

主論文の要旨

Expression of Vascular Endothelial Growth Factor
by Retinal Pigment Epithelial Cells Induced by
Amyloid- β Is Depressed by an Endoplasmic
Reticulum Stress Inhibitor

（アミロイド β により増大する血管内皮増殖因子の発現は
小胞体ストレス阻害剤により抑制される）

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻

頭頸部・感覚器外科学講座 眼科学分野

(指導：寺崎 浩子 教授)

松井 朝子

【緒言】

加齢性黄斑変性症 (AMD) は先進国の中途失明の原因として非常に重要な疾患である。AMD の前駆病変であるドルーゼンは、網膜色素上皮細胞 (RPE) の下に蓄積する沈着物であり、細胞老化に関連する様々な物質が含まれていると報告されている。アルツハイマー病の病因として知られるアミロイドβ (Aβ) もドルーゼンに含まれていると報告されている。Aβ は細胞実験で RPE における血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現を増加させることが実証されている。

小胞体 (ER) は、細胞内の異常な構造を持つタンパク質を除去する役割をもつが、異常なタンパク質が増加するとその細胞は ER ストレス下にあるとされ、小胞体ストレス応答 (UPR) と呼ばれる反応が活性化される。UPR も RPE における VEGF の発現を増加させることが報告されている。

今回我々は、ER ストレスを低減することが知られている 4-フェニルブチル酢酸 (PBA) が、Aβ による RPE での VEGF の発現増加を抑制することができるかを調べた。

【方法】

細胞実験

RPE の細胞株である ARPE-19 細胞を培養し、コンフルエントに達した後、培地を 1,10 または 25 μM Aβ を含む無血清培地に切り替え、24 時間培養した。そこへ、ARPE-19 細胞における Aβ 刺激に対する PBA の防御的役割を調べるため、2.5 mM の PBA を添加して 14 時間培養する群を作り、その後、それらの培地を 2.5 mM PBA および 25 μM Aβ を含む培地へ変更し、さらに 24 時間培養した。

また今回の研究では、生体環境により近い状態を模した極性培養も行った。ARPE-19 細胞をトランスウェルフィルター上 (0.4 μm 孔) のプレコートマトリゲル上で培養し、こちらも通常の培養と同様に、PBA (2.5 mM) による前処理を 14 時間行った後、Aβ (25 μM) および/または PBA (2.5 mM) を ARPE-19 の上側の培地に添加し 24 時間培養した。

酵素免疫測定法

培地中の VEGF 濃度を Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)法を用いて測定した。眼内でドルーゼンが存在するのは RPE の基底側であるため、極性培養実験では RPE の基底膜側の培地中の VEGF 濃度を測定した。

免疫染色

ARPE-19 細胞を培養し、Aβ・PBA 負荷後、ER ストレスのマーカーとして知られる GRP78/Bip の発現を確認する目的で抗 GRP78 抗体を用いて免疫染色した。ER ストレス誘導物質として知られる Tunicamycin も陽性対照として使用して免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。

ウェスタンブロット法

培養したウェルから細胞を回収して煮沸し、遠心分離した後に得られた上清 20 μl

を使用し、ウェスタンブロット法にて caspase12、caspase4、GADD153/CHOP と、対照として GAPDH を検出した。再現性を確認するため、3 回行った。

TUNEL 染色

細胞を 2.5mM の PBA または通常の培地で 14 時間前処理した後、2.5mM PBA 添加、25 μ M A β 添加、25 μ M A β および 2.5 mM PBA を添加し 24 時間した。細胞固定後 In Situ Cell Death kit(Roche)を用いて 1 時間染色し、蛍光顕微鏡にて TUNEL 陽性細胞の数を計算した。ウェル毎に 3 か所で TUNEL 陽性細胞を計測し、その平均数を算出した。

