

平成21年 5 月 10 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890070
 研究課題名（和文） 加齢黄斑変性における脈絡膜新生血管発症機序の解明（ $A\beta$ とHtrA1の関与）
 研究課題名（英文）
 研究代表者
 吉田 武史（YOSHIDA TAKESHI）
 東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：30451941

研究成果の概要： $A\beta$ はRPEに対しHtra1とMMP2という二つの重要なプロテアーゼの発現を亢進させることが明らかになった。さらにMMP2発現上昇の過程として、 $A\beta$ はMMP14の重要なtranscriptional factorであるNFkBを活性化させ、このNFkBの活性化がMMP14発現を亢進させる可能性が示唆された。このMMP14の発現亢進が引き続きMMP2を活性型へと導くことで、Bruch膜の構造変化を引き起こす可能性があると予想される。AMDにおける脈絡膜新生血管発生の過程の中で $A\beta$ のBruch膜への影響は重要なステップと考えられ、AMDにおける予防治療のアプローチを考慮する際に重要であると思われる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：加齢黄斑変性、アミロイド β 、老化

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性(AMD)は先進国において失明原因の上位にあり増加傾向にある。病態の本態は脈絡膜新生血管であり、近年では抗VEGF療法などが行われるようになり、一定の成果が出ているものの、疾病発生後の治療法であり、発生以前の状態に戻すことは不可能であり、後遺症としての視力障害が残ってしまう。このことから予防治療こそが最も有効な解決策であるが、脈絡膜新生血管発症の機序は未だ明らかになっていない。

脈絡膜新生血管発症には網膜色素上皮細胞

の基底膜であるBruch膜を貫く必要があり、Bruch膜の何らかの変化が脈絡膜新生血管発症には重要であることがわかっており、AMD患者の前駆病変である細胞外沈着物 drusen が注目されているが、我々は drusen 中に存在する Amyloid beta ($A\beta$) が AMD 発症の原因物質である可能性をつきとめた (JCI 2005)。

さらに近年では、セリンプロテアーゼの一つである HtrA1 遺伝子の 1 塩基多型が滲出型 AMD の発症リスクを大幅に増大させ、HtrA1 が AMD 患者の drusen 中に有意に存在することが報告された (Science 2006)。HtrA1 は細胞

外基質の合成に關与する TGF- β のシグナルを阻害することや、細胞外基質の構成成分である Fibronectin を分解することから、我々は HtrA1 が眼においても細胞外基質である Bruch 膜の合成分解に關与している可能性があると考へた。また、Alzheimer 病の腦においても HtrA1 が老人斑内に $A\beta$ とともに存在すること (PNAS 2006) から、今回我々は AMD において、drusen 中における $A\beta$ の異常蓄積により RPE における HtrA1 の遺伝子発現が上昇することで HtrA1 が過剰に drusen 内に蓄積し、HtrA1 は Bruch 膜の合成や分解に影響を与えたと考へている。

2. 研究の目的

加齢黄斑変性眼において網膜色素上皮下に異常蓄積し、我々のこれまでの研究により加齢黄斑変性の本態である脈絡膜新生血管 (CNV) の発生に大きな影響を及ぼすことが明らかになった $A\beta$ が、さらにはヒト RPE 細胞における HtrA1 の発現に変化を与えるか、その他にも脈絡膜新生血管発症に重要とされる Matrix Metalloproteinase (MMP)-2、さらには MMP2 の活性化型への変換酵素である MMP14 にも焦点をあて、その発現変化が細胞外基質である Bruch 膜の組成に影響を与え、その組成の変化が Bruch 膜の構造変化をもたらすことで、脈絡膜側からの血管侵入をたやすくし、CNV 発生へ導かれるかを検討し、新しい治療のアプローチにつなげていく。

3. 研究の方法

① RPE における $A\beta$ による HtrA1 の発現変化

培養ヒト 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 $A\beta$ (50 μ M) 刺激を 24 時間行い mRNA 抽出、および培養上清を採取し、HtrA1 に対してリアルタイム PCR にて遺伝子の発現を確認する。

② RPE における $A\beta$ による MMP2 の発現変化

培養ヒト 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 $A\beta$ (50 μ M) 刺激を 24 時間行い mRNA 抽出、および培養上清を採取し、MMP2 に対してリアルタイム PCR にて遺伝子の発現と ELISA を用いて活性化型と非活性化型のタンパク発現を確認する。

③ RPE における $A\beta$ による MMP2 の発現変化

培養ヒト 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 $A\beta$ (50 μ M) 刺激を 24 時間行い mRNA 抽出、および培養上清を採取し、MMP14 に対してリアルタイム PCR にて遺伝子の発現を確認する。

