

## 研究課題：網膜色素上皮細胞の加齢メカニズムの解明と高齢者の失明防止

代表研究者：東京大学医学部眼科学教室・助教 上田高志

共同研究者：東京大学医学部眼科学教室・博士課程 Murilo Felix Roggia

### 【まとめ】

網膜色素上皮細胞の加齢と機能異常によって発症する加齢黄斑変性は世界的に主要な失明原因である。我々は網膜色素上皮細胞による視細胞外節の貪食の結果 PGC-1 $\alpha$  の発現が誘導されることを明らかにしてきた。そのメカニズムとして外節の細胞表面への接着による FAK を起点とした細胞内シグナルの存在を明らかにした。誘導された PGC-1 $\alpha$  は細胞内で種々の抗加齢効果を発揮することが明らかとなった。

### 1. 研究の目的

加齢黄斑変性はヒトにとって主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異常であるが、RPE 細胞の加齢のメカニズムについては未だ不明な部分が多い。現在、世界的に高齢化社会の時代に突入しつつあり、quality of vision を維持して生活していくことはますます重要となってきている。本研究では、RPE

細胞を用いた細胞生物学的実験と遺伝子改変動物を用いた表現系の検討を行い、RPE 細胞の加齢に関する新たなメカニズムを提唱する。また、新たな治療ターゲットの発掘によって高齢化社会における失明防止に資することを目的とする。

### 2. 研究の方法・経過

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。本応募者はこの現象が RPE 自体にとってどのような役割を有するかという観点から研究を行ってきた。特に、OS を貪食した RPE 細胞では PGC-1 $\alpha$  の発現が誘導されることを見出した。PGC-1 $\alpha$  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。

2-1. OSの貪食はいくつかのステップによって成り立っている。 $\alpha v \beta 5$  integrinによるOSのbinding, CD36, MerTKによるinternalization、また細胞内でのautophagyを介した代謝過程が明らかとなっている。そこで、OSによるRPE細胞でのPGC-1 $\alpha$ 誘導がどのステップに依存しているかをそれぞれの分子についてのsiRNAやブロッキング抗体を用いて検証を行う。また、RPE細胞表面でintegrinによって認識されたシグナルは細胞内でfocal adhesion kinase (FAK) やintegrin linked kinase (ILK) などの役割についても阻害剤を用いてメカニズムを明らかにしていく。

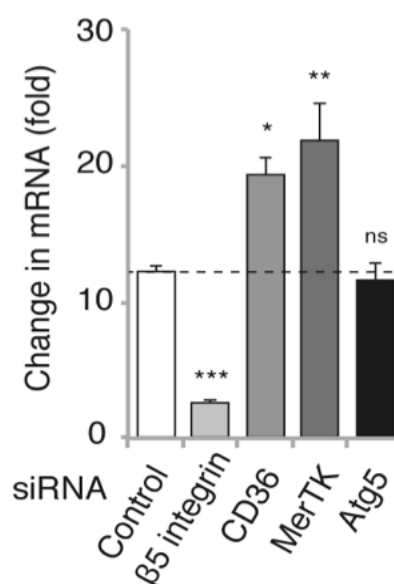
2-2. 不死化RPE (ARPE-19)細胞と豚眼から単離したOSを用いて検討を行う。OSを貪食した細胞でのreactive oxygen species (ROS) levelやミトコンドリア生成の変化を検討する。また、その結果として酸化ストレス下での加齢がどのように変化するかSA- $\beta$ -galactosidase assayによって検討する。また、これらの変化がPGC-1 $\alpha$ 依存性であるかどうかをsiRNAによるノックダウンによって確認する。

2-3. PGC-1 $\alpha$ ノックアウトマウスのRPEの加齢に特有のphenotype(加

齢黄斑変性)が存在しているかを主に電子顕微鏡下で確認する。これによってPGC-1 $\alpha$ がRPEの加齢に関与するかをin vivoで確認できる。

### 3. 研究の成果

3-1. OSによるPGC-1 $\alpha$ 誘導のメカニズム



上図に示すようにARPE-19細胞において各種siRNA transfection後、OS貪食を行わせたところ、PGC-1 $\alpha$ 発現上昇を抑制したのは $\beta 5$  integrin siRNAをtransfectionした場合のみであった。 $\alpha v \beta 5$  integrinの細胞内シグナル伝達の起点であるFAKの阻害剤を用いても同様にOSによるPGC-1 $\alpha$ 発現誘導を抑制した。このことから、OS貪食によるRPE細胞での

PGC-1 $\alpha$  発現誘導には OS の RPE への binding が主要な起点であることが示唆された。

### 3-2. PGC-1 $\alpha$ の RPE 細胞における保護効果

OS を付加した ARPE-19 細胞では、抗酸化酵素の発現上昇、ROS level の低下、ミトコンドリア生合成の上昇、SA- $\beta$ -galactosidase の低下を認め、PGC-1 $\alpha$  に特異的な siRNA を用いた検討によって、これらの総じて抗加齢的な現象は PGC-1 $\alpha$  依存性であることが示唆された。また、PGC-1 $\alpha$  の発現が siRNA によって抑制された ARPE-19 細胞では、lysosomal pathway を制御する transcription factor EB やその下流ターゲット遺伝子の発現低下を認めた。その結果、過酸化脂質の細胞内蓄積上昇を認めた。

### 3-3. PGC-1 $\alpha$ ノックアウトマウス RPE における加齢現象

上図に示すように、ワイルドタイプ (WT) と比較してノックアウトマウス (KO) では RPE における type 2 melanolysosome 顆粒の蓄積、不完全な basal infoldings、脈絡膜毛細血管盤 (CC) の退縮が認められた。

## 4. 今後の課題

本研究によって RPE 細胞の加齢現象について新たなメカニズムが明らかとなった。今後 FAK 以下のシグナル伝達を詳細に明らかとし、新規治療ターゲットを明らかにしていきたい。

## 5. 研究結果の公表方法

Murilo F. Roggia, Takashi Ueta.  $\alpha$ v $\beta$ 5 Integrin/FAK/PGC-1 $\alpha$  pathway confers protective effects on retinal pigment epithelium. として PLoS One. に掲載受諾された。

