



Title	眼における $A\beta$ 発現量の評価と AMD 病態解明への導入
Author(s)	
Citation	令和3（2021）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書．2022
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/85610
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

令和3年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな氏名	そのだ あやと 園田 彩斗	学部 学科	医学部 保健学科	学年	2 年
ふりがな 共 同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	辻川 元一	所属	医学系研究科保健学専攻 再生発生医学研究室		
研究課題名	眼における A β 発現量の評価と AMD 病態解明への導入				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

【1. 研究背景・目的】

難病にも指定されている加齢黄斑変性症 (AMD) は、欧米においては中途失明原因の第 1 位であり、日本においても罹患者が増えている重要な眼科疾患である。また、生活の西洋化および、高齢者が発症することからも、本邦に於いても有病者数は増加の一途をたどると予想される。AMD は発症メカニズム等解明されておらず、治療は対症的な療法であり、根治治療法が開発されていない。この解決には病因論の解明が極めて重要である

AMD 発症に関連すると考えられているのが、アルツハイマー病発症にも関わるタンパク A β の沈着である。実際に、RPE 細胞の基底層に沈着した drusen から A β が検出され、これが滲出型 AMD 発症時の血管新生に繋がる補体活性に深く関与しているという報告もされている⁽¹⁾⁽²⁾。AMD 発症に関わる因子として、RPE 細胞で発現する *HTRA1* と呼ばれるセリンプロテアーゼの発現と活性も挙げられるが、ここでも A β がこれの発現を促進しているという報告がされている⁽³⁾⁽⁴⁾。本研究では加齢と遺伝要因である *HTRA1* と A β の関連について検討したのちに、その病態に関わる機構について研究を行うこととした。

【2. 研究概要】

今回の研究では、そもそも A β が眼組織、網膜に於いてそもそも存在するのか、他の神経組織等と比較していかなる発現を持つのかを検討した。まず WT-zebrafish (以下 Zf) においてどの程度の A β が発現しているかを「眼」、「脳」、「筋(尾部)」で比較し、さらに彼との関連を調べるためにさらには 4 ヶ月 Zf と 2 年 Zf でどれだけ A β 発現量が変化しているかについても検証した。

本研究で得られる結果は A β 発現にどのような傾向が見られるかを示すことができるとともに、今後検証予定である *HTRA1* ノックアウト Zf における A β 発現量と比較する上でも、有用なデータになると考える。

【3. 研究方法】

今回は A β 前駆体である APPb-202 遺伝子をターゲットとし、これの部位別 RT-qPCR を実施した。まず、RT-qPCR を行う上で必要な mRNA を抽出するために、個々の Zf から眼 (眼球全体)、脳、

筋(尾部)を取り出し、ニッポンジーンの ISOGEN II に浸した後、破碎を行い totalRNA の単離を製造元のプロトコルに従い実施した。単離後は 30 ないし 50mL の RNase フリー水に再懸濁した。

次に、RT-qPCR については、タカラバイオの One Step TB Green® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit を用いて 1step 法で A β 発現量の計測を実施した。この時のプライマー設定について、A β は APP 遺伝子の残基 40 または 42 によって構成されるという特徴も考慮して、その残基部位にいずれかのプライマーが結合するように設定するようにした。よって、今回は以下の塩基配列のプライマーを用いて RT-qPCR を行った (表 1)。計測対象となった Zf の個体数は、4 ヶ月 Zf については n=2、2 年 Zf については N=5 であり、いずれの個体についても複数回 PCR を実施した。解析は、APPb-202 と G3PDH の発現量の相対定量を用いて、結果で得られた外れ値は解析対象から除外した。

(表 1) 今回用いるプライマーの塩基配列

Gene	Forward primer	Reverse primer
APPb-202	5'- ATGTTCTCGCGGAGGACAT -3'	5'- GTTCTGCATTTGCTCAAAGA -3'
G3PDH	5'- GTGGAGTCTACTGGTGTCTTC -3'	5'- GTGCAGGAGGCATTGCTTACA -3'

