

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390322

研究課題名(和文) 加齢黄斑変性発症の四次元時空的解明と分子標的治療の確立

研究課題名(英文) The molecular pathogenesis for age-related macular degeneration and establishment of novel treatment

研究代表者

大野 京子 (Ohno-Matsui, Kyoko)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：30262174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円、(間接経費) 4,050,000円

研究成果の概要(和文)：我々はAMD発症を惹起する原因物質としてドルーゼン内に蓄積する アミロイド(A<sub>β</sub>)に着目し、A<sub>β</sub>分解酵素欠損マウスでA<sub>β</sub>蓄積に伴い早期AMDの病態が再現できる事を明らかにした。本研究は早期AMDから脈絡膜新生血管(CNV)を伴う晩期AMDまでの全過程を再現するモデル構築、CNV発生に重要な因子の同定、新たな分子治療の確立を目的とする。AMD患者でCNVが発生する網膜脈絡膜境界面の病的変化として、Bruch膜のintegrity破綻、マトリックス分解酵素を強発現し脈絡膜側からBruch膜に侵入する細胞の存在をin vivoで同時再現するためcathepsin L、HTRA-1の重要性を検討した。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that Alzheimer's amyloid beta was an important causative factor for developing the age-related macular degeneration (AMD) by using neprilysin-deficient mice. Although this mouse developed the features of early AMD, such as the degeneration of retinal pigment epithelium (RPE) and drusen deposition, they did not develop the choroidal neovascularization, which was an important feature for late stage AMD. Thus, in the present study, we focused on the integrity of Bruch's membrane as well as a role of endothelial progenitor cells. As a key factor for disrupted integrity of Bruch's membrane, we examined the role of cathepsin L and HTRA-1 in the development of late stage AMD.

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 ドルーゼン 網膜色素上皮 脈絡膜新生血管 Amyloid beta neprilysin Bruch膜

### 1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性(AMD)は先進諸国における中高年の失明原因の首位であり、高齢化社会の進行とともに罹患人口の更なる増加が予想される。AMDの中でも特に、脈絡膜新生血管(CNV)が生じる滲出型AMDが頻度も多く、視覚障害も強いことから重要である。滲出型AMDに対しては、抗VEGF療法が臨床応用されているが、CNV発生後の治療であるため、CNVが退縮しても黄斑部に癒痕組織が残存し、視力改善効果には限界がある。AMD発症の前駆病変としてドルーゼンがある(日眼会誌2008)。ドルーゼンは、網膜色素上皮(RPE)外側の細胞外沈着物であり、疫学的研究では、黄斑部に大型のドルーゼンと色素沈着があると5年以内に58%にCNVが発症すると報告されている(Arch Ophthalmol 1993)。従ってAMDの予防治療を確立するためには、ドルーゼンからCNV発生に至るまでの分子機構を解明し、そのメカニズムに基づいた分子標的治療を確立するのが理想的である。

しかし、これまでの国内外の研究において、CNV発生の分子機構は完全には解明されていない。その主な理由として、ドルーゼン蓄積からCNV発生に至る過程を再現した動物モデルが確立されていないことがあげられる。

我々は、AMD発症を惹起する原因物質として、ドルーゼン内に蓄積しているアルツハイマー病発症の原因物質である $\beta$ アミロイド(A $\beta$ )に着目して研究を進めてきた。その結果、RPEにA $\beta$ を負荷するとVEGFの発現上昇とともに、血管新生抑制因子; PEDFの発現が低下すること、さらにA $\beta$ の分解酵素である neprilysin を欠損したマウスでは、RPE外側に basal deposits の蓄積と、RPEの変性や機能不全が生じ、A $\beta$ の過剰蓄積により、少なくとも早期AMDの病態まで再現できることを世界ではじめて明らかにした(J Clin Invest 2005)。しかし、早期AMDの状態からCNVを伴う晩期AMDまでの全過程をマウスモデルで再現することには、我々を含め国内外の研究者の誰も成功していない。CNV発生の予防治療を確立するためには、検眼鏡的に確認できる前駆病変であるドルーゼンからCNV発生までの全過程を再現できるマウスモデルの確立が急務である。我々は、neprilysin ノックアウトマウスにおいて、CNV発症にまで至らなかった原因として、以下の3つの可能性を考えている。高齢の neprilysin ノックアウトマウスにおいても、RPE外側のA $\beta$ の蓄積量が十分多量ではなかったこと(A $\beta$ 蓄積は電顕レベルにとどまっていた)、Bruch膜は構造的に intact であり、integrityの破綻がみられなかったこと、これまでの研究は、主としてRPEとその外側に存在するBruch膜の変化に注目したものであり、脈絡膜側からどの細胞がどのような機序で最初にBruch膜に侵入するのか

