

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791669

研究課題名(和文) 網膜色素上皮・ブルッフ膜におけるリポフスチンの作用の解明

研究課題名(英文) Role of lipofuscin on retinal pigment epithelial cells and Bruch's membrane

研究代表者

柳 靖雄 (YANAGI YASUO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90376442

研究成果の概要(和文)：

網膜色素上皮・ブルッフ膜におけるリポフスチンの作用の解明

研究成果の概要(英文)：

Role of lipofuscin on retinal pigment epithelial cells and Bruch's membrane
Role of lipofuscin in retinal pigment epithelium

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2010年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：リポフスチン、網膜色素上皮

1. 研究開始当初の背景

網膜色素上皮(retinal pigment epithelium; 以下 RPE)の加齢性変化は、滲出型加齢黄斑変性(age-related macular degeneration; 以下 AMD)と密接に関連している。滲出型 AMD は、脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization; 以下 CNV)を特徴とする進行性の疾患で、欧米では中途失明の第一の原因であり、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。現在のところ、治療による視力改善効果は限られており、その発症予防が重要である。滲出型 AMD の前駆段階は早期加齢黄斑症(age-related maculopathy; 以下 ARM)と呼ばれ、組織学的には、RPE にリポフスチンと呼ばれる老化色素、および RPE の基底膜である Bruch 膜にドルーゼンとよばれる脂質/蛋白

複合体の沈着物を認める事が知られている。ドルーゼンには免疫グロブリンの沈着、補体の沈着、炎症性サイトカインの発現、マクロファージの浸潤等、炎症を示唆する所見が認められ、ARM では RPE の加齢性変化により慢性的な炎症が惹起されている事が示唆される。さらに、Bruch 膜は加齢性変化に伴い細胞外マトリックスの変化により脆弱化すると考えられている。このような事実から ARM における慢性炎症に加えて Bruch 膜の加齢性変化は AMD の発症に重要な因子であると考えられるようになってきた。

加齢による RPE 障害には老化色素リポフスチン、特にその主要構成成分の A2E(N-retinylidene-N-retinylethanolamine)の関与が強く示唆さ

れている。A2E はミトコンドリア傷害や細胞膜傷害作用があり細胞傷害性を有するが、光線照射により酸化され、細胞傷害性の高い oxirane (酸化 A2E) に変換され更に強い細胞傷害をきたすことも判明している。これまでに我々は、A2E を培養網膜色素上皮細胞に取り込ませた系を用いて光線傷害を検討する系を確立し、様々な臨床状況における光傷害の検討を行った。まず、A2E を用いて青色光の RPE に対する光毒性保護効果を検討し、青色光の抑制で RPE の光毒性保護効果、および RPE による血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現上昇抑制効果を示してきた。これらの実験結果は、青色光が A2E を介して潜在的に RPE を傷害し炎症を惹起し、AMD の発症、伸展を促進ということを示したものである (Yanagi Y et al., 2007 JCRS)。更に興味深い事に我々は、A2E を網膜下に投与したマウス、ラット眼球において、VEGF の発現が上昇する事を見いだしている (未発表データ, in submission)。このマウス、ラットでは通常マウスやラットで CNV を形成しないような弱いレーザーによる Bruch 膜の傷害で CNV が発症しやすくなる事が判明している。in vivo, in vitro の実験より A2E は核内受容体であるレチノイン酸受容体のリガンドとして作用し、転写レベルで血管新生因子の発現を上昇させ、更に、A2E の蓄積したモデルマウスでレチノイン酸受容体のアンタゴニスト投与により CNV の発症が抑制される事も見いだしている (Figure1)。更に、リポフスチンの生成と visual cycle のビタミン A 代謝産物とに連関がある事に着目し A2E 以外にも、RPE の慢性炎症を惹起するリポフスチン構成成分も同定しつつあり、retinyl palmitate, all-trans retinol dimer により VEGF が活性化される事を示した。また、これらの投与および光線照射において、RPE において β -catenin の活性化を認めている。

