HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Biological function analysis of ATP6AP2/(pro)renin receptor in the retina
Author(s)	神田, 敦宏
Description	配架番号：1685
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第6963号
Issue Date	2015-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6963
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60039
Type	doctoral thesis
File Information	Atsuhiro_Kanda.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

Biological function analysis of ATP6AP2/(pro)renin receptor in the retina

(ATP6AP2/（プロ）レニン受容体の網膜における生物学的機能解析)

2015 年 9 月

北海道大学

神田　敦宏

学　位　論　文

Biological function analysis of ATP6AP2/(pro)renin receptor in the retina

(ATP6AP2/（プロ）レニン受容体の網膜における生物学的機能解析)

2015 年 9 月

北海道大学

神田　敦宏

目次

発表論文目録および学会発表目録 ····· 1 頁

緒言 ····· 4 頁

略語表 ····· 10 頁

第 1 章

緒言 ····· 14 頁

実験方法 ····· 16 頁

実験結果 ····· 21 頁

考察 ····· 34 頁

結論 ····· 38 頁

第 2 章

緒言 ····· 40 頁

実験方法 ····· 42 頁

実験結果 ····· 46 頁

考察 ····· 64 頁

結論 ····· 71 頁

第 3 章

緒言 ····· 73 頁

実験方法 ····· 75 頁

実験結果 ····· 81 頁

考察 ····· 93 頁

結論 ····· 97 頁

総括····· 98 頁

謝辞 ····· 107 頁

引用文献 ····· 108 頁

発表論文論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Kanda A, Noda K, Saito W, Ishida S. (Pro)renin receptor is associated with angiogenic activity in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 2012; 55: 3104-3113
2. Kanda A, Noda K, Saito W, Ishida S. Vitreous renin activity correlates with vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*. 2013; 97: 666-668
3. Kanda A, Ishida S. Vitreous renin-angiotensin system is mediated by soluble (pro)renin receptor in diabetic retinopathy: new implication of receptor-associated prorenin system. *Twn J Ophthalmol*. 2013; 3:51-53
4. Kanda A, Noda K, Yuki K, Ozawa Y, Furukawa T, Ichihara A, Ishida S. Atp6ap2/(pro)renin receptor interacts with Par3 as a cell polarity determinant required for laminar formation during retinal development in mice. *J Neurosci*. 2013; 33: 19341-19351
5. Kanda A, Noda K, Ishida S. ATP6AP2/(pro)renin receptor contributes to glucose metabolism via stabilizing the pyruvate dehydrogenase E1 ß subunit. *J Biol Chem*. 2015; 290: 9690-9700

本研究の一部は以下の学会に発表した。

国際学会

1. Kanda A, Noda K, Saito W, Ishida S. (Pro)renin receptor is associated with angiogenic activity in proliferative diabetic retinopathy. Association for Research in Vision and Ophthalmology. Fort Lauderdale, FL, 2012
2. Kanda A, Noda K, Saito W, Ishida S. (Pro)renin receptor is associated with angiogenic activity in proliferative diabetic retinopathy. The 10th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care. Sapporo, Hokkaido. 2012
3. Kanda A, Noda K, Yuki K, Ozawa Y, Furukawa T, Ichihara A, Ishida S. Functional analysis of (pro)renin receptor in mouse retinal development. The 10th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care. Sapporo, Hokkaido. 2013
4. Kanda A, Noda K, Yuki K, Ozawa Y, Fukuhara T, Ichihara A, Ishida S. Functional analysis of (pro)renin receptor in mouse retinal development. Association for Research in Vision and Ophthalmology. Seattle, WA, 2013

5. Kanda A. Atp6ap2/(pro)renin receptor is associated with cell polarity required for laminar formation during retinal development in mouse. 9th Japan-Korea International Symposium in Ophthalmology: Sapporo, Japan; 2014
6. Kanda A, Yuki K, Furukawa T, Ichihara A, Ishida S. Atp6ap2/(pro)renin receptor interacts with Par3 as a cell polarity determinant required for laminar formation during retinal development in mice. World Ophthalmology Congress 2014 Tokyo: Tokyo, Japan; 2014
7. Kanda A, Noda K, Ishida S. Identification of (pro)renin receptor/Atp6ap2-binding proteins in the retina of adult mice. Association for Research in Vision and Ophthalmology. Orlando, FL, 2014
8. Kanda A. Atp6ap2/(pro)renin receptor is associated with cell polarity required for laminar formation during retinal development in mouse. 2015 Meeting with Hokkaido University: Taipei, Taiwan; 2015
9. Kanda A, Noda K, Ishida S. ATP6AP2/(pro)renin receptor contributes to glucose metabolism via stabilizing the E1 β subunit of pyruvate dehydrogenase complex. Asia-ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) 2015: Yokohama, Japan; 2015
10. Kanda A. Atp6ap2/(pro)renin receptor is associated with cell polarith required for laminar formation during retinal development in mice. Special Interest Groups : Retinal developmet and regeneration. Asia-ARVO 2015: Yokohama, Japan; 2015

国内学会・研究会

1. 神田敦宏. 糖尿病網膜症における（プロ）レニン受容体の血管新生活動性への関与. 第 4 回 Retina research meeting、東京、2011
2. 神田敦宏、野田航介、齋藤 航、Anand Swaroop、石田 晋. 網膜疾患における（プロ）レニン受容体および関連分子の発現解析. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011
3. 神田敦宏、野田航介、齋藤 航、石田 晋. （プロ）レニン受容体の増殖糖尿病網膜症組織検体における血管新生活動性への関与. 第 116 回 日本眼科学会 東京、2012
4. 神田敦宏、野田航介、齋藤 航、結城賢弥、小沢洋子、古川貴久、市原淳弘、石田 晋. 網膜疾患および発生における（プロ）レニン受容体の機能解析. 第2回わかもと先進医療研究会、東京、2012
5. 神田敦宏、野田航介、結城賢弥、小沢洋子、古川貴久、市原淳弘、石田晋. マウス網膜発生における（プロ）レニン受容体の機能解析. 第35回 日本分子生物学会、福岡、2012

6. 神田敦宏、野田航介、小沢洋子、古川貴久、市原淳弘、石田 晋. マウス網膜発生における(プロ)レニン受容体の生理的機能解析. 第117回 日本眼科学会、東京、2013
7. 神田敦宏、野田航介、結城賢弥、小沢洋子、古川貴久、市原淳弘、石田晋. マウス網膜発生における（プロ）レニン受容体の生理的機能解析 第17回 眼科分子生物学研究会、焼津、2013
8. 神田敦宏. 糖尿病網膜症における（プロ）レニン受容体の血管新生活動性への関与. 第 10 回 新宿 Angiotensin Biology Conference、東京、2013
9. 神田敦宏. (Pro)renin Receptor is associated with angiogenic activity in proliferative diabetic retinopathy. 第 8 回 Cardio-Diabetes 研究会、東京、2014
10. 神田敦宏. 網膜における（プロ）レニン受容体の病理的・生理的機能解析. 第６回(プロ)レニン受容体フォーラム、札幌、2014
11. 神田敦宏. (Pro)renin receptor is associated with angiogenic activity in proliferative diabetic retinopathy. 平成25年日本眼科学会学術奨励賞受賞講演 第118回日本眼科学会総会、東京、2014
12. 神田敦宏. 糖尿病網膜症における(プロ)レニン受容体の血管新生活動性への関与. 「炎症眼科学講座」終了記念シンポジウム、札幌、2014
13. 神田敦宏. 網膜におけるレニン・アンジオテンシン系、第１回眼科基礎研究の会、滝川、2014
14. 神田敦宏.（プロ）レニン受容体と糖代謝. 第７回(プロ)レニン受容体フォーラム、熊本、2015
15. 神田敦宏. 糖尿病網膜症における受容体結合プロレニン系の関与. イノベーションセミナー、札幌、2015
16. 神田敦宏. Atp6ap2 is required for laminar formation during retinal development in mice. 平成26年日本眼科学会学術奨励賞受賞講演 第119回日本眼科学会総会、札幌、2015
17. 神田敦宏. 糖尿病網膜症におけるレニン・アンジオテンシン系. 第119回日本眼科学会総会、札幌、2015
18. 神田敦宏. 網膜における（プロ）レニン受容体の病理的・生理的機能解析. 北海道大学大学院医学研究科 循環病態内科学 リサーチセミナー、札幌、2015
19. 神田敦宏. 糖尿病網膜症における血管炎症－受容体結合プロレニン系の関与－. 第36回日本炎症・再生医学会、東京、2015

緒言

ヒトは、外界から得る情報の 8 割を視覚に依存すると考えられている。我々の眼は、視覚サイクルを介して暗所の中ではわずか 1 個の光分子をも感知することが可能である一方、明るい太陽光の下でも良好な視力を得ることが出来るほどのダイナミックレンジの広い感度を持つ、重要な感覚器官である[1,2]。

わが国はかつてない超高齢社会を迎えており、健康長寿という言葉に代表されるように、眼をはじめとする感覚器（Quality of Vision）や循環器臓器の健康を維持することは、Quality of Life の向上に直結する重要課題となっている[3,4]。しかしながら、我々を取り巻く環境は大きく変わり、様々な危険因子（加齢、飲酒、喫煙、ライフスタイルの欧米化など）が生活習慣病の罹患者数の増加・進行を助長している。生活習慣病では、内臓肥満から長期の経過にわたって全身に血管症が起こり、脳・心・腎・眼などの主要臓器の障害により、糖尿病のみならず高血圧・動脈硬化などを合併し、糖尿病腎症をはじめとする重症度の高い心腎障害や糖尿病神経障害に陥る。眼科領域では糖尿病網膜症がわが国の失明原因の上位につけている。また、加齢を含む複数の要因により眼の網膜にある黄斑部が変性を起こす加齢神経変性疾患の一つ、加齢黄斑変性（age-related macular degeneration、AMD）も世界中で罹患者数が急増していることが問題になっている[5]。これら網脈絡膜疾患や心腎障害は終末病態として炎症・血管新生・線維化をきたし、生活習慣病に合併した血管症と位置づけられる[6-8]。眼科領域ではすでに血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor: VEGF）阻害薬が臨床応用されている[9-15]。しかし、終末病態で介入する抗 VEGF 療法には神経網膜の不可逆的変性による限界も認められ、より良い視野機能予後を得るためにさらに上流の経路に早期介入（慢性化前に）する戦略の確立は急務である[16,17]。

レニン・アンジオテンシン系（renin-angiotensin system: RAS）は、古くから研究がなされており生物学的な現象としては 1930 年代には発見・報告されている[18]。そして、その後さらなる研究が進み 1950 年代にその生物学的全貌が明らかになった[19]。RAS は、肝臓で作られたアンジオテンシノーゲンが、腎臓で産生・分泌されたレニンによりアンジオテンシンⅠ（AngⅠ）となり、さらにアンジオテンシン変換酵素（ACE）によってアンジオテンシンⅡ（AngⅡ）に変換される。最終活性ペプチドであるこの AngⅡは、血管平滑筋や腎尿細管に存在する１型の Ang Ⅱ受容体（Ang Ⅱ type 1 receptor: AT1-R）に作用し、血圧や体液

を調整する循環ホルモンシステムである。RAS は、生物が海から陸へと進化する過程で塩分と水を細胞外液として体内に保持するために発達したと考えられている。しかし、もともと臓器局所では、細胞の分化と増殖、炎症、線維化など組織の修復（リモデリング）など生理的な役割を担ってきたと考えられる[20]。前者は循環 RAS、後者は組織 RAS と呼ばれる（図 1)。これまでに我々は、眼局所には組織 RAS が存在し、RAS の下流において VEGF や炎症性サイトカイン、白血球走化因子・接着分子の発現亢進による炎症機序を介して網脈絡膜病態が形成されることを示してきた[21-25]。飢餓時代に塩分保持など生命維持に必須の役割を担ってきた RAS であるが、皮肉にも飽食の現代社会においては生活習慣病の進行因子となっている。さらに、我々は組織 RAS の上流に（プロ）レニン受容体[(pro)renin receptor: (P)RR]が存在し、眼組織における炎症・血管新生の上流で網脈絡膜疾患の分子病態を制御していることを動物モデルで示した[26-30]。

プロレニンは、レニンの不活性酵素前駆体という以外にその生理的・病理的機能は不明であった。古典的には、プロレニンのプロセグメントと呼ばれるレニン酵素活性中心を覆っている部分がカテプシン B などのプロセッシング酵素によって切断されてレニンとなるタンパク質融解的活性化と呼ばれるプロレニンの活性化メカニズムが知られていた[31,32]。しかしその後、プロレニンに対する受容体(P)RR が同定され、新たな RAS 活性化メカニズムが報告された[33]。プロレニンは、(P)RR と結合すると、タンパク切断などなく立体構造変化のみが起こり、レニン活性中心の露出の結果、レニンと同程度の酵素活性を発揮する(図 2)[34-37]。さらに、プロレニンと(P)RR が結合すると、RAS 非依存性に直接(P)RR の細胞内シグナルとして細胞外シグナル調節キナーゼ(extracellular signal-regulated kinase: ERK) 1/2 の活性化が起きる[33,38,39]。我々はこのように RAS 非依存性である組織RAS と受容体細胞内シグナルの二つの経路を活性化させる(P)RR を中心とした系を受容体結合プロレニン系(receptor-associated prorenin system: RAPS)と呼ぶことを提唱している（図 3）[16,40]。RAPS は、眼組織のみならず腎臓や心臓などの病態モデルにおいても認められている。しかしながら、ヒトの眼病態形成における(P)RR の病理的作用は明らかにされていない。そこで第一章では、日本では予備軍を含めると約 2,200 万人以上が罹患している糖尿病の三大細小血管症の１つ（糖尿病腎症、糖尿病神経障害）で，中途失明の原因第 2 位である糖尿病網膜症をターゲットとし、増殖糖尿病性網膜症患者より採取された臨床検体を用い、病態形成と(P)RR の関連について研究を行った「増殖糖尿病性網膜