【4. 研究結果】

まず、組織別に発現量の比較を行ったところ、4 ヶ月 Zf、2 年 Zf 共に筋系に比べて神経系での A β 発現量が多く、神経系の中でも脳に比べて眼の方が発現量が多かった。また、いずれの組織においても 4 ヶ月 Zf の方が神経系における発現量が筋系に比べて顕著に高いことが分かり (eye/muscle; 2 年 Zf vs. 4 ヶ月 Zf = 212.775 ± 812.038 vs. 1549.475 ± 1977.372 , $p=0.0235$ / brain/muscle; 2 年 Zf vs. 4 ヶ月 Zf = 65.755 ± 212.372 vs. 245.178 ± 405.102 , $p=0.0122$)、有意とは言えないものの、脳に比べ眼での発現量の方が多いことも示唆された (eye/brain; 2 年 Zf vs. 4 ヶ月 Zf = 1.740 ± 2.856 vs. 10.912 ± 24.344 , $p=0.0828$)。ここで、2 年 Zf と 4 ヶ月 Zf 間での eye/brain 比に有意性を見出せなかった原因として、サンプル数の少なさが一番の原因ではないかと考えている。

2 年 Zf eye/muscle と 4 ヶ月 Zf eye/brain のデータについては、サンプル数が少なかったため、または PCR 精度の問題のためか、統計的に正規性は認められなかったが (2 年 Zf eye/muscle; $p=0.0003$ / 4 ヶ月 Zf eye/brain; $p=0.0034$)、やはり、眼での発現の方が多い傾向にあった (図 1 / 表 2 / 検定は有意差については Mann-Whitney 検定、正規性については Shapiro-Wilk 検定を行った)。つまり、A β の発現は眼球に於いて顕著であると考えられた。

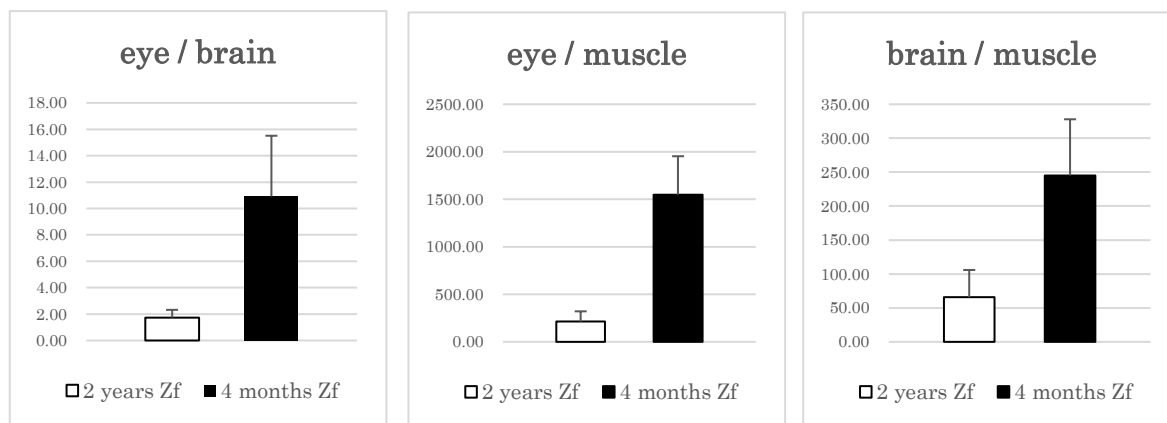


図 1. A β の部位別発現量の比較

表 2	eye / brain		eye / muscle		brain / muscle	
	2 years Zf	4 months Zf	2 years Zf	4 months Zf	2 years Zf	4 months Zf
発現度平均	1.740	10.912	212.775	1549.475	65.755	245.178
標準偏差	1.428	12.172	406.019	988.686	106.186	202.551
標準誤差	0.583	4.601	108.513	403.630	40.134	82.691
P 値	0.608	0.0034	0.0003	0.109	0.782	0.174

