

中山人間科学振興財団活動報告書 2014

2014 年度研究助成

失明原因としての網膜色素上皮細胞の老化に関する
メカニズムの解明

上田高志

東京大学大学院医学系研究科・医学部 眼科

研究の背景と目的

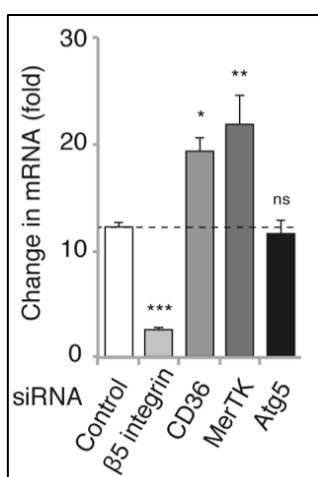
加齢黄斑変性は世界的に、特に先進諸国では重要な失明原因である。病態は網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium; RPE) 細胞の加齢による機能不全にあるが、RPE の加齢のメカニズムは未だ不明である。RPE 細胞は常に視細胞外節(outer segments; OS)の貪食を行うことによって視機能の維持に貢献している。特に、OS を貪食した RPE 細胞では PGC-1 α の発現が誘導されることを見出した¹。PGC-1 α は代謝調節因子として重要である他、加齢現象にも関与していることが知られている。本研究では OS の貪食が RPE にとっては不要物の代謝以上の重要性を持つ可能性、特に抗加齢効果を持つ可能性を検証するとともにそのシグナル経路を明らかにすることによって新たな治療ターゲットを見出すことを目的とした。

研究の方法と結果

①OS の貪食による RPE 細胞での PGC-1 α の発現のメカニズム

ヒト RPE の cell line である ARPE-19 細胞を用いた。RPE による OS の貪食のメカニズムはいくつかのステップからなる²⁻⁴。第一に α v β 5 integrin による OS の認識、CD36 や MerTK 受容体による OS の細胞内への取り込み、そしてオートファジー/ライソソーム経路による OS の代謝である。そこで、各ステップを siRNA を用いてノックダウンした時に、OS による PGC-1 α の発現誘導がどのように影響を受けるかを検討した (図 1)。

図 1



すると、 β 5 integrin をノックダウンした時のみ、PGC-1 α の発現誘導が抑制され、その他のステップでは抑制されなかった。むしろ、CD36 や MerTK のノックダウンによって OS の細胞内への取り込みを抑制した場合には PGC-1 α の発現誘導が促進された。この結果は CD36 や MerTK ブロッキング抗体を用いて検討しても同様の結果であった。

RPE 細胞では、 α v β 5 integrin において OS を細胞外で認識した際、細胞内では

focal adhesion kinase (FAK)によってシグナル伝達されると考えられている⁴。そこで、OSによるPGC-1 α の発現誘導がFAKを介したものか確認するために、FAKの特異的な阻害剤を付加した上でOSを貪食させたところ、PGC-1 α の発現誘導は1/3程度に抑制された。以上のような検討から、 α v β 5 integrin/FAK/PGC-1 α のシグナル経路が見出された。

② α v β 5 integrin/FAK/PGC-1 α シグナルによるRPEにおける保護的効果

- ・ARPE-19細胞ではOS付加によって抗酸化酵素の発現上昇と細胞内酸化ストレスレベルの減少が認められたが、PGC-1 α をノックダウンした細胞ではこの効果は消失した。

- ・ARPE-19細胞ではOS付加によってミトコンドリア生合成の活性化が認められたが、PGC-1 α をノックダウンした細胞ではこの効果は消失した。

- ・酸化ストレス負荷によってARPE-19細胞では加齢細胞の1つの特徴である、senescence-associated β -galactosidaseの活性上昇が認められるが、OS負荷によって活性は抑制できる。一方でPGC-1 α をノックダウンした細胞ではこの効果は消失した。

- ・PGC-1 α をノックダウンしたARPE-19細胞では、ライソソーム機能を司る転写因子であるtranscription factor EB(TFEB)の核内発現量の低下、TFEBのターゲット遺伝子の発現低下、RPE細胞で主なcathepsinであるcathepsin D活性の低下を来した。OS付加後の細胞内過酸化脂質の量はPGC-1 α をノックダウンしたARPE-19細胞で増加した。

