

平成 18 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

加齢黄斑変性における脈絡膜血管新生の分子メカニズム

吉田 武史

東京医科歯科大学眼科学教室

要 約

滲出型加齢黄斑変性(age-related macular degeneration, AMD)の主たる病態は脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)である。網膜色素上皮細胞(retinal pigment epithelial cell, RPE)はさまざまな血管新生関連因子を発現するが、なかでも vascular endothelial growth factor(VEGF)に代表される血管新生促進因子と pigment epithelium derived factor(PEDF)などの抑制因子をともに高濃度に発現している。何らかの原因により RPE が病的状態に移行する結果、血管新生関連因子の発現バランスが崩れ、CNV 発生を惹起すると推察される。CNV 発生においては、前駆病変であるドルーゼンが深くかかわっていることが推測されているものの、ドルーゼン中の何が RPE に病的刺激として作用するのかは不明であった。ドルーゼン中には各種補体や免疫物質に加え、Alzheimer 病において脳に蓄積するアミロイド β (amyloid β , A β)が含ま

れることが近年報告された。そこで我々は AMD において CNV 発生を惹起する原因物質として A β に着目し、AMD における CNV 発生に A β が与える影響について検討した。まず、A β を培養ヒト RPE に添加すると VEGF の発現上昇と PEDF の発現低下を惹起し、さらに A β を過剰に蓄積する neprilysin ノックアウトマウスにおいてドルーゼンに類似した網膜下沈着物の形成や RPE の変性など、AMD の初期病態を再現できることを明らかにし、A β が初期 AMD の重要な原因物質である可能性を示唆した。A β は AMD における CNV 発症には重要な役割をもつと考えられる。(日眼会誌 111 : 881—891, 2007)

キーワード：加齢黄斑変性、脈絡膜新生血管、網膜色素上皮、アミロイド β 、ドルーゼン

A Review

Molecular Mechanism of Choroidal Neovascularization
in Age-related Macular Degeneration

Takeshi Yoshida

Department of Ophthalmology and Visual Science, Tokyo Medical and Dental University

Abstract

The exudative form of age-related macular degeneration (AMD) is characterized by choroidal neovascularization (CNV). Retinal pigment epithelial cells (RPE) secrete various angiogenesis-related factors, especially vascular endothelial growth factor (VEGF) and pigment epithelium-derived factor (PEDF). The imbalance between the VEGF and PEDF secreted by RPE is a key contributor to the development of CNV in AMD. The earliest clinical hallmark of AMD is the presence of drusen. Although drusen are an epidemiological risk factor for the development of CNV, the mechanism of how drusen induce the development of CNV remains unclear. Recent proteome analysis demonstrated that amyloid β (A β) deposition was specific to drusen from eyes with

AMD. We focused on A β and investigated the effect of A β on cultured human RPE cells as well as ocular findings in neprilysin gene-disrupted mice, which leads to an increased deposition of A β . Our study demonstrates that A β accumulation affects the balance between VEGF and PEDF in the RPE, and reproduces features characteristic of human AMD, such as RPE atrophy and basal deposit formation in neprilysin gene-disrupted mice. Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 111 : 881—891, 2007)

Key words : Age-related macular degeneration, Choroidal neovascularization, Retinal pigment epithelium, Amyloid β , Drusen

別刷請求先：113-8519 文京区湯島 1-5-45 東京医科歯科大学眼科学教室 吉田 武史 E-mail : takec.oph@tmd.ac.jp (平成 18 年 4 月 13 日受付, 平成 19 年 7 月 31 日改訂受理)

Reprint requests to : Takeshi Yoshida, M. D., Ph. D. Department of Ophthalmology and Visual Science, Tokyo Medical and Dental University. 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

(Received April 13, 2006 and accepted in revised form July 31, 2007)

I はじめに

加齢黄斑変性(age-related macular degeneration, AMD)は、黄斑部網膜が加齢に伴って異常を来す疾患であり、先進国においては、60歳以上の高齢者の中途失明や視力低下の主因である^{1)~3)}。日本においても、AMD全体で約43万人もの患者がいると推察され、その数はさらに増加傾向にある⁴⁾。AMDのなかでも視力低下のより著しい滲出型AMDの主たる病態は脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)であり、黄斑部において、脈絡膜血管由来の内皮細胞が網膜色素上皮細胞(retinal pigment epithelial cell, RPE)下、あるいは感覚網膜下に増殖して伸展し、出血や浮腫などの滲出性病変を引き起こし、不可逆的、かつ深刻な視力低下につながるものである。近年では光線力学療法(photodynamic therapy, PDT)や抗vascular endothelial growth factor(VEGF)療法など新しい治療法も試みられているが、いったんCNVが発生してしまうと、視力低下なくCNV発症前の状態に戻すことは非常に困難であることより、CNV発症を未然に防ぐ予防治療が最も望ましいと考えられている。この観点から、AMDにおけるCNV発生のメカニズムを解明することが非常に重要であるが、現在のところAMDにおいてCNVが発生する分子機構は完全には解明されていない。AMDにおけるCNV発生は、RPE、RPEの基底膜であるBruch膜、CNV発生母体となる脈絡膜血管を基盤とする複合体病変であるといわれており、これらの部位の病的移行が本症発症の引き金となると考えられている。

本稿では、我々の研究成果をもとにAMDでのCNV発生における分子機構、特にAMDの前駆病変であるドルーゼンおよび、ドルーゼン蓄積に伴うRPE変化に着目して解説したい。

II ドルーゼンとAMD

ドルーゼンは組織学的にはRPEの細胞膜と基底膜の間、もしくはRPEの基底膜下の細胞外沈着物であり⁵⁾、AMDにおける唯一の前駆病変と考えられている。疫学的には、ドルーゼンの数、大きさ、融合性が増加することにより、滲出型AMDのCNVの発生頻度が増加することが知られている⁶⁾⁷⁾。これまでにドルーゼン中には、さまざまな蛋白質、特にHLA-DR鎖、Ig軽鎖、後期グリケーション終末産物(Advanced glycation end products, AGEs)、vitronectinおよび補体複合体など、免疫や炎症反応に関係する物質が多く含まれていることが報告されている⁸⁾。このことから、ドルーゼンに対する反応としての慢性炎症や酸化ストレスの重要性が多く報告されており、CNV発生の病態形成に関与していると考えられているが、現時点においてドルーゼン中のどの蛋白質が主たる原因なのかは明らかにはなってい

ない。しかしながら、近年、剖検眼を用いた解析によりドルーゼン中にAlzheimer病の原因物質で、脳内の老人斑の主要構成物質であるamyloid β ($A\beta$)がAMDを発症した眼球のドルーゼン中に高頻度に存在することが報告された^{9)~11)}。このことはAMDにおけるCNV発症機序を考えるうえで非常に興味深い。

