

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	長岡 奈都子
論文審査担当者	主査 寺田 純雄 副査 堤 剛、磯村 宜和
論文題目	Visual arrestin modulates gene expression in the retinal pigment epithelium: Implications for homeostasis in the retina
(論文内容の要旨) 【要旨】 網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium: RPE) は、視細胞に接する網膜色素上皮細胞の単層構造であり、視細胞外節の貪食作用を有する。また RPE は様々な増殖因子を産生および分泌しており、網膜の恒常性を維持するために不可欠である。アレスチン 1 (ARR1) は視細胞で特異的に発現しており、視細胞と RPE における視覚サイクルを維持するための重要な分子である。本研究では、ラットの網膜での ARR1 の発現が視覚遮断モデルでは減少することを示した。また ARR1 は正常眼の視細胞および RPE で検出されたが視覚遮断モデルの RPE では明らかな取り込みを認めず、ARR1 に対する光刺激による RPE の貪食作用が示された。さらに培養ヒト RPE に ARR1 を強制発現させることにより、basic fibroblast growth factor (bFGF) の発現が上昇し、transforming growth factor-β1 (TGF-β1)、TGF-β2 および bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) の発現が減少することを明らかにした。bFGF の発現上昇は正常な視細胞の生存に寄与し、RPE の上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition : EMT) の誘導因子である TGF-β family の発現低下はその抑制に働くと考えられることから、ARR1 が網膜の恒常性維持にはたらく機序が示唆された。 【緒言】 網膜には光受容に特化した細胞である視細胞が存在し、光エネルギーの吸収による視物質の化学変化と一連の情報変換が光覚発生の機序である。脊椎動物の視細胞には主に暗所視を担う杆体と、明所視を担う錐体の 2 種類がある。網膜に入射した光は、神経細胞層を透過して視細胞に到達し、外節に局在する光受容蛋白質 (視物質) に吸収される。杆体の視物質はロドプシンと呼ばれる G 蛋白質共役型受容体 (G-protein coupled receptor : GPCR) である。アレスチンは GPCR シグナル制御蛋白質であり、網膜特異的に局在する視覚アレスチンにはアレスチン 1 (ARR1, rod arrestin) とアレスチン 4 (ARR4, cone arrestin) がある。ARR1 は光刺激により活性化したロドプシンに結合して不活性化させる過程に作用し、正常な光応答の維持に必要不可欠である。Arr1 の変異は、視細胞および RPE を原発とした進行性の変性がみられる網膜色素変性や、先天性夜盲のひとつである小口病の一因である。また Arr1 ノックアウトマウスでは光依存性の杆体変性がみられる。これらは ARR1 の光障害からの視細胞保護と網膜恒常性維持への働きを示唆すると考えられるが、その機序はいまだ解明されていない。	

RPEは視細胞外節の貪食作用を有し、またbFGFやTGF- β など様々な増殖因子を産生および分泌することにより、網膜恒常性において重要な役割を担っている。bFGFは主にRPEによって合成および分泌される神経栄養因子であり、視細胞への光障害に対する保護効果や網膜色素変性のモデルラットにおける視細胞の保護作用を示すことが報告されている。TGF- β は、分化、アポトーシス、遊走、免疫細胞機能、細胞外マトリックス合成など重要な生物学的応答を調節する多機能性サイトカインである。3つのTGF- β アイソフォーム(TGF- β 1、 β 2、および β 3)がRPEで発現するが、主にTGF- β 1、TGF- β 2、およびBMP-2が産生されている。TGF- β は、網膜上膜 epiretinal membrane (ERM) や増殖性硝子体網膜症 proliferative vitreoretinopathy (PVR)の病理の特徴であるRPEの上皮間葉転換(EMT)の主要な誘導因子である。つまりRPEにおけるTGF- β の発現上昇は、EMTによる網膜疾患の発症促進に作用する可能性がある。

この論文では、ラット網膜におけるArr1の視細胞特異的な発現と視覚遮断モデルにおけるARR1の減少を明らかにした。さらにARR1が貪食作用によりRPEに取り込まれることを示唆した。ヒト培養RPEを用いたARR1の強制発現によりbFGFとTGF- β familyの発現が変化したことから網膜恒常性維持に働く機序が示唆される。

【方法】

生後3週のWistar rat(n=6)の片眼に瞼々縫合を行い視覚遮断モデルを作成し、もう片眼をコントロール眼とした。2週間後に眼球を摘出して、パラフィン切片の免疫染色とウェスタンブロットを行い、ARR1の発現変化を検討した。またヒト培養RPEにトランスフェクションを行いARR1を強制発現させ、PCRにてbFGFとTGF- β 1、TGF- β 2、BMP-2のmRNAの発現変化を検討した。

【結果】

In situ hybridization (ISH)にて、正常ラット網膜ではArr1は視細胞に特異的に発現していることを明らかにした。またImmunohistochemistry (IHC)を行いコントロール眼ではARR1は視細胞およびRPEで検出されたが、視覚遮断モデルではRPEでのARR1の明らかな取り込みは検出されなかった。またウェスタンブロットではコントロールと比較し視覚遮断モデルでは網膜におけるARR1の発現は約70%減少していた。

またヒト培養RPEにおけるARR1の強制発現により、bFGFのmRNA発現は93倍と有意に上昇し、TGF- β 1、TGF- β 2、BMP-2のmRNAはそれぞれ30%、46%、37%の有意な発現減少がみられた。

