2010

Chi ZL et al., Overexpression of Mutated Optineurin and WDR36 Leads to Normal Tension Glaucoma in Mice. Association for Research in Vision and Ophthalmology May 2009

池 在龍 他 緑内障遺伝子WDR36トランスジェニックマウスの解析 第113回日本眼科学会総会 4月 2009

Chi ZL et al., Susceptibility genes and animal models of glaucoma. Asia Association for Research in Vision and Ophthalmology. Asia Association for Research in Vision and Ophthalmology January 2009

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○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〕

6. 研究組織

研究代表者 池 在龍 (Chi Zai Long)

独立行政法人国立病院機構 東京医療センター (臨床研究センター)・研究員

研究者番号：30567459