という、脈絡膜側からの要因の解明がなされてこなかったこと、があげられる。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、これまでの我々の研究成果をさらに発展させ、A $\beta$ 蓄積量の増加に加え、RPE、Bruch膜、および脈絡膜というCNV発生にcriticalな3つの組織に生じる病的変化を同時に再現することにより、ドルーゼン蓄積からCNV発生に代表される晩期AMDまでの全過程を再現するマウスモデルを確立し、さらに、その成果に基づいて、AMD進行過程の分子機構に基づいた全く新しい観点からの予防治療を確立しようとするものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 網膜下における Amyloid $\beta$ (A $\beta$ )の蓄積量増加

neprilysin 欠損マウスでCNVが発生しなかった要因の1つとして、本マウスではA $\beta$ の蓄積は電顕レベルで認められるのみであり、A $\beta$ の蓄積量が不十分であった可能性が考えられる。そこで、網膜下のA $\beta$ 蓄積を増加させるために、以下のアプローチを行った。

A $\beta$ の前駆蛋白(APP)トランスジェニックマウスと neprilysin 欠損マウスとの交配による二重変異体の作成 APP トランスジェニックマウスはプリオン・プロモーターを用いて神経細胞特異的に APP を過剰発現するマウスであり、脳組織においては、neprilysin 欠損マウスより数十倍多いA $\beta$ の蓄積がみられる。我々はこれまでの研究において、プリオン・プロモーターがRPEで作用するか不確定であったため、neprilysin 欠損マウスを使用した。予備実験として APP トランスジェニックマウスにおける網膜組織の変化を観察したところ、neprilysin 欠損マウスに類似した basal deposits の蓄積、RPEの変性がみられ、網膜下におけるA $\beta$ の蓄積が免疫電顕で確認された(未発表データ)。以上から、APP トランスジェニックマウスと neprilysin 欠損マウスの交配により網膜下のA $\beta$ 蓄積が増幅される可能性が高いと予測される。そこで、両マウスの二重変異体のホモ動物における網膜変化を光学顕微鏡、電子顕微鏡を用いて経時的に観察した。

#### (2) ヒト網膜色素上皮細胞に対する加齢および高コレステロール負荷によるA $\beta$ の発現変化

AMDの発症要因として加齢と高コレステロール血症は重要な要因である。そこでこれら因子によりA $\beta$ の蓄積を制御する因子に発現変化があるか、培養ヒト網膜色素上皮細胞を用いてAPP,  $\beta$ -secretase,  $\gamma$ -secretase, BACE, neprilysin の mRNA の発現および酵素活性を調べた。さらにこれらの制御因子の変化により、A $\beta$ の蓄積が変化するかについてELISA法にて解析した。

(3) 脈絡膜血管新生 (CNV) 発生早期のメカニズムの解明

つぎに、Bruch 膜破たんに伴う CNV 発生早期の細胞イベントを理解するために、レーザー凝固を用いたマウスの CNV モデルを作成し、レーザー照射から CNV 発生までの 3 日以内の早期の変化を組織学的に解析した。特に CD43 陽性のマクロファージ、Iba-1 陽性のミクログリア、ならびにマトリックス分解酵素であるカテプシン L に着目し、これらに対する抗体を用いて免疫組織学的に解析した。

さらにカテプシン L 欠損マウスを用いて同様にレーザー照射による CNV モデルを作成し CNV に対する影響を解析した。

(4) A $\beta$  による血管内皮前駆細胞における CX3CR1 への影響を解明

さらに骨髄由来の血管内皮前駆細胞とその受容体 CX3CR1 の役割に着目し、上記に A $\beta$  がどのような影響を与えるか、培養細胞を用いた *in vitro* の実験ならびに CX3CR1 欠損マウスに野生型マウスの骨髄を移植し、レーザー照射による CNV モデルを作成した場合に CNV の大きさがどのように変化するかを脈絡膜フラットマウントを用いて解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) APP トランスジェニックマウスとネプリライシン欠損マウスの二重変異マウス作成

