

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791262

研究課題名(和文) 加齢黄斑変性症における補体制御因子のレドックス制御

研究課題名(英文)

Redox regulation of complement activation in age related macular degeneration.

研究代表者

猪俣 泰也 (Inomata Yasuya)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：50452884

研究成果の概要(和文): 細胞外チオレドキシン(TRX-1)結合タンパクを解析した結果、factor H (CFH)を含む5つのタンパク質を同定した。TRX-1はCFHの作用を相加的に増強しており、マウスでの脈絡膜新生血管(CNV)モデルにおいてはTRX-1過剰発現遺伝子改変マウスは野生型と比べCNV形成が阻害されていた。また同モデルにてlectin-like oxidized low density lipoprotein type-1 (LOX-1)の発現上昇がしていることを見出し、LOX-1遺伝子欠損マウスでもCNV形成が抑制されていることを見いだした。

研究成果の概要(英文):

We examined the role of thioredoxin-1 (TRX-1), an endogenous protein with a variety of redox-related roles, in the formation of choroidal neovascularization (CNV). TRX-1-associated proteins from human plasma were isolated by two-dimensional gel electrophoresis with the use of a column coupled with a mutant TRX-1 and were identified by mass spectrometry and proteomics analysis. Complement activation was determined by a fluid-phase. In human plasma, five proteins associated with TRX-1 were identified as apolipoprotein A-I, the CD5 antigen-like member of the scavenger receptor, cysteine-rich superfamily fibrinogen, albumin, and complement factor H (CFH). TRX-1 inhibited the alternative pathway C3 convertase, and its effect was additive with CFH. CNV was induced by laser photocoagulation of the ocular fundus in wild-type and transgenic mice overexpressing human TRX-1 (TRX-1 Tg). Mice were injected intraperitoneally with TRX-1, mutant TRX, or vehicle. The incidence of CNV was evaluated by lectin staining. The incidence of laser-induced CNV was reduced in TRX-1 Tg mice and in C57B/6 mice treated with TRX-1 but not in mutant TRX-1 compared with wild-type mice. Additionally, we elucidated the role of the scavenger receptor, lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor type 1 (LOX-1), in the formation of CNV. In wild-type mice, the relative expression level of LOX-1 mRNA compared with the control increased significantly 6 hours after laser injury and peaked 12 hours after laser injury. At 3 days after laser injury, increases in MCP-1 and VEGF significantly decreased in LOX-1-deficient mice compared with wild-type mice. Morphometric analyses revealed that the induction of CNV formation was significantly inhibited in LOX-1-deficient mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：加齢黄斑変性症・補体・チオレドキシシン・LOX-1・レドックス制御

1. 研究開始当初の背景

脈絡膜新生血管は網膜に不可逆性変化をもたらす。近年、その発症機序と全身。眼局所の酸化ストレスの蓄積が指摘されている。亜鉛、ビタミン類などの抗酸化物質による発症予防効果などが報告され、酸化ストレスの蓄積、暴露による細胞応答がその病態進展に関与していると考えられている。一方で酸化ストレス以外にその発症機序として注目されているのは補体及び補体制御因子を介する免疫反応が挙げられる。加齢黄斑変性症はその前駆病変として黄斑部の網膜色素上皮に軟性ドルーゼンと呼ばれる沈着物が形成されることが知られている。現在までの報告では、ヒト検体での軟性ドルーゼンのプロテオソーム解析及び自然発症の加齢黄斑変性モデルマウスの軟性ドルーゼンの解析によりその成分に補体因子の沈着を認める報告がなされた。また加齢黄斑変性症患者において補体制御因子である complement factor H (CFH) の一塩基多型 (SNP) を認める報告がなされており、補体制御系の異常に伴う局所の免疫反応の破綻がその病態に関与することが明らかになりつつある。

2. 研究の目的

加齢黄斑変性症は、世界的にも重要な視機能障害の原因であり、近年の疫学調査や基礎研究から酸化ストレスによる病態進展という側面と、免疫反応の根幹をなす補体制御系の異常による病態進展という側面が報告されている。しかし、現在に至るまで、脈絡膜新生血管発症におけるこの両者(酸化ストレスと補体制御)の相互関係を示す基盤的研究はなされていない。そこで我々は、加齢黄斑変