症の病態形成における（プロ）レニン受容体の関与」[41-43]。

(P)RR は、網膜疾患のみならず腎臓や心血管系など生活習慣病の標的臓器の炎症病態にも関与することが明らかとなり、生活習慣病における臓器保護のための共通の創薬ターゲット分子としても注目されている。しかしながら、創薬研究をおこなっていく上で、予期せぬ副作用などを回避するためにもターゲット分子の生理的機能を十分に理解しておく必要がある。実際、*(P)RR* 遺伝子を欠損したゼブラフィッシュやアフリカツメガエルは胎生致死の上、眼球・心臓の発達不全も呈する[44]。さらに、(P)RR の C 末端側膜貫通領域が ATP 依存性プロトンポンプ vacuolar H^+-ATPase（v-ATPase）のアダプタータンパク ATP6AP2 と同一分子であることがわかったことから[33,45]、ｖ-ATPase に関連する多彩な生理的・病理的意義が ATP6AP2［以下、(P)RR を(P)RR/ATP6AP2 と表記する］の機能とリンクしている可能性が指摘されていた[46,47]。そして、この v-ATPase に関連した(P)RR/ATP6AP2 機能は、正常発生や炎症病態などに様々な作用を持つ Wnt シグナル系において、Wnt 受容体リン酸化に必須であることもアフリカツメガエルを用いた研究により明らかとなった[48-50]。また、心筋細胞（心臓）や糸球体上皮細胞（腎臓）特異的なコンディショナルノックアウトマウスの解析結果からは、このマウスの心筋細胞では v-ATPase の構成と機能の障害が起こり細胞内小器官の pH が上昇する結果、オートファジーに障害が生じて細胞死に至ることが判明するなど、(P)RR/ATP6AP2 は細胞構造や維持に重要な役割を担っていることが報告されている[51-53]。しかしながら、網膜における(P)RR/ATP6AP2 の生理的な機能解析を行った報告はない。そこで、第 2 章では網膜発生期「Atp6ap2/(プロ)レニン受容体の網膜発生期における細胞極性への関与」[54]、第 3 章では網膜成体期「Atp6ap2/(プロ)レニン受容体のグルコース代謝への関与」[55] における(P)RR/ATP6AP2 の生理的機能解析を行った。

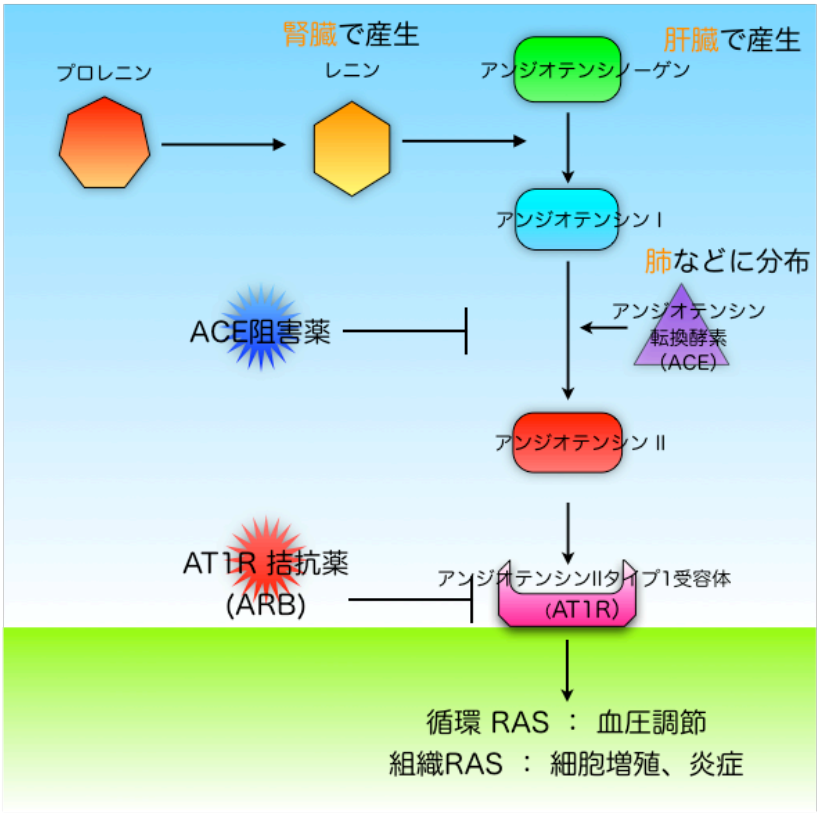


図 1. レニン-アンジオテンシン系（RAS）

肝臓で作られたアンジオテンシノーゲンは腎臓のレニンや肺などのアンジオテンシン変換酵素(ACE)などの酵素によってアンジオテンシン II になり、血管平滑筋のアンジオテンシン 1 型受容体(AT1-R)を介して血圧を上昇させる。この循環ホルモンシステムを RAS という。RAS は重要な血圧調節系であるため、ACE 阻害薬や ARB など RAS 抑制薬は代表的な高血圧の治療薬である。しかし最近、AT1-R のシグナルは，血圧上昇に関与するだけでなく、血管新生・炎症病態を形成することがわかってきた。

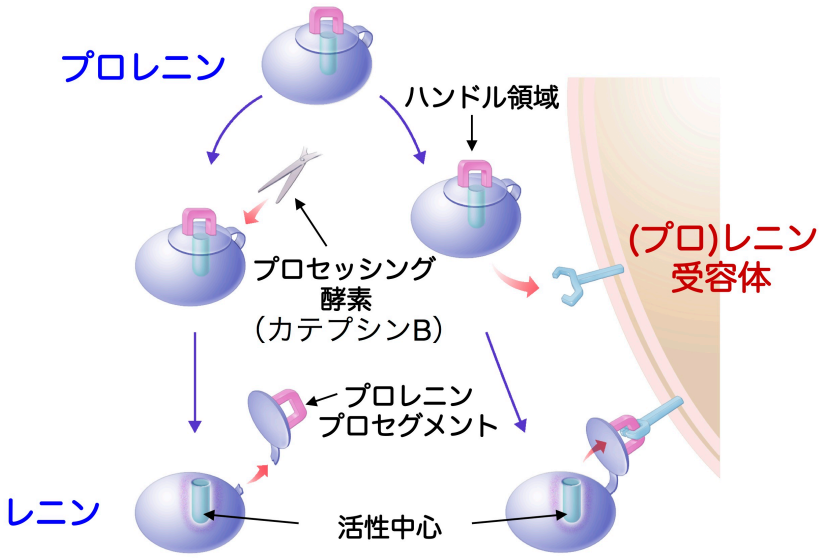


図 2　プロレニンと(P)RR

プロレニンが(P)RR に結合すると、プロセグメントが通常のようにタンパク質融解により切断される（レニン分子になる=タンパク質融解的活性化）ことなく立体構造のみが変化することによりレニン活性が生じ（=非タンパク質融解的活性化）、これが組織 RAS 活性化のトリガーとなる。

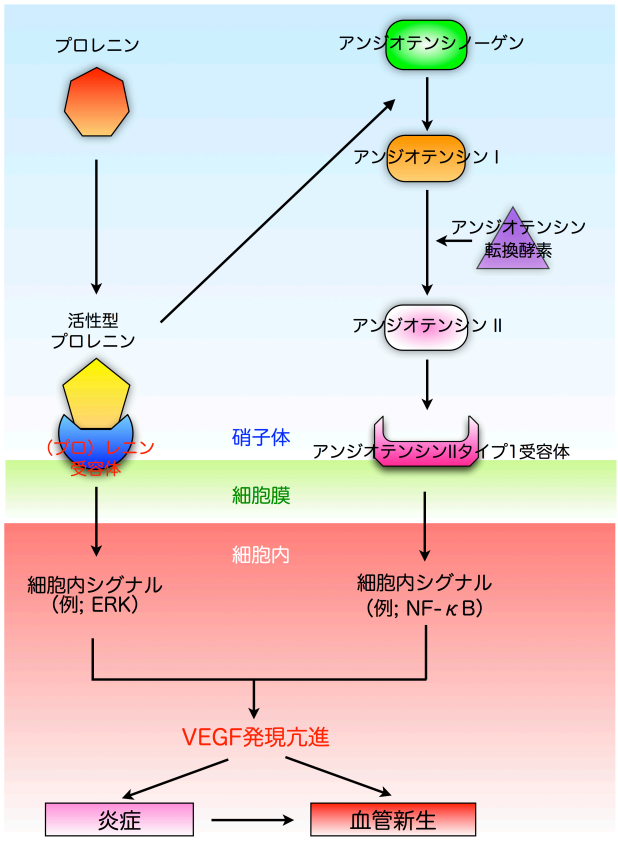


図 3　受容体結合プロレニン系（receptor-associated prorenin system: RAPS）

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ACE	angiotensin converting enzyme
AGT	angiotensinogen
AMD	age-related macular degeneration
AngII	angiotensin II
aPKC	atypical protein kinase C
ARB	angiotensin II receptor blocker
AT1R	angiotensin II type I receptor
AT2R	angiotensin II type II receptor
ATP6AP2	ATPase H(+)-transporting lysosomal accessory protein 2
α-SMA	α－smooth muscle actin
Brn3	POU domain, class 4, transcription factor 1
CAR	cone arrestin
Chx10	ceh-10 homeodomain containing homolog
CKO	conditional knockout
Crb	Crumbs
Crx	Cone-rod homeobox
GCL	ganglion cell layer
DAPI	4’,6-diamidine-2’-phenylindole dihydrochloride
DLAT	dihydrolipoamide S-acetyltransferase
DLD	dihydrolipoamide dehydrogenase
DME	diabetic macular edema
DR	diabetic retinopathy
ELSA	enzyme-linked immunoSorbent assay
ERK1/2	Extracellular Signal-regulated Kinase1/2
ERM	epiretinal membrane
fl(P)RR	full length form of (P)RR
FVT	fivrovascular tissue
GST	glutathione S-transferase
HEK	human embryonic kidney
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

HRMEC	human retinal microvascular endothelial cell
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
INL	inner nuclear layer
IP	immunoprecipitation
IS	inner segment
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MH	macular hole
MS	mass spectrometry
NF-κB	nuclear factor-κB
NRP	neuropilin
ONL	outer nuclear layer
OPL	outer plexiform layer
OS	outer segment
Pals1	protein associated with Lin Seven 1
PAR3	partitioning defective 3 homolog
PAR6	partitioning defective 6 homolog
Patj	Pals1-associated tight junction protein
Pax6	paired box 6
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDH	pyruvate dehydrogenase
PDHA	PDH E1 α subunit
PDHB	PDH E1 ß subunit
PDHX	PDH component X
PRD	proliferative diabetic retinopathy
PFA	paraformaldehyde
(P)RR	(pro)renin receptor
PRRB	(pro)renin receptor blocker
PVDF	polyvinylidene fluoride
QOL	quality of life
QOV	quality of vision
RAPS	prorenin-associated receptor system

RAS	renin-angiotensin system
REN	prorenin
RGC	retinal ganglion cell
Rho	rhodopsin
RPE	retinal pigment epithelium
ROS	reactive oxygen species
siRNA	small interfering RNA
STZ	streptozotocin
s(P)RR	soluble form of (P)RR
TBS	Tris buffered saline
v-ATPase	vacuolar H^+-ATPase
VEGF	vascular endothelial growth factor
ZO-1	zona occludens-1

第 1 章

増殖糖尿病性網膜症の病態形成における（プロ）レニン受容体の関与

(Pro)renin receptor is associated with angiogenic activity in proliferative diabetic retinopathy.

緒言

生活習慣病では、内臓肥満から長期の経過にわたって全身に血管症が起こり、脳・心・腎・眼などの主要臓器の障害により寿命が短縮する。眼科領域では、網脈絡膜疾患の糖尿病網膜症・加齢黄斑変性・網膜静脈閉塞症といった生活習慣病や加齢が発症・進行の危険因子である血管症の罹患者数が年々増加している。糖尿病網膜症は、我が国では予備軍を含めると約 2,200 万人が罹患している糖尿病の 3 大細小血管症の 1 つで、網膜において炎症や血管新生が起こっており、主要な中途失明原因である。主な治療は光凝固術や硝子体手術，そして VEGF 阻害薬を用いた抗血管新生療法などだが、未だ発症の詳細なメカニズムが充分にわかっておらず、新たな治療戦略の確立は、失明や重度の視力障害を回避するための社会的急務となっている。

RAS は、臓器局所では細胞の分化・増殖など組織修復などの役割を担っている（組織 RAS）[21-25]。さらに、その上流に位置する（プロ）レニン受容体は、眼組織において VEGF を介した炎症・血管新生の上流で糖尿病網膜症をはじめとする様々な眼疾患の分子病態を制御していることを我々は明らかにしてきた[受容体結合プロレニン系（RAPS）][26-30,40]。しかしながら、ヒト眼組織検体を用いた研究報告は一切なされていなかった。本章では、ヒト増殖糖尿病網膜症手術サンプルを用いて組織 RAS および(P)RR/ATP6AP2 の血管新生への関与を検討した。

北海道大学病院眼科で手術された増殖糖尿病網膜症患者より採取した硝子体と線維血管増殖組織において、(P)RR/ATP6AP2 と病態関連分子の発現を ELISA 法（酵素結合免疫吸着法；可溶型(P)RR，VEGF，プロレニン）や免疫組織染色[（P）RR，VEGF，ERK1/2]を行い、(P)RR/ATP6AP2 の血管活新生動性を検討した[対照群には黄斑円孔および網膜前膜患者の検体を使用]。また、リアルタイム PCR 法を用い詳細な *VEGF* 遺伝子発現解析を初代培養正常ヒト網膜血管内皮細胞にて行った。

糖尿病網膜症の網膜血管新生には、VEGF（なかでも VEGF165 アイソフォーム）が主要な病態分子であることが知られている[6]。まず我々は、ヒト網膜血管内皮細胞において，プロレニンによる(P)RR/ATP6AP2 刺激で *VEGF165* 発現を促進していることを明らかにした（その VEGF 発現亢進は、プロレニンと(P)RR/ATP6AP2 の結合を特異的に阻害するデコイペプチド（PRRB）や、細胞内シグナル ERK の阻害剤により抑制された)。実際、(P)RR/ATP6AP2 は線維血管増殖組織の血管内皮細胞に発現しており VEGF との共局在が確認した。そして，増殖糖尿病網膜症

患者の硝子体における可溶型(P)RR の発現量は、対照群に比べ有意に増加していた。また、可溶型(P)RR の発現量は、硝子体中の VEGF 発現量さらには増殖組織での血管密度と正の相関が認められた。さらに硝子体中の活性型プロレニン量が VEGF 発現量と相関していたことから、眼内における組織 RAS も血管新生に関与していると考えられた。(P)RR/ATP6AP2 は糖尿病網膜症における血管新生、つまり疾患の進行に関与する重要な分子であることが示唆される。

糖尿病網膜症における可溶型(P)RR 量増加のメカニズムの解明は、疾患発症の原因・進行解明に繋がる可能性がある。また、(P)RR/ATP6AP2 をはじめとする RAPS 関連分子が新規薬物治療のターゲットとして、今後の創薬研究において大きく貢献することが期待される。

