

論文の内容の要旨

論文題目 スフィンゴシン 1-リン酸の脈絡膜真性血管への影響検討

氏名 寺尾 亮

滲出型加齢黄斑変性症 (AMD) は脈絡膜新生血管 (CNV) による網膜出血や漿液性網膜剥離など引き起こす。AMD は加齢、環境因子、遺伝的要因などを含めた様々な因子が AMD 発症の要因と関連があるとされており、特に光線暴露、酸化ストレスなどにより引き起こされると言われている。血管内皮増殖因子 (VEGF) や低酸素誘導因子 (HIF) などを含めた血管新生増殖因子や炎症性サイトカインが CNV 形成に関与していると言われている。しかし AMD 病態の主な原因や CNV の発症機序については未だ解明されていない箇所も多いため、更なる病態解明と治療応用への検討が必要であると考えられる。

S1P は多彩な生理活性を有するリゾリン脂質メディエーターである。S1P は sphingosine kinase (SphK ; SphK1, SphK2) により sphingosine から生成される。S1P のキャリア蛋白には Albumin または apolipoprotein M (ApoM) の 2 種類があり、血液循環内では S1P はそれらのキャリア蛋白に結合している。S1P は G 蛋白共役受容体である S1P 受容体 (S1P1-S1P5) に作用し多彩な細胞機能に関与する。S1P が慢性疾患としての AMD の病態機序に関与しており治療ターゲットの一つとして見込まれているが S1P の詳細な CNV 形成病態機序への関与メカニズムについては明らかにされていない。

本検討の目的は S1P の AMD を始めとした網膜疾患への関与を探ることである。AMD の発症ないし進行させる因子としての S1P の可能性を検討する。具体的には、加齢や様々な網膜ストレスにより S1P が増加していること、そして S1P そのものが血管新生などの CNV 病態形成に関与していることを検証する必要があると考えられる。

はじめに網膜へのストレスとしての光刺激と網膜内 S1P の関連について検証した。in vitro では光刺激が視細胞で S1P の産生酵素を活性化させ、視細胞内 S1P を増加させていた。また in vivo の検討から SphK1, SphK2 は網膜全体に発現するが、光刺激により視細胞外節で SphK1 の発現が上昇するということを発見した。そのメカニズムとしてビジュアルサイクルの中間産物で視細胞や RPE に対し毒性があり、Stargardt 病、AMD を引き起こす all-trans-retinal が視細胞の SphK1 発現を増強させたことから、SphK1 が atRAL の下流シグナルに存在することが示唆された。また S1P は Akt のリン酸化を抑制することで、cleaved caspase-3 を発現させ、S1P は視細胞の Apoptosis を誘導していた。以上の結果から、光刺激が視細胞の SphK1 発現を上昇させ、増加した S1P が視細胞死を引き起こしたと考えられた。in vivo 光誘導網膜障害モデルで SphK 阻害剤の硝子体内投与が LED による網膜内 S1P の上昇を抑制し、かつ網膜障害を形態学的、機能的に抑制していたことから、光刺激により視細胞内の S1P 産生が亢進し、生理的レベルを超えた S1P が視細胞死を誘導すること、SphK 阻害による S1P 産生阻害が光誘導網膜障害の治療としての可能性を有していることが明らかになった。

次章の検討として S1P の網膜色素上皮細胞への作用および CNV 病態形成の関与を検証した。網膜の恒常性維持機能を有している RPE 細胞由来の炎症性サイトカインやケモカイン、血管新生誘導因子が一因として CNV 形成に関与している。生体内では RPE 細胞は細胞間で tight junction を形成しており、網膜内のバリア関門としての重要な blood retinal barrier (BRB) の一部となっている。そのため RPE 機能異常をきたす因子は滲出型 AMD を発症させる要因と考えられている。RPE 細胞に Albumin に溶解し結合させた S1P (Albumin-S1P) を投与したところ、IL-8、C-C motif chemokine-2 などのケモカインや VEGF の発現が増加した。そしてそれらの変化は S1P2 を介していた。S1P/S1P2 の下流に VEGF という血管新生や血管透過性亢進の病態に大きな影響を及ぼす因子や、炎症反応に強く関与するケモカインが存在することが示唆された。また Albumin-S1P は S1P2 および S1P3 を介して HIF-1 α の発現を上昇させた。S1P が低酸素非依存性の HIF-1 α 活性化因子として HIF-1 による細胞応答を制御しており、S1P/S1P2 と S1P/S1P3 ともに HIF-1 α 発現に関与していると考えられた。本章では RPE 細胞間バリア機能に対する影響についても検討した。Albumin-S1P は S1P2 を介して RPE の細胞間接着を有意に減弱させ、バリア破綻を引き起こしていた。この変化は ZO-1 と N-cadherin の細胞間接合部における発現低下、 β -catenin の核内移行誘導によるものと考えられた。また Albumin-S1P による N-cadherin と β -catenin のチロシンリン酸化がみられた。これらの結果から、Albumin-S1P が N-cadherin と β -catenin のチロシンリン酸化により cadherin- β -catenin 複合体解離を引き起こすことで細胞間バリア機能低下と β -catenin の核内移行を生じさせたと考えられた。in vivo ではマウスレーザー誘導 CNV モデルを用いて評価した。その結果、S1P2 が CNV 形成または病的新生血管からの血管漏出に関与していることが明らかになった。これらの検討から、S1P は S1P2、S1P3 を介して CNV 形成を促進させることが明らかになり、特に S1P/S1P2 が滲出型 AMD を含めた網膜内血管新生疾患に関与している可能性があると考えられた。

最後に S1P のキャリア蛋白である ApoM の作用について検討した。近年、Albumin に結合した S1P と ApoM に結合した S1P (ApoM-S1P) は作用が異なると報告されている。特に ApoM は S1P シャペロンとして働き、ApoM-S1P は S1P 受容体への作用選択性が変化し S1P1 に特異的に作用する。本検討で RPE 細胞に ApoM-S1P を投与したところ、血管新生誘導因子やケモカインの発現を上昇させなかったことから、ApoM-S1P は Albumin-S1P とは異なり CNV 形成を促進する因子の発現に関与しないと考えられた。また ApoM-S1P は S1P1 を介して、接合部での ZO-1 発現を制御することで RPE 細胞のバリア機能を増強させていた。更に ApoM 硝子体投与に CNV モデルを有意に抑制する効果が認められたことから、ApoM が CNV 病態に対し抑制作用があることが明らかになった。

本検討を通して、AMD 発症の環境要因としての光線暴露が網膜内で S1P を増大させること、S1P の産生を抑制することでその光線暴露による網膜障害を抑制することを明らかにした。そしてその増加した S1P の RPE や CNV への生理活性作用を評価した。その中で特に血管新生や炎症反応促進、細胞間バリア機能変化作用に焦点を絞り、RPE 細胞内でそれら誘導することで CNV 病態形成に関与することを証明した。更に、S1P シャペロンである ApoM の S1P 受容体選択性

に着目した。ApoM が S1P による RPE 細胞由来の血管新生誘導や炎症反応、バリア機能破綻を抑制し、CNV 形成を抑制することを示した。S1P 受容体特異的阻害ないし ApoM による S1P 制御が CNV を本態とする滲出型加齢黄斑変性症の治療になり得ると考えられた。