2. 研究の目的

本研究では、慢性炎症におけるリポフスチンの関与を分子レベルで明らかにし、傷害抑制のための新たな治療標的を同定する事を目的としている。すなわち、リポフスチンを介した RPE 傷害と光線暴露、および慢性炎症、Bruch 膜の脆弱化の機構を分子生物学的手法を駆使して多方面から解析すると同時に、その知見に基づいて、RPE 潜在傷害と慢性炎症のより有効な治療法の確立につき検討するものである

3. 研究の方法

3-1) リポフスチンの細胞傷害作用：メカニズムの分子レベルでの解析

RPE の培養細胞株 (ARPE-19 細胞) を用いて、リポフスチンを培養 RPE に取り込ませ、RPE

由来の血管新生因子の発現を検討する系を用いて特にリポフスチン構成成分の retinyl palmitate, ATR-dimer に着目し、リポフスチンの活性化の分子メカニズムを明らかにする。この評価にはこれまで我々が注目してきた VEGF の発現検討以外に pigment epithelial derived factor (PEDF) の発現検討や他の炎症性サイトカイン、マトリックスメタロプロテアーゼなどの発現検討を加える。ヒト臍帯血由来血管内皮細胞を用いた angiogenesis assay による内皮細胞のチューブ形成を指標にした血管新生因子の評価系を用いる。リポフスチンによる細胞機能障害が細胞外マトリックスにどのような影響を及ぼすかを検討する。また、最近になってこの系で光線照射を介して補体の活性化が起こることが報告されているが、この補体の活性化のメカニズムを分子レベルで明らかにする事も目的とする。

3-2) リポフスチン沈着と慢性炎症：in vivo での解析

我々は、A2E を網膜下に投与したマウス、ラット眼球において、VEGF の発現が上昇し、CNV が発症しやすくなる事を見いだしている。また、このモデルでは脈絡膜に沈着物を認め、complement factor H, 活性化された補体の複合体の沈着を同部位に認めている。補体の活性化は ARM において認められる所見であるが、retinyl palmitate, ATR-dimer 投与眼についても同様の検討を行い、この補体の活性化について詳細に検討し、更に、ARM に特徴的な慢性炎症の所見である免疫グロブリンの沈着、炎症性サイトカインの発現、マクロファージの浸潤等が認められるか検討する。更に、この系を発展させリポフスチンや光線傷害とドルーゼンの沈着、Bruch 膜の変化の関連について検討を加える。これまでに、リポフスチンの沈着によってドルーゼンの沈着が促進されうると考えられているが、in vivo で両者の直接の関係を示した実験は存在しない。光線照射やリポフスチンの沈着で β -catenin の活性化が認められる知見より、RPE で見られる β -catenin の活性化と炎症所見、Bruch 膜の変化との関連を RPE 特異的な β -catenin の conditional ノックアウトマウスを用いて解析する。長期の観察において光線暴露の有無でドルーゼンの沈着や Bruch 膜の構造や炎症所見に違いが認められるかを検討し、さらに光線暴露が関与するかを検討する。

4. 研究成果

4-1) リポフスチンの細胞傷害作用：メカニズムの分子レベルでの解析

リポフスチン構成成分の
1) A2E, 2) ATR-dimer, 3) Retinyl palmitate, の

それぞれを網膜色素上皮に対する作用を *in vitro* で検討した。その結果いずれの因子の付加によっても血管新生因子 VEGF の発現を mRNA レベルで上昇させる事がわかった。また、興味深い事に A2E の負荷によって補体制御因子である加齢黄斑変性の疾患感受性遺伝子として同定されている Factor H の結合タンパク質であるアドレノメジュリンの発現上昇も認めた。さらに、*in vivo* の検討ではアドレノメジュリンの硝子体内投与により脈絡膜新生血管が抑制できる事を示した。更に、他の因子についても同様の検討を加えると同時に、更に他の補体、並びに炎症系のマーカーの挙動を明らかにし、リポフスチンの沈着による RPE の変化を明らかにする事で脈絡膜新生血管発症のメカニズムの手がかりを得る事を予定している。