次に、組織別に 4 ヶ月 Zf と 2 年 Zf で A β 発現量にどの程度の差があるかを検討したところ、眼において発現量の顕著な低下が見られることが分かった。この結果は予測していたものとは大きく異なるものであり、今後さらなる研究を行っていく必要がある。ただし、今回はデータには正規性を仮定した統計学的検討であり、真に差があるとは断言できないが、データの分布から考えて（あるいは、差の大きさから考えて）この傾向は正しいと考えられる。（図 2／表 3／検定は Shapiro-Wilk 検定を行った）。

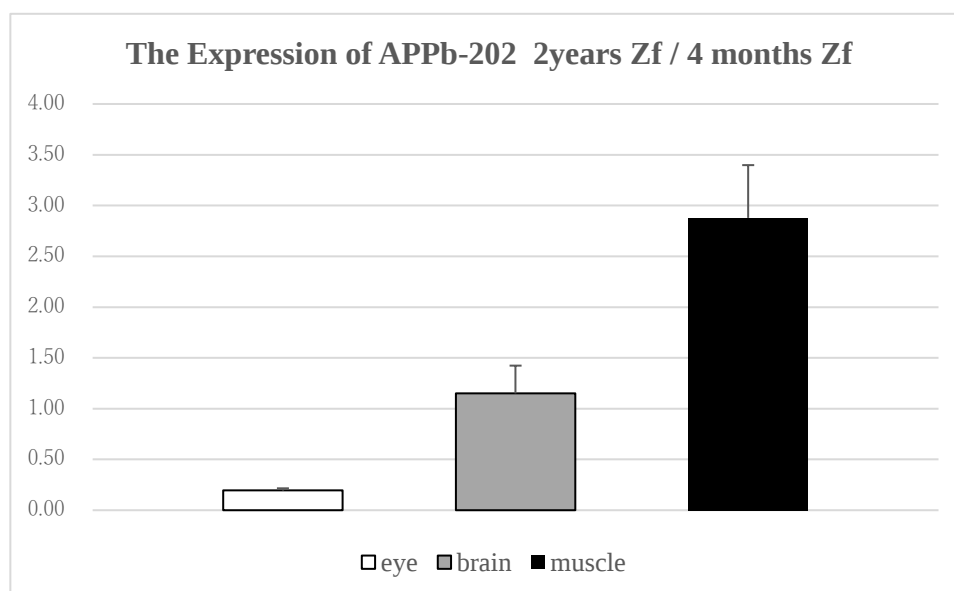


図 2. 4 ヶ月 Zf と 2 年 Zf の A β 発現量の部位別比較

表 3	APPb-202 発現量		
	eye	brain	muscle
発現度平均	0.194	1.151	2.878
標準偏差	0.237	1.832	0.519
標準誤差	0.022	0.273	0.519
P 値	4.014E-14	7.635E-09	1.178E-15

【5. 考察・今後について】

結果で示したように、こういった形の比較のデータはこれまでになく、今後 A β を中心とした病態解明を行っていく上で参考になる結果であると考えられる。加齢による検討についてであるが、脳に於

いては $A\beta$ は加齢により増加していることを考えると、眼で減少してるのは正しいと現在は考えている。この結果は $A\beta$ は AMD に於いては重要ではないことを示唆するのかもしれない。ただし、絶対量は眼の方が多いいことも鑑みて、今後はなぜ $A\beta$ が神経系、特に眼において過剰に発現し、健常体の場合は老化すると発現量が低下していくのかを検証していく必要がある。AMD のヒト生体では $A\beta$ 沈着が多く見られるという報告についてもそもそも発現の絶対量が多いが、加齢には関係がないのかもしれない。今後、次のような仮説と検証法を提示する。