III amyloid β ($A\beta$)とは

$A\beta$ は39~43残基のアミノ酸からなる蛋白質である。Alzheimer病における脳内においてみられる老人斑の主な構成物質がこの $A\beta$ であり、疾患の本態と考えられている。 $A\beta$ 自体は生理的ペプチドであり、前駆体蛋白質であるAPP(Amyloid precursor protein)¹²⁾から β -Secretase(β -site cleaving enzyme, BACE)と γ -Secretase[プレセニリン(PS)複合体]¹³⁾によって順次切断されて産生するが、通常は速やかに酵素的分解を受けている。脳内において生理的にAPPより産生された $A\beta$ の分解過程の律速段階を担う主要分解酵素が、中性エンドペプチダーゼの一つであるneprilysinであり、neprilysinの働きにより、通常脳内では $A\beta$ は産生と分解のバランスが保たれていることが近年報告された¹⁴⁾¹⁵⁾。しかしながら、何らかの原因により、脳内に異常蓄積した $A\beta$ はそれ自体のみならずミクログリアを刺激し、さまざまなサイトカインやケモカインを発現することにより神経細胞を障害することや、アポトーシスを惹起することによりAlzheimer病の発症に関与することがこれまで多く報告されている^{16)~19)}。

前述したとおり、これまでの報告により^{9)~11)} $A\beta$ がAMDを有する眼球のドルーゼン中に存在することが近年明らかになったが、我々はドルーゼン中に異常蓄積した $A\beta$ がAlzheimer病と同様にAMD発症にも関与している可能性があると考えた。そこで我々はまず、 $A\beta$ の産生と発現調節を行う細胞についてRPEに焦点を当て、RPEにおいて、 $A\beta$ の前駆体であるAPPと、APPから $A\beta$ を切り出す酵素の一つである β -Secretaseならびに $A\beta$ の分解酵素neprilysinについて、各遺伝子発現と各蛋白質発現について検討した。培養ヒトRPEを10% fetal bovine serum(FBS)、10 ng/ml basic FGFを含むDulbecco's modified eagle's medium(DMEM)培養液にて、ラミニンでコーティングした培養皿を使用して培養することによって生体内において生理的状态である分化型に誘導²⁰⁾した後、抽出したRNAを用いてそれぞれの遺伝子発現をpolymerase chain reaction amplification(PCR法)にて検討したところ、ヒトRPE細胞はAPP、 β -Secretase、neprilysinの各遺伝子を発現していることが確認された(図1A)。また、albino ddYマウスの眼球切片を用い、APP、 β -Secretase、neprilysinの各免疫染色を行ったところRPE細胞層に一致する部位にそれぞれ染色が確認された(図1B~

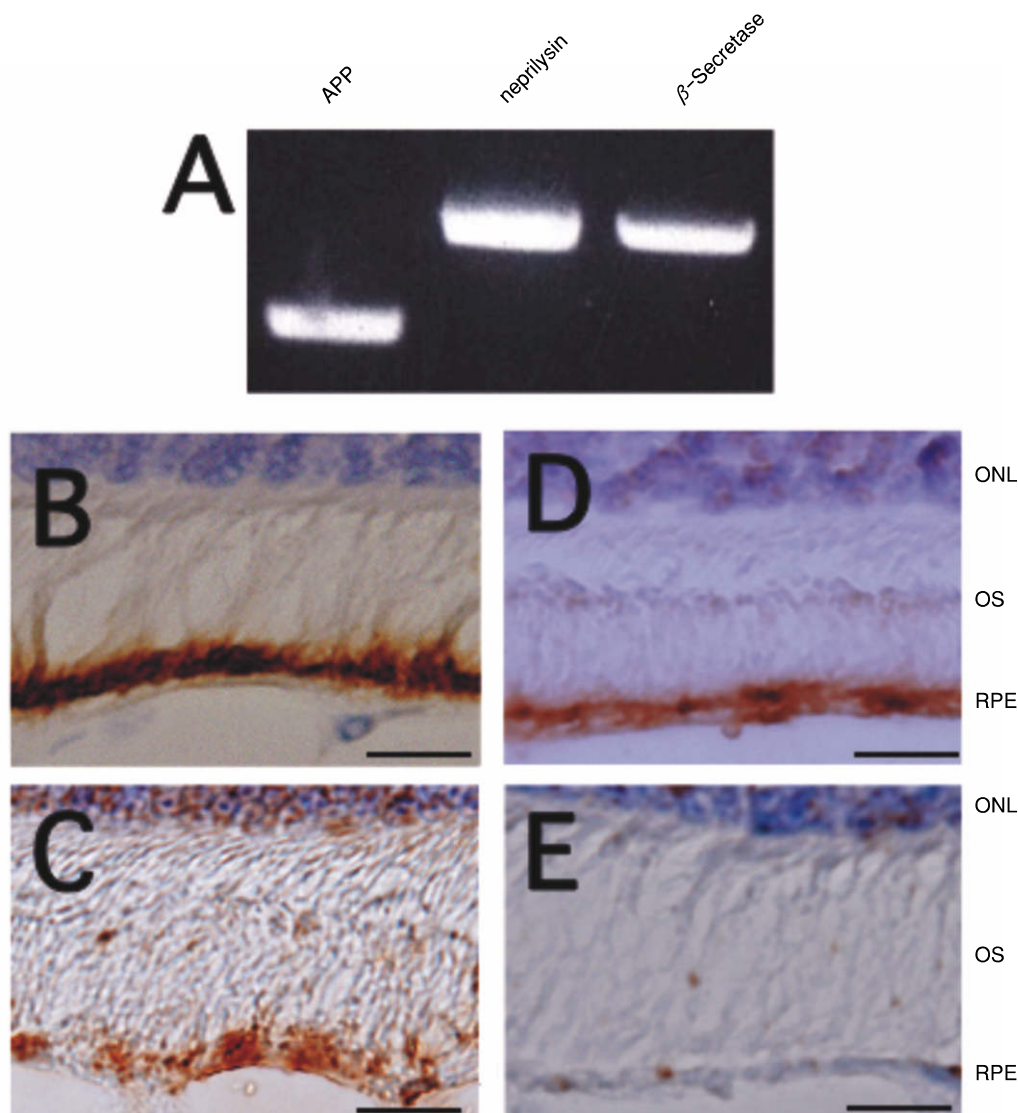


図 1 網膜色素上皮細胞(RPE)における amyloid β ($A\beta$) 関連因子の発現.

A: 培養ヒト RPE 細胞における Amyloid precursor protein (APP), β -Secretase, neprilysin の遺伝子発現 [reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)].

B~E: albino ddY マウス眼球における APP (B), β -Secretase (C), neprilysin (D) における免疫染色. E は陰性対照. ONL: outer nuclear layer, OS: outer segment. バーは 30 μ m.

(文献 21 より転載, 一部改変)

E). これらのことから RPE 細胞は恒常的に $A\beta$ を産生し, 発現調節を行っていることが明らかになったが, 加齢や酸化ストレスといった何らかの病的要因による RPE における $A\beta$ 関連因子の発現変化がドルーゼン中における $A\beta$ の異常蓄積の原因になりうると推測される²¹⁾.