- ・最後にPGC-1 α ノックアウトマウスRPEにおける加齢に関連した表現系について検討した。

図 2

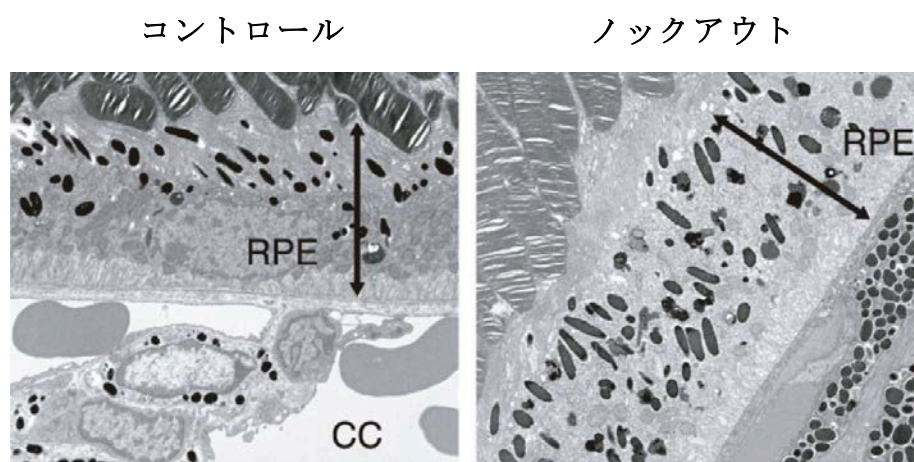
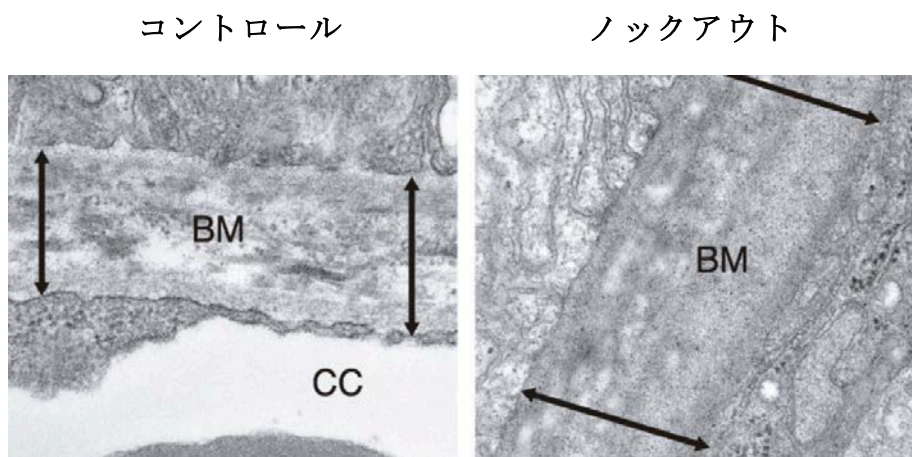


図2に示すようにノックアウトマウスのRPEでは加齢に伴うリポフスチンの蓄積が認められた。

図3



また、図3に示すように、ノックアウトマウスではRPEの基底膜であるブルッフ膜 (BM) の肥厚と電子密度の上昇が認められたが、これも加齢したヒト眼球での所見と同様のものではあった。さらに、脈絡膜毛細血管 (CC) の萎縮も加齢とともに進行するが、コントロールマウスではBMの外側に常に脈絡膜毛細血管 (CC) がはっきりと観察できたが、ノックアウトマウスでは観察されなかった。

まとめ

図4

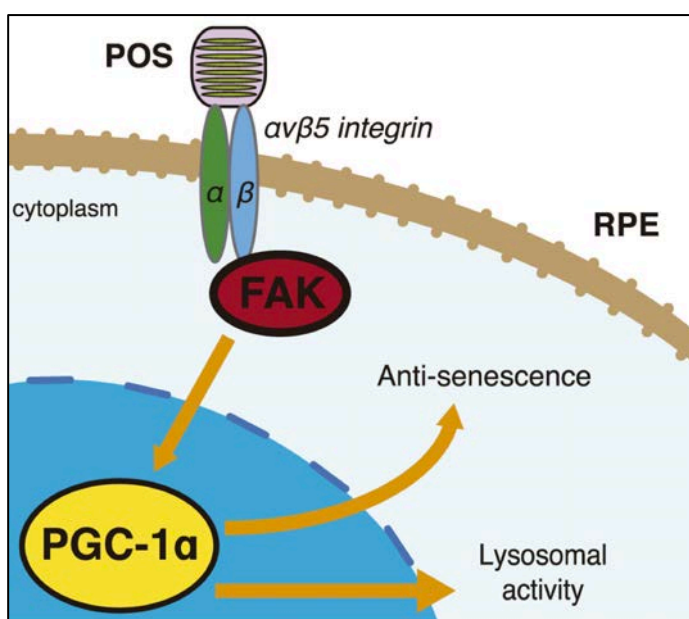


図 4 に示すように、本研究では、OS が $\alpha\beta 5$ integrin に認識されることにより、RPE 細胞内では FAK と PGC-1 α を介して、様々な抗加齢的な作用を誘導する仕組みが明らかとなった⁵。代謝の活性化による RPE の抗加齢効果については今後さらなる検討が必要と考えられた。

謝辞

本研究は、公益財団法人中山人間科学振興財団による平成 26 年度研究助成により遂行されました。ご支援頂きましたことを深く感謝申し上げます。

参考文献

1. Ueta T, Inoue T, Yuda K, et al. Intense physiological light upregulates vascular endothelial growth factor and enhances choroidal neovascularization via peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:1366–1371.
2. Finnemann SC, Silverstein RL. Differential roles of CD36 and alpha v beta5 integrin in photoreceptor phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *J Exp Med* 2001;194:1289–1298.
3. Finnemann SC. Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors. *EMBO J* 2003;22:4143–4154.
4. Kim JY, Zhao H, Martinez J, et al. Noncanonical autophagy promotes the visual cycle. *Cell* 2013;154:365–376.
5. Roggia MF, Ueta T. $\alpha\beta 5$ Integrin/FAK/PGC-1 α pathway confers protective effects on retinal pigment epithelium. Under review.