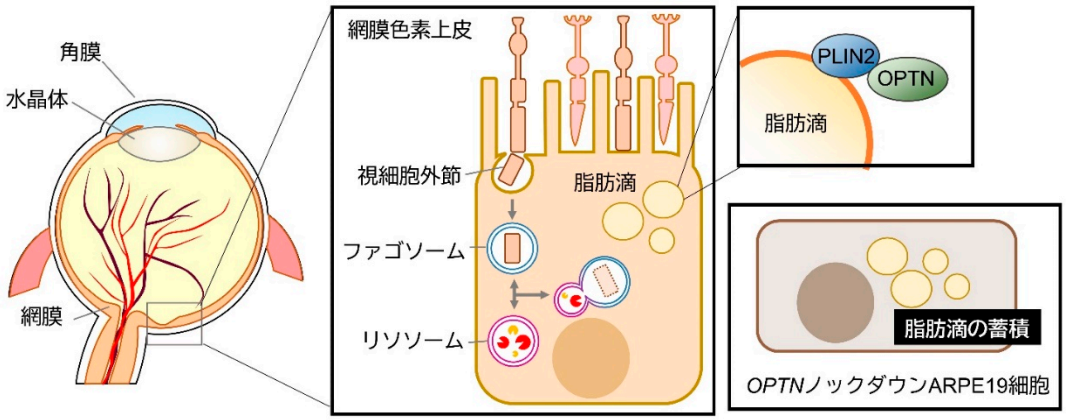
106　網膜における加齢性脂質蓄積の分子メカニズムの解明	大津　航

【目的】加齢黄斑変性は、加齢とともに黄斑の障害が不可逆的に進行し失明に至る網膜変性疾患であり、高齢化に伴う世界的な増加から、高齢者の QOL 維持の大きな課題となっている。加齢に加え、高脂血症や喫煙などが関与する多因子疾患として知られるが、その病態メカニズムについては未だ完全には明らかになっておらず、治療法開発の妨げになっている。網膜色素上皮（RPE）における脂質成分の蓄積は、加齢黄斑変性の病理学的特徴の一つであり、高齢マウスやモデルマウスにおいても RPE における脂質滴の蓄積が認められることが報告されている。本研究では、RPE における脂質の蓄積の分子基盤の解明を目的に、脂質滴マーカーであるペリリピン 2（PLIN2）とオートファジー受容体であるオプチニューリン（OPTN）との相互作用に着目し、RPE におけるその役割について調査した。

【方法】ヒト OPTN およびヒト PLIN2 の蛍光タンパク質タグ付加発現ベクターと、*OPTN* 遺伝子に対する shRNA（OPTN-sh）による発現抑制ベクターを作製した。ヒト網膜色素上皮細胞由来株である ARPE19 細胞を用い、Neon NxT エレクトロポレーション を用いてこれらのプラスミドベクターの遺伝子導入を行った。脂質滴は Lipi-Green で染色して検出した。マウスの網膜色素上皮への遺伝子導入については妊娠 14.5 日目の Slc:ICR マウスを用い、既報（Otsu *et al.*, 2019, *J. Neurosci.*; doi: 10.1523/JNEUROSCI.2811-18.2019）に基づいて実施した。動物は生後 21 日に眼球を採取し、固定網膜を免疫染色に供した。画像はオリンパス社の共焦点顕微鏡 FV3000 で取得した。

【結果】ARPE19 細胞に発現させた PLIN2 と OPTN は空胞様の構造の表面で共局在し、細胞可溶化物を用いた実験によりこれらの共免疫沈降が認められた。shRNA 発現ベクターによる *OPTN* 遺伝子発現抑制により Lipi-Green により染色される脂肪滴の核近傍における集積が増加した。PLIN2 に pH 感受性緑色蛍光タンパク質（pHluorin）と赤色蛍光タンパク質（mCherry）を共に付加したレポーターを ARPE19 細胞で発現させたところ、OPTN の発現を抑制した細胞では pHluorin と mCherry の両方の蛍光（黄色）による空胞様の典型的な脂質滴構造に加え、mCherry の蛍光（赤色）のみを示す球状の構造が観察され、PLIN2 がオートリソソームのような酸性小器官に蓄積していることが示唆された。マウスの網膜色素上皮に発現させた OPTN のシグナルは PLIN2 陽性の点状の構造と部分的に重なって観察された。以上の結果から、網膜色素上皮細胞における脂質滴の形態や分解に OPTN が関与しており、OPTN の関わる選択的オートファジーは網膜の脂質代謝に重要な役割を果たしていると考えられる。