IV RPE 細胞における血管新生関連因子の発現変化

視細胞を含む網膜外層は本来無血管であり, 外側にある脈絡膜血管からの拡散により栄養されている. 特に視機能の中心である黄斑部は視細胞を含む外層網膜により構成されるため完全な無血管組織である. 網膜の外層にある一層の上皮細胞 RPE は恒常的にさまざまな血管新

生関連因子を発現することで網膜のホメオスタシスを維持していることが知られており²²⁾²³⁾, その中でも, 代表的な血管新生促進因子である血管内皮増殖因子 (VEGF) を恒常的にかつ高濃度に産生しているのにもかかわらず, 異常な血管新生を起こすことなく上記のような網膜のホメオスタシスが維持される. ここで重要な役割をしているのが, RPE から産生され, 神経網膜の栄養因子として注目され, 近年, 強力な血管新生抑制因子でもあることが報告された色素上皮由来因子 (pigment epithelium-derived factor, PEDF) である^{24)~26)}. 生理的状态を模して分化誘導した培養ヒト RPE は, RPE が産生する種々の成長因子の中でも VEGF と, PEDF の両者を高濃度に産生し, 成人の網膜組織でも RPE における恒常的な VEGF, PEDF の産生が確認されている. ま

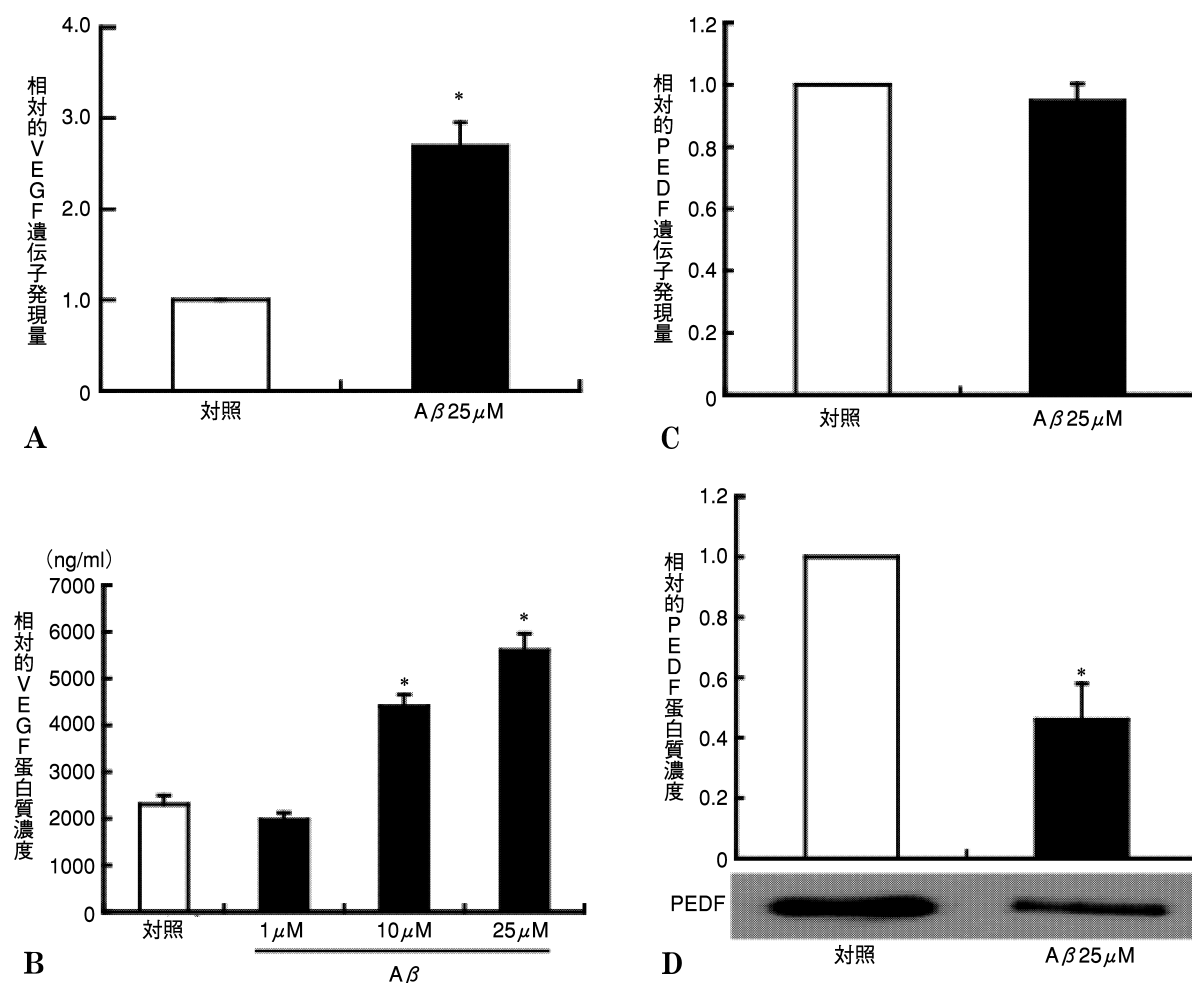


図2 Aβ刺激(25 μM)を受けた培養 RPE 細胞における血管新生関連因子の発現変化。

- A : Aβ 刺激を受けた培養 RPE 細胞の vascular endothelial growth factor (VEGF) 遺伝子発現変化 (real-time PCR).
 B : Aβ 刺激を受けた培養 RPE 細胞の培養上清中における VEGF 蛋白質発現変化 (ELISA 法).
 C : Aβ 刺激を受けた培養 RPE 細胞の pigment epithelium derived factor (PEDF) 遺伝子発現変化 (real-time PCR).
 D : Aβ 刺激を受けた培養 RPE 細胞の培養上清中における PEDF 蛋白質発現変化 (Western blotting 法).
 * : Mann-Whitney U test. $p < 0.05$

た、RPE においては感覚網膜側である apical side に比べ、脈絡膜側である basal side からは、2~7 倍の VEGF 分泌があることから²⁷⁾、生理的に脈絡膜からの血管の侵入を PEDF が防いでいることが予想される。また、Ohno ら²⁸⁾によれば分化誘導した培養 RPE に酸化ストレスとして H₂O₂ を負荷すると、VEGF の発現は高濃度のまま変化しなかったが、PEDF の発現は有意に低下し、さらには、H₂O₂ による酸化ストレス負荷時の RPE 培養上清は、血管内皮細胞の管腔形成を著明に促進することから、生理的状态では RPE は VEGF と PEDF を高濃度に産生し、両者のバランスが保たれているため CNV は生じないが、何らかの病的刺激により RPE における両者のバランスが崩れることが CNV 発生の引き金を引くのではないかというメカニズムを示唆している。このことから RPE における血管新生関連因子発現

