

## 論文の内容の要旨

論文提出者氏名	田中正明
論文審査担当者	主査 菅野 祐幸 教授 副査 樋口 京一 教授 ・ 田淵 克彦 教授
論文題目 Adrenomedullin-RAMP2 system ameliorates subretinal fibrosis by suppressing epithelial-mesenchymal transition in age-related macular degeneration (アドレノメデュリン-RAMP2系は、加齢黄斑変性において上皮間葉転換を抑制し、網膜下線維化を改善する)	
(論文の内容の要旨) 〔背景と目的〕 加齢黄斑変性(age-related macular degeneration : AMD)は失明原因の上位を占める眼疾患である。滲出型 AMD は、脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization : CNV)からの滲出液の漏出や、血管破綻による網膜出血により視力障害を引き起こす。CNV の形成には、vascular endothelial growth factor (VEGF)が重要な役割を果たしていると考えられている。このため、現在 AMD の治療としては、抗 VEGF 薬の硝子体投与が主に行われている。しかしながら、抗 VEGF 薬療法を繰り返すことで網膜下線維化を引き起こし、滲出性変化とは異なる不可逆的な視力障害をきたす症例が存在する。我々は多彩な生理活性を有するペプチドであるアドレノメデュリン(AM)と、その受容体活性調節タンパクである RAMP2 に着目した。AM-RAMP2 系には、抗炎症作用、抗線維化作用、臓器保護作用などが報告されている。本研究では、AMD における AM-RAMP2 系の病態生理学的意義、特に網膜下線維化や上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition : EMT)に対する影響に注目して検討を行った。 〔材料および方法〕 1) 9-12 週齢雄の野生型(WT)マウスおよび AM、RAMP2 のヘテロノックアウト(KO)マウスを用いた。AMD の生体モデルであるレーザー誘導脈絡膜新生血管(laser-induced choroidal neovascularization : LI-CNV)をマウス眼へ誘導し、7 日後に眼球を摘出して脈絡膜展開標本を作成した。免疫染色を行い、CNV や線維化の面積、マクロファージ浸潤を評価した。また、LI-CNV 誘導マウスに対して、AM あるいは PBS の硝子体注射による影響を検討した。 2) LI-CNV 誘導マウスに対して、浸透圧ポンプを用いて AM あるいは PBS を持続投与し、14 日目の脈絡膜サンプルを用いてアレイアッセイを行い、線維化関連因子の発現を網羅的に評価した。 3) ヒト網膜色素上皮細胞(ARPE19)に対して、TGF- $\beta$ +TNF- $\alpha$ の 48 時間刺激を行い、EMT を誘導した。AM 投与の有無による EMT への影響を、上皮系マーカー(ZO-1)や間葉系マーカー(SM22 $\alpha$ )を指標にし、免疫染色およびリアルタイム PCR にて検討した。 4) TGF- $\beta$ 阻害剤(SB431542)、あるいは CXCR4 阻害剤(Plerixafor)を、LI-CNV 誘導した RAMP2KO マウスと WT マウスへ投与し、CNV と線維化面積におよぼす影響を検討した。 5) 網膜下線維化における TGF- $\beta$ -RhoA-ROCK1-CXCR4 経路の関与と、AM-RAMP2 系との関連を検討するため、レーザー処置した RAMP2 KO マウスと WT マウスの脈絡膜において、免疫染色やリアルタイム PCR によって RhoA, ROCK1 の発現を検討した。さらに ROCK1, CXCR4 遺伝子発現に対する、SB431542, ROCK1 阻害剤(Y27632)の投与の影響を検討した。	

〔結果〕

- 1) AM、RAMP2 KO マウスでは、WT マウスと比較して CNV は拡大し、網膜下線維化、マクロファージ浸潤の悪化を認めた。反対に、LI-CNV を誘導したマウスに AM を硝子体投与したところ、CNV の縮小、網膜下線維化、マクロファージ浸潤の改善を認めた。
- 2) LI-CNV を誘導した脈絡膜では、TGF- $\beta$ 、CXCR4、CTGF、THBS1 などの線維化関連因子の発現が上昇したが、AM 投与により低下した。
- 3) TGF- $\beta$ +TNF- $\alpha$  刺激は、ARPE19 において EMT を誘導し、上皮系マーカーの発現減少と間葉系マーカーの発現亢進をもたらしたが、AM の投与によりそれらは抑制された。また、AM の投与は、EMT を誘導した ARPE19 において、TGF- $\beta$ 、RhoA、ROCK1、CXCR4 の遺伝子発現を抑制した。
- 4) LI-CNV モデルにおける SB431542、Plerixafor の投与によって、RAMP2 WT マウスと KO マウスの間でみられた CNV と網膜下面積の差は消失した。
- 5) RAMP2 $\pm$ マウスでは、LI-CNV モデルにおいて、脈絡膜の RhoA、ROCK1 の発現亢進を認めた。SB431542、あるいは ROCK1 阻害剤 (Y27632) を投与すると、脈絡膜における RhoA、ROCK1 の遺伝子発現は低下した。

〔結論〕

AM-RAMP2 系は、TGF- $\beta$ -RhoA-ROCK1-CXCR4 経路を介する EMT を抑制することで、LI-CNV における網膜下線維化を改善する。AM-RAMP2 系は、AMD における網膜下線維化に対して、有望な治療標的になることが期待される。