実験方法

1．臨床検体

北海道大学病院眼科で手術された増殖糖尿病網膜症患者より採取した硝子体（23 例、男性 10 名、女性 13 名、平均年齢 60.3 歳）と線維性血管増殖膜組織（11 例）において、(P)RR と病態関連分子の発現を ELISA 法や免疫組織染色に使用した。対照群には黄斑円孔および網膜前膜患者（16 例、男性 7 名、女性 9 名、平均年齢 64.0 歳）の検体を使用した。硝子体サンプルは経結膜的無縫合硝子体切除システム（23G または 25G）を使用して、扁平部硝子体切除の開始時に回収した。そして、得られた硝子体は、超音波処理後、15,000xg で 4℃、20 分間遠心を行い、その上清を-80℃で急速に凍結した。涙、血液と生理食塩水の汚染を避けるために、結膜上の流体を注意深くカッター挿入前に除去した。線維性血管増殖膜組織（増殖膜）は、除去後、直ちに 4%パラホルムアルデヒド（PFA）にて固定した。本研究に使用した臨床検体すべては、書面により同意を得た患者より術中に採取したものであり、臨床検体の扱いは北海道大学病院自主臨床研究審査委員会に承認を受け、定められたガイドライン「北海道大学病院における臨床研究の取扱いに関する指針」などに基づいて実施した。

2．抗体作製

ヒト（プロ）レニン受容体遺伝子(GenBank No. NM_005765)を pGEX4T-2 vector (GE Healthcare, Piscataway, NJ)にクローニングし、大腸菌株 Rosetta-gami 2 (DE3) (Novagen, Madison, WI)にヒートショック法で遺伝子導入し、glutathione S-transferase (GST)融合（プロ）レニン受容体タンパク質を発現・精製した。LB 培地 5ml で、遺伝子導入大腸菌株をプレインキュベーション後、500ml の LB 培地に O.D.=0.5 となるように加え、1 時間 37℃にて培養を行った。その後、イソプロピル-β-チオガラクトピラノシドを終濃度 1mM となるように加え、さらに 4 時間培養をした。培養菌液を回収して、可溶化バッファー(1% Triton X-100、プロテアーゼ阻害剤、TBS）で懸濁し、ソニケーションを行って可溶化をした。20,000xg 遠心後、上清に Glutathione-Sepharose (GE Healthcare)ビーズを加え、GST 融合（プロ）レニン受容体タンパク質を吸着させた後、可溶化バッファーで洗浄を行った。そして、15 mM Glutathione 溶液で溶出した。得られた組換えタンパクは、イムノブロット法などで純度などを確認した。そして、得られた GST 融合（プロ）レニン受容体タンパクを抗原として、株式会社アイティーエム（長野県松本市）に依頼をして腸骨リンパ節法を用いて、mouse 抗-（プ

ロ）レニン受容体 monoclonal 抗体（Ms3-24）を作製し、プロテイン A ビーズカラム(GE Healthcare)にて精製・濃縮を行った。*(P)RR/ATP6AP2* 変異体は、polymerase chain reaction (PCR)法を用いて作製した。全ての DNA コンストラクトは、使用前に配列の確認を行った。また遺伝子組換え体の取り扱いは、「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」に則しておこなった。

3．イムノブロット解析

サンプルをポリアクリルアミドゲルにて泳動・分離後、PVDF (polyvinylidene fluoride) 膜に転写した。5%スキムミルク(Wako Pure Chemical Industries)でブロッキングを行い、各種 1 次抗体 [Ms3-24 抗体、anti-GST 抗体（Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA）、 anti-ß-actin 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)]と反応させた。Horseradish peroxidase 標識 2 次抗体と反応後、シグナルを enhanced chemoluminescence (Western Lightning Ultra, Perkin Elmer, Waltham, MA)で発光させ、LAS-4000 mini camera system (Fujifilm, Tokyo, Japan)で検出した。

4．免疫組織染色

組織を 4%PFA で固定し、パラフィン包埋後に切片を作製した。キシレンとエタノールで脱パラフィンした後、10 mM クエン酸バッファー（pH6.0）内で電子レンジを用いて抗原賦活化を行った。切片は 5%正常ヤギ血清(Life Technologies)と 0.05% Triton X-100 を含有する PBS で室温 1 時間かけてブロッキングをおこなった。その後、以下の抗体を用いて一次抗体反応をおこなった [mouse anti-（プロ）レニン受容体抗体(Ms3-24)、goat anti-(P)RR 抗体（R&D systems, Minneapolis, MN）、rabbit anti-リン酸化 ERK1/2 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)、anti-α-smooth muscle actin（α-SMA）抗体、anti-CD31 抗体、anti-CD34 抗体、anti-VEGF 抗体 (Abcam, Cambridge, MA)、mouse anti-prorenin monoclonal 抗体(Abcam)]。0.05% Triton X-100/PBS で 5 分 3 回洗浄した後、Alexa Fluor 488 または 546 (Life Technologies)をラベルした二次抗体で蛍光標識し、核は 4',6-diamino-2- phenylindole (DAPI, Lonza, Basel, Switzerland)で染色した。切片は FluoView FV10i-DOC (Olympus, Tokyo, Japan)で観察した。

5．細胞と試薬

ヒト網膜上皮細胞(hTERT-RPE1、ARPE-19)、ヒト網膜芽細胞腫(Y79)は American

Type Culture Collection (Manassas, VA) より購入した。細胞はそれぞれ 10% ウシ胎児血清 (Life Technologies, Carlsbad, CA) を添加した DMEM/F12 および RPMI-1640 培地(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)で 37℃、5% CO_2濃度で培養をした。ヒト網膜毛細血管内皮細胞 (HRMEC) は、Cell Systems (Kirkland, WA)より購入し、専用培地 (CS-C) で培養をした。

プロレニンと (プロ) レニン受容体の結合を阻害するデコイペプチド (PRRB、NH_2-RIFLKRMPSI-COOH) [28] は、 GeneDesign 社(Osaka, Japan)に合成・精製を依頼した。

細胞は無血清培地に変換した後、1μmol/l PRRB または 10μmol/l MAPK/ERK kinase (MEK) 阻害剤 U0126 (Promega, Madison, WI)で 15 分間前に処理を行った。その後、10nmol/l プロレニンを添加して 3 時間後培養後、細胞を回収し遺伝子発現解析を行った。

6. RNA 抽出およびリアルタイム PCR

細胞および網膜から TRIzol Reagent を用いて RNA を回収し、GoScrip Reverse Transcriptase(Promega)と oligo dT(20) primers を用いて RNA の逆転写をおこなった。プライマー (表１)、GoTaq qPCR Master Mix (Promega)、を使用し、StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies) を用いて real-time PCR を施行した。反応条件は 95℃ 2 分, 続いて 95℃ 15 秒、60℃ 60 秒が 40 サイクルとした。Threshold cycle (C_T) 値は StepOnePlus Real-Time PCR System のプログラムにより自動的に測定された。内因性コントロール *HPRT1* を用いて各サンプル中の遺伝子の相対的発現量をΔΔCT 法で算出した[56]。

7. ELISA 法

可溶型 (プロ) レニン受容体の測定には、Ms3-24 抗体と goat-(プロ) レニン受容体を用いたサンドイッチ ELISA を一般的なプロトコールに沿って行った[57]。goat-(プロ) レニン受容体抗体を 96well plate に吸着させた後、硝子体サンプルを加え、一昼夜反応させた。0.05% Tween20/PBS で洗浄後、Ms3-24 抗体を加えた。インキュベーション・洗浄後、シグナルを可視化するため Tetramethylbenzidine 試薬を添加した。検量線は、GST 融合 (プロ) レニン受容体タンパクを希釈して作製した。

また、プロレニン、VEGF、レニン活性は、それぞれ市販のキットを使用した [prorenin (Innovative Research, Novi, MI)、VEGF (R&D systems)、renin activity (ALPCO Diagnostics, Salem, NH)]。

8. 形態計測解析

増殖膜における血管密度は、既報[6]に沿って行った。CD34抗体で免疫染色を行い、二重盲検法で血管腔の数え、組織の大きさで割った（vessels/mm^2）値とした。

9. 活性型プロレニン濃度算出

活性型プロレニンは、可溶型（プロ）レニン受容体と結合したプロレニンに相当し、既報でその解離定数 K_D 値が報告されている[58]。K_D（4.0 nmol/l）= [prorenin]x[s(P)RR] / [activated prorenin]。この K_D 値を元に硝子体中の活性型プロレニン量を算出した。

10. 統計解析

結果は平均値±標準誤差で示した。また各群間の比較検討は Student's *t*-test または Spearman rank correlation を用いて解析し、P 値が 0.05 を下回った場合に統計学的に有意差ありとした。

表 1：RT-PCR およびリアルタイム PCR 使用プライマー配列

Target gene	**Sequence**
(P)RR	forward 5'-AGG CAG TGT CAT TTC GTA CC-3'
	reverse 5'-GCC TTC CCT ACC ATA TAC ACT C-3'
REN	forward 5'-GTG TCT GTG GGG TCA TCC ACC TTG-3'
	reverse 5'-GGA TTC CTG AAA TAC ATA GTC CGT-3'
AGT	forward 5'-CTG CAA GGA TCT TAT GAC CTG C-3'
	reverse 5'-TAC ACA GCA AAC AGG AAT GGG C-3'
ACE	forward 5'-CCG AAA TAC GTG GAA CTC ATC AA-3'
	reverse 5'-CAC GAG TCC CCT GCA TCT ACA-3'
AT1R	forward 5'-AGG GCA GTA AAG TTT TCG TG-3'
	reverse 5'-CGG GCA TTG TTT TGG CAG TG-3'
AT2R	forward 5'-GGC CTG TTT GTC CTC ATT GC-3'
	reverse 5'-CAC GGG TTA TCC TGT TCT TC-3'
HPRT1	forward 5'-ACC CCA CGA AGT GTT GGA TA-3'
	reverse 5'-AAG CAG ATG GCC ACA GAA CT-3'
VEGF121	forward 5'-GAT CAA ACC TCA CCA AGG CCA-3'
	reverse 5'-GCC TCG GCT TGT CAC ATT TTT C-3'
VEGF165	forward 5'-CAG ATT ATG CGG ATC AAA CCT CA-3'
	reverse 5'-CAA GGC CCA CAG GGA TTT TC-3'
VEGF189	forward 5'-CAG CAC AAC AAA TGT GAA TGC AG-3'
	reverse 5'-GGC CCA CAG GGA ACG CT-3'
FLT1	forward 5'-TTT AAA AGG CAC CCA GCA CAT-3'
	reverse 5'-TTA CTC ACC ATT TCA GGC AAA GAC-3'
KDR	forward 5'-GGC CCA ATA ATC AGA GTG GCA-3'
	reverse 5'-TGT CAT TTC CGA TCA CTT TTG GA-3'
NRP1	forward 5'-AAG GTT TCT CAG CAA ACT ACA GTG-3'
	reverse 5'- GGG AAG AAG CTG TGA TCT GGT C-3'

結果

1. 抗-(P)RR/ATP6AP2 抗体（Ms3-24）の評価

まずはじめに、(P)RR/ATP6AP2 の機能を解明するため、GST 融合膜型(P)RR/ATP6AP2 [GST-fl(P)RR]タンパク質を抗原としてマウスモノクローナル抗体を作製（Ms3-24）した。

そして、Ms3-24 抗体の認識部位を同定するため、(P)RR/ATP6AP2 の deletion mutant を 4 つ作製し（図 4A)、膜型を含め 5 種類の GST 融合タンパク質を用いて、イムノブロット法を行った。結果、C 末端のみを有する(P)RR/ATP6AP2 [GST-ATP6AP2]でバンドが消失した。一方、N 末端を有する組換え体[GST-(P)RR-124]でバンドが認められたことから（図 4B)、Ms3-24 は(P)RR/ATP6AP2 タンパク質の N 末端側 124 アミノ酸までを認識していることがわかった。

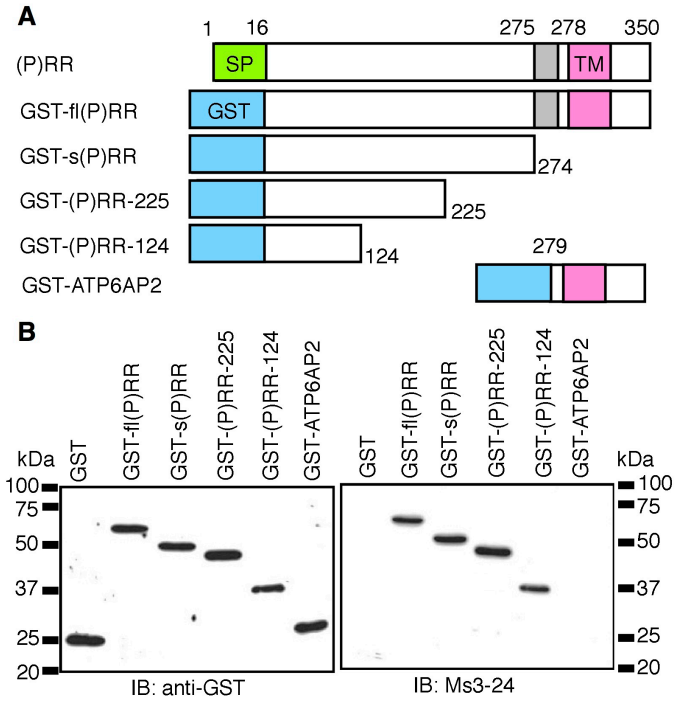


図 4　抗-(P)RR/ATP6AP2 抗体（Ms3-24）の評価

A: (P)RR/ATP6AP2 変異体。B:組換え GST 融合(P)RR/ATP6AP2 タンパク質を用いた、イムノブロット解析。

さらにこの Ms3-24 抗体の特異性をマウス組織を用いたイムノブロット法および免疫組織染色にて検討した。マウス網膜、脳、腎臓のホモジネートを用いて発現の解析を行ったが、予想分子質量 35kDa 付近に特異的にバンドが検出された（図 4C)。さらに、マウス網膜を用いた免疫組織染色では、既報[26]と一致する視細胞、網膜血管や神経節細胞で市販品の抗-(P)RR/ATP6AP2 抗体とシグナルが共局在していた（図 4D-G)。このことより、我々が作製した(P)RR/ATP6AP2 抗体（Ms3-24）は(P)RR/ATP6AP2 タンパク質を特異的に認識すると考えられる。この抗体を用いて以降の蛍光免疫組織染色や ELISA を行った。