変化が AMD における CNV 発症機序を考えるうえで、非常に重要であると考えられている。

そこで我々は RPE における血管新生関連因子の発現変化を誘導する物質として Aβ に注目し、Aβ による RPE における VEGF と PEDF 発現変化について検討した。培養ヒト RPE 細胞を分化誘導した後、Aβ (1~40 : HCl form) を 1~25 μM の濃度に調整した serum free DMEM に培養液を交換、24 時間後に培養上清を採取した。また、Aβ (25 μM) で 24 時間刺激した RPE 細胞はホモジナイズし RNA を抽出した。それらを用いて VEGF と PEDF の遺伝子レベルと蛋白質レベルでの発現変化を検討した。Aβ 刺激による RPE 細胞における VEGF の発現変化は、遺伝子発現を real-time PCR にて検討したところ VEGF 遺伝子は対照に対し有意な発現上昇がみられた (図 2 A)。培養上清中の VEGF 蛋

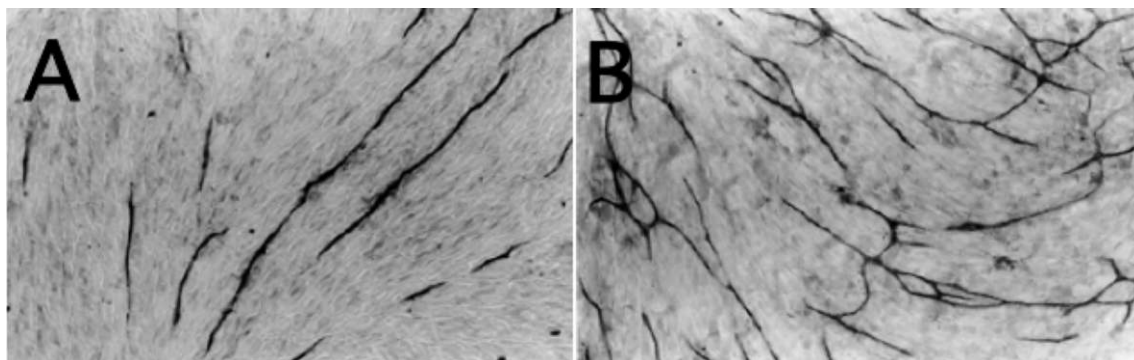


図 3 $A\beta$ 刺激($25\ \mu\text{M}$)をした RPE 細胞培養上清の血管新生効果。

$A\beta$ 刺激をした RPE 細胞培養上清の血管新生効果の検討(B)。ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)と血管線維芽細胞の共培養による血管新生キットを用いた。対照として通常の RPE 細胞培養上清を使用(A)。

白質濃度に関しては ELISA 法にて濃度依存性に有意な発現上昇が認められた(図 2 B)。一方 PEDF では、real-time PCR にて PEDF 遺伝子は対照に比べ有意な変化は認められなかったものの(図 2 C)、 $A\beta$ ($25\ \mu\text{M}$) で刺激した RPE 培養上清中の PEDF 蛋白質濃度は有意に発現が低下していた(図 2 D)。今回の PEDF の発現低下が posttranscriptional レベルである可能性が考えられる²¹⁾。さらに我々は $A\beta$ 刺激を受けた RPE 細胞が実際に血管新生効果を示すかを検討するために、 $A\beta$ ($25\ \mu\text{M}$) 24 時間刺激をした RPE 細胞培養上清を採取し、ヒト臍帯静脈内皮細胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)と血管線維芽細胞の共培養による血管新生キットを用い、 $A\beta$ 刺激をした RPE 細胞培養上清を使用して HUVEC を培養した場合の HUVEC の管腔形成能を検討したところ、 $A\beta$ 刺激を受けない通常の RPE 細胞培養上清を用いて培養した場合(図 3 A)と比べて、著明な HUVEC の管腔形成促進がみられ(図 3 B)、 $A\beta$ 刺激を受けた RPE 細胞は血管新生関連因子の発現変化を惹起し、血管内皮細胞の増殖、遊走が促進されることが明らかになった²¹⁾。

これらのことから、RPE は $A\beta$ により血管新生関連因子の発現変化を引き起こされ、眼内血管新生バランスを促進環境に導き、脈絡膜血管内皮細胞を刺激する可能性が考えられる。

V AMD 動物モデル

近年、monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)ノックアウトマウスの眼球において、ドルーゼンや CNV などの AMD の病態が再現されることが報告された。本マウスにみられたドルーゼン様の沈着物には活性型補体 C5a と免疫グロブリン IgG が蓄積しており、C5a と IgG が RPE における VEGF の発現を亢進させることで CNV 発生を引き起こす可能性を示唆している²⁹⁾。この MCP-1 ノックアウトマウスにおいては、単球の走化性因子である MCP-1 が欠如しているために、

沈着したドルーゼンを通常貪食するマクロファージが誘導されずドルーゼンは除去されないことが推察される。その結果として異常蓄積したドルーゼンが RPE を刺激し、VEGF の発現を上昇させていることが推測できる。また、ヒトドルーゼン中には、活性化された補体 C3a, C5a が含まれており、これらが RPE における VEGF 産生を亢進させること、レーザー照射による CNV モデルマウスにおいて、C3a, C5a の中和抗体を眼内にレーザー照射後投与することにより CNV 発生が有意に抑制されたことが報告されており³⁰⁾、AMD における CNV 発生と MCP-1, マクロファージ, 免疫, 補体などの関与を示唆している。

我々は、 $A\beta$ の分解酵素である neprilysin を遺伝子的に欠損させ、脳内に $A\beta$ を過剰に蓄積させるように遺伝子操作した neprilysin ノックアウトマウス(27 か月齢)の眼球を用いて、眼球の切片を光顕像や電顕像にて観察したところ、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色の光顕像にて RPE 細胞内の空胞形成変化がみられた(図 4 B, D)が、通常の月齢マッチングさせたマウスにおいてはこのような変化はみられなかった(図 4 A, C)。さらに電顕像において詳細に観察したところ、ヒトドルーゼンに類似した basal laminar deposit と basal linear deposit の蓄積(図 5 C 矢印)と、RPE 細胞内における空胞形成(図 5 A 矢印)、細胞間の空隙形成(図 5 B 矢印)や RPE 細胞自体の萎縮(図 5 A)といったヒト AMD に非常に類似した病態が認められた。また、ドルーゼン様の蓄積物内における $A\beta$ の存在を確認するために、金コロイドを用いた $A\beta$ に対する免疫電顕を行ったところ(図 6 A~C)、ドルーゼン様の蓄積物内に多くの $A\beta$ の存在が確認された(図 6 C)。光顕にて neprilysin ノックアウトマウス(27 か月齢)の眼球を用い、VEGF と PEDF の各免疫染色を行ったところ、RPE における VEGF の発現上昇と PEDF の発現低下といった血管新生因子の血管新生促進方向への発現変化がみられた(図 7 A~D)。以上の結果は neprilysin ノックアウトマウス