上記の 2 種類のマウスを交配し、tail DNA を用いた genomic PCR により二重変異体が作成できたことを確認した。ネプリライシン欠損マウス、APP トランスジェニックマウス、二重変異マウスそれぞれの網膜組織のみを抽出して homogenate し、Western blotting にて網膜内 A $\beta$  の定量を試みたがこれは検出できなかった。しかし、網膜組織切片を用いて Ab 抗体による免疫組織染色の結果では、ネプリライシン欠損マウス、APP トランスジェニックマウスに比較して二重変異マウスでは網膜内の染色が増強しており、交配により網膜内 Ab の蓄積が増加していることが示唆された。

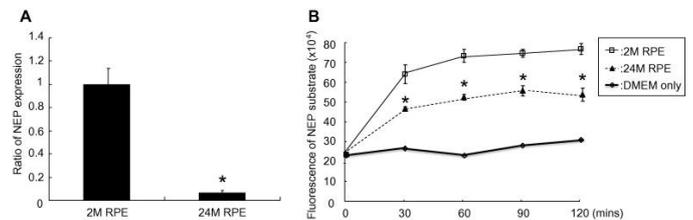
(2) 二重変異マウスの網膜変化の解析

つぎに、二重変異体が高齢後 (12 か月令) に sacrifice し、光学顕微鏡、電子顕微鏡的に網膜の組織所見を観察した。光学顕微鏡ではネプリライシン欠損マウスにおいてすでに我々が報告した所見と同様に、二重変異マウスにおいても網膜色素上皮細胞の空胞形成を伴った網膜変性がみられた。電子顕微鏡所見では、網膜色素上皮細胞の変性所見、貪食されなくなった視細胞外節の蓄積、RPE 外側のドルーゼン様の細胞外沈着物の形成がみられた。Bruch 膜の integrity は保たれており明らかな連続性の破綻や CNV は観察されなかった。

(3) 網膜色素上皮細胞に対する加齢および

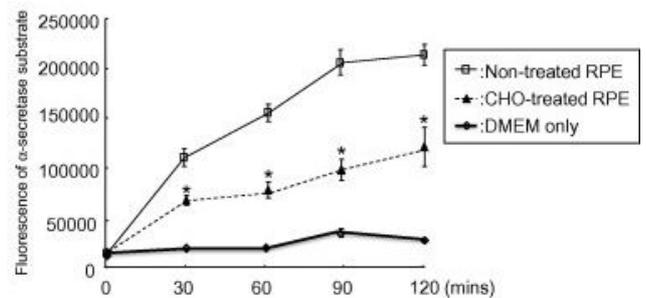
高コレステロールによる A $\beta$  制御因子の変化  
AMD 発症の要因として加齢と高コレステロール血症が重要である。そこで網膜下への A $\beta$  蓄積に関与すると思われる、RPE 細胞における A $\beta$  制御因子の発現変化について解析した。生後 2 か月と 24 か月のマウスからそれぞれ primary RPE 細胞を培養し、APP,  $\beta$ -secretase,  $\gamma$ -secretase, BACE, neprilysin の mRNA の発現および酵素活性を調べた。加齢マウスの RPE 細胞の上清中には A $\beta$  の蓄積が増加していた。その原因として、A $\beta$  分解酵素であるネプリライシンの発現は加齢とともに低下し、また A $\beta$  の切り出し酵素である BACE の発現は加齢とともに上昇していた (図 1)。BACE のうち、BACE1 が RPE 細胞では主たる因子であった。

(図 1)

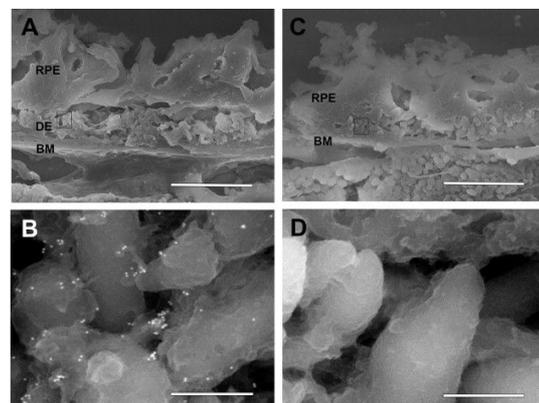


つぎに、RPE 細胞を高コレステロール状態で培養すると、やはり培養上清中の A $\beta$  量が増加しており、コレステロール下ではネプリライシンの発現が低下していた (図 2)。さらに高コレステロール餌で飼育したマウスでは、網膜下に deposits の形成と、そこに一致した A $\beta$  の蓄積が免疫電顕により確認され、我々が二重変異マウスにおいて観察した所見を再現することができた (図 3)。