④ Neprilysin knockout mice の網膜色素上皮細胞における MMP14 遺伝子の発現

$A\beta$ の分解酵素である Neprilysin を遺伝子

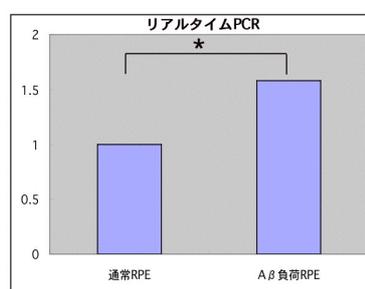
操作により欠損させ、網膜色素上皮に $A\beta$ が異常蓄積することが確認されているマウスより網膜色素上皮を摘出、ホモジナイズし total RNA を抽出、MMP14 に対してリアルタイム PCR にて遺伝子の発現を確認する。

⑤ RPE における $A\beta$ による転写因子 NF κ B 活性化

NF κ B binding site を 3 つもつ Luciferase 発現遺伝子を renilla 発現遺伝子とともに RPE に導入し、12 時間後 $A\beta$ 刺激 (50 μ M, 24 時間) を行い、Dual Luciferase assay にて蛍光を Luminometer を用いて測定する。

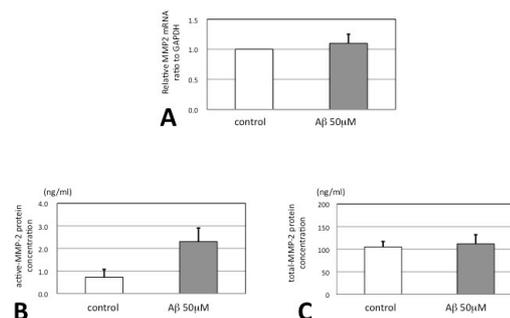
4. 研究成果

① RPE における $A\beta$ による HtrA1 遺伝子の発現変化



培養 RPE 細胞に $A\beta$ (50 μ M) 刺激 (24 時間) をおこなったところ、HtrA1 遺伝子の発現はコントロールに比べ約 1.5 倍になり、有意差が認められた。

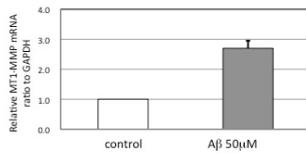
② RPE における $A\beta$ による MMP2 の発現変化



培養 RPE 細胞において MMP2 の遺伝子発現はコントロールと比べ $A\beta$ 刺激 (24 時間、50 μ M) により変化はない (A)。上清を用いての総 MMP2 タンパク発現は $A\beta$ 刺激 (24 時間、50 μ M) により変化はない (C)。しかし活性化型 MMP2 は $A\beta$ 刺激 (24 時間、50 μ M) により約 3.1 倍と有意に増加していた (B)。このことより、MMP2 活性化の上昇が確認され、posttranscriptional

level であることが確認された。

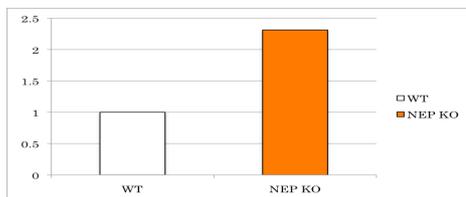
③ RPE における Aβ による MMP14 の発現変化



培養 RPE 細胞において MMP14 の遺伝子発現はコントロールと比べ Aβ 刺激 (24 時間、50 μ M) により約 2.7 倍と有意に上昇していた。

④ Neprilysin knock-out mice 網膜色素上皮細胞における MMP14 遺伝子の発現

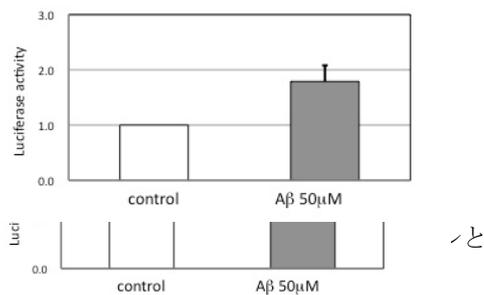
Neprilysin knock-out mice の網膜色素上皮



細胞において MMP14 の遺伝子発現がコントロール (Wild Type: WT) と比べ 2.3 倍と有意に上昇していた。

⑤ RPE における Aβ による転写因子 NFκB 活性化

培養 RPE 細胞において Luciferase 発現は Aβ



AMD において Aβ によるブルッフ膜への影響は未だ報告はないが、今回の結果より、Aβ は RPE に対し様々な細胞外基質に影響を与える因子に変化を与えることが明らかになった。

Htra1 と MMP2 という二つの重要なプロテアーゼが Aβ により RPE において発現亢進することが明らかになった。さらに MMP2 発現上昇の過程として Aβ は MMP14 の重要な transcriptional factor である NFκB を活性化させ、この NFκB の活性化が MMP14 発現を亢