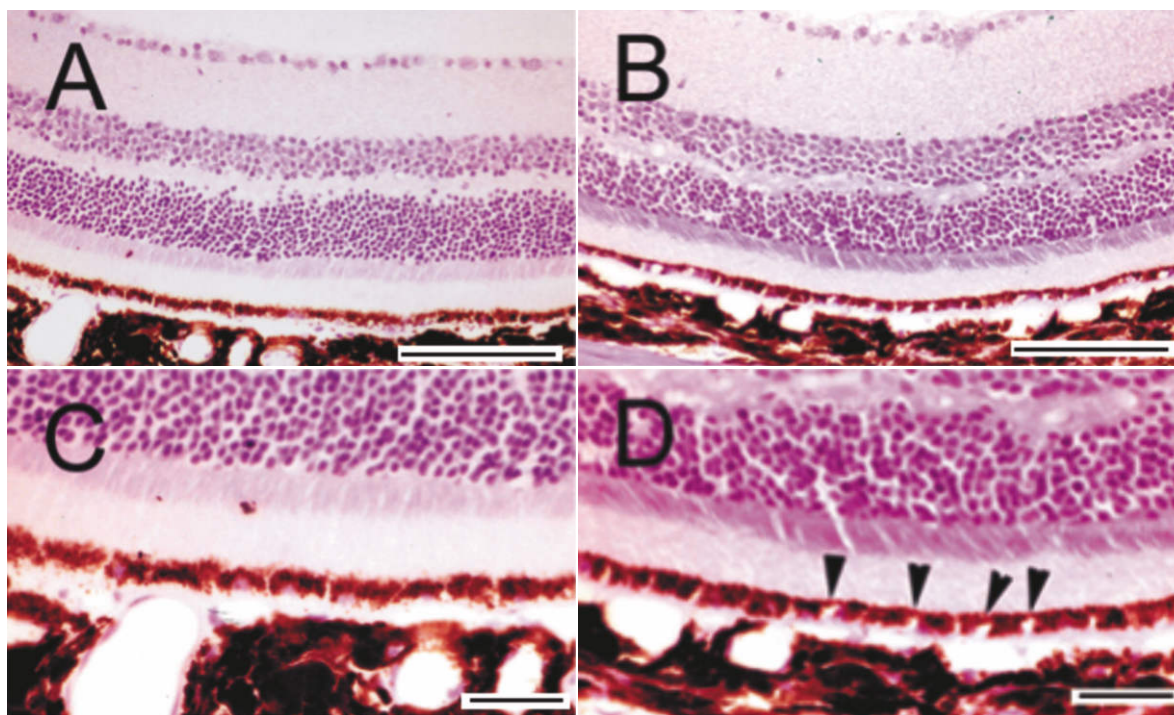


図 4 neprilysin ノックアウトマウス(27 か月齢)における眼球切片のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色.

A, C : 月齢マッチングさせた対照.

B, D : neprilysin ノックアウトマウス(27 か月齢). RPE 内には多くの空胞形成(矢頭)がみられる.

C と D はそれぞれ A と B の拡大画像.

バーは A と B が 150 μm , C と D が 30 μm . (文献 21 より転載, 一部改変)

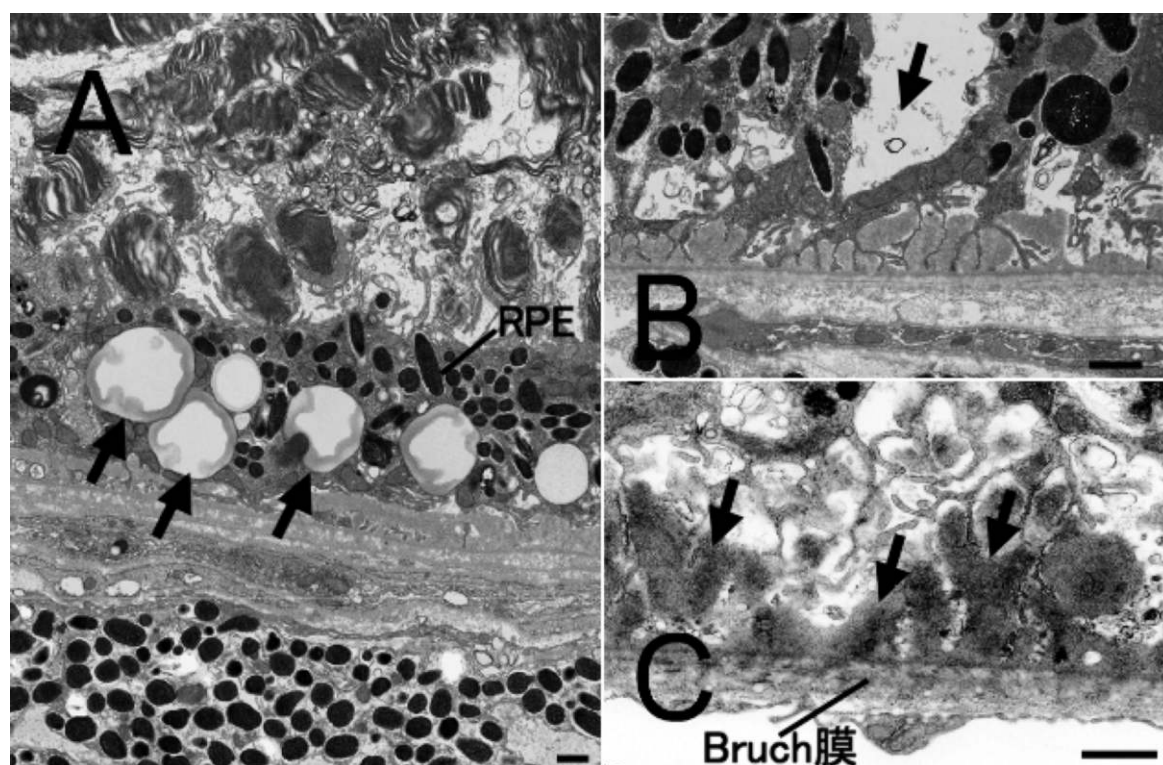


図 5 neprilysin ノックアウトマウス(27 か月齢)眼球切片における電顕所見.

A : RPE 細胞内に空胞形成を認める(矢印).

B : RPE 細胞間の結合の破綻を認める(矢印).

C : RPE 下に蓄積した細胞外沈着物(矢印)はヒトドレーゼンにおける basal laminar deposit と basal linear deposit に類似している. Bruch 膜は健全性が保たれている.