- ・ 老年期になるにつれて、 $A\beta$ 沈着は生体、特に神経系にとって悪影響でしかないため、健常体 Zf においては、APP のアミノ酸配列を残基 42 の部分で切断し $A\beta$ を生成する β -secretase の発現に何らかの抑制がかかっている。または、 $A\beta$ 分解の律速酵素として働いている neprilysin の発現量が増加している可能性がある。これらの仮説を検証するために、今回の実験で行った手法と同様の作業を行い、リアルタイム RT-PCR で発現量を計測していく。
- ・ 実際に老年 Zf の APP、つまり $A\beta$ の発現量は減少しているが、沈着量自体は増加している可能性があり、これが AMD 等神経系疾患の発症に影響を及ぼしている可能性がある。ここで、沈着量増加の原因として深く関わっている物質に $GA\beta$ が挙げられるが、これは柳澤らによって発見された $A\beta$ の沈着を促進させる糖脂質であり、アルツハイマー病治療薬の新規ターゲットとしても現在注目されている⁵⁾。この仮説については、始めに網膜における $A\beta$ 沈着量を免疫組織化学法により、測定比較した後に、 $GA\beta$ の発現量を qPCR により測定することにより、それらデータに相関があるかを検証する。

今後の方針について、まず脳における $A\beta$ 発現量のデータサンプルと 4 ヶ月 WT-Zf の個体数が少ないことから、今後個体数を増やして同じ形で qPCR を行い、今回の研究データにさらに信用性を付け加えていきたいと考えている。また、若年期から老年期にかけて特に眼における $A\beta$ 発現量は対数曲線を描くことが予想されるため、中間期の Wt-Zf についても $A\beta$ 発現量を測定していきたいと考えている。次に、AMD モデルである Rh1::HTRA1 トランスジェニック Zf についても同様に研究を行った後に、先に述べた考察と仮説および、現状予測している AMD 病態経路についても順次研究を進めていく予定である。

本研究では AMD と $A\beta$ 病態の関連性に重きを置いて研究を行っていくが、今回の研究で示されたように、 $A\beta$ ないしその前駆体である APP に関しては、AMD やアルツハイマー病を初めとした疾患に関わらず多くの生体反応経路に関わっているかつ、若年期と成体、老年期でそれぞれ違った働きをしている可能性があるということも示唆される。今回の研究結果はそういった意味で非常に有意義なものではないかと考える。

【参考文献】

- (1) Lincoln V. Johnson, William P. Leitner, Alexander J. Rivest, Michelle K. Staples, Monte J. Radeke, Don H. Anderson. The Alzheimer's $A\beta$ -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration. Proceedings of the National Academy of Sciences Sep 2002, 99 (18) 11830-11835; DOI: 10.1073/pnas.192203399

- (2) Wang J, Ohno-Matsui K, Yoshida T, Shimada N, Ichinose S, Sato T, Mochizuki M, Morita I. Amyloid-beta up-regulates complement factor B in retinal pigment epithelial cells through cytokines released from recruited macrophages/microglia: Another mechanism of complement activation in age-related macular degeneration. *J Cell Physiol.* 2009 Jul;220(1):119-28. doi: 10.1002/jcp.21742. PMID: 19277984.
- (3) Oura Y, Nakamura M, Takigawa T, Fukushima Y, Wakabayashi T, Tsujikawa M, Nishida K. High-Temperature Requirement A 1 Causes Photoreceptor Cell Death in Zebrafish Disease Models. *Am J Pathol.* 2018 Dec;188(12):2729-2744. doi: 10.1016/j.ajpath.2018.08.012. Epub 2018 Sep 29. PMID: 30273602.
- (4) Jiying Wang, Kyoko Ohno-Matsui, Ikuo Morita; Amyloid β enhances expression and activity of HTRA1 in retinal pigment epithelial cells, a mechanism of wet age-related macular degeneration development from drusen. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013;54(15):335.
- (5) Yanagisawa, K., Odaka, A., Suzuki, N. et al. GM1 ganglioside-bound amyloid β -protein (A β): A possible form of preamyloid in Alzheimer's disease. *Nat Med* 1, 1062–1066 (1995). <https://doi.org/10.1038/nm1095-1062>