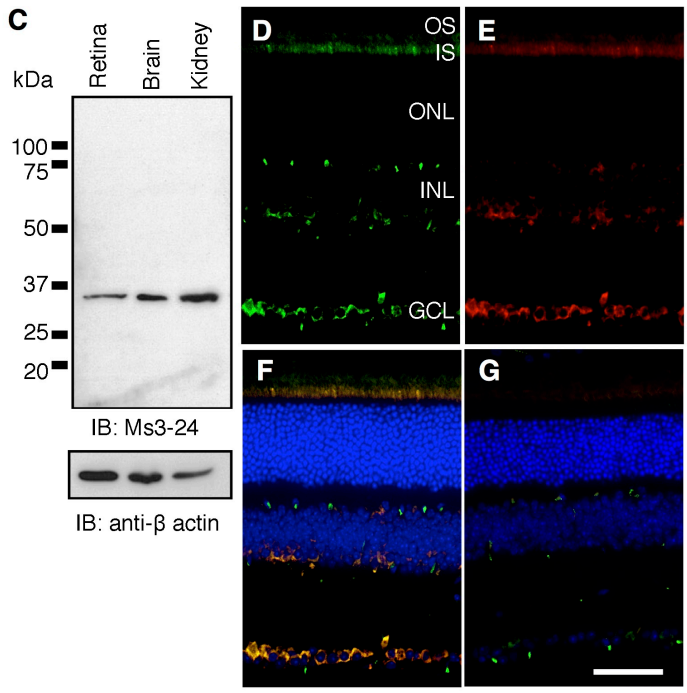


図 4　抗-(P)RR/ATP6AP2 抗体（Ms3-24）の評価

C: マウス網膜、脳、腎臓ホモジネートを用いたイムノブロット解析。D-F:Ms3-24（緑色)、市販品抗-(P)RR/ATP6AP2 抗体（赤色)、核（青色)。（G）陰性コントロール、一次抗体なし。スケールバー:30μM

1. ヒト網膜および増殖膜における RAS 関連分子の発現

これまでに病態モデル動物を用いた研究成果により眼疾患への RAS および RAPS の関与は明らかとなった [21-30]。しかしながら、ヒトでの眼疾患における関連に関しては一切報告がなかった。そこで、ヒト増殖糖尿病網膜症手術サンプルを用いて組織 RAS および(P)RR/ATP6AP2 の血管新生への関与を検討した。まずヒト網膜に(P)RR/ATP6AP2 をはじめとする RAS コンポーネントの存在を確認するため、増殖糖尿病網膜症患者より採取された線維性血管増殖膜（以下、増殖膜）およびヒト由来網膜関連細胞において遺伝子発現を確認したところ、増殖膜および網膜関連細胞において全ての分子の発現が認められた（図 5A)。

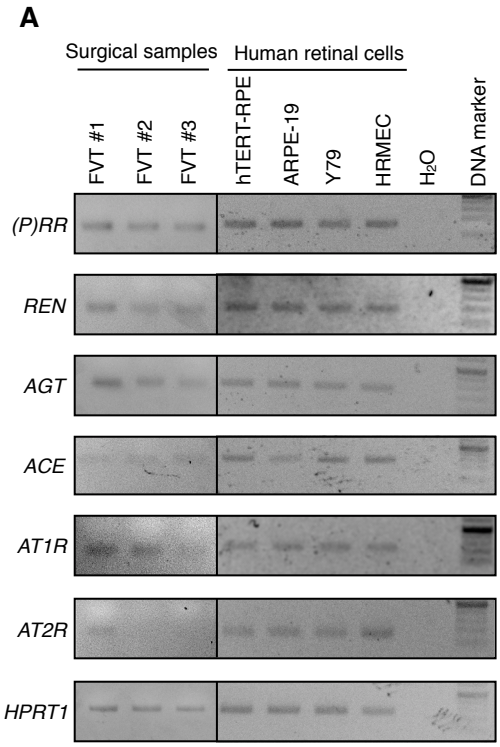


図 5　(P)RR および RAS コンポーネントの発現解析

A: 増殖糖尿病網膜症患者より採取された線維性血管増殖膜およびヒト由来網膜関連細胞における遺伝子発現解析。FVT: 線維性血管増殖膜。hTERT-RPE、ARPE-19:　ヒト網膜色素上皮細胞。Y79:ヒト網膜芽細胞腫。HRMEC:ヒト網膜血管内皮細胞。

2. 増殖膜における（プロ）レニン受容体タンパクの局在

さらに線維性血管増殖膜における(P)RR/ATP6AP2 の局在を詳細に解析するため免疫組織染色法にて検討を行ったところ、(P)RR/ATP6AP2 は血管周辺部に局在していた。さらに血管内皮細胞マーカー抗-CD31 抗体、血管平滑筋マーカー抗-α-smooth muscle actin 抗体との二重染色を行った結果、(P)RR/ATP6AP2 は血管内皮細胞に局在していることが明らかとなった（図 5B-G)。

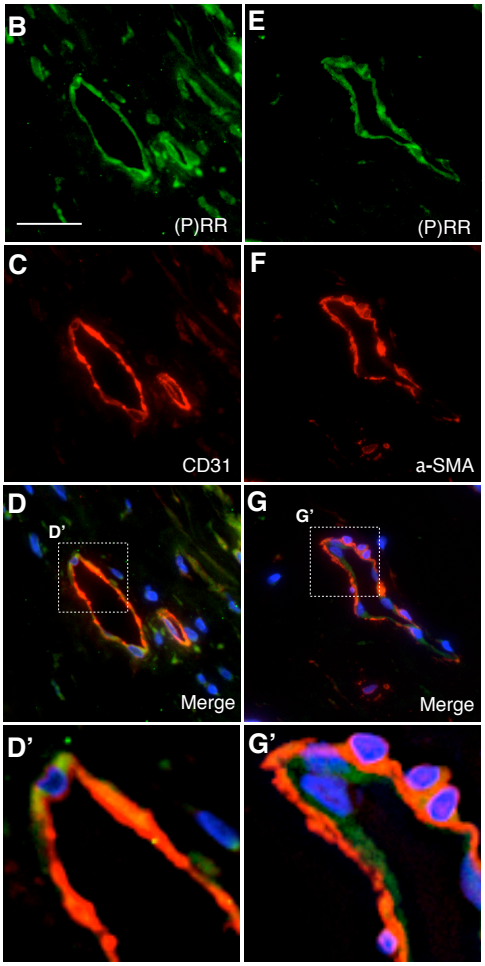


図 5　(P)RR および RAS コンポーネントの局在解析

B-G: 線維性血管増殖膜を用いた免疫組織染色。(P)RR は血管周辺部に検出され（B, E 緑色)、血管内皮細胞マーカーCD31（C　赤色）と共局在が認められた（D, D'）。一方、血管平滑筋マーカーα-smooth muscle actin（F 赤色）とは認められなかった（G, G'）。スケールバー；30μm。

3. 増殖膜における（プロ）レニン受容体タンパクの局在

また、増殖膜の血管内皮細胞における(P)RR/ATP6AP2 蛍光シグナルは、リガンドであるプロレニン、細胞内シグナルの ERK1/2、さらに下流に存在する VEGF と共局在していた（図 6A-I)。

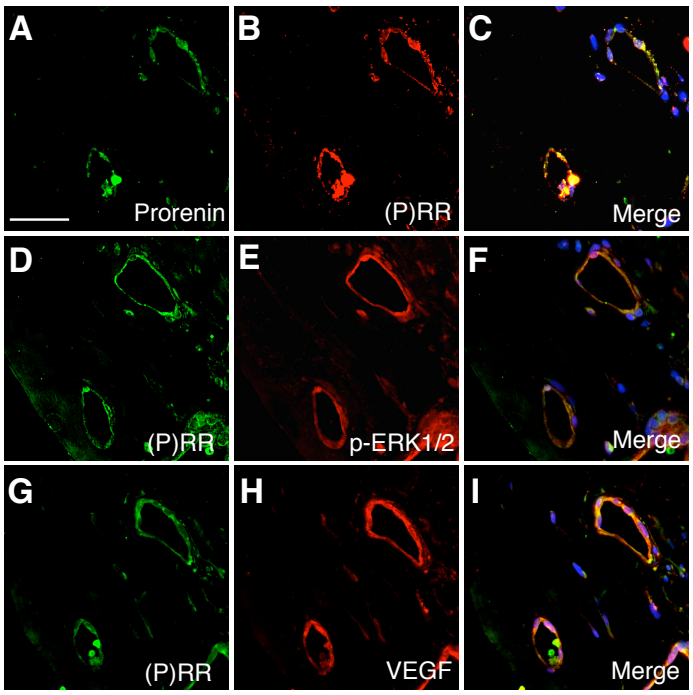


図 6　線維性血管増殖膜における免疫組織染色

A-C: プロレニンと(P)RR。D-F: (P)RR と p-ERK1/2。G-I: (P)RR と VEGF の線維性血管増殖膜における免疫組織染色。スケールバー；30μm。

4.プロレニン刺激におによる網膜血管内皮細胞での VEGF 発現

糖尿病網膜症の網膜血管新生には、VEGF（なかでも VEGF165 アイソフォーム）が主要な病態分子であることが知られている[6]。そこで、血管内皮細胞における(P)RR/ATP6AP2 とプロレニンの機能をさらに詳細に解析するため、初代培養ヒト網膜血管内皮細胞を用いた *in vitro* 実験を行った。網膜血管内皮細胞をプロレニンで刺激し、*VEGF* 遺伝子の発現量変化をリアルタイム PCR 法にて解析を行った。結果、プロレニン刺激で *VEGF165* をはじめとして *VEGF121* や *VEGF189* の遺伝子発現上昇が認められた（*VEGF121*, fold change = 1.38; *VEGF165*, fold change = 2.16; *VEGF189*, fold change = 1.31)。

そしてその *VEGF* 発現亢進は、プロレニンと(P)RR/ATP6AP2 の結合を特異的に阻害する PRRB や、(P)RR/ATP6AP2 の細胞内シグナルの ERK 阻害剤により抑制された[PRRB 処理（*VEGF121*, fold change = 1.12; *VEGF165*, fold change = 1.09; *VEGF189*, fold change = 0.92), U0126 処理（*VEGF121*, fold change = 1.24; *VEGF165*, fold change = 1.38; *VEGF189*, fold change = 0.91)］(図 7A)。これらの結果から、ヒト網膜血管内皮細胞における VEGF 発現にプロレニンと(P)RR/ATP6AP2 経路が関与していることが示唆された。

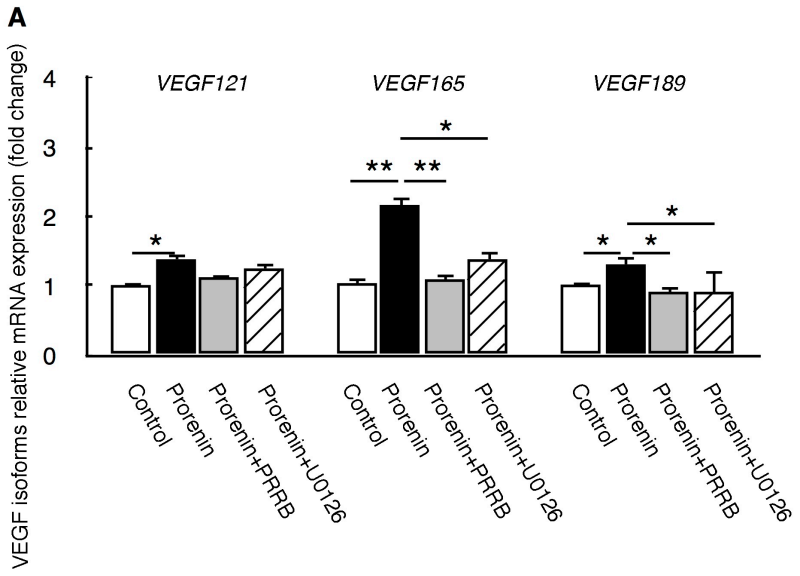


図 7　ヒト網膜血管内皮細胞における VEGF 発現解析

（A）ヒト網膜血管内皮細胞（HRMEC）にプロレニンを添加し、*VEGF121*、*165*、*189* の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。プロレニン刺激により VEGF の発現量は有意に増加し、PRRB や ERK1/2 シグナル伝達阻害薬（U0126）の前処理により抑制された。n = 6、**: P<0.01、*: P<0.05。

ウシ網膜血管内皮細胞を用いた解析で、AngII 刺激により AT1R が活性化し、VEGF および VEGFR-2 の遺伝子発現量が増加して、VEGF 誘導血管新生が活性化されることが報告されている[59]。そこでヒト網膜血管内皮細胞へのプロレニン刺激による *VEGFR-2（KDR）*および *VEGFR-1（FLT1）*、*NRP1* の遺伝子発現が変化していないかを調べた。結果、プロレニン刺激によってこれら 3 種類の遺伝子発現に有意な変動は認められなかった（*VEGFR-1*, fold change = 1.02; *VEGFR-2*, fold change = 1.13; *NRP1*, fold change = 1.02）（図 7B)。このことより、VEGF の発現上昇は、定常的に発現している RAS 関連分子の活性化を介してではなく、プロレニン-(P)RR/ATP6AP2 の経路を介してであると考えられる。

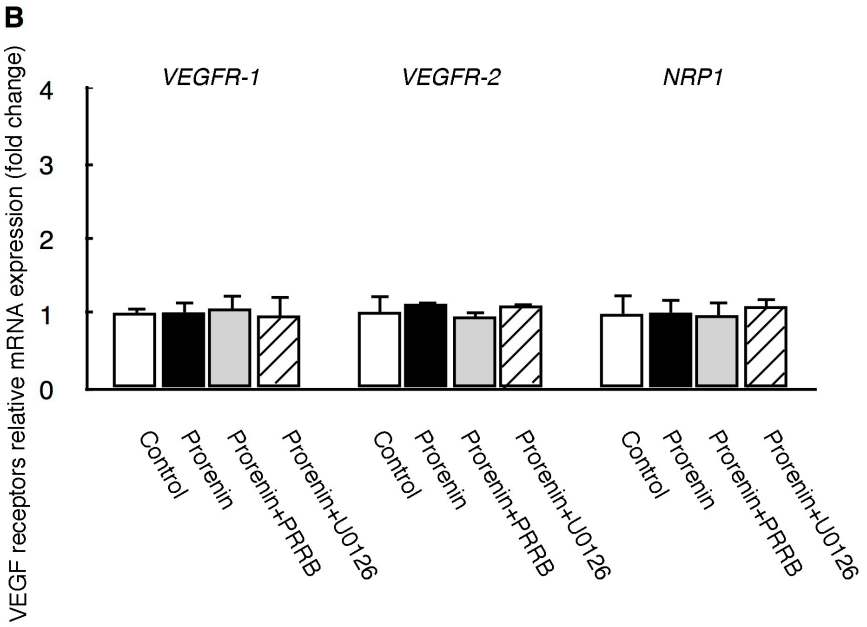


図 7　ヒト網膜血管内皮細胞における VEGF 発現解析

（B）ヒト網膜血管内皮細胞（HRMEC）にプロレニンを添加し、*VEGFR-1*、*VEGFR-2*、*NRP1* の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。n = 6。