各バーは 1 μm . (文献 21 より転載, 一部改変)

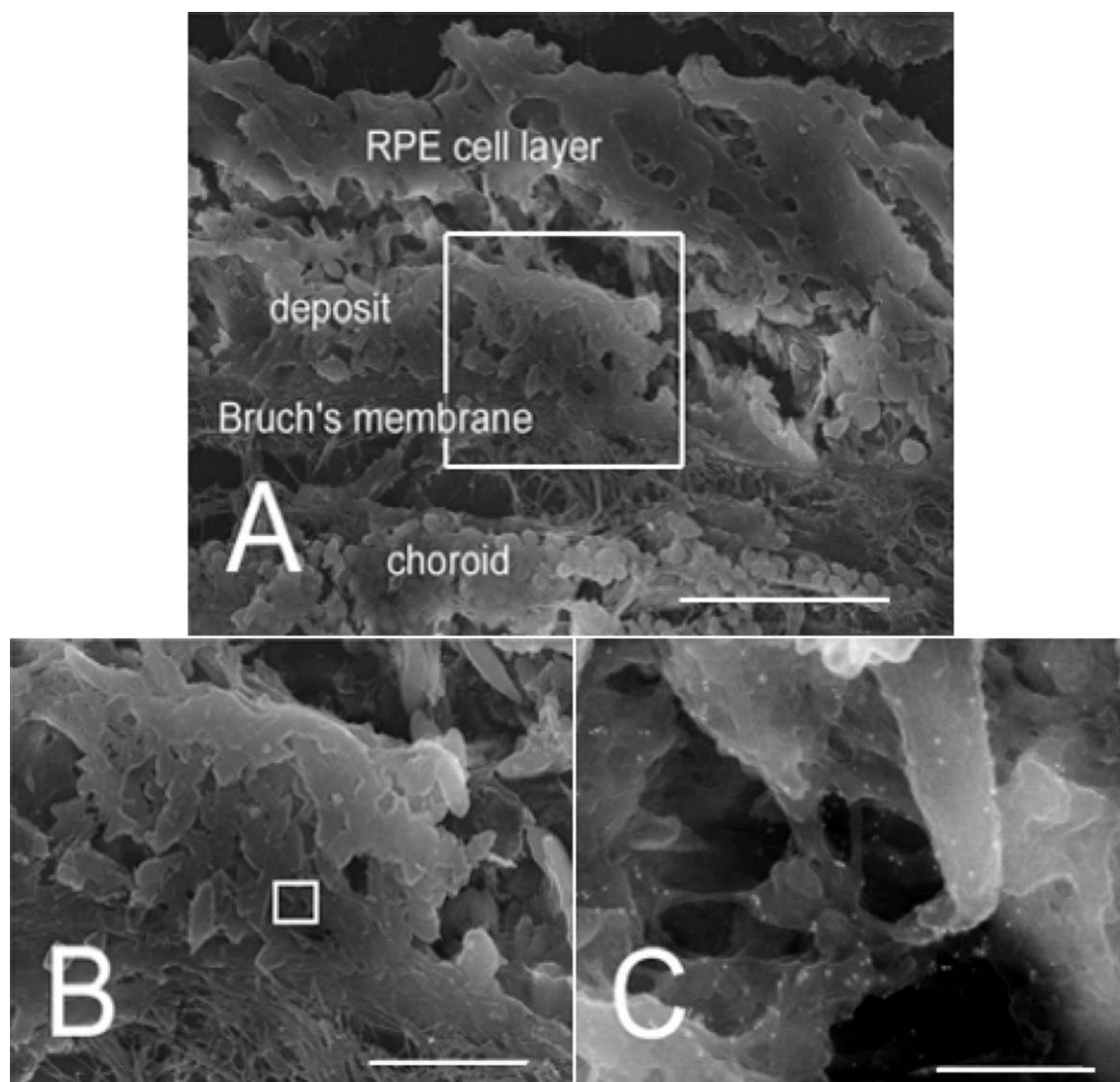


図 6 neprilysin ノックアウトマウス (27 か月齢) 眼球切片における $A\beta$ 免疫電顕所見。

抗 $A\beta$ 抗体を用いた金コロイドによる免疫電顕画像。RPE 下のドルーゼン様の細胞外沈着物内に $A\beta$ の沈着を認める。B は A の強拡大, C は B の強拡大を示す。

バーは A : 10 μm B : 3.6 μm C : 360 nm. (文献 21 より転載, 一部改変)

の眼球は、ヒト AMD に類似した病態を再現でき²¹⁾, neprilysin ノックアウトマウスがヒト AMD の動物モデルとして有用である可能性が示されたとともに、 $A\beta$ が AMD 発生の原因物質として重要であることを示すものである。しかしながら今回の動物モデルでは CNV 発症には至らず、血管新生関連因子の発現変化の他に、さらなる何らかの病的変化が CNV 発症には必要であると考えられる。

VI CNV 発生と Bruch 膜

種々の動物モデルでヒト AMD の病態をある程度再現することができるようになった。しかしながら、RPE の変化に始まり明らかな自然発症的な CNV を再現した報告はこれまでにない。我々の検討した neprilysin ノックアウトマウスにおいても、明らかな CNV は生じていなかった。neprilysin ノックアウトマウスの眼球組織

を詳細に観察したところ、RPE の変性とは対照的に、基底膜である Bruch 膜の健全性は保たれていることが分かった (図 5 C)。RPE の組織特異的に VEGF を過剰発現するトランスジェニックマウスにおいても、脈絡膜内に血管の増生はみられたものの、Bruch 膜を貫く CNV の発生がみられなかった³¹⁾ ことなどから、 $A\beta$ 刺激による RPE における血管新生関連因子の発現変化のみでは CNV 発生には十分でなく、加えて Bruch 膜の障害、脆弱化が必須な要因ではないかと推察される。元々 Bruch 膜は加齢により肥厚し、構成蛋白質の変化により脆弱化することが知られており、この加齢による Bruch 膜の脆弱化が CNV を侵入させやすくすると考えられてきたが、近年の研究からは、加齢に加え、他の要因による Bruch 膜の障害も重要なファクターであろうと考えられている。