網膜色素上皮細胞の脂肪滴上におけるオプチニューリン（OPTN）とペリリピン 2（PLIN2）の相互作用



106. 網膜における加齢性脂質蓄積の分子メカニズムの解明

大津　航

岐阜薬科大学 バイオメディカルリサーチ寄附講座

Key words：網膜色素上皮，加齢黄斑変性，脂肪滴，オートファジー，オプチニューリン

緒　言

加齢黄斑変性は、加齢とともに黄斑の障害が不可逆的に進行し失明に至る網膜変性疾患である。高齢化に伴い世界的に増加傾向にあり、高齢者の視力維持と健康寿命の延長の大きな課題となっている。本邦をはじめ東アジアでは加齢黄斑変性は滲出型の患者が多数を占め、それらに対しては抗 VEGF 薬が有効である。また重度の患者に対しては iPS 由来 RPE シートの移植が試みられるなどの新しい治療法の開発が進められている。一方で、世界的には萎縮型患者の割合の方が多く、それらに対しては治療法が乏しいのが現状である。加齢に加え、遺伝的要因と高脂血症、高血圧、喫煙、過剰な光の曝露など環境因子が関与する多因子疾患として知られるが、その病態進行の分子メカニズムについては未だ多くは明らかになっていない。加齢黄斑変性は病態進行に伴い、網膜色素上皮の近傍でドルーゼンと呼ばれる脂質を含む沈着物や不溶性色素（リポフスチン）の蓄積が認められる。網膜色素上皮は、レチノイドサイクルなど視細胞への栄養供給と不要物の処理を担っており、その機能破綻がドルーゼンのような沈着物の蓄積となって現れ、加齢黄斑変性の病態進行に至ると考えられている。高齢マウスの網膜色素上皮においては脂肪滴の沈着が認められ、それらが網膜色素上皮の重要な役割の一つである貪食能を低下させることが明らかとなっている［1］。また、萎縮型加齢黄斑変性様モデルマウスの網膜色素上皮においては、脂質成分の沈着などの前駆病変に加え、オートファジーの蓄積の他、脂肪滴のマーカータンパク質として知られるペリリピン 2（PLIN2）のシグナルの増加が報告されている［2］。マウスモデルで認められるこのような脂肪滴マーカーの発現増大は、脂肪滴の形成と分解のバランスの破綻を示唆している。また、オートファジーによる選択的な脂肪滴の分解機構としてリポファジーが知られており、近年病態との関わりが注目を集めている［3］。網膜色素上皮の視細胞外節のファゴサイトーシスには、オートファジー関連因子 LC3 が関与することが知られているが、最近になって LC3 と選択的オートファジー受容体の一つとしてオプチニューリン（OPTN）の相互作用がファゴソームの成熟に重要な役割を果たすことが明らかとなった［4, 5］。そこで本研究では網膜色素上皮における脂肪滴の選択的な分解機構リポファジーにおける PLIN2 と OPTN の関与とその役割について明らかにすることを目的に調査を実施した。

方　法

1. 実験材料

ARPE19 細胞由来の cDNA ライブラリーからヒト *OPTN* 遺伝子のコーディング領域［Gene ID：NM_001008211］を PCR にて増幅し、pCAGIG を背景とするプラスミドベクターにクローニングした。ヒト *PLIN2* 遺伝子は、pEGFP-C1-ADRP（Addgene、Plasmid#87161）より PCR にて増幅して同様に発現ベクターを作製した。*OPTN* 遺伝子に対する shRNA 発現ベクターは既報［6］に基づいて対象となる配列（OPTN-sh#1：5’-GGGCAGTGCTGAAGGAACTGA-G-3’、OPTN-sh#2：5’-GGGCATCGTGTCTGAACTGCAG-3’）からオリゴを設計し、作製した。

2. 細胞培養

ヒト由来網膜色素上皮細胞株（ARPE19、Cat#CRL-2302）は American Type Culture Collection より購入し、既報［1］にも基づいて培養と継代操作、Lipi-Green（同仁化学研究所）による脂肪滴染色を行った。遺伝子導入は Neon NxT エレクトロポレーションシステム-10μL（Thermo Fisher Scientific）を用い、マニュアルに従い 1μg のプラスミド DNA と 100,000 細胞を混合した細胞混濁液に対し、1,350 V、20 ms、2 pulses の条件でエレクトロポレーションを実施した。生細胞観察はオリンパス社の FV3000 レーザー走査型顕微鏡にステージトップインキュベーター（東海ヒット）を設置し、37℃, 5%CO_2の条件下で経時的に画像を取得し、解析を行った。