性における補体活性化と酸化ストレスの因果関係を解明すべく研究を計画した。

3. 研究の方法

我々は従来の研究の流れより、チオレドキシシン(TRX-1)に着目して検討を行った。TRX-1はヒトから大腸菌までよく保存された活性部位を有し、ペルオキシレドキシシンとの協調作用により活性酸素種(ROS)を消去する抗酸化物質として働く。我々は改変体 TRX-1 カラムを用いた細胞外 TRX-1 結合タンパクを解析した。またマウスでのレーザー誘発脈絡膜新生血管モデルを作成し TRX-1 の効果を検討した。また同様のモデルにて酸化型 LDL 受容体の一つである lectin-like oxidized low density lipoprotein type-1 (LOX-1) についても解析を行った。

4. 研究成果

TRX-1 結合蛋白の解析においては、ヒト血漿において補体の主要な制御因子である complement factor H (CFH) を含む 5 つのタンパク質を同定した。(下図)

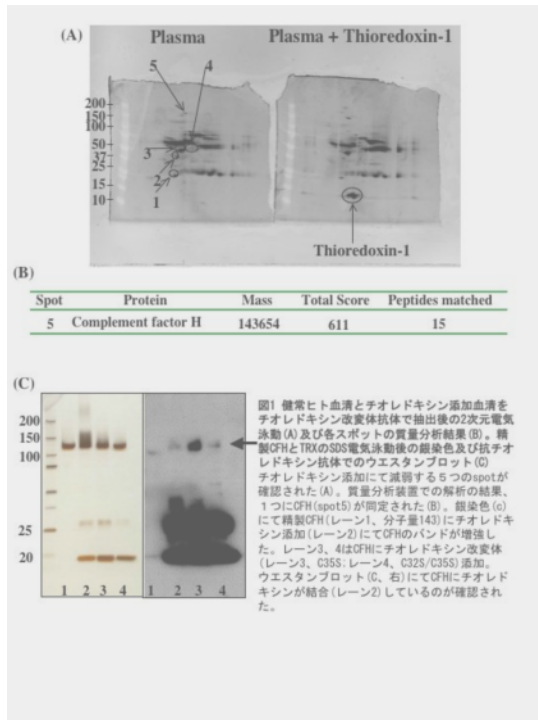


図1 健康ヒト血清とチオレドキシ添加血清をチオレドキシ抗体で抽出後の2次元電気泳動(A)及び各スポットの質量分析結果(B)。精製CFHとTRXのSDS電気泳動後の染色及び抗チオレドキシ抗体でのウエスタンブロット(C)チオレドキシ添加にて減弱する5つのspotが確認された(A)。質量分析装置での解析の結果、1つにCFH (spot5) が同定された(B)。染色(c)にて精製CFH (レーン2)、分子重143)にチオレドキシ添加(レーン3)にてCFHのバンドが増強した。レーン3、4はCFHにチオレドキシ改変体(レーン3、C35S:レーン4、C32S/C35S)添加。ウエスタンブロット(C、右)にてCFHにチオレドキシが結合(レーン2)しているのが確認された。

補体活性化に関して検討した結果、CFH による補体活性化の抑制作用は TRX-1 の添加により相加的に増強された。(下図)

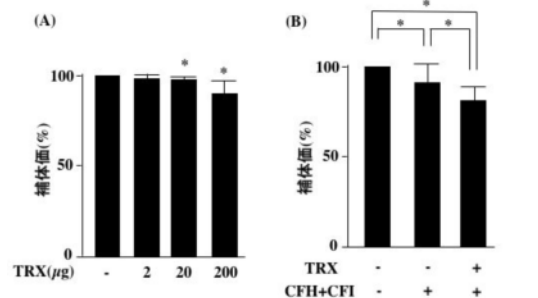


図2 健康ヒト血清へのチオレドキシ添加での補体価(A)及び補体抑制因子(CFH, CFI)との共添加での補体価(B)。チオレドキシ添加にて補体価の低下を認める(A)。CFH, CFIの添加にて補体価の低下を認めるが、チオレドキシを共添加する事で相加的に補体価の低下を認める(B)。(*, P< 0.05 Fisher PLSD test)

レーザー誘発脈絡膜新生血管モデルでの検討では、レーザー照射にて照射部に C3b の沈着を認めたが TRX-1 過剰発現遺伝子改変マウスにおいては野生型と比べ C3b 沈着が抑制されていた。また TRX の腹腔内投与にて C3b に沈着が抑制されていた。(下図)