5. 増殖糖尿病患者硝子体中における可溶型（プロ）レニン受容体

また、(P)RR/ATP6AP2 は細胞内で合成された後、ER-ゴルジ体を経由して種々の翻訳後修飾を受け、細胞膜に移行することが知られている [60]。しかし、一部(P)RR/ATP6AP2 はプロセッシング酵素の furin や ADAM19 により切断され、その N 末端側タンパク質が可溶型(P)RR[s(P)RR]として細胞外に放出されることが報告されている [61,62]。そこで増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中で可溶型(P)RR 量を ELISA 法を用いて測定した。その結果、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体における可溶型(P)RR の発現量は，対照群（黄斑円孔および網膜前膜患者検体）に比べ有意に増加していた（PDR 群、3.88 ± 0.43 ng/ml；対象群、0.56 ± 0.16 ng/ml）（図 8A)。また、増殖膜の血管内皮細胞にて、(P)RR/ATP6AP2 と furin、ADAM19 との共局在が認められた（図 8B-G)。

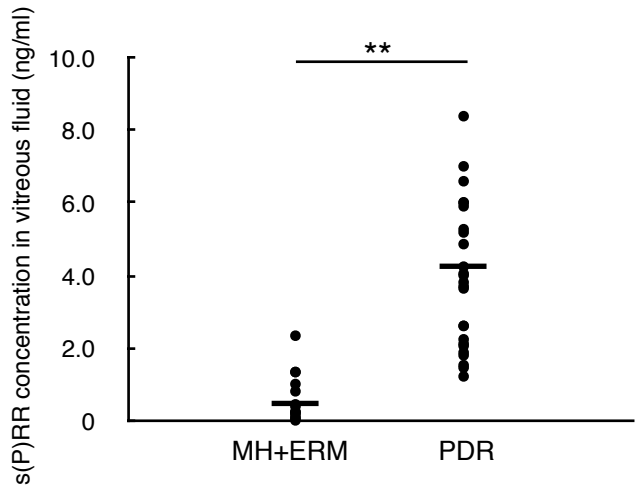


図 8　硝子体中における可溶型(P)RR 量

A：ELISA 法を用い、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体における可溶型(P)RR 量[s(P)RR]を測定した結果，対照群（黄斑円孔および網膜前膜患者検体）に比べ有意に増加していた。**: P<0.01

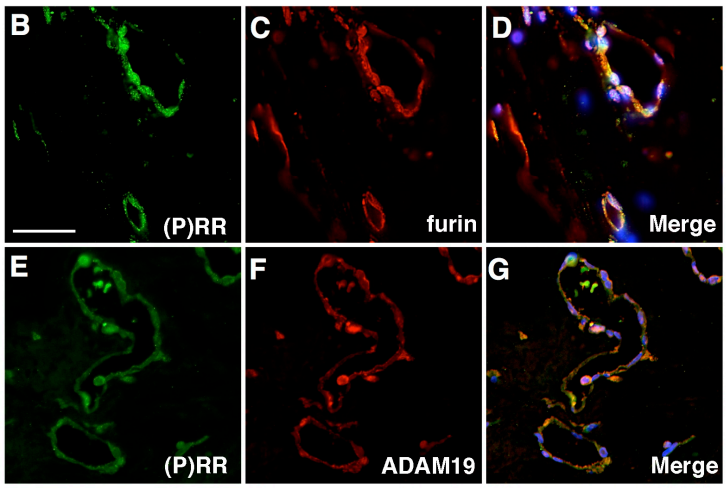


図 8　線維性血管増殖膜における免疫組織染色

B-D: (P)RR と furin。E-G: (P)RR と ADAM19。スケールバー；30 μm。

さらに、プロレニン量も測定したところ、増殖糖尿病網膜症群で増加(PDR 群、184.09 ± 26.02 pg/ml；対象群、65.16 ± 12.85 pg/ml) し、可溶型(P)RR 量と有意な正相関を示した($p < 0.05$, $r^2 = 0.242$) (図 9A, B) 。

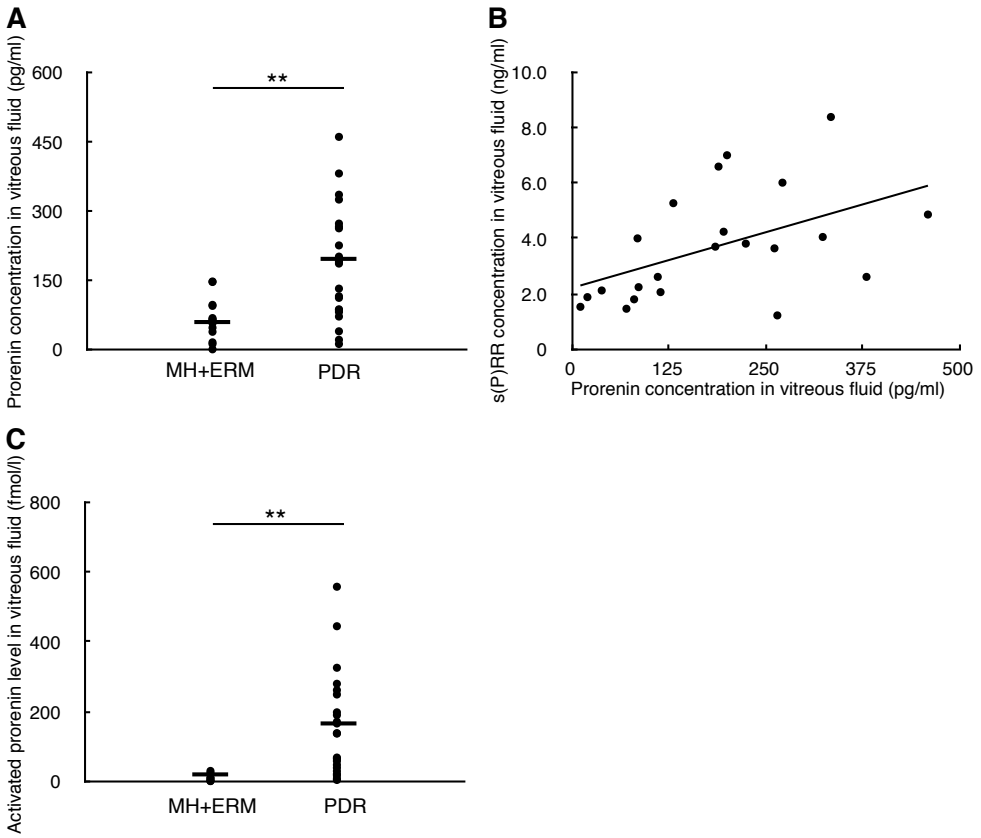


図 9　硝子体中におけるプロレニン量、活性型プロレニン量

A: ELISA 法を用い、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体におけるプロレニン量を測定した結果，対照群（黄斑円孔および網膜前膜患者検体）に比べ有意に増加していた。B: 増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中における可溶型(P)RR とプロレニン量は正相関を示した。C: 既報をもとにプロレニンと可溶型(P)RR が結合した際に産生される活性型プロレニンの計算値を算出した結果、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体で有意な高値を示した。**: P<0.01

6. 増殖糖尿病患者硝子体中における可溶型（プロ）レニン受容体との相関性解析

また、既報で *in vitro* 解析にてプロレニンと可溶型(P)RR が結合した際に産生される活性型プロレニン量の結合解離定数 K_D 値が報告されている [58]。その計算値を用い本結果を解析すると、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体で活性型プロレニン量は有意な高値を示した（PDR 群、157.45 fmol/l；対象群、7.78 fmol/l）（図 9C）。また増殖糖尿病網膜症群で上昇していた VEGF 量（PDR 群、536.20 ± 115.94 pg/ml；対象群、66.39 ± 32.22 pg/ml）（図 10A）と可溶型(P)RR 量（$p < 0.01$, $r^2 = 0.546$）、活性型プロレニン量は正相関を示し（$p < 0.01$, $r^2 = 0.243$）（図 10B, C）、さらに興味深い事に増殖組織での血管密度と可溶型(P)RR 量が正の相関が認められた（$p < 0.05$, $r^2 = 0.520$）（図 10D）。

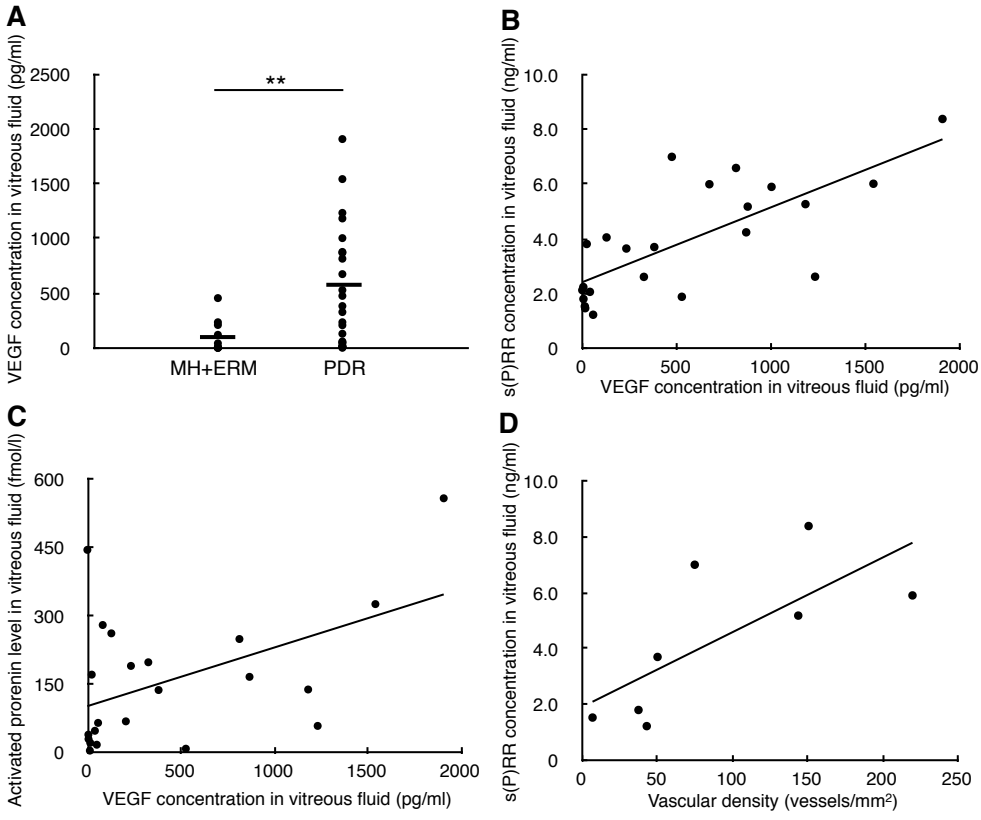


図 10　硝子体中における VEGF 量と血管活動性

A: ELISA 法を用い、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体における VEGF 量を測定した結果，対照群に比べ有意に増加していた。可溶型(P)RR と VEGF (B)、活性型プロレニンと VEGF (C) の相関解析。共に有意な正の相関を示す。D:硝子体中の可溶型(P)RR 量と増殖膜血管密度の相関解析。有意な正の相関を示す。

7. 増殖糖尿病患者硝子体中におけるレニン活性

組織 RAS の活性化を示す一つのパラメーターとしてレニン活性がある。しかしながら、これまでに眼内におけるレニン活性を測定した報告はない。そこで増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中でレニン活性を ELISA 法を用いて測定した。その結果、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体におけるレニン活性は，対照群に比べ有意に増加していた（PDR 群、1.10 ± 0.29 ng/ml.h；対象群、0.44 ± 0.13 ng/ml.h）（図 11A)。さらに、前記の解析で得られた可溶型（プロ）レニン受容体（$p < 0.01$, $r^2=0.438$)、プロレニン（$p < 0.05$, $r^2=0.209$)、活性型プロレニン（$p < 0.01$, $r^2=0.462$)、VEGF 濃度（$p < 0.05$, $r^2=0.284$）との相関性を解析した結果、全てにおいて有意な正相関を示した（図 11B-E)。

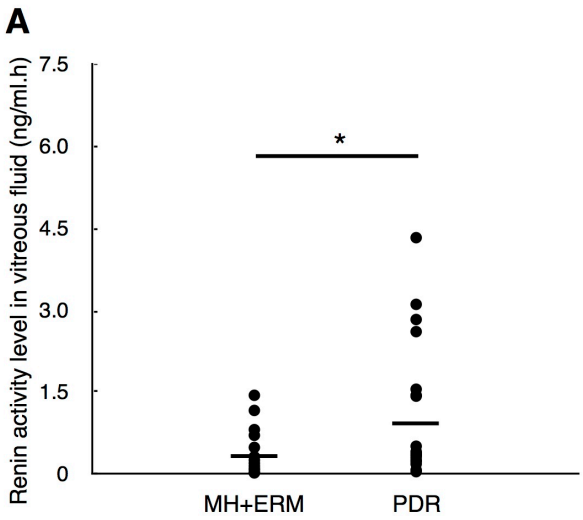


図 11　硝子体中におけるレニン活性

A: ELISA 法を用い、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体におけるレニン活性量を測定した結果，対照群（黄斑円孔および網膜前膜患者検体）に比べ有意に増加していた。*: P<0.05