3. 免疫沈降法と免疫蛍光染色

35 mm ディッシュに遺伝子導入した ARPE19 細胞を播種し、24 時間培養後、細胞を RIPA バッファーで回収し、4℃にて 12,000×g で 20 分間遠心分離し、分離後の上清をタンパク質抽出液として回収した。BCA protein assay kit を用いてタンパク質濃度を定量し、200μg のタンパク質溶液に対し 1μL の抗 GFP 抗体（MBL、#598）を 1 時間氷上で反応させた後に、25μL のプロテイン G-マグネティックビーズ（MBL、MJS002V2）を添加し、4℃にて一晩反応させた。RIPA バッファーにて 3 回洗浄後、2×サンプルバッファーをビーズに添加し 70℃にて 5 分間加温し、結合タンパク質を溶出し、既報［7］に基づいて電気泳動、転写および検出を行った。免疫蛍光染色については既報［7］に基づいて実施した。

4. マウス子宮内エレクトロポレーションと免疫組織染色

マウスの網膜色素上皮への遺伝子導入については、妊娠 14.5 日目の Slc:ICR マウスを用い、既報［8］を基に一部改変して実施した。動物は生後 21 日に眼球を採取し、固定網膜を免疫染色に供した。画像はオリンパス社の FV3000 レーザー走査型顕微鏡にて取得した。

結果および考察

1. ARPE19 の脂肪滴形成における OPTN タンパク質の関与

PLIN2 と OPTN の相互作用について調べるために、ARPE19 細胞に GFP 付加 OPTN（OPTN-GFP）と mCherry 付加 PLIN2（mCh-PLIN2）を共発現させたところ、OPTN-GFP と mCh-PLIN2 は空胞様の構造の辺縁において一部共局在が認められた。これらの細胞可溶化物を免疫沈降に供したところ、抗 GFP 抗体によって沈降した OPTN-GFP のシグナルとともに mCh-PLIN2 のシグナルが観察され、これらの共免疫沈降が認められた（図 1a）。次に shRNA 発現ベクターによって OPTN タンパク質の発現を抑制したところ、Lipi-Green により染色される脂肪滴の分布が変化し、特に核近傍における Lipi-Green のシグナルの集積が増加した（図 1b）。

2. PLIN2 蛍光レポーターによる脂肪滴の解析

脂肪滴の分解には選択的オートファジーによる経路が知られており、オートファゴソームにより囲われた脂肪滴が最終的にリソソームと融合することでオートリソソームを形成し、酸性環境下で働く酵素により分解を受けると考えらえれている。これらの脂肪滴の受ける分解経路について解析するために PLIN2 に pH 感受性緑色蛍光タンパク質（pHluorin）と赤色蛍光タンパク質（mCherry）を共に付加したレポーターを発現させるプラスミドベクターを作製し、ARPE19 細胞で発現させた（図 2a，b）。対照群の細胞では、pHluorin と mCherry の両方の蛍光（黄色）による空胞様の構造が観察された（図 2c）。一方で、OPTN の発現を抑制した細胞ではこのような脂質滴に加え、mCherry の蛍光（赤色）のみを示す球状の構造が認められた（図 2c）。このことは、PLIN2 レポーターが酸性環境に取り込まれていることを示唆しており、OPTN 発現抑制による選択的オートファジーの機能破綻により PLIN2 がオートリソソームに蓄積されたと考えられる。

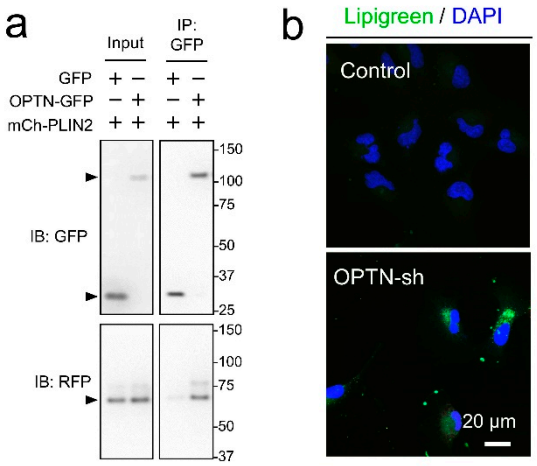


図 1. OPTN と PLIN2 の共免疫沈降と OPTN の発現抑制による脂肪滴形成の促進

a) ARPE19 細胞に対し mCherry 付加 PLIN2 と GFP 単独もしくは GFP 付加 PLIN2 を共発現させ、細胞可溶化物を抗 GFP 抗体による免疫沈降に供した。

b) *OPTN* に対する shRNA 発現 48 時間後の細胞を固定し、Lipigreen 染色（緑）に供した。脂肪滴の核（DAPI、青）近傍の集積が認められた。スケールバー：20 μm。