【考察】

Arr1はヒト及びマウスで視細胞に発現することが報告されているが、本研究でラットでも視細胞に特異的に発現していることを明らかにした。またARR1は通常の光環境下ではRPEで検出されるが、光刺激を遮断したモデルでは明らかな取り込みがみられないことを示した。ARR1は暗順応条件下で視細胞内節と外網状層に局在しているが、光刺激により視細胞内節から外節に移動する特徴があることから、光刺激はARR1の発現とRPEの貪食による取り込みに重要であると考えられる。哺乳動物の網膜の生理機能が概日時計、外節脱落、ロドプシン遺伝子発現の制御下にあるとの報告があり、ARR1が正常な視覚機

能に作用するとともに RPE において網膜恒常性の維持に関与する遺伝子発現を調節している可能性が考えられた。

Arr1 の変異による既知の網膜疾患として網膜色素変性および小口病 1 型がある。網膜色素変性は Arr1 を含む 100 以上の遺伝子変異に関連する遺伝性網膜変性疾患である。多くは病初期に杆体の変性に始まり、錐体の変性を生じて最終的に視細胞と RPE 萎縮に至るため、臨床的には不可逆的な夜盲および視野狭窄、視力低下を呈する。Arr1 変異が網膜色素変性を発症する機序は不明であるが、ARR1 が正常な網膜恒常性の維持に重要であると考えられる。また小口病 1 型は定常的な夜盲症を特徴とする先天性非進行性疾患であり、Arr1 の突然変異が光応答の回復段階を障害し、杆体の暗順応を遅延させる。つまり ARR1 は、正常な視覚サイクルの維持に加えて、RPE を介して網膜の恒常性と機能を維持するよう働いている可能性がある。網膜色素変性のモデルラットにおいて、bFGF が視細胞の保護作用を示すことが報告されている。本研究の結果から、視細胞における ARR1 発現は網膜への光刺激によって調節され、発現上昇した ARR1 が RPE によって貪食されることにより bFGF の発現と分泌が増加し、視細胞の恒常性に寄与することが示唆された。また TGF- β family は黄斑前膜(ERM)や増殖硝子体網膜症(PVR)の原因となる RPE の上皮間葉転換(EMT)の主要な誘導因子であることが報告されている。本研究では ARR1 の強制発現により TGF- β family の発現低下がみられたことから、ARR1 は EMT の誘導に抑制的に働く可能性が考えられた。以上より、光刺激による ARR1 の発現が RPE における bFGF の発現上昇と TGF- β family の発現低下を誘導し、網膜の恒常性維持に働いている機序が示唆された。

【結論】

視覚アレスチンの発現には光刺激が重要であり、また RPE における増殖因子の発現を調整することにより網膜の恒常性維持に働いている可能性がある。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	甲 第 5939 号	長岡 奈都子
論文審査担当者	主 査 寺田 純雄 副 査 堤 剛、磯村 宜和	
【論文審査の要旨】		
1. 論文内容		
本論文はアレスチンの網膜色素上皮における機能につき検討した結果をまとめたものである。		
2. 論文審査		
1) 研究目的の先駆性・独創性		
アレスチン1は視細胞に特異的に発現し、光刺激により活性化したロドプシンを賦活化する分子と考えられおり、その変異は網膜色素変異や小口病の一重系の原因となる。しかしながら光刺激下における視細胞から網膜色素上皮にわたる網膜恒常性維持において、同分子がどのような役割を果たしているかは不明である。申請者ら視覚遮断ラットモデルとヒト培養網膜色素上皮細胞へのトランスフェクション実験により、アレスチン1の網膜における新規仮説の検討を目的として解析を行った。得られた結果は幾つかの留保がつくものの、一定の意義を有するものと評価される。		
2) 社会的意義		
本研究により、アレスチン1は視細胞特異的に発現し、視覚遮断により減少すること、及び興味深いことに、対照実験において、視細胞以外に網膜色素上皮細胞にも少量局在することが観察された。また、ヒト培養網膜色素上皮細胞にアレスチン1を強制発現させると、bFGFの発現が上昇し、TGFβの発現が減少する。以上の所見から、視細胞外節に含まれているアレスチン1が網膜色素上皮細胞に貪食され、結果として網膜の恒常性維持に寄与するとする仮説を提唱している。網膜色素変性をはじめとする網膜変性疾患の病態を考察し、その治療開発を図る上で、一定の意義ある研究成果である。		
3) 研究方法・倫理観		
研究にはラット個体とヒト培養細胞が使用され、確立された形態学的、生化学的手法により解析が行われている。アレスチン1の網膜色素細胞への取り込みの確認が十分とはいえず、最終的な結論を導き出すことは不可能であるが、得られた所見自体は興味深い内容を含むものと評価できる。動物実験等につき倫理的な観点からは適正に研究が遂行されている。		
4) 考察・今後の発展性		

免疫組織化学によりアレスチン1が網膜色素上皮細胞に局在することが推定される結果が得られていることから、上述の仮説を提唱、考察しているが、この点については果たして申請者らの主張の通り貪食によるものかどうか、電子顕微鏡や分子生物学的な手法による検証が必要に思われる。また仮説通りであった場合でも、培養色素上皮細胞における強制発現実験における結果が、アレスチン1の網膜色素上皮細胞への取り込みとその作用発揮を正しく反映していることを証明する必要がある。以上を前提とすれば、申請者らの所見には網膜恒常性維持に寄与する未知のメカニズムが潜む可能性があり、今後の実験追加により更なる発展を期待したい。アレスチンの視細胞における輸送や視細胞再生における役割、網膜色素細胞におけるTGFβの生理的機能等についても、今後の研究の進展が望まれる。

3. その他

特記すべき事項はない。

4. 審査結果

以上より、本論文は博士（医学）の学位の申請要件を満たす水準にあるものと考えられる。