



Title	TIMP-3 in Bruch's Membrane : Changes during Aging and Age-related Macular Degeneration
Author(s)	瓶井, 賀弘
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/42879">https://doi.org/10.18910/42879</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	瓶井 賀弘
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第15605号
学位授与年月日	平成12年5月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	TIMP-3 in Bruch's Membrane:Changes during Aging and Age-related Macular Degeneration (ブルッフ膜における TIMP-3: 加齢および加齢性黄斑変性に伴う変化)
論文審査委員	(主査) 教授 田野 保雄
	(副査) 教授 谷口 直之 教授 不二門 尚

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

加齢性黄斑変性は先進国における高齢者失明原因の第1位であり、現在有効な治療法のない難治性疾患である。臨床的には、網膜色素上皮下への多形性物質の蓄積であるドルーゼンを初期症状とし、進行すると網膜下新生血管、網脈絡膜萎縮を生じ、失明に至る。しかし、加齢性黄斑変性の細胞生物学的メカニズムはほとんど解明されていない。

Sorsby 網膜変性症は、加齢性黄斑変性に類似した臨床像を呈する遺伝疾患で、近年、Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-3 (TIMP-3) の点変異によって生じることが判明した。

TIMP-3は、細胞外基質 (extracellular matrix; ECM) を分解する酵素群である Matrix Metalloproteinases (MMPs) に結合し、その活性を抑制する TIMP ファミリーの1つである。生体での役割は完全に解明されていないが、ECM の過剰分解を抑制することによるターンオーパーの制御に加え、新生血管抑制作用があることが報告されている。眼では、主に網膜色素上皮 (RPE) で遺伝子発現が見られ、免疫組織学的には、RPE と脈絡膜の間に位置する Bruch 膜に染色が認められる。Bruch 膜における物質の透過性は、網膜～脈絡膜間の栄養代謝に大きく影響を及ぼしており、その恒常性の維持に携わっていると考えられる TIMP-3も重要な役割を担っている可能性がある。本研究では、黄斑部における TIMP-3の分布、含有量、活性について、正常眼における加齢による変化、および、加齢性黄斑変性眼と同年齢の正常眼との相違を検討した。

#### 〔方法〕

14歳から96歳までの正常献眼36眼と、加齢性黄斑変性眼15眼 (74-98歳) を用いた。黄斑部を含む10x12mm の組織を眼球より切り出し、そのうち、中心窓を含む2mm 幅の組織を免疫組織学的検討に用い、残りの10x10mm の組織から RPE と Bruch 膜、脈絡膜を単離し、可溶性物質の抽出を行なった。

免疫組織学的検討は、未固定凍結切片を抗ヒト TIMP-3モノクローナル抗体と反応させ、アビジン-ビオチン複合体法を用い、aminoethylcarbasol による深赤色の発色で判定した。

生化学的検討として、上記抗体を用いた Western Blot 法による TIMP-3の定量、および、MMP とその基質となるゼラチンを含む SDS ゲルを用いた電気泳動である reverse zymography による MMP 抑制活性の定量を行なった。定量は、一定量の組換え TIMP-3蛋白をコントロールとして用い、バンドとして表れる結果をコンピュータを用いて

画像処理し、比較算出した。

#### 〔成績〕

正常眼では、TIMP-3は Bruch 膜に一様に分布しており、50歳以上の眼で著明な染色が見られた。特に、80,90歳代では、脈絡膜毛細血管板の周囲へも指状の伸展が見られた。定量検討でも、TIMP-3の含有量は、92ng/cm<sup>2</sup>から1061ng/cm<sup>2</sup>までの範囲に渡っており、年齢とともに増加していた ( $r=0.66$ )。活性は含有量と有意に相関していた ( $r=0.82$ )。加齢性黄斑変性眼では、ドルーゼンの見られる領域に多量に分布し、RPE の萎縮の見られる領域ではほとんど欠失していた。加齢性黄斑変性眼に含まれる TIMP-3量は、同年齢の正常眼に比べ、有意に上昇していた (877mg/cm<sup>2</sup>対577mg/cm<sup>2</sup>;  $P=0.009$ )。MMP 抑制活性も、正常眼に比べ、有意に上昇していた ( $P<0.001$ )。

#### 〔総括〕

TIMP-3は、黄斑部 Bruch 膜において、正常の加齢に伴い増加する蛋白であることが判った。このことは、TIMP-3が加齢に伴う黄斑部疾患に関与している可能性を示唆する。加齢性黄斑変性では、同年齢の正常眼に比べ、TIMP-3及び活性は有意に上昇しており、加齢性黄斑変性で見られる Bruch 膜の肥厚に関与している可能性があると推測された。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、黄斑部における tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) の分布、含有量、活性について、正常眼における加齢による変化、および、加齢黄斑変性における変化を同年齢の正常眼と比較し、検討したものである。分布は免疫組織化学にて検討し、正常眼ではブルッフ膜に一様に分布し、年齢と共にその染色が高度になることを示された。含有量、および活性は生化学的手法を用いて定量し、両者ともに加齢にしたがって増加し、年齢との間に高い相関が示された。加齢黄斑変性眼では、肥厚したブルッフ膜に強い染色を認め、特にその初期病変とされるドルーゼンに集積が見られた。同年齢の正常眼に比べ、TIMP-3含有量は有意に上昇しており、活性は約 2 倍に上昇していることが示された。これらの結果は、TIMP-3が黄斑部ブルッフ膜において、加齢に伴い増加する加齢関連蛋白であることを明らかにし、TIMP-3が加齢黄斑変性の発症に関与している可能性を示唆しており、先進国における高齢者失明の第1原因である加齢黄斑変性のメカニズムを解明する一助となるものと考えられ、学位論文に値するものと認める。