進させる可能性が示唆された。そして MMP14 の発現亢進が引き続き MMP2 を活性型へと導くことで、Bruch 膜の構造変化を引き起こすことで新生血管が Bruch 膜を貫きやすくする可能性があると考えられる。

AMD における脈絡膜新生血管発生の過程の中で Aβ の Bruch 膜への影響は重要と考えられ、AMD における予防治療のアプローチを考慮する際に非常に重要な事項であると思われる。

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)

① Hayashi K, Ohno-Matsui K, Shimada N, Moriyama M, Hara W, Yoshida T, Tokoro T, Mochizuki M. Intravitreal bevacizumab on myopic choroidal neovascularization that was refractory to or had recurred after photodynamic therapy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009 May;247(5):609-18. 査読有り

② Wang J, Ohno-Matsui K, Yoshida T, Kojima A, Shimada N, Nakahama K, Safranov O, Iwata N, Saido TC, Mochizuki M, Morita I. Altered function of factor I caused by amyloid beta: implication for pathogenesis of age-related macular degeneration from Drusen. *J Immunol*. 2008 Jul 1;181(1):712-20. 査読有り

③ Shimada N, Ohno-Matsui K, Yoshida T, Sugamoto Y, Tokoro T, Mochizuki M. Progression from macular retinoschisis to retinal detachment in highly myopic eyes is associated with outer lamellar hole formation. *Br J Ophthalmol*. 2008 Jun;92(6):762-4. 査読有り

④ Hsiang HW, Ohno-Matsui K, Shimada N, Hayashi K, Moriyama M, Yoshida T, Tokoro T, Mochizuki M. Clinical characteristics of posterior staphyloma in eyes with pathologic myopia. *Am J Ophthalmol*. 2008 Jul;146(1):102-110. 査読有り

⑤ Hayashi K, Ohno-Matsui K, Teramukai S, Shimada N, Moriyama M, Hara W, Yoshida T, Tokoro T, Mochizuki M. Photodynamic therapy with verteporfin for choroidal neovascularization of pathologic myopia in Japanese patients: comparison with nontreated controls. *Am J Ophthalmol*. 2008

Mar;145(3):518-526. 査読有り

- ⑥ Shimada N, Ohno-Matsui K, Yoshida T, Futagami S, Tokoro T, Mochizuki M. Development of macular hole and macular retinoschisis in eyes with myopic choroidal neovascularization. Am J Ophthalmol. 2008 Jan;145(1):155-161. 査読有り
- ⑦ Shimada N, Ohno-Matsui K, Nishimuta A, Moriyama M, Yoshida T, Tokoro T, Mochizuki M. Detection of paravascular lamellar holes and other paravascular abnormalities by optical coherence tomography in eyes with high myopia. Ophthalmology. 2008 Apr;115(4):708-17. 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

- ① T. Yoshida, K. Ohno-Matsui, J. Wang, N. Shimada, I. Morita, M. Mochizuki. Amyloid- β Regulates the Gene Expression Profile of Matrix Metalloproteinases in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. Annual meeting of ARVO in Fort Lauderdale FL (USA). Apr 27, 2008.
- ② N. Shimada, K. Ohno-Matsui, J. Wang, T. Yoshida, M. Mochizuki, I. Morita. Reduced Retinal and Choroidal Neovascularization in Cathepsin L Gene-Deficient Mice. Annual meeting of ARVO in Fort Lauderdale FL (USA). Apr 27, 2008.
- ③ 吉田武史, 近視性脈絡膜新生血管の病態と自然経過, 第112回眼科学会総会、2008年4月17日 横浜
- ④ 吉田武史、大野京子、王 紀英、島田典明、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回眼科学会総会、2008年4月18日 横浜

- ⑤ T Yoshida, K Ohno-Matsui, N Shimada, A Kojima, M Moriyama, K Hayashi, T Tokoro, M Mochizuki. Correlation with the subtypes and the long-term visual outcome of myopic choroidal neovascularization, World Ophthalmology Congress 2008 in Hongkong, Jul 1, 2008.
- ⑥ 吉田武史 大野京子 島田典明 小島有里子 森山無備 林 憲吾 黄 威翔 所敬 望月 學. 近視性脈絡膜新生血管の病型分類と自然経過, 第62回日本臨床眼科学会 2008年10月24日 東京
- ⑦ 吉田武史 大野京子 島田典明 林 憲吾 森山無備 小島有里子 安濟健次郎 林和歌子 末吉慎一 所敬 望月 學. 近視性脈絡膜新生血管タイプ別による自然経過群とPDT群の予後の比較検討、第47回網膜硝子体学会, 2008年11月28日 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者
吉田武史

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし