

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861644

研究課題名(和文) 網膜色素上皮でのリポ蛋白・アミロイド の機能の解明と加齢黄斑変性の治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of functions of lipoproteins and amyloid beta in retinal pigment epithelium to treat age-related macular degeneration

研究代表者

佐藤 里奈 (SATO, Rina)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：80634451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性は視覚障害に関わる重大な疾患である。加齢黄斑変性前駆病変である網膜色素上皮(RPE)下のドレーゼン内部にアミロイド の局在を認め、病態への関与が示唆されている。また、加齢性に沈着する脂質はRPE由来であることがわかっている。RPE細胞の3次元球体培養を行うと、RPE球状塊は、内部のアポトーシスを起こした成分を表層のRPEが貪食、処理して、表面にリポ蛋白の排泄を観察することができる。アミロイド 産生を および セクレターゼ阻害剤により阻害すると、リポ蛋白の排泄が少なく、表面は平滑でエラスチンの発現も低下して、リポ蛋白の排泄にはブルッフ膜のリモデリングが不可欠であると推測された。

研究成果の概要(英文)：Age-related macular degeneration (AMD) is a major cause of severe vision loss. It is known that drusen, a hallmark of AMD, involves amyloid beta, which may play a role in the pathogenesis of AMD. Also age-related accumulation of lipid is supposed to be derived from lipoproteins secreted by retinal pigment epithelium (RPE). In the 3-D spheroid culture of RPE cells, inner cells lead to apoptosis, phagocytosed by an RPE monolayer formed at the surface and accompanied by outward secretion of lipoproteins. When spheroids are treated by secretase beta and gamma inhibitors, lipoproteins secretion and expression of elastin, a major component of Bruch's membrane are reduced, suggesting that lipoprotein secretion should require remodeling of Bruch's membrane.

研究分野：眼科

キーワード：加齢黄斑変性 網膜色素上皮 リポ蛋白 アミロイド

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration: AMD) は、光線暴露を起因とする眼の加齢変化を背景に、黄斑下の慢性炎症により脈絡膜新生血管が発生し急激に視力低下に至る滲出型と徐々に網膜視細胞、網膜色素上皮、脈絡膜毛細血管が萎縮に至り徐々に視力低下する萎縮型が存在し、どちらの病型においても、進行すると中心視野の障害と視力低下を来す。欧米先進国における成人の失明原因の首位であり、我が国でも約70万人が罹患し、失明原因の第4位に位置し、近年の生活様式の欧米化に伴い、増加傾向にある。現在、国内に多い滲出型 AMD に対して、光線力学的療法に加え、2008 年末より抗血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) 療法が登場し、約3~5割の患者は矯正視力 0.5 以上を維持できるようになった。AMD は加齢による慢性疾患であるため、治療を行っても生涯にわたって再燃を繰り返し、結局、視力低下に至る症例も多く、患者の精神的、肉体的、経済的負担、医療経済の圧迫、高齢化社会における QOL の低下など社会的にも多くの問題があり、新たな治療法や予防法の開発が求められる。そのためには AMD の病態解明が必要であるが、加齢性疾患であるため、加齢性変化を理解する必要がある。

AMD は一般的に 50 歳以上で発症し 80 歳代まで年代別発症率が上昇し、文字通り「加齢」が危険因子である。AMD が発症する前に多くの症例で、ドルーゼン 網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium: RPE) の色素異常 色素上皮剥離といった「前駆病変」を認め、これらは疫学上、AMD の危険因子である。AMD の病態を解明するためには、RPE 細胞の生理機能と、「光線暴露」を宿命として前駆病変が出現する以前の出生直後から始まっている眼の加齢変化を理

解する必要がある。

RPE 細胞は光線暴露で酸化変性した視細胞外節を貪食しレチノイドをリサイクルする生理機能により網膜外層のホメオスタシスを維持しているが、酸化変性した物質は処理しきれず自発蛍光を発する残渣である「リポフスチン」として RPE 内に蓄積し始める。おそらくそれが引き金となり、30 代ぐらいから RPE 直下に「脂質沈着」を認め、RPE が生理的に分泌する血管内皮増殖因子などの必要な物質の移動を妨げ、また、過酸化脂質の形成が慢性炎症を引き起こし、AMD 発症の要因となっていると考えられる。脂質代謝について理解が深まれば、病態の理解、新規予防法開発のヒントが得られるかもしれない。