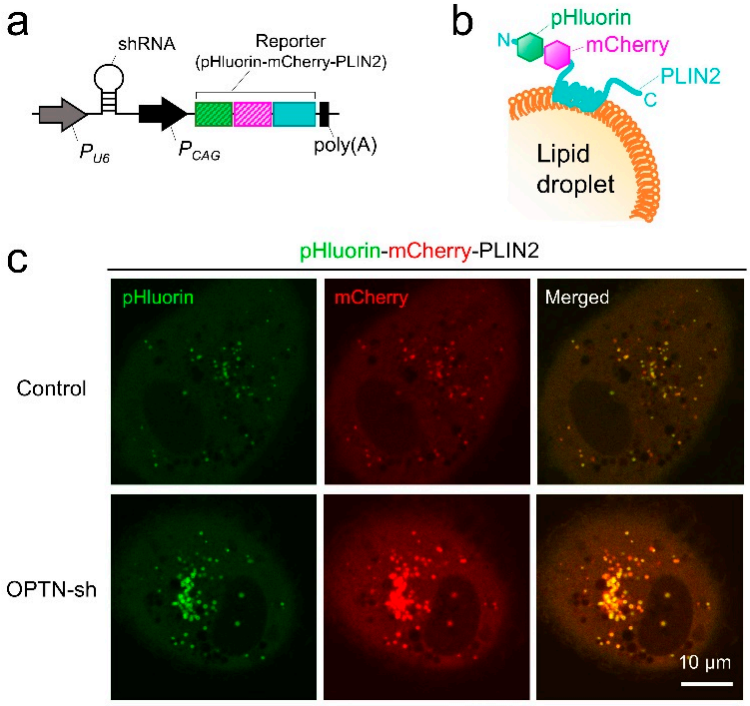


図 2. *OPTN* 遺伝子発現抑制による脂肪滴の増加

a) OPTN-sh と pHluorin-mCherry-PLIN2 共発現プラスミド。

b) 脂肪滴膜に結合した pHluorin-mCherry-PLIN2 レポーターの模式図。

c) pHluorin-mCherry-PLIN2 単独および OPTN-sh と pHluorin-mCherry-PLIN2 共発現プラスミドを ARPE19 細胞に一過性発現させ、48 時間後に走査型レーザー顕微鏡にて観察した。スケールバー：10 μm。

3. マウス網膜色素上皮における PLIN2 と OPTN の共局在

最後にマウスの網膜色素上皮における OPTN と PLIN2 の細胞内分布について、プラスミドによる遺伝子導入法を用いて検討した（図 3a）。網膜色素上皮に発現させた PLIN2-mCherry は細胞体全体に点状の構造物として観察された（図 3b）。また、PLIN2 のシグナルは部分的に OPTN-GFP のシグナルと重なり、これらのタンパク質は網膜色素上皮においても実際に局在を共にしていることが明らかとなった。