【結果】

VEGF 濃度

通常の培養で VEGF 濃度を測定すると、対照群では 1,257 pg/ml であり、1、10、25 μ M A β を加えると、それぞれ 1340、1755、2345 pg/ml と増加した。一方、25 μ M A β + 2.5 mM PBA 群では、741 pg/ml で、25 μ M A β (PBA なし) 群よりも有意に低下していた。

極性培養細胞では、基底膜側の培地中 VEGF 濃度は、対照群で 612 pg/ml であったのに対し、25 μ M A β 群では 906 pg/ml であったが、2.5mM PBA + 25 μ M A β 群では 559 pg / ml と大幅に減少した。

免疫染色

次に、GRP78/Bip について免疫染色を行うと、25 μ M A β 群は対照群と比較し蛍光強度が有意に増加していた。しかし、25 μ M A β + 2.5 mM PBA 群では、25 μ M A β 群と比較し、蛍光強度は有意に減少した。

ウェスタンブロット法

ER ストレスマーカーである、cleaved caspase4、cleaved caspase12、GADD153/CHOP は、10 μ M および 25 μ M A β 群で増加がみられた。25 μ M A β + 2.5 mM PBA 群では、cleaved casapse12、4 の発現は低下した。また GADD153 / CHOP も A β の添加により増加し、PBA の添加によって減少した。

TUNEL 染色

PBA の将来的な利用を踏まえて、A β と PBA の細胞毒性を確認するために TUNEL 染色を行い陽性細胞 (アポトーシス) の数を計測した。

コントロール群、2.5mM PBA 群に比べると、25 μ M A β 群では、それぞれ TUNEL 陽性細胞の数は 3.86 倍、3.37 倍に増加しており、A β による細胞毒性が示唆された。また、有意差はないものの、25 μ M A β + 2.5 mM PBA 群では、25 μ M A β 群に比べ、TUNEL 陽性細胞の数は減少していた。これらの結果から、PBA は A β によって誘導されるアポトーシスを阻害すること、PBA 自体は強い RPE 毒性を有しないことが示唆され、さらに PBA によってアポトーシスが誘発されたために、VEGF 濃度が減少したのではないと考えられた。

【考察】

ARPE-19 細胞が A β に曝露されると、GRP78/Bip の発現は増加し、caspase4、12 は活性化された。しかし、それらの発現は、PBA への同時曝露によって減少した。通常の培養と極性培養の両方で、A β によって VEGF の発現は増加したが、PBA によって抑制された。また、PBA は RPE のアポトーシスを惹起しなかった。

PBA のみの添加では RPE のアポトーシスは増加しなかったため、VEGF 発現の減少は PBA の毒性によるものではなかったと言える。

GRP78/Bip を含む UPR マーカーのシグナルは、A β 曝露後に著明に増強し、PBA 添加後は減弱していた。これらの結果から、A β に起因する小胞体ストレスが RPE における VEGF の発現を増加させたと考えられた。

CHOP、cleaved caspase12、4 は、ER ストレスによるアポトーシスと炎症に関与することが知られているが、今回、その発現が A β に反応して増加し、PBA の添加によって抑制された。

PBA による ARPE-19 細胞のアポトーシスの有意な増加は見られず、PBA の細胞毒性のために PBA 添加群で VEGF が減少したということは無いようであった。

25 μ M A β 単独曝露群と、25 μ M A β + 2.5 mM PBA 曝露群では TUNEL 陽性細胞の数に有意差は無かったものの、我々の結果からは、PBA が、アポトーシスを増加させることはなく、A β に起因するアポトーシスを阻害した、ということが示唆された。

本研究の結果とこれまでの研究から、ER ストレス阻害剤である PBA は、RPE において ER ストレスによる VEGF の発現を抑えることで、AMD の発症を阻害することができると考えてもよいだろう。

【結論】

培養 ARPE-19 への PBA の添加で、A β に起因する VEGF の発現、ER ストレスマーカーの発現は抑制された。このことから、ER ストレスを標的とする薬剤が、AMD の予防に有効であることが示唆された。