(図 2)



(図 3)



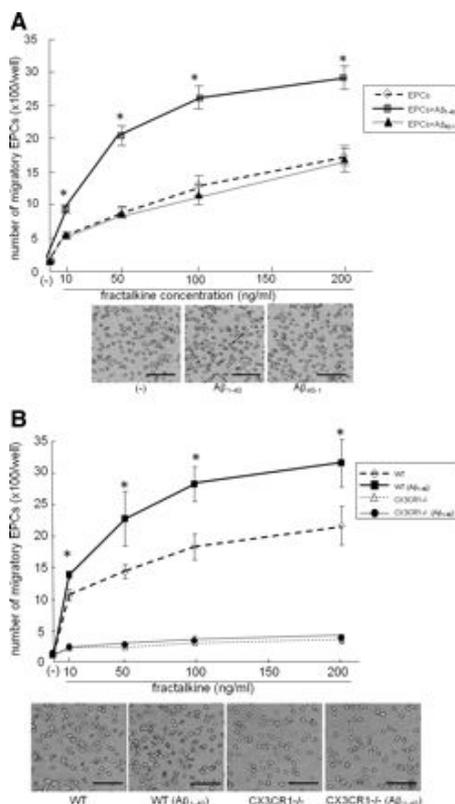
(4) レーザー光凝固による脈絡膜血管新生 (CNV) モデルの Bruch 膜の観察

さらにマウスの眼底にレーザー照射により Bruch 膜の断裂を起こし CNV 発生までの早期に生じる細胞イベントを観察した。その結果、早期には VE cadherin 陽性の血管内皮前駆細胞が重要であり、本細胞がマトリックス分解酵素であるカテプシン L を発現していることがわかった。カテプシン L 欠損マウスに骨髄致死照射ののちに野生型マウスの骨髄を移植しそこにレーザー照射を行うと CNV は有意に小さく、以上から Bruch 膜の連続性が破たんした CNV の早期過程においては血管内皮前駆細胞が発現するマトリックス分解酵素カテプシン L が重要であることが示された。

(5) CX3CR1 を介した A $\beta$  による血管内皮前駆細胞の遊走促進

そこでつぎに、血管内皮前駆細胞(EPC)にさらに着目し、A $\beta$  が EPC の遊走と CNV に与える影響を検討した。EPC は成熟した血管内皮細胞である HUVEC に比べ、受容体 CX3CR1 を有意に高く発現しており、A $\beta$  負荷によりさらに CX3CR1 の発現が上昇した。CX3CR1 のリガンドである fractalkine を培養上清中に転嫁し EPC の遊走を見るアッセイにおいて上清中にさらに A $\beta$  を付加すると遊走がさらに促進された (図 4)。また、CX3CR1 欠損マウス由来の EPC では遊走が有意に抑制されていた。CX3CR1 欠損マウスの骨髄を移植された野生型マウスではレーザー照射による CNV が有意に小さく、CX3CR1 を介した EPC の遊走が CNV 発生に重要であること、また A $\beta$  がこれを促進することが示された。

(図 4)



(6) 二重変異マウスに対する光線力学療法の施行による CNV

最後に AMD の全過程を再現し、Bruch 膜の integrity 破たんを侵襲的手技でなく再現するために、APP トランスジェニックマウスとネプリライシン欠損マウスの二重変異マウスに光線力学療法を施行し、EPC の遊走が同部位に起こることを見出した (未発表データ)。これに引き続く CNV の発生を現在さらに解析中である。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 10 件)

Wolf S, Balciuniene VJ, Laganovska G, Menchini U, Ohno-Matsui K, Sharma T, Wong TY, Silva R, Pilz S, Gekkieva M; RADIANCE Study Group. RADIANCE: A Randomized Controlled Study of Ranibizumab in Patients with Choroidal Neovascularization Secondary to Pathologic Myopia. *Ophthalmology*. 査読あり. 121(3), 2014, 682-692