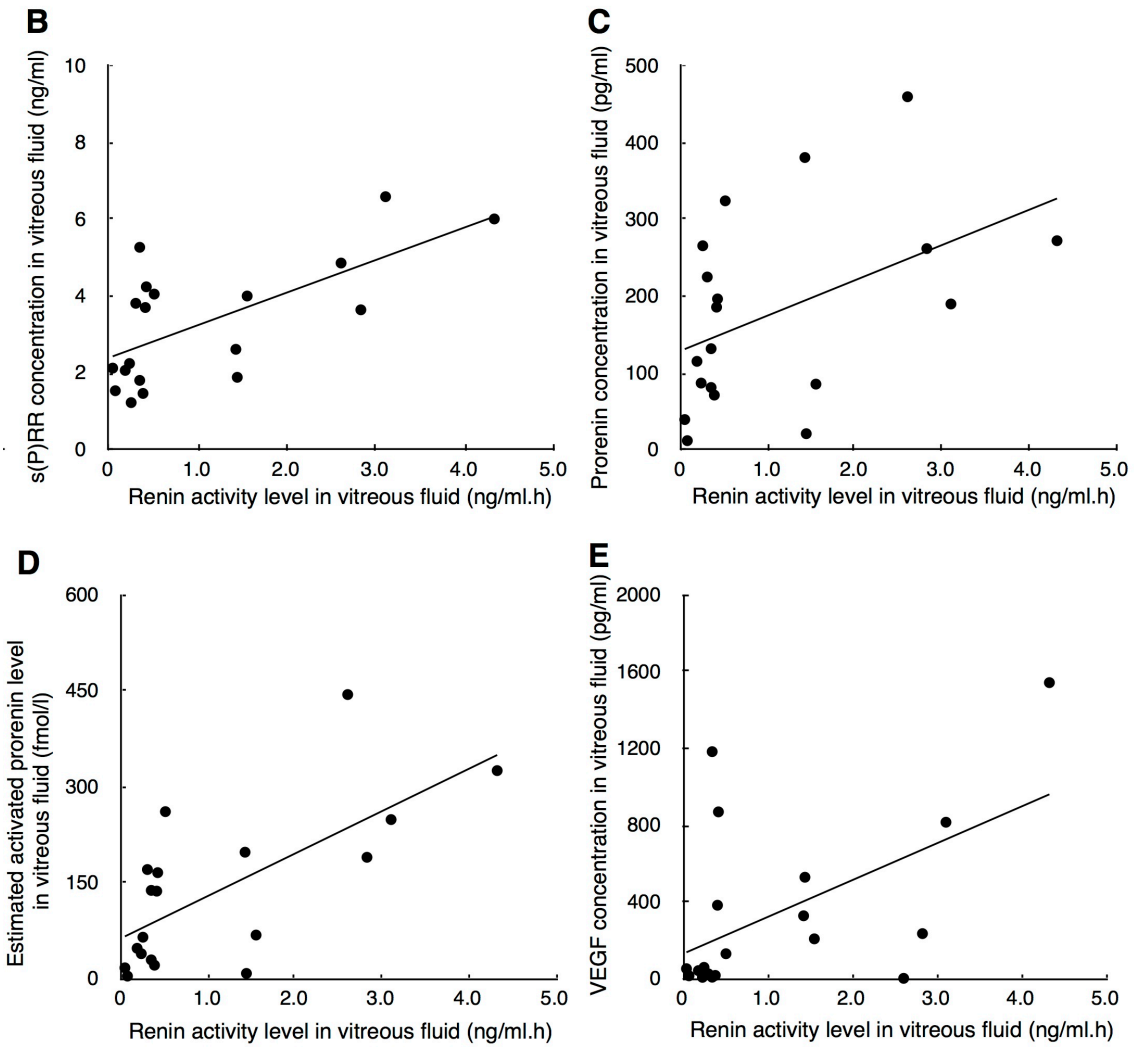


図 11　硝子体中におけるレニン活性

レニン活性と可溶型(P)RR（B)、レニン活性と VEGF（C)、レニン活性と活性型プロレニン（D）、レニン活性と VEGF（E）の相関解析。共に有意な正の相関を示す。

考察

本研究により増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中において可溶型(P)RR、プロレニン、活性型プロレニン、VEGF、レニン活性が対象群に比べ有意に上昇していることが明らかとなった。また増殖糖尿病網膜症患者より採取された線維性増殖膜の血管内皮細胞において、(P)RR/ATP6AP2 とプロレニン、VEGF が共局在していた。さらに、初代培養ヒト網膜血管内皮細胞をプロレニン刺激することでVEGF165 の発現が亢進することを明らかにした。

先進国の失明原因として重要な糖尿病網膜症、加齢黄斑変性、網膜静脈閉塞症はともに高血圧、動脈硬化などの生活習慣病が発症・進行の危険因子とみなされている。前述の通りこれらの眼疾患における共通の終末病態である血管新生は VEGF によって促進されることが解明され、抗 VEGF 療法の導入は一定の成功を収めている。しかし、これらの疾患にはまず VEGF 発現を誘導する炎症病態が先行し、多彩な分子が複数のステップで関与することもわかっている。そのため VEGF という病態下流の単一分子を阻害する治療戦略には限界も見えてきており、より上流のプロセスを早期に抑制する戦略が次世代の治療として望ましいと考えられる。本研究結果より、増殖糖尿病網膜症患者硝子体中のタンパク量が上昇していたプロレニンは、網膜および増殖膜の血管内皮細胞に局在する膜型(P)RR と結合し、その細胞内シグナルを活性化させるだけでなく、網膜 RAS 活性化のトリガーとなり、VEGF の発現亢進を介して炎症・血管新生を惹起していると考えられる[網膜 RAPS（図 12A）]。一方、プロレニンはさらに硝子体中の可溶型(P)RR と結合して、硝子体内で組織 RAS[硝子体 RAS（図 12B）]活性化を引き起こし、血管新生・炎症に関与していることが示唆される。このように、網膜 RAPS に加えて硝子体 RAS と呼ぶべき病態の介在が推定され、眼内における組織 RAS も血管新生に関与していると考えられ、(P)RR/ATP6AP2 は糖尿病網膜症における血管新生・炎症，つまり疾患の進行に関与する重要な分子であることがヒト臨床検体を用いて初めて示された。これまでの我々の動物モデルでの解析結果[21-30,40]に加え、ヒト組織の臨床検体においても(P)RR/ATP6AP2 は疾患の進行（血管新生・炎症）に関与する病理的に重要な分子であることが証明出来、網脈絡膜疾患の治療においての分子標的治療として(P)RR/ATP6AP2 が有用であることが示された。

臨床の現場で、網膜硝子体手術を行う眼科医は、線維性増殖膜の牽引力によって起こる硝子体内出血や網膜剥離などの深刻な合併症を回避するために硝子

体を除去する。しかし、本研究により硝子体自身が糖尿病網膜症の病態増幅器になり得る可能性を示せた。実際、VEGF をはじめとする様々な炎症性サイトカインが増殖性糖尿病網膜症患者の硝子体で増加している[63-66]。また、VEGF による血管透過性上昇により発症する糖尿病黄斑浮腫が、硝子体手術によりすぐに病態が改善することをたびたび眼科医は経験する。これは一部、硝子体 RAS で説明が出来るかもしれない（糖尿病網膜症の病態形成の原因となる AT1R NF-κB/VEGF 経路)。硝子体は、炎症性サイトカインのリザーバータンクとなっているのみならず、RAS の反応・活性化の場にもなっているとも考えられる。そういった意味でも、網膜硝子体手術の施行は、硝子体 RAS 活性化により産生される VEGF などの炎症性サイトカインを減少させる生物学的な意味合いも含んでいるのではないかと示唆される。

また、糖尿病網膜症の診療はこの 10 年で大きく変革した。手術機器の改良により終末期の増殖網膜症の手術成績は向上し、新しい診断機器の開発により浮腫性変化の定量が可能になり、分子病態の解明により VEGF 阻害薬による薬物療法（硝子体注入）が導入された。これらは、網膜症診療の前線の眼科医にとって画期的な進歩であった。数々の細胞生物学的研究や臨床サンプルから網膜症に炎症が関与することが明らかにされ、抗炎症ステロイド薬も局所投与されるようになった。また、糖尿病網膜症の危険因子として高血糖、高血圧、脂質異常、喫煙、妊娠などが古くから指摘されており、これらの危険因子を軽減するための全身管理が重要と考えられる。そして、多くの疫学調査や介入試験により網膜症と全身危険因子との関係も検討され、血糖・血圧管理の重要性に加えて、脂質管理の意義については臨床試験（FIELD, ACCORD）の結果から議論されている[67,68]。具体的には、トリグリセリドに主に作用するフィブラート系薬剤（PPAR-a 作動薬）の網膜症に対するベネフィット（それぞれ、レーザー治療を必要とするリスクの軽減、または、網膜症の進行）が示されたが、脂質の改善と相関しないことから、結果の解釈について議論されている。また、LDL コレステロールに主に作用するスタチン系薬剤(HMG-CoA 還元酵素阻害薬)については、小規模のランダム化試験（プラセボ対照ではない）で atorvastatin によりレーザー治療後の硬性白斑の減少に有意差がみられたとしているが[69]、大規模無作為化対照試験による有効性は示されていない。脂質に関しては、どちらの薬剤も多面的作用 pleiotropic effects があることから、抗炎症効果など脂質代謝と関係ない機序も推測されている。また、血糖コントロールに関しては、数々の

臨床研究（DDCT/EDIC, UKPDS, Kumamoto Study, ACCORD-Eye）によって強化インスリン療法を含めた厳格な血糖コントロールが網膜症の管理に不可欠であることは明らかである[67,70]。さらに、過去一定期間の血糖コントロールの効果が長期にわたり持続して網膜症を含めた血管合併症を抑制することが明らかになり、「metabolic memory」または「legacy effect」と呼ばれるが、この観点からも血糖コントロールは最重要である（血圧コントロールではこの効果は認められない)。さらに、腎症を含めた全身管理の一環としてRASの抑制は、網膜症の発症・進行の防止につながることが複数の臨床試験(EUCLID, DIRECT, RASS)で複数の RAS 抑制薬(lisinopril, candesartan, losartan, enalapril)によって示された[33,70-74]。これは血圧に依存しない組織RASの抑制効果と考えられ、網膜症の長期マネージメントにとって組織 RAS の制御が有益であることを示している（詳細に関しては後述）[75]。

糖尿病網膜症の全身マネージメントとして、血糖・血圧を厳格に管理することは基本であるが、血圧に依存しない組織 RAS の関与が複数の無作為化対照試験から明らかになった。このことは、高血圧を合併した糖尿病網膜症患者に対するRAS抑制薬のベネフィットが循環RASに対する降圧作用と組織RASに対する抗炎症・抗血管新生作用という複数の作用機序を介することを意味する。さらに、網膜RAPSや硝子体RASといった分子メカニズムが解明されたことは、網膜症に対する局所投与による分子標的療法の開発にもつながるであろう。

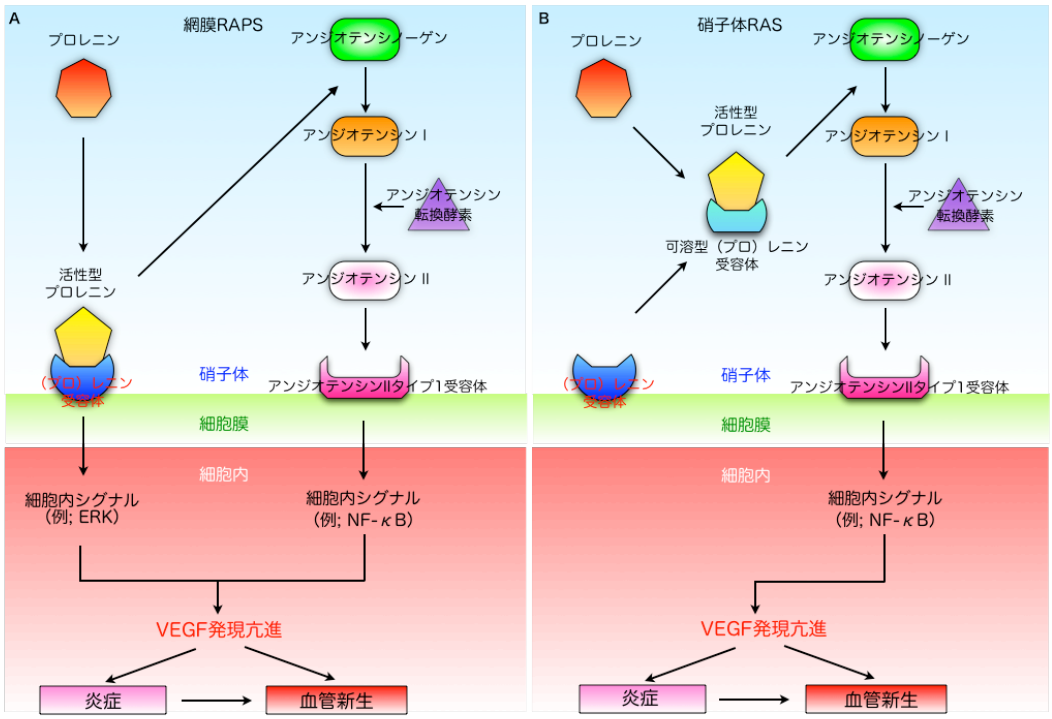


図 12　網膜受容体結合プロレニン系と硝子体レニン-アンジオテンシン系

結論

(P)RR/ATP6AP2 は、糖尿病網膜症における病理的血管新生に関与する重要な分子である可能性が示された。

第 2 章

Atp6ap2/(プロ)レニン受容体の網膜発生期における細胞極性への関与

Atp6ap2/(pro)renin receptor interacts with Par3 as a cell polarity determinant required for laminar formation during retinal development in mice.

緒言

RAS は、生物が海から陸へと進化する過程で塩分と水分を体内に保持するために発達した循環ホルモンシステム（循環 RAS）であるが、臓器局所では細胞の分化・増殖など組織修復などの役割を担っている（組織 RAS）[21-25]。(P)RR/ATP6AP2 は、RAS の上流に位置して組織 RAS 活性化のみならず RAS 非依存性の細胞内シグナルを伝達している。そして我々は、(P)RR/ATP6AP2 が眼組織における炎症・血管新生の上流で網膜疾患の分子病態を制御していることを動物モデルで示し、RAPS という新たな病態概念を提唱してきた[26-30,40]。さらに、糖尿病網膜症などの患者より採取した臨床検体を用いた解析の結果、(P)RR/ATP6AP2 は糖尿病網膜症における疾患の進行に関与する重要な分子であることを第 1 章で示した[41-43]。一方、(P)RR は、その C 末端領域断片が ATP 依存プロトンポンプ vacuolar H^+-ATPase（v-ATPase）のアダプタータンパク Atp6ap2 と同一分子であり、近年では、RAS とは独立した生理機能に関連することが明らかにされた[33,45]。そこで我々は、網膜発生における(P)RR/ATP6AP2 の生理的機能の解明するため、網膜視細胞特異的 *Atp6ap2/(P)RR* コンディショナルノックアウトマウスを作製し、詳細な解析を行った。

Atp6ap2/(P)RR 遺伝子の通常ノックアウトマウスは胎生致死であるため、Cre-LoxP システムを用いたコンディショナルノックアウト（CKO）マウスを作製した。*Atp6ap2*/LoxP マウスと網膜視細胞特異的プロモーター*Cone-rod homeobox protein*（*Crx*)-Cre マウスを交配し、視細胞特異的 *Atp6ap2*-CKO マウスを得た。そして、Cre の発現が認められる胎児期 12.5 日目から経時的に網膜を採取し、免疫組織染色法、イムノブロット法によるタンパク発現・局在解析や網膜電図などによる解析を行った。

コントロール（WT）マウスにおいて、Atp6ap2/*(P)RR* は網膜全体に発現局在しており、胎児期（胎児期 12.5 日目）から成体期（生後 2 ヶ月）に掛けて普遍的に発現していることがわかった。まず、WT および *Atp6ap2*-CKO マウス網膜の形態的解析を行ったところ、Cre の発現が認められる胎児期 12.5 日目では *Atp6ap2*-CKO マウスの網膜に顕著な変化は認められなかったが、14.5 日目には層構造の異常が認められ、網膜細胞の分化が完了する生後 14 日目の網膜では、視細胞を中心とした網膜の層構造が著明に障害され、偽ロゼット形成が認められた。また網膜電図における振幅低下が認められた。そこで、*Atp6ap2* 遺伝子欠損が視細胞の分化に影響しているのではないかと考え、生後 14 日目の網膜を用

