

論文内容の要旨

申請者氏名 平井 慎一郎

加齢黄斑変性 (Age-related macular degeneration : AMD) は網膜色素上皮 (Retinal pigment epithelium : RPE) の変性を特徴とする不可逆性視力喪失の大きな原因の一つである。病因の一つとしてリポフスチンによる RPE のライソゾーム機能阻害、同時にこれらライソゾームにおけるオートファジー消化プロセスも関与すると考えられている。よって、加齢に伴う疾病においてオートファジーがどのように関与するかを探索することは AMD の病態を理解するうえで大切であり、薬剤ターゲット探索にも貢献しうる。本研究では未だ不明な点の多いヒト RPE 変性の病態を探索するため、ラットで網膜変性を引き起こすことが知られている 2-Phenyl-APB-144 (APB) を用いた網膜変性モデルの有用性に関して明らかとすることを試みた。

その結果、ヒト網膜色素上皮細胞株 (ARPE-19) に対して APB は時間及び濃度依存的な細胞障害性を示し、細胞内 pH を上昇させた。APB および Bafilomycin はライソゾーム含有酵素のプロカテプシンのカテプシンへの転換を阻害した。このように、APB はライソゾーム活性を阻害することで細胞障害性を発揮することが示された。また、ARPE-19 を飢餓条件培養ないしは APB 処理するとオートファジーマーカー LC3-II が増加すること、この際には飢餓条件下で活性化される転写因子 ATF4 の翻訳活性が上昇することも明らかとなった。これらの結果は、APB が、ライソゾーム機能を阻害することによりオートファジー経路不全を引き起こし、その結果細胞を飢餓条件へと導き細胞障害性を発揮することを示している。さらに、各種化合物の APB 誘発細胞死に対する影響を探索したところ、eIF2 α 脱リン酸化阻害剤が有効であることが明らかとなった。このことより、RPE オートファジー不全に対する新しい薬理学的アプローチの可能性が示された。

次に、ラットで APB 経口投与後の RPE に対する毒性発現活性本体を探索すると共に、APB の毒性学的プロファイルを探した。その結果、APB は 40 mg/kg 以下で毒性学的変化を誘発せず、生物学的利用率は 88.3% であった。以上から、APB 未変化体が毒性発現本体であると共に、弱塩基性の物理化学的性質が RPE 障害誘発の原因である可能性が示唆された。これは In vitro での知見を In vivo における考察に用いる妥当性を示すものと考えられた。

最後に APB 誘発ラット網膜変性に対する eIF2 α 脱リン酸化阻害剤 : Salubrinal の作用を検討した結果、APB 誘発の網膜電位減弱および網膜血管関門透過性の破綻は Salubrinal により保護されることが明らかとなった。

以上のように、本研究は APB による網膜色素上皮のオートファジー不全と飢餓状態の誘発による ATF4 翻訳活性の上昇などの分子機構を初めて明らかにすると共に、eIF2 α 脱リン酸化阻害剤が本障害に対し有効な治療標的である可能性を示した。本研究成果は AMD におけるオートファジー関連病理を RPE 細胞株並びにラットにおいて再現し得ることを初めて示すことができ、今後の AMD をはじめとする網膜症治療薬の探索に活用されることが期待される。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 平井 慎一郎

加齢黄斑変性 (Age-related macular degeneration : AMD) は光および映像に対して非常に鋭敏な網膜の黄斑 (Macula) と呼ばれる領域内の網膜色素上皮 (Retinal pigment epithelium : RPE) の変性を特徴とする不可逆性視力喪失の大きな原因の一つである。全世界では約 1 億 2000 万人が罹患する本疾患に対して未だ有効な治療薬は存在せず、新薬の登場が切に望まれている。AMD にはドライ型およびウェット型と呼ばれる 2 種類の病型があり、ドライ型が全体の約 90% を占めると考えられている。ウェット型に対しては抗 VEGF (Vascular endothelial growth factor : 血管内皮細胞成長因子) 抗体の眼球硝子体内注射が治療法として存在し、急激な視力喪失を防ぐ有効な手段であるものの、あくまでも一時的な病態進行抑制のために視力喪失を回避することはできず、根本治療とはなり得ていない。一方で、ドライ型 AMD には未だ有効な治療薬が存在しないと共に、新薬を見出すための簡便且つ病態を反映した動物モデルは未だ見出されていない。

そこで申請者は、ラットにおいて RPE を障害し網膜症を引き起こすことが報告されている化学物質 2-Phenyl-APB-144 (APB) に着目し、APB によって引き起こされる RPE 機能障害のメカニズムと AMD 病態との類似性を探求すると共にこれの AMD 病態モデルとしての応用可能性について検討を行った。まず申請者は、ヒト網膜色素上皮細胞株 (ARPE-19) に対して APB は細胞内 pH を上昇させ、ライソゾーム含有酵素のプロカテプシンからカテプシンへの転換を阻害することを見出した。また、ARPE-19 を飢餓条件培養ないしは APB 処理した際にオートファジーマーカーである LC3-II の増加することや転写因子 ATF4 の翻訳活性が上昇することが明らかとなり、APB は飢餓条件下と同様にライソゾーム機能障害に追従してオートファジー経路を阻害することを見出した。このようなライソゾーム機能障害やオートファジー経路の障害はヒト AMD 病態においても報告されており、APB によって引き起こされる病態と初めてその類似性が明らかとなった。

続いて、申請者は APB 誘発ラット網膜症モデルにおいて、eIF2 α 脱リン酸化阻害剤である Salubrinal が顕著な保護作用を示すことを電気生理学的並びに病理組織学的検討により見出した。この保護作用は APB による ARPE-19 細胞死に対しても見いだされた。以上から本網膜症モデルは APB による RPE 障害と Salubrinal による保護効果を細胞レベル及び生体レベルの双方において検証可能であったことから、新薬創出の為に有用であることを申請者は明らかとした。

以上のように、本論文は APB 誘発網膜症モデルの分子メカニズムとその AMD 病態との共通性を見出し、新薬創出の為に有用である可能性を新たに見出した点で、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。