Wolf S, Balciuniene VJ, Laganovska G, Menchini U, Ohno-Matsui K, Sharma T, Wong TY, Silva R, Pilz S, Gekkieva M; RADIANCE Study Group. RADIANCE: A Randomized Controlled Study of Ranibizumab in Patients with Choroidal Neovascularization Secondary to Pathologic Myopia. *Ophthalmology*. 査読あり. 121(3), 2014,682-692

Miyake M, Yamashiro K, Nakanishi H, Nakata I, Akagi-Kurashige Y, Kumagai K, Oishi M, Tsujikawa A, Moriyama M, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Yoshimura N. Evaluation of Pigment Epithelium-derived Factor and Complement Factor I Polymorphisms as a Cause of Choroidal Neovascularization in Highly Myopic Eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 査読あり. 54(6), 2013, 4208-4212

Hayashi K, Shimada N, Moriyama M, Hayashi W, Tokoro T, Ohno-Matsui K. Two Year Outcomes of Intravitreal Bevacizumab for Choroidal Neovascularization in Japanese Patients with Pathological Myopia. *RETINA*. 査読あり. 32, 2012, 687-695

Wang J, Ohno-Matsui K, Morita I. Cholesterol enhances amyloid  $\beta$  deposition in mouse retina by modulating the activities of A $\beta$ -regulating enzymes in retinal pigment epithelial cells. *Biophys Biochem Res Commun*. 査読あり. 424, 2012, 704-709

Wang J, Ohno-Matsui K, Morita I.

Elevated amyloid  $\beta$  production in senescent retinal pigment epithelium, a possible mechanism of age-related subretinal accumulation of amyloid  $\beta$ . *Biochem Biophys Res Commun.* 査読あり. 423, 2012, 73-78

Wang J, Ohno-Matsui K, Nakahama K, Okamoto A, Yoshida T, Shimada N, Mochizuki M, Morita I. Amyloid beta enhances migration of endothelial progenitor cells by upregulating CX3CR1 in response to fractalkine, which may be associated with development of choroidal neovascularization. 査読あり. *Jul:31(7),2011,e11-8*

Nagaoka N, Shimada N, Hayashi W, Hayashi K, Moriyama M, Yoshida T, Tokoro T, Ohno-Matsui K. Characteristics of periconus choroidal neovascularization in pathological myopia. *Am J Ophthalmol* 査読あり. 152(3), 2011, 420-427

Shimada N, Hayashi K, Yoshida T, Tokoro T, Ohno-Matsui K. Development of Macular Detachment after Successful Intravitreal Bevacizumab for Myopic Choroidal Neovascularization. *Jpn J Ophthalmol* . 査読あり. 55(4), 2011, 378-382

Moriyama M, Ohno-Matsui K, Shimada N, Hayashi K, Kojima A, Yoshida T, Tokoro T, Mochizuki M. Correlation between visual prognosis and fundus autofluorescence and optical coherence tomographic findings in highly myopic eyes with submacular hemorrhage and without choroidal neovascularization. 査読あり. *RETINA*, 31, 2011,74-80.

[学会発表] (計 3 件)

Kyoko Ohno-Matsui. Retina Subspecialty day: Choroidal Neovascularization Secondary to Pathologic Myopia. The American Academy of Ophthalmology 米国眼科会議. 2013.11.16. New Orleans, USA.

Kyoko Ohno-Matsui. The potential role of amyloid  $\beta$  in the development of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. Symposium “Fundamental mechanism underlying both physiological and pathological angiogenesis”. The 19th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization and the 1st Asia-Pacific Vascular

Biology Meeting. 2011.12.9, Tokyo Kyoko Ohno-Matsui. Anti-VEGF for myopic choroidal neovascularization. In symposium “Are all anti-VEGFs drugs the same?” Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress 2011, 2011.3.22, Sydney, Australia

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

大野 京子 (OHNO-MATSUI, Kyoko)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・准教授  
研究者番号：30262174

### (2)研究分担者

森田 育男 (MORITA, Ikuo)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：60100129

望月 学 (MOCHIZUKI, Manabu)  
東京医科歯科大学・医学部・教授  
研究者番号：10010464