



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	乙第1895号
学位記番号	論第1660号
氏名	臼井 英晶
授与年月日	平成 30年 12月 31日
学位論文の題名	In vitro drusen model: three-dimensional spheroid culture of retinal pigment epithelial cells ( In vitro ドルーゼンモデル: 網膜色素上皮細胞の3次元スフェロイド培養) Journal of Cell Science 2018 Aug 28; 132 (4)
論文審査担当者	主査: 澤本 和延 副査: 鵜川 真也、小椋 祐一郎

## 論文内容の要旨

加齢黄斑変性 (AMD) は先進国の高齢者の失明原因の主要疾患の1つとなっている。ドルーゼンは網膜の外側にある網膜色素上皮 (RPE) 下の加齢性沈着物で、疫学上、AMD の発症リスクであるため AMD 前駆病変と診断される。ただ、ドルーゼンの生成過程や AMD 発症への役割は明らかではない。我々は以前に、メチルセルロースで粘性を持たせた培養液と丸底培養皿で RPE 細胞を培養することで、球状細胞塊 (スフェロイド) を形成させると、内部はアポトーシスを起こし、表面にブルッフ膜を伴う分化した単層の RPE (上皮) が生成されることを報告した。今回の研究では、この球体培養によってヒトの加齢眼で見られるドルーゼンと共通のタンパク発現を認めるドルーゼン様の沈着物が生成されることを報告する。この RPE 3次元球体培養モデルは、ドルーゼン生成の機序を明らかにし、AMD の病態解明につながる新しい *in vitro* の AMD モデルとして役立つものと考えられる。

通常の 75 cm<sup>2</sup> 培養皿で継代・培養した RPE 細胞を回収し、メチルセルロース添加培養液に入れ、丸底 96 穴培養皿に播種すると、翌日には、内側にアポトーシスした RPE 細胞、外側には単層 RPE 細胞及びブルッフ膜から成るスフェロイドが確認された。このスフェロイドを培養していると、時に、RPE とブルッフ膜の間に、光学顕微鏡下で内部が均一なドルーゼン様沈着物の形成を認めた。スフェロイドのライブイメージングによって、ドルーゼン様沈着物は RPE 細胞から出芽するように形成されることが観察された。RPE に蛍光標識した微粒子を貪食させたものを使って作ったスフェロイドにおいて、ドルーゼン様沈着物が蛍光を発しないことから、アポトーシスした RPE 細胞ではないことを確認した。分化した細胞という観点では初代培養の RPE 細胞を用いることが一般的であるが、後述のリポフスチンが様々な程度で蓄積している結果に影響を与える可能性がある。一方、スフェロイド形成により RPE 細胞の再分化が促進されることは以前の研究で確認している。以上のことより、今回の研究では、3-6 回継代した RPE 細胞を用いた。

RPE 細胞は、日々、光線暴露により酸化した視神経細胞外節のメンテナンスのため、外節先端の貪食・消化活動を行っているが、その過程で酸化物質が処理されず残渣としてリポフスチンが RPE 細胞内に蓄積してくる。リポフスチンは複雑に酸化や糖化修飾、架橋された難溶性の複合化合物で、リポフスチン蓄積とドルーゼンや AMD の関連は十分解明されていない。そこで、リポフスチンとドルーゼンとの関連を調べるために、リポフスチン模擬微粒子として糖酸化ナノ粒子を作製し、RPE 細胞に前処理として貪食させ、スフェロイドを作製した。糖酸化ナノ粒子の蓄積した RPE スフェロイドは、蓄積しなかったものと比較してドルーゼン様沈着物と (basal laminar deposits 様) びまん性沈着物を多く産生することが確認された。我々は以前にも家兎のリポフスチン蓄積モデルでドルーゼンの生成を報告していて、リポフスチン蓄積のドルーゼン生成との関与が示唆された。ヒトの加齢眼で、種々の補体、amyloid  $\beta$ 、Vitronectin、apoE が RPE 下の沈着物に発現を認め、また、補体 H 因子 (CFH) や apoE の遺伝子多型と AMD の関与が示唆されている。今回の実験で、RPE スフェロイドにおいて、CFH、Vitronectin、apoE の発現を認めた。これらはヒトドルーゼン内での発現も確認されており、我々の RPE スフェロイドでも生理的発現部位と類似の部位での発現を認めた。

AMD の発症要因として、遺伝的要因以外に、環境要因の関与、特に、光線暴露や喫煙等による酸化ストレスの関与が報告されている。ヒト網膜においては、RPE 内の蓄積リポフスチンやブルッフ膜に沈着した過酸化脂質、脈絡膜血管からの高酸素暴露、光線暴露が主なフリーラジカ

ル発生要因と想定されるがこれらの生理的環境を実験的に再現するのは困難である。そこで、RPE スフェロイドに、ニコチン、塩化コバルト (CoCl<sub>2</sub>)、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) の負荷を行い、タンパク発現の変化を RT-PCR を用いて解析したところ、C3、C5、APP は発現亢進し、apoE、vitronectin、CFH は減少した。これらの結果から、酸化ストレスが RPE の生理的環境を破壊させ、病的な炎症を誘導していると推測される。