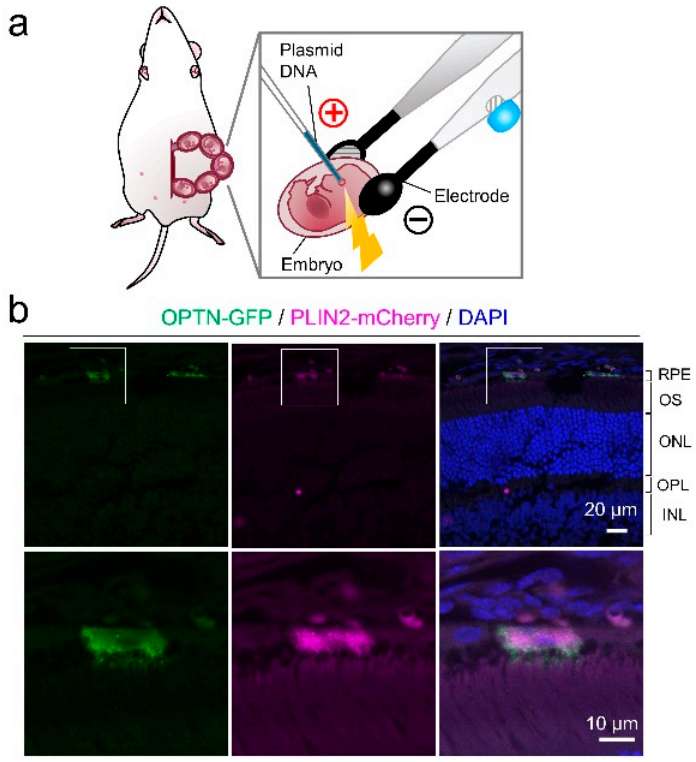


図 3. マウス網膜色素上皮における OPTN と PLIN2 の細胞内分布

a） 子宮内エレクトロポレーションによる遺伝子導入の模式図。

b） マウス網膜色素上皮に OPTN-GFP と PLIN2-mCh を共発現させ、切片を免疫蛍光染色に供し、共焦点顕微を用いて観察した。RPE：網膜色素上皮、OS：外節、ONL：外顆粒層、OPL：外網状層、INL：内顆粒層。スケールバー：20 μm（上段）、10 μm（下段）。

本研究によって、網膜色素上皮の脂肪滴上で PLIN2 とオートファジー受容体である OPTN が相互作用し、脂質滴の形態や分解に役割を果たしていること想起させるような結果を得ることが出来た。今後、加齢黄斑変性のリスク因子として知られる酸化ストレス条件下のタンパク質の動態や、脂肪滴の蓄積に関わる遺伝子の発現について解析することで、病態下の網膜色素上皮における脂質成分の蓄積の分子基盤を明らかにし、新たな創薬標的の探索と治療薬開発へとつながることが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、岐阜薬科大学バイオメディカルリサーチ寄附講座の角﨑英志特任教授ならびに岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室の嶋澤雅光教授である。

文　献

1) Yako T., Otsu W., Nakamura S., Shimazawa M., and Hara H. Lipid Droplet Accumulation Promotes RPE Dysfunction. International Journal of Molecular Sciences, 2022 Feb 4;23(3):1790. PMID: 35163712 DOI: 10.3390/ijms23031790

2) Chuang JZ., Yang N., Nakajima N., Otsu W., Fu C,, Yang H., Lee M., Akbar A., Badea T., Guo Z., Nuruzzaman A., Hsu KS., Dunaief J., and Sung CH. Retinal pigment epithelium-specific CLIC4 mutant is a mouse model of dry age-related macular degeneration. Nature Communications, 2022 Jan 18;13(1):374. PMID: 35042858 DOI: 10.1038/s41467-021-27935-9

3) Schott MB., Rozeveld CN, Weller SG, McNiven MA. Lipophagy at a glance. Journal of Cell Science, 2022 Mar 1;135(5):jcs259402. PMID: 35260889 DOI: 10.1242/jcs.259402

4) Kim JY., Zhao H., Martinez J., Doggett TA., Kolesnikov AV., Tang PH., Ablonczy Z., Chan CC., Zhou Z., Green DR., Ferguson TA. Noncanonical autophagy promotes the visual cycle. Cell, 2013 Jul 18;154(2):365-76. PMID: 23870125 DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.012

5) Tan LX, Germer CJ., Thamban T., Cunza NL., Lakkaraju A. Current Biology, 2023 Sep 25;33(18):3805-3820.e7. PMID: 37586372 DOI: 10.1016/j.cub.2023.07.031

6) Li A., Saito M., Chuang JZ., Tseng YY., Dedesma C., Tomizawa K., Kaitsuka T., Sung CH. Ciliary transition zone activation of phosphorylated Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase entry and fate of neural progenitors. Nature Cell Biology, 2011 Apr;13(4):402-11 PMID: DOI: 10.1038/ncb2218

7) Otsu W., Ishida K., Nakamura S., Shimazawa M., Tsusaki H., and Hara H. Blue light-emitting diode irradiation promotes transcription factor EB-mediated lysosome biogenesis and lysosomal cell death in murine photoreceptor-derived cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020 May 28;526(2):479-484. PMID: 32234235 DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.03.118

8) Otsu W, Hsu YC, Chuang, JZ, and Sung, CH. The Late Endosomal Pathway Regulates the Ciliary Targeting of Tetraspanin Protein Peripherin 2. Journal of Neuroscience, 2019 May 1;39(18):3376-3393. PMID: 30819798 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2811-18.2019