い各細胞のマーカー抗体で免疫組織染色を行ったが、視細胞をはじめとする網膜細胞への分化に影響は認められなかった。一方、これまでの報告で網膜の層構造形成には、細胞間接着分子（ß-catenin、N-cadherin など）や細胞極性分子（Par3、aPKC など）が重要な役割を担っていることが明らかにされている。そこで、胎児期 14.5 日目の網膜における Atp6ap2/*(P)RR* とそれら分子との局在を確認したところ、神経芽細胞層の頂端側での共局在が認められたが、*Atp6ap2*-CKO マウス網膜ではそれが損失していた。そして、イムノブロット法で細胞間接着分子などの発現を確認したが、発現量に有意な差は認められなかったことより、Atp6ap2/*(P)RR* は神経芽細胞層の頂端側におけるそれら分子の局在に関与していると考えられた。さらに、マウス網膜や遺伝子導入細胞を用いた免疫沈降法を行った結果、Atp6ap2/*(P)RR* は細胞極性分子の Par3 と共役することが明らかとなった。これらのことより、Atp6ap2/*(P)RR* は網膜視細胞の発生期においては、Par3 と共役し細胞極性に関与しているとと考えられる。

Atp6ap2/(P)RR は、臓器障害における病態形成のみならず、視細胞の発生段階において細胞極性に関わる重要な役割を担っており、多彩な生理的現象にも関連していると示唆される。

実験方法

1．マウスおよび細胞

本実験におけるマウスの扱いは「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」および「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」に則しておこなった。また Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) で定められたガイドラインに基づいて実施した。

視細胞特異的 Atp6ap2/(P)RR ノックアウトマウスを作製するため、*loxP/Atp6ap2* 遺伝子組換えマウス[51]と *Cone-rod homeobox* (*Crx*) プロモーター制御 *Cre* 遺伝子導入 (*Crx-Cre*) マウス[76]を交配させた。

2．蛍光免疫染色

眼球を 4%パラホルムアルデヒド (PFA) で氷上 30 分固定した後、スクロースにて脱水し、Frozen Section Compound (Leica, Exton, PA)に包埋して凍結切片を作製した。切片は 5%正常ヤギ血清(Life Technologies)と 0.05% Triton X-100 を含有する Phosphate buffered saline (PBS)で室温 1 時間かけてブロッキングをおこなった。その後、以下の抗体を用いて一次抗体反応をおこなった[mouse および rabbit anti-Atp6ap2 抗体[42] および Sigma-Aldrich, St.Louis, MO]、mouse anti-rhodopsin 抗体(Millipore, Billerica, MA)、rabbit anti-cone arrestin 抗体(Millipore)、rabbit anti-calbindin 抗体(Millipore)、mouse anti-glutamine synthetase 抗体(Millipore)、rabbit anti-Par3 抗体(Millipore)、rabbit anti-phosphorylated (p-) Histone H3 抗体(Millipore)、mouse anti-Pax6 抗体(Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, IA)、goat anti-Brn3 抗体(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)および rabbit anti-Par6 抗体(Santa Cruz Biotechnology)、sheep anti-Chx10 抗体(Abcam, Cambridge, MA)、chicken anti-calreticulin 抗体(Abcam)および mouse anti-58K Golgi protein 抗体(Abcam)、mouse anti-N-cadherin 抗体(BD Biosciences, San Jose, CA)、mouse anti-ß-catenin 抗体(BD Biosciences) および mouse anti-aPKCλ (BD Biosciences)、rabbit anti-zona occludens (ZO)-1 抗体(Life Technologies, Carlsbad, CA)、rabbit anti-Crb2 抗体(Thermo Scientific, Rockford, IL)、rabbit anti-Pals1 抗体(Proteintech, Chicago, IL) および mouse anti-α-tubulin 抗体(Sigma-Aldrich)]。0.05% Triton X-100/PBS で 5 分 3 回洗浄した後、Alexa Fluor 488 または 546 (Life Technologies)、HiLyte Fluor 647 (Anaspec, San Jose, CA)をラベルした二次抗体で蛍光標識し、核は

4',6-diamino-2- phenylindole (DAPI, Lonza, Basel, Switzerland)で染色した。切片は FluoView 1000 confocal microscope (Olympus, Tokyo, Japan)で観察した。

3. RNA 抽出および PCR

網膜から TRIzol Reagent を用いて RNA を回収し、GoScrip Reverse Transcriptase(Promega)と oligo dT(20) primers を用いて RNA の逆転写をおこなった。プライマー (*Atp6ap2*; forward 5'- CTG GTG GCG GGT GCT TTA G -3', reverse 5'- GCT ACG TCT GGG ATT CGA TCT -3' and *Actb*; forward 5'- CAT CCG TAA AGA CCT CTA TGC CAA C -3', reverse 5'- ATG GAG CCA CCG ATC CAC A -3')、GoTaq qPCR Master Mix (Promega)、を使用し、遺伝子発現を検討した。

4. 網膜細胞計測

生後 14 日目のマウス網膜を DMEM 培地中で細かく切り分け、トリプシンを加え 37℃で 15 分間インキュベーションした。解離させた網膜細胞を 4%パラホルムアルデヒド (PFA) で 10 分間室温、20 分間 37℃で固定をした後、網膜細胞特異的マーカー抗体で蛍光免疫染色を行った。二重盲検法で細胞陽性数を計測した。

5. 網膜電図

12 時間以上暗順応させたマウスに対し、暗赤色灯下でペントバルビタール(70 mg/kg)腹腔内注射により麻酔し、保温パッド上で以下の処置をした。0.5% tropicamide、0.5% phenylephrine (Santen Pharmaceutical Co.)を点眼し散瞳させた。接地電極は尾の皮下に針で刺し、基準電極は口腔内に設置した。関電極として金線を角膜に設置した。応答は差動増幅され、0.313 から 1000 Hz の範囲のデジタルバンドパスフィルターを通ることで a 波と b 波が得られ、PowerLab System 2/25 (AD Instruments, New South Wales, Australia)を用いて記録した。光刺激は Ganzfeld System SG-2002 (LKC Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)を用いて 800 cd·s/m2、0.004 秒間照射した。電極インピーダンスの監 視は各動物の測定前後で行った。a 波の振幅はベースラインから a 波のトラフまでとして測定した[77]。

6. プラスミド DNA 構築と変異導入

ヒト *ATP6AP2* cDNA (GenBank No. NM_005765)は、FLAG-tag を付加して pCI vector (Promega, Madison, WI)にクローニングした。全ての *ATP6AP2* 変異体は、polymerase chain reaction (PCR)法を用いて作製した。ヒト *PAR3* cDNA (NM_001184785) は pCMV-Tag 3B vector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)にクローニングをした。全ての DNA コンストラクトは、使用前に配列の確認を行った。

7. 免疫沈降法

マウス網膜および細胞を細胞溶解バッファー [radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer、プロテアーゼ阻害剤 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)]にてホモジナイズした。サンプルを Protein G beads (Life Technologies)と 4℃で 1 時間プレインキュベーションした後、抗体を加え 4℃で一昼夜インキュベーションした。ビーズを細胞溶解バッファーで 3 回洗浄後、SDS バッファーでタンパクサンプルを溶解・溶出させた。その後、サンプルをポリアクリルアミドゲルにて泳動・分離後、PVDF (polyvinylidene fluoride) 膜に転写した。5%スキムミルクでブロッキングを行い、各種 1 次抗体 [rabbit anti-Atp6ap2 抗体、rabbit anti-Par3 抗体、mouse anti-N-cadherin 抗体、mouse anti-ß-catenin 抗体、mouse anti-aPKCλ 抗体、rabbit anti-ZO-1 抗体、anti-FLAG 抗体と anti-Myc 抗体 (Wako Pure Chemical Industries)]と反応させた。Horseradish peroxidase 標識 2 次抗体と反応後、シグナルを enhanced chemoluminescence (Western Lightning Ultra, Perkin Elmer, Waltham, MA)で発光させ、 LAS-4000 mini camera system (Fujifilm, Tokyo, Japan)で検出した。

8. Known-bait/known-prey yeast two-hybrid 解析

Known-bait/known-prey 解析は、Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System (Clontech, Mountain View, CA)のマニュアルに従い行った。*ATP6AP2* と PAR3 を bait vector pGBKT7 または prey vector pGADT7 (Clontech)にクローニングした。酵母 AH109 株に、bait そして prey ベクターを順次遺伝子導入した。bait 遺伝子導入株は [minus-tryptophan (*TRP*) selection]、prey 遺伝子導入株は [minus-leucine (*LEU*) selection] 栄養欠損培地で選別をした。bait/prey 遺伝子導入株は[minus-*TRP*, -*LEU*, -histidine (*HIS*), -adenosine (*ADE*) selection]

栄養欠損培地で選別を行い、さらに *lac Z* 遺伝子の発現を ß-galactosidase 活性の filter lift assay にて確認した。プレート上に培養した酵母をワットマン濾紙に複写を作り、液体窒素で凍結させた。濾紙を乾燥後、X-gal 溶液（0.1mg/ml X-Gal、60mM Na2HPO4、40mM NaH2PO4, 10mM KCl、1mM MgSO4）を浸透させ、30℃で 30 分間反応をさせた。

9. 統計解析

結果は平均値±標準誤差で示した。また各群間の比較検討は Student’s *t*-test を用いて解析し、P 値が 0.05 を下回った場合に統計学的に有意差ありとした。

実験結果

1. マウス網膜における Atp6ap2/(P)RR

これまでに我々はヒトおよび成体マウス網膜に Atp6ap2/(P)RR タンパクが発現していることを報告している [42] が、網膜発生期における発現・局在解析は行われていなかった。そこで、まず胎児期 12.5 日目と生後 14 日目のマウス網膜を用いて免疫組織染色を行い、Atp6ap2/(P)RR タンパクの局在を検討した。結果、胎児期網膜では Atp6ap2/(P)RR タンパクは神経芽層の頂端側と神経節細胞層に比較的強く局在していることがわかった（図 13A)。一方、成体網膜では既報 [42] と一致して、視細胞内節、神経節細胞層、内顆粒層（Müller 細胞）に局在していた（図 13B)。

さらに網膜発生期間での *Atp6ap2/(P)RR* 遺伝子の発現変化を半定量 PCR 法にて解析を行ったが、胎児期から成熟期にかけて大きな発現変化は認められず、ほぼ同程度の発現量であった（図 13C)。また、イムノブロット法を用いてタンパクレベルでも確認したが、半定量 PCR 法と同じ結果であった（図 13D)。これらのことより、Atp6ap2/(P)RR はマウス網膜の発生さらには成体での機能維持に何らかの役割を担っていると考えられる。

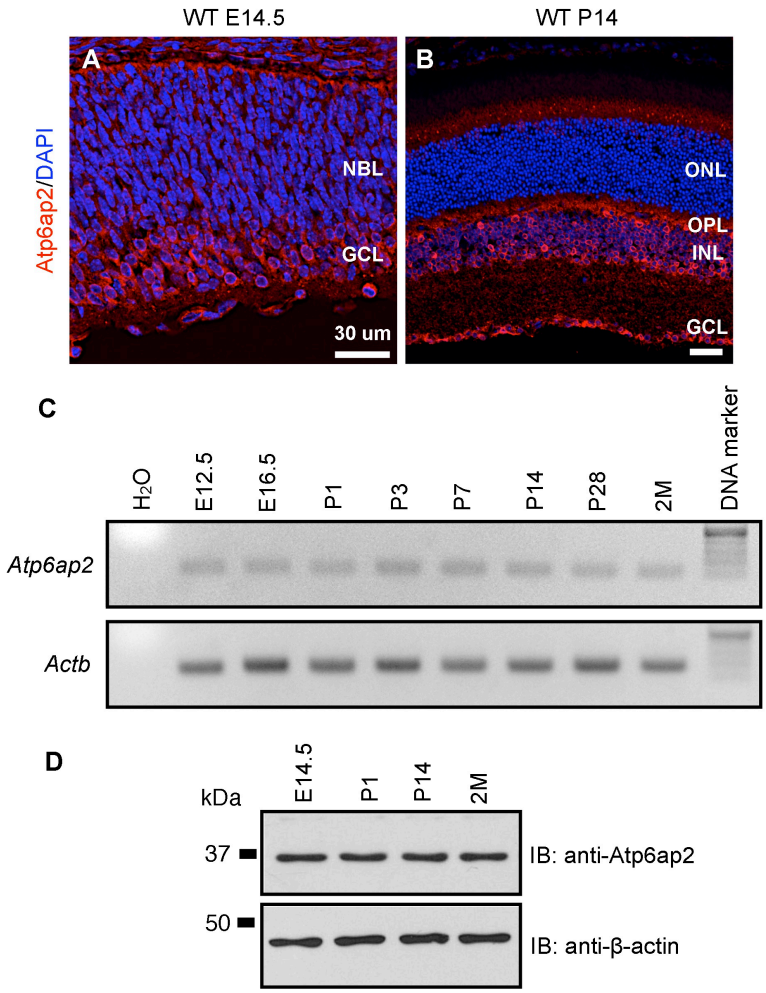


図 13　マウス網膜における Atp6ap2/(P)RR の発現局在

正常マウス網膜胎児期 14.5 日目（A）と生後 14 日目（B）における免疫組織染色。Atp6ap2/(P)RR（赤色）は神経芽層の頂端側と神経節細胞層に検出（A）され、成体網膜では視細胞内節、神経節細胞層、内顆粒層（Müller 細胞）に検出（B）された。核（DAPI、青色）。C:半定量 PCR 法によるマウス網膜発生・成長過程での *Atp6ap2/(P)RR* 遺伝子発現解析。D: イムノブロット法によるマウス網膜発生・成長過程での Atp6ap2/(P)RR タンパク発現解析。遺伝子・タンパク発現ともに胎児期から成熟期にかけて大きな発現変化は認められない。

2. 視細胞特異的 Atp6ap2/(P)RR 欠損マウス

①網膜形態、機能への影響

網膜における Atp6ap2/(P)RR の生理的機能を解明するため、Cre/loxP システムを用い、網膜視細胞特異的 *Atp6ap2/(P)RR* コンディショナルノックアウトマウス（*Atp6ap2*-CKO）を作製した。Cre/loxP システムとは、DNA 組換え酵素 Cre が *loxP* 配列と呼ばれる DNA 配列に対し働くことにより生じる部位特異的組換え反応を利用した遺伝子組換え実験系である。これにより *loxP* 配列を有した *loxP/Atp6ap2* 遺伝子組換えマウス[51]と、*Cone-rod homeobox*（*Crx*）プロモーター制御 *Cre* 遺伝子導入マウス（*Crx-Cre*）[76]を交配させ、*loxP/Atp6ap2* と *Crx-Cre* の組換え遺伝子を有した *Atp6ap2*-CKO マウスを作製した。*Crx-Cre* マウスでは、Cre が胎児期 12.5 日目から視細胞に発現する[76]。つまり、*Atp6ap2*-CKO マウスでは胎児期 12.5 日目以降の視細胞のみにおいて *Atp6ap2* 遺伝子の欠損がおこる。