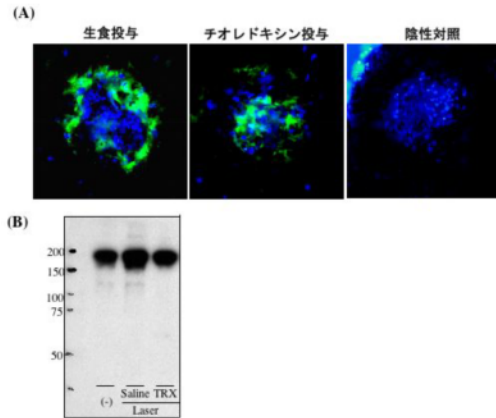


図4 レーザー照射実験的CNV作成マウスでの補体(C3b)の免疫染色像(A)とウエスタンブロット(B)。マウス眼座にレーザー照射後3日後に、C3bを染色(緑)するとレーザー照射部位への沈着を認め(A、右)。チオレドキシ投与では沈着の減少が観察される(A、中央)。またウエスタンブロットにて脈絡膜組織中のC3bは未処理(B、左)に比べ、レーザー照射で沈着が増強(B、中央)するが、チオレドキシにて減少(B、右)することが確認された。

また TRX-1 過剰発現遺伝子改変マウスにおいては野生型と比べ CNV 形成が阻害されており、TRX の腹腔内投与にて CNV 形成が阻害されていた。(右図)

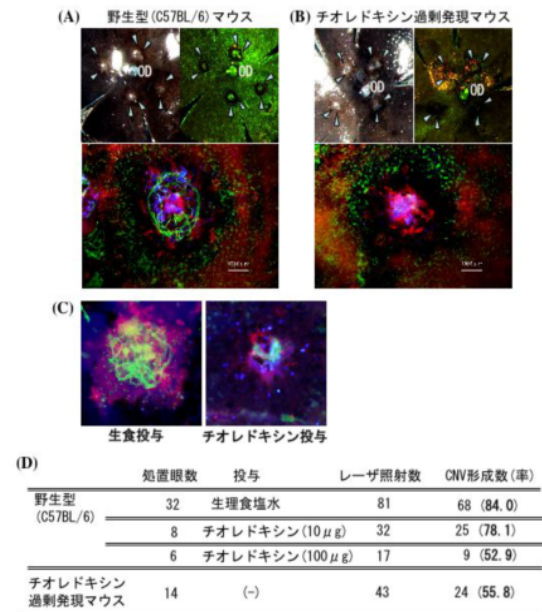


図3 レーザー照射実験的CNV作成マウスの新生血管像(A、B、C)とCNV形成率(D)マウス眼座にレーザー照射後7日後に、新生血管を染色(緑)すると野生型(A)ではCNV形成を認めるが、チオレドキシ過剰マウス(B)では形成されにくい。また野生型マウスへのチオレドキシ投与(C、右)にてCNVが形成されにくい。チオレドキシ投与、チオレドキシ過剰マウスでは対照群に比べ有意にCNV形成率の低下を認めた(D)。

LOX-1 に関する検討では、LOX-1 遺伝子欠損マウスにレーザー誘発脈絡膜新生血管モデルを作成した所、レーザー照射により誘導される MCP-1 などの炎症性サイトカイン、血管内皮増殖因子(VEGF)やマトリックスメタロ

プロテアーゼの発現が誘導されるが、LOX-1 遺伝子欠損マウスでは抑制されていた。また形成される脈絡膜新生血管も抑制されていた

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2件)

Inomata Y, Fukushima M, Hara R, Takahashi E, Honjo M, Koga T, Kawaji T, Satoh H, Takeya M, Sawamura T, Tanihara H Suppression of choroidal neovascularization in lectin-like oxidized low density lipoprotein type-1-deficient mice. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 査読有, 50, 2009, 3970-3976

Inomata Y, Tanihara H, Tanito M, Okuyama H, Hoshino Y, Kinumi T, Kawaji T, Kondo N, Yodoi J, Nakamura H. Suppression of Choroidal Neovascularization by Thioredoxin-1 via interaction with complement factor H. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 査読有, 49, 2008, 5118-5125

6. 研究組織

(1)研究代表者

猪俣 泰也 (INOMATA YASUYA)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：50452884

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：