近年、AMD 患者における遺伝子解析の結果、補体活

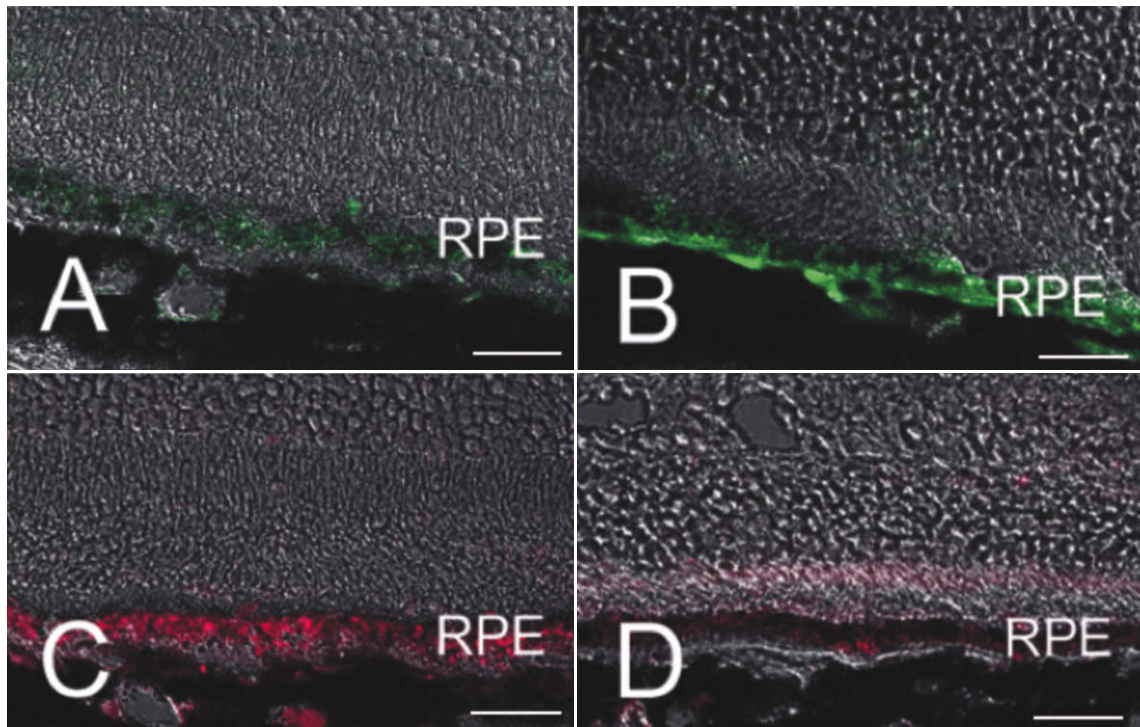


図 7 neprilysin ノックアウトマウス (27 か月齢) 眼球切片における VEGF と PEDF の免疫染色。
neprilysin ノックアウトマウス (27 か月齢) (B, D) と月齢マッチングさせた対照 (A, C)。
RPE における VEGF の発現 [A, B : FITC (緑)] と PEDF の発現 [C, D : Texas Red (赤)]。
バーは 40 μm 。(文献 21 より転載)

性化の代替経路の抑制因子である補体因子 H (complement factor H, CFH)^{32)~34)} や、同じく代替経路の活性化因子である補体因子 B (complement factor B, CFB)³⁵⁾ の一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism, SNP) が AMD 発症に強く関与することが相次いで報告され、CFH の遺伝子変異は補体代替経路の活性化に対する抑制作用を減弱させ、慢性炎症を惹起する可能性が考えられる。また、CFB の遺伝子変異は AMD 発症のリスクを減少させると報告されている。このように AMD 発症には補体活性化の代替経路の関連因子の遺伝子的要因が関与している可能性が示された。このような補体経路の遺伝子多型の結果、無秩序な補体活性化に伴う慢性炎症が生じる可能性が示唆され、生じた慢性炎症によるマクロファージなどの単球や白血球の遊走、Bruch 膜への接着が、Bruch 膜の脆弱化を生じ、CNV が網膜下へ侵入しやすくなる可能性があると考えられる。また、AMD 患者の Bruch 膜や RPE には補体活性化の最終産物である膜攻撃複合体 (membrane attack complex; MAC) が蓄積しており³⁶⁾、MAC 蓄積に伴う Bruch 膜の破綻も CNV 発症に関与する可能性があると考えられる。また、Alzheimer 病を発症した脳内において、 $A\beta$ が種々の補体活性化に関与していることが報告されている³⁷⁾³⁸⁾ が、AMD においても、ドルーゼン内に $A\beta$ とともに、種々の補体蛋白質やその制御因子が共存していること³⁹⁾ などから、ドルーゼン内に異常蓄積した $A\beta$ が補

体活性化に関与している可能性があると考えられる。 $A\beta$ は RPE における血管新生関連因子の発現変化を引き起こす他に、遺伝的背景のもと補体活性化の代替経路に影響を与え、局所的な慢性炎症を惹起することにより、Bruch 膜に障害を与える可能性が考えられる。

またごく最近、HtrA 1 遺伝子の SNP が滲出型 AMD の発症リスクを大幅に増大させることが報告された⁴⁰⁾⁴¹⁾。HtrA 1 蛋白質はセリンプロテアーゼファミリーの一つであり、細胞外基質に影響を与えることが知られている。報告によれば HtrA 1 蛋白質は AMD 患者のドルーゼン中に有意に存在し、かつ AMD 患者の白血球における HtrA 1 遺伝子発現が上昇していた⁴⁰⁾。なお、HtrA 1 による matrix metalloproteinases (MMPs) の活性化を通じて細胞外基質である Bruch 膜の分解に影響を与えることで CNV 発症に関与している可能性が示唆されている。また、Alzheimer 病における脳においても MMPs の活性化がみられ⁴²⁾、実験系においては $A\beta$ が単球系において MMPs の発現を上げることが報告されている⁴³⁾ ことから、 $A\beta$ と HtrA 1, MMPs の関係も非常に興味深い。

このように、RPE における血管新生関連因子の発現変化とともに、補体活性化に伴う慢性炎症や、細胞外基質に影響を与える HtrA 1 の働きにより Bruch 膜の脆弱化が発生し、CNV 発症を誘導するのではないかと我々は推察しているところである。

VII おわりに

AMD における CNV 発症の分子機構の解明はここ数年で飛躍的に進み、特に AMD 患者に対する遺伝子の解析により AMD 発症における補体活性化や HtrA 1 の重要性が示唆された意義は大きく、補体活性化による慢性炎症や HtrA 1 による Bruch 膜の構造変化の結果としての Bruch 膜の脆弱化などの病的変化が AMD における CNV 発症の鍵である可能性があると我々は考えている。

近年では AMD に伴う CNV に対してさまざまな抗血管新生療法が試みられている。しかしながら、これらの治療はすべて CNV 発生後の治療であり、発生後の治療では瘢痕組織が残存し視力障害が残存してしまうことから、今後さらに AMD における CNV 発生の分子メカニズム解明が進み、 $A\beta$ の産生抑制ならびに分解促進、そして沈着抑制や沈着 $A\beta$ のクリアランス、補体系の活性化の抑制といった $A\beta$ や補体を新しい標的とした CNV 発生の予防や根本的治療が可能になる日が、そう遠くないことを我々は信じている。

稿を終えるにあたり、受賞講演の機会を与えて下さいました学術奨励賞選考委員各位、第 111 回日本眼科学会総会長 下村嘉一教授に心より感謝申し上げます。また、ご指導をいただきました東京医科歯科大学 望月 學教授、森田育男教授、大野京子准教授、研究に協力いただきました同大学 市野瀬志津子先生、理化学研究所 西道隆臣先生、岩田修永先生、九州大学 石橋達朗教授、久富智明先生、鶴見大学 佐藤哲二教授、および東京医科歯科大学眼科の大学院生とスタッフに感謝いたします。