2. 研究の目的

加齢性の RPE 直下の沈着物であるドルーゼンの内部にアミロイド の発現を認め、加齢黄斑変性との関連が示唆されている。アミロイド は、膜結合型蛋白であるアミロイド前駆タンパクが、セクレターゼおよびセクレターゼで分解を受けて、アミノ酸の数が 40 か 42 のアミロイド が切り出され、細胞外に放出される。アルツハイマー病における老人斑にも局在していて、オリゴマーや凝集体を形成して、細胞障害や炎症に関わっていると考えられている (アルツハイマー病のアミロイド仮説)。また、アミロイド には ApoE 結合部位があり、ApoE はアミロイドの凝集を抑制していると報告されているが、RPE は ApoE や ApoB-100 を構成成分に持つリポ蛋白を放出することが最近、わかっている。そこでアミロイドとリポ蛋白との関連性に注目し、RPE の 3 次元球体培養システムを用いて検討した。

3. 研究の方法

ドイツアイバンクから提供または市販のものを購入して得たヒト RPE 細胞を 96 穴丸底培養皿でメチルセルロース添加培養液中で培養を行うと、表層にブルッフ膜側（基底膜側）を外側にした 1 層の上皮を持つ球状細胞塊が形成される。アミロイド は、アミロイド前駆蛋白が および セクレターゼによって切り出されて遊離するが、これらセクレターゼ阻害剤をそれぞれ培養液に混ぜて、1 週間後に RPE 細胞球を回収し、細胞球の直径、表面のリポ蛋白を含む排泄物の有無や形態を光学顕微鏡にて観察した。また、ApoB-100、エラスチンの局在を調べるために免疫組織学的検討を行った。

4 . 研究成果

RPE 細胞球の直径は各セクレターゼ群でコントロールより観察期間を通じて大きかった。

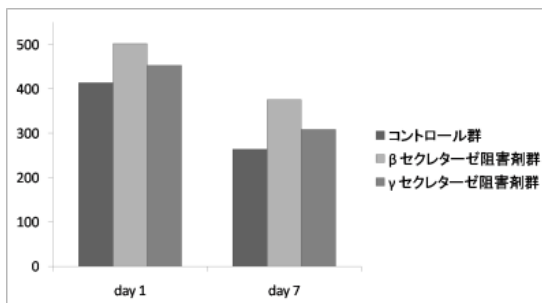


図 1. 1 週間後の細胞球の直径

リポ蛋白を含む排泄物は および セクレターゼ阻害剤群において、コントロール群と比較して少なく、RPE 細胞球表面は平滑であった。

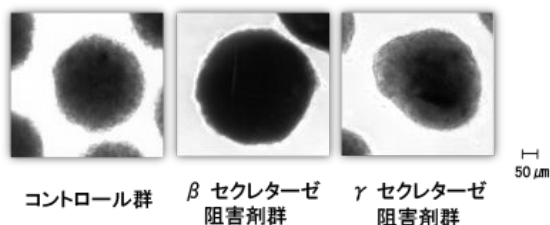


図 2. 1 週間後の細胞表面の形態

免疫染色ではリポ蛋白の構成成分である ApoB-100 とブルッフ膜の主要構成成分であるエラスチンがコントロール群の方で強く染色され、リポ蛋白の排泄に伴い、ブルッフ膜のメンテナンスが盛んに行われていると考えられた。

各セクレターゼ阻害剤により、リポ蛋白の構成成分であるアポ B-100 と、ブルッフ膜の主要構成成分であるエラスチンに関して、各セクレターゼ阻害剤の影響で発現量が低下していることが免疫染色と ELISA で示された。

RPE のブルッフ膜メンテナンスを伴うリポ蛋白産生機構にアミロイド 発現の関与が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

佐藤里奈、高齢者の眼科疾患の現状、*Geriat. Med.* 2016;54:109-112. 査読無.

Sato R, Yasukawa T, Kacza J, Eichler W, Nishiwaki A, Iandiev I, Ohbayashi M, Kato A, Yafai Y, Bringmann A, Takase A, Ogura Y, Seeger J, Wiedemann P. Three-dimensional spheroidal culture visualization of membranogenesis of Bruch's membrane and basolateral functions of the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54:1740-1749. 査読有
doi: 10.1167/iovs.12-10068

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

6．研究組織

(1)研究代表者

佐藤 里奈 (Sato, Rina)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：80634451