まず、我々はこの *Atp6ap2*-CKO マウス網膜の形態変化を解析した。対照群のコントロールマウスでは網膜の成熟につれ単層から複数の層構造を形成していた（図 14A-C)。一方、*Atp6ap2*-CKO マウスでは胎児期 12.5 日目では大きな変化は観察されなかったが、胎児期 14.5 日目には網膜が薄くなり、層構造にも乱れが生じていた（図 14D, E)。そして、それは生後 14 日目網膜では視細胞を中心とした網膜の層構造が著明に障害され、外顆粒層は偽ロゼット形成を呈していた（図 14F)。

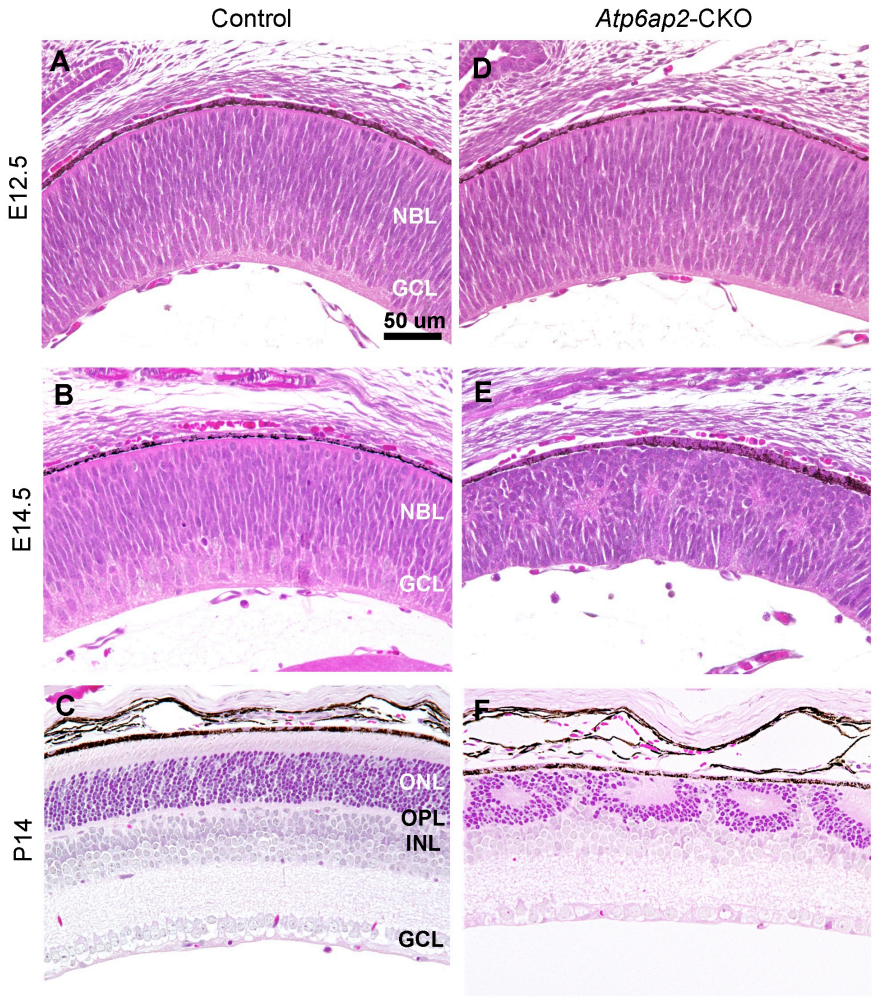


図 14　視細胞特異的 *Atp6ap2/(P)RR* 欠損マウス網膜における形態・機能への影響

胎児期 12.5 日目（A, D)、14.5 日目（B, E)、生後 14 日目（C, F）におけるコントロールおよび *Atp6ap2*-CKO マウス網膜のヘマトキシリン･エオジン染色。胎児期 14.5 日目以降の *Atp6ap2*-CKO マウス網膜で形態の変化が認められた（E, F)。

また、網膜電図を用いて網膜の機能変化を測定したところ、*Atp6ap2*-CKO マウスでは a-波（コントロール、481.7±26mV；*Atp6ap2*-CKO、142.4±68 mV、 $p < 0.0006$)、b-波（コントロール、1039.0±96mV；*Atp6ap2*-CKO、487.7±138 mV、$p < 0.0006$）ともに著明な低下が認められた（図 14G-I)。これらのことから、視細胞における Atp6ap2 は網膜の形態維持（形成）に重要な役割を担っていることが示唆される。

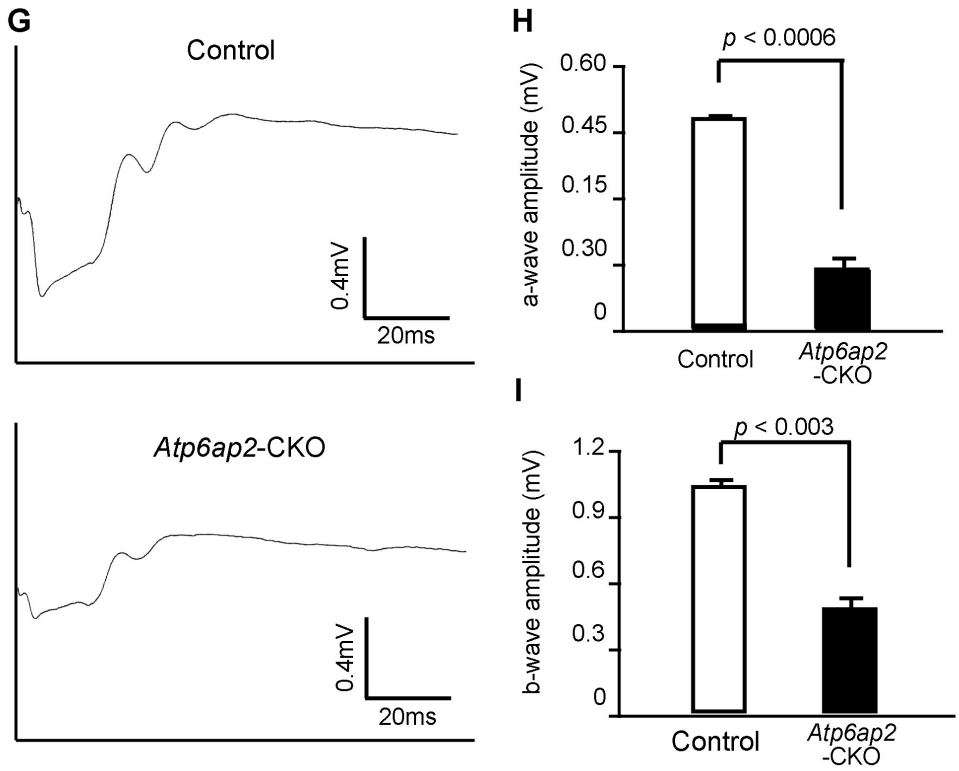


図 14　視細胞特異的 *Atp6ap2/(P)RR* 欠損マウス網膜における形態・機能への影響

G-I: 生後 1 ヶ月のコントロールおよび *Atp6ap2*-CKO マウスでの網膜電図。*Atp6ap2*-CKO マウスでは a-波、b-波ともに低下していた。n = 6-7。

2. 視細胞特異的 Atp6ap2/(P)RR 欠損マウス

②網膜分化への影響

Atp6ap2-CKO マウス網膜において形態の異常が認められたため、我々は *Atp6ap2* 遺伝子欠損が細胞の分化に影響を及ぼしているか検討した。マウス網膜では細胞の分化は生後 14 日目までには完了している。そこで、生後 14 日目のコントロールおよび *Atp6ap2*-CKO マウス網膜切片を用いて、網膜細胞のマーカー抗体にて免疫組織染色を行った。*Atp6ap2*-CKO マウス網膜では、層構造が異常なためマーカー抗体のシグナルが異常局在を示していたが、全ての発現が認められた（図 15A-N)。さらに、各マーカーの陽性数をカウントして、コントロールおよび *Atp6ap2*-CKO マウス網膜で比較したが有意な差は認められなかった(図 150)。これらの結果は、*Atp6ap2* 遺伝子欠損は網膜細胞の分化には影響しないことを示している。

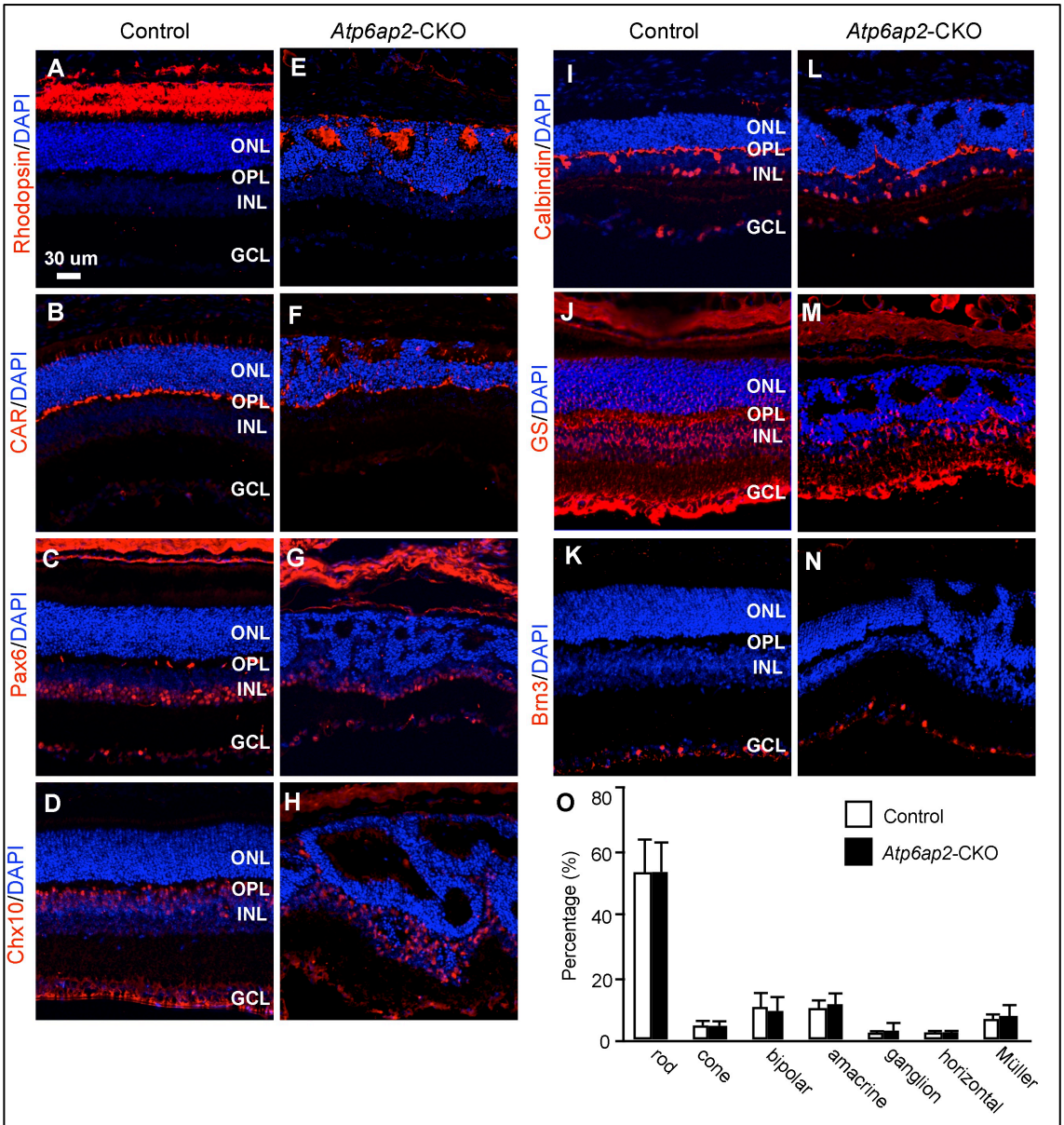


図 15　視細胞特異的 *Atp6ap2/(P)RR* 欠損マウス網膜における網膜細胞局在

生後 14 日目のコントロールおよび *Atp6ap2*-CKO マウス網膜での各網膜細胞のマーカー抗体（赤色）を用いた免疫組織染色。Rodopsin（杆体視細胞、A, E）、cone arrestin（錐体視細胞、B、F）、Pax6（アマクリン細胞と神経節細胞、C, G）、Chx10（双極細胞、D, H）、Calbindin（水平細胞、I, L）、glutamine synthetase（Müller 細胞、J, M）、Brn3（神経節細胞、K, N）。核（DAPI、青色）。O: 各陽性細胞数を計測し、比率にて表示。コントロールおよび *Atp6ap2*-CKO マウスで有意差はない。n = 12。

2. 視細胞特異的 Atp6ap2/(P)RR 欠損マウス

③網膜細胞接着・極性分子への影響

ß-catenin、N-cadherin、Par3、Crb2、Pals1などの細胞接着および極性分子は生理的な発生においては重要な機能を担っており、その遺伝子変異・欠損は網膜前駆細胞の異常局在を引き起こすことが報告されている[78-84]。*Atp6ap2*-CKOマウスも同様に網膜の層構造の異常が認められたことより、Atp6ap2と細胞接着および極性分子に関連があるのではないかと考えた。そこでまず、Atp6ap2とそれら分子の局在を免疫染色法で確認をした。結果、胎児期14.5日目網膜ではAtp6ap2とß-catenin、N-cadherin、Par3が神経芽層の頂端側で共局在していたが（図16A-I)、一方、細胞極性を担う分子群の一つ、Crb-Pals1-Patj複合体を構成するCrb2やPals1とはしていなかった（図16J-O)。また、*Atp6ap*2-CKOマウス網膜においてCrb2とPals1の局在を解析したが、胎児期14.5日目の神経芽層頂端側や生後14日目の視細胞で異常局在を示していた(図17A-H)。しかしながら、既報で*Crb2*や*Pals1*遺伝子変異マウスも同様に網膜の層構造異常形成が報告されているが、その表現系が認められるのは胎児期18.5日目および15.5日目である[85,86]。今回我々の*Atp6ap2*-CKOマウスは少し早く胎児期14.5日目で表現系が確認されている。これらのことからCrb2やPals1は網膜層構造形成におけるAtp6ap2のターゲット分子ではないと示唆される。