AMD の病態解明が困難な理由として、AMD の理想的な動物モデルや培養モデルが確立されていないことが一因と考えられる。我々の RPE 3次元球体培養は、AMD の病態やドレーゼンの生成機序、RPE の基底側機能の解明に有用であると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

加齢黄斑変性 (AMD) は先進国の高齢者の失明原因の主要疾患の1つとなっている。ドルーゼンは網膜の外側にある網膜色素上皮 (RPE) 下の加齢性沈着物で、疫学上、AMD の発症リスクであるため AMD 前駆病変と診断される。しかし、ドルーゼンの生成過程や AMD 発症への役割は明らかではない。In vitro での実験モデル作成として、メチルセルロースで粘性を持たせた培養液と丸底培養皿で RPE 細胞を培養することで、球状細胞塊 (スフェロイド) を形成させると、内部はアポトーシスを起こし、表面にブルッフ膜を伴う分化した単層の RPE (上皮) が生成されることを以前報告した。今回の研究では、この球体培養によってヒトの加齢眼で見られるドルーゼンと共通のタンパク発現を認めるドルーゼン様の沈着物が生成されることを報告した。

作成されたスフェロイドを継続培養していると、RPE とブルッフ膜の間に、光学顕微鏡下で内部が均一なドルーゼン様沈着物の形成を認めた。ライブイメージングによって、ドルーゼン様沈着物は RPE 細胞から出芽するように形成されることが観察された。RPE に蛍光標識した微粒子を貪食させたものを使って作ったスフェロイドにおいて、ドルーゼン様沈着物が蛍光を発しないことから、アポトーシスした RPE 細胞ではないことを確認した。RPE 細胞は、日々、光線暴露により酸化した視神経細胞外節のメンテナンスのため、外節先端の貪食・消化活動を行っているが、その過程で酸化物質が処理されず残渣としてリポフスチンが RPE 細胞内に蓄積して行く。リポフスチンは複雑に酸化や糖化修飾、架橋された難溶性の複合化合物で、リポフスチン蓄積とドルーゼンや AMD の関連は十分解明されていない。そこで、リポフスチンとドルーゼンとの関連を調べるために、リポフスチン模擬微粒子として糖酸化ナノ粒子を作製し、RPE 細胞に貪食させ、スフェロイドを作製した。糖酸化ナノ粒子の蓄積した RPE スフェロイドは、蓄積しなかったものと比較してドルーゼン様沈着物と (basal laminar deposits 様) びまん性沈着物を多く産生することが確認された。これは以前に報告した、家兎のリポフスチン蓄積モデルでドルーゼンの生成と類似しており、リポフスチン蓄積のドルーゼン生成との関与が示唆された。ヒトの加齢眼で、種々の補体、amyloid $\beta$ 、Vitronectin、apoE がドルーゼンに発現することを認めるが、今回の実験で、RPE スフェロイドにおいて、CFH、Vitronectin、apoE の発現を認め、生体におけるドルーゼンと RPE スフェロイドのドルーゼン様沈着物との類似性を認めた。

AMD の発症要因として、遺伝的要因以外に、環境要因の関与、特に、光線暴露や喫煙等による酸化ストレスの関与が報告されている。そこで、RPE スフェロイドに、ニコチン、塩化コバルト (CoCl<sub>2</sub>)、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) の負荷を行い、タンパク発現の変化を RT-PCR を用いて解析したところ、C3、C5、APP は発現亢進し、apoE、vitronectin、CFH は減少した。これらの結果から、酸化ストレスが RPE の生理的環境を破綻させ、病的な炎症を誘導していると推測された。

本研究から、RPE 3次元球体培養モデルは、生体の RPE 細胞、ブルッフ膜と類似した立体構造を構築し、ドルーゼン様沈着物を形成することが確認された。このことから、AMD の病態解明につながる新しい in vitro での AMD モデルとして役立つものと考えられた。

本研究の意義：AMD の病態解明が困難な理由として、AMD の理想的な動物モデルや培養モデルが確立されていないことが一因と考えられる。RPE 3次元球体培養は、AMD の病態やドルーゼンの生成機序、RPE の基底側機能の解明に有用であると考えられた。

主査：澤本和延教授より、RPE 細胞による、生体での視細胞外節貪食と、スフェロイドモデルにおけるアポトーシス RPE 細胞貪食との違いについて、生体ドルーゼンとスフェロイドモデルにおけるドルーゼン様沈着物との違いについて、ブルッフ膜形成について、糖酸化の有無によるドルーゼン形成の違いについて、本モデルがシミュレートできる網膜構造の範囲について、また第1副査：鶴川真也教授より、生体とスフェロイドモデルでのドルーゼン形成の時間の違いについて、塩素イオンチャンネルとブルッフ膜形成の関係性について、第2副査：小椋祐一郎教授より専門領域として、加齢黄斑変性の診断・治療指針についての質問があった。これらの

質問に対して、申請者から適切な回答が得られ、学位論文の内容に対する理解も十分であると判断した。したがって、本申請者は博士（医学）の学位を授与するに値すると判定された。

論文審査担当者 主査 澤本和延 副査 鵜川真也 小椋祐一郎