4-2) リポフスチン沈着と慢性炎症 : *in vivo* での解析

RPE 特異的な conditional ノックアウトマウス作成のための RPE65-Cre トランスジェニックマウスの系統を作成し、RPE 特異的な Cre 遺伝子の発現を確認した。また、RPE で b-catenin をノックアウトしたマウスを作製するために b-catenin^{flox} マウスと交配をすすめており、ヘテロマウスの作成に至った。

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 9 件) (すべて査読あり)

1. Yanagi Y, Ueta T, Obata R, Iriyama A, Fukuda T, and Hashimoto H. Utility values in Japanese patients with exudative age-related macular degeneration. *Jpn J Ophthalmol* 55, 35-38, 2011

2. Iriyama A, Usui T, Yanagi Y, Amano S, Oba M, Miyata K, Nishiyama N, Kataoka K. Gene Transfer using Micellar Nanovectors inhibits Corneal Neovascularization *in vivo*. *Cornea*, in press

3. Nomura Y, Ueta T, Iriyama A, Inoue Y, Obata R, Tamaki Y, Yamaguchi T, Yanagi Y. Vitreomacular interface in typical exudative age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Ophthalmology*, in press

4. Nomura Y, Tamaki Y, Yanagi Y. A case of vitreopapillary traction diagnosed by spectral-domain optical coherence tomography, *Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging*, in press

5. Yuda K, Inoue Y, Tomidokoro A, Tamaki Y, Yanagi Y. Nerve fiber layer thickness in exudative age-related macular degeneration in Japanese patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2009 [epub ahead of print]

6. Ueta T, Yanagi Y, Tamaki Y, Yamaguchi T. Cerebrovascular accidents in ranibizumab. *Ophthalmology* 116: 362, 2009

7. Ueta T, Obata R, Inoue Y, Iriyama A, Takahashi H, Yamaguchi T, Tamaki Y, Yanagi Y. Background comparison of typical age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in Japanese patients. *Ophthalmology* 116: 2400-6, 2009

8. Nomura Y, Tamaki Y, Tsuji H, Kojima H, Yanagi Y. A case of vasoproliferative retinal tumor treated by transpupillary thermotherapy. *Retinal Cases & Brief Reports* 3: 358-60, 2009

9. Iriyama A, Inoue Y, Takahashi H, Tamaki Y, Jang WD, Yanagi Y. A2E, a component of lipofuscin, is pro-angiogenic *in vivo*. *J Cell Physiol* 220: 469-75, 2009

[学会発表] (計 4 件)

1. 柳 靖雄 : 網脈絡膜新生血管のメカニズム, 学会合同シンポジウム「抗血管新生治療-基礎と臨床-」, NOW2009 (48 網膜・26 眼循環・15 糖尿病眼 合同学会) 2009.12.5、名古屋

2. 柳 靖雄 : 加齢黄斑変性のドラッグデリバリーシステムの現状と今後, シンポジウム「眼科領域におけるドラッグデリバリーシステムのアップデート」, 第 63 回日本臨床眼科学会, 2009.10.11、福岡

3. 柳 靖雄 : 抗血管新生薬剤の種類, シンポジウム「抗血管新生治療の適応と実際」, 第 63 回日本臨床眼科学会, 2009.10.10、福岡

4. 柳 靖雄 : 脈絡膜新生血管 : VEGF とその受容体を標的とした治療, シンポジウム「抗血管新生治療の新戦略 - 血管細胞生物学からのアプローチ」, 第 113 回日本眼科学会総会, 2009.4.18、東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳 靖雄 (YANAGI YASUO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90376442

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

なし