文 献

- 1) Sommer A, Tielsch JM, Katz J, Quigley HA, Gottsch JD, Javitt JC, et al : Racial differences in the cause-specific prevalence of blindness in east Baltimore. *N Engl J Med* 325 : 1412—1417, 1991.
- 2) Attebo K, Mitchell P, Smith W : Visual acuity and the causes of visual loss in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 103 : 357—364, 1996.
- 3) VanNewkirk MR, Weih L, McCarty CA, Taylor HR : Cause-specific prevalence of bilateral visual impairment in Victoria, Australia : the Visual Impairment Project. *Ophthalmology* 108 : 960—967, 2001.
- 4) Oshima Y, Ishibashi T, Murata T, Tahara Y, Kiyohara Y, Kubota T : Prevalence of age related maculopathy in a representative Japanese population : the Hisayama study. *Br J Ophthalmol* 85 : 1153—1157, 2001.
- 5) Green WR : Histopathology of age-related macular degeneration. *Mol Vis* 5 : 27, 1999.
- 6) Bird AC, Bresser NM, Bresser SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD, et al : An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol* 39 : 367—374, 1995.
- 7) Smiddy WE, Fine SL : Prognosis of patients with bilateral macular drusen. *Ophthalmology* 91 : 271—277, 1984.
- 8) Ishibashi T, Murata T, Hangai M, Nagai R, Horiuchi S, Lopez PF, et al : Advanced glycation end products in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 116 : 1629—1632, 1998.
- 9) Johnson LV, Leitner WP, Rivest AJ, Staples MK, Radeke MJ, Anderson DH : The Alzheimer's A beta-peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 11830—11835, 2002.
- 10) Dentchev T, Milam AH, Lee VM, Torojanowski JQ, Dunaief JL : Amyloid-beta is found in drusen from some age-related macular degeneration retinas, but not in drusen from normal retinas. *Mol Vis* 9 : 184—190, 2003.
- 11) Anderson DH, Talaga KC, Rivest AJ, Barron E, Hageman GS, Johnson LV : Characterization of beta amyloid assemblies in drusen : the deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 78 : 243—256, 2004.
- 12) Vassar R, Bennett BD, Babu-Kahn S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, et al : Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286 : 735—741, 1999.
- 13) Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, et al : The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 422 : 438—441, 2003.
- 14) Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, et al : Metabolic regulation of brain A β by neprilysin. *Science* 292 : 1550—1552, 2001.
- 15) Iwata N, Takaki Y, Fukami S, Tsubuki S, Saido TC : Region-specific reduction of A beta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging. *J Neurosci Res* 70 : 493—500, 2002.
- 16) Wisniewski T, Ghiso J, Frangione B : Biology of A beta amyloid in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 4 : 313—328, 1997.
- 17) Maat-Schieman ML, van Duinen SG, Rozemuller AJ, Haan J, Poos RA : Association of vascular amyloid beta and cells of the mononuclear

- phagocyte system in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis(Dutch) and Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56 : 273—284, 1997.
- 18) **Yamada M, Itoh Y, Shintaku M, Kawamura J, Jensson O, Thorsteinsson L, et al** : Immune reactions associated with cerebral amyloid angiopathy. *Stroke* 27 : 1155—1162, 1996.
 - 19) **Uchihara T, Akiyama H, kondo H, Ikeda K** : Activated microglial cells are colocalized with perivascular deposits of amyloid-beta protein in Alzheimer's disease brain. *Stroke* 28 : 1948—1950, 1997.
 - 20) **Campochiaro PA, Hackett SF** : Corneal endothelial cell matrix promotes expression of differentiated features of retinal pigmented epithelial cells : implication of laminin and basic fibroblast growth factor as active components. *Exp Eye Res* 57 : 539—547, 1993.
 - 21) **Yoshida T, Ohno-Matsui K, Ichinose S, Sato T, Iwata N, Saido TC, et al** : The potential role of amyloid beta in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *J Clin Invest* 115 : 2793—2800, 2005.
 - 22) **Marmor MF** : Structure, function, and disease of the retinal pigment epithelium, in *The Retinal Pigment Epithelium*. In : Marmor MF, et al (Eds) : Oxford Press, New York, 3—12, 1998.
 - 23) **Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell, JE** : Histology of the Human Eye. In : Hogan MJ : Saunders WB, Philadelphia, 320—392, 1971.
 - 24) **Tombran-Tink J, Chadler GG, Johnson LV** : PEDF : a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res* 53 : 411—414, 1991.
 - 25) **Tombran-Tink J, Johnson LV** : Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30 : 1700—1707, 1989.
 - 26) **Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, et al** : Pigment epithelium-derived factor : a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 285 : 245—248, 1999.
 - 27) **Blaauwgeers HG, Holtkamp GM, Rutten H, Witmer AN, Koolwijk P, Partanen TA, et al** : Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol* 155 : 421—428, 1999.
 - 28) **Ohno-Matsui K, Morita I, Tombran-Tink J, Mrazek D, Onodera M, Mochizuki M, et al** : Novel mechanism for age-related macular degeneration : an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. *J Cell Physiol* 189 : 323—333, 2001.
 - 29) **Ambati J, Ananda A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, et al** : An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med* 9 : 1390—1397, 2003.
 - 30) **Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, Sarma JV, Barnum SR, Lambris JD, et al** : Drusen complement components C3a and C5a promote chorioidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 : 2328—2333, 2006.
 - 31) **Schwesinger C, Yee C, Rohan RM, Jousen AM, Fernandez A, Meyer TN, et al** : Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *Am J Pathol* 158 : 1161—1172, 2001.
 - 32) **Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, et al** : Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308 : 385—389, 2005.
 - 33) **Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, et al** : Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 308 : 419—421, 2005.
 - 34) **Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ, Manning J, Panhusen C, Farrer LA, et al** : Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 308 : 421—424, 2005.
 - 35) **Gold B, Merriam JE, Zernant J, Hancox LS, Yaiber AJ, Gehrs K, et al** : Variation in factor B (BF) and complement component 2(C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet* 38 : 458—462, 2006.
 - 36) **McGeer EG, Klegris A, McGeer PL** : Inflammation, the complement system and the diseases of aging. *Neurobiol Aging* 26 : 94—97, 2005.
 - 37) **Akiyama H, Berger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, et al** : Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21 : 383—421, 2000.
 - 38) **Webster S, Lue LF, Brachova L, Tenner AJ, McGeer PL, Terai K, et al** : Molecular and cellular characterization of the membrane attack complex, C5b-9, in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 18 : 415—421, 1997.
 - 39) **Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LJ, et al** : A common haplotype in the complement regulatory gene factor H(HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 7227—7232, 2005.
 - 40) **Yang Z, Camp NJ, Sun H, Tong Z, Gibbs D, Cameron DJ, et al** : A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science* 314 : 992—993, 2006.
 - 41) **Dewan A, Liu M, Hartman S, Zhang SS, Liu DT, Zhao C, et al** : HTRA1 promoter polymorphism

- in wet age-related macular degeneration. *Science* 314 : 989—992, 2006.
- 42) **Sekine-Aizawa Y, Hama E, Watanabe K, Tsubuki S, Kanai-Azuma M, Kanai Y**, et al : Matrix metalloproteinase(MMP) system in brain : identification and characterization of brain specific MMP highly expressed in cerebellum. *Eur J Neurosci* 13 : 935—948, 2001.
- 43) **Lee EO, Kang JL, Chong YH** : The amyloid-beta peptide suppresses transforming growth factor-beta 1-induced matrix metalloproteinase-2 production via Smad 7 expression in human monocytic THP-1 cells. *J Biol Chem* 280 : 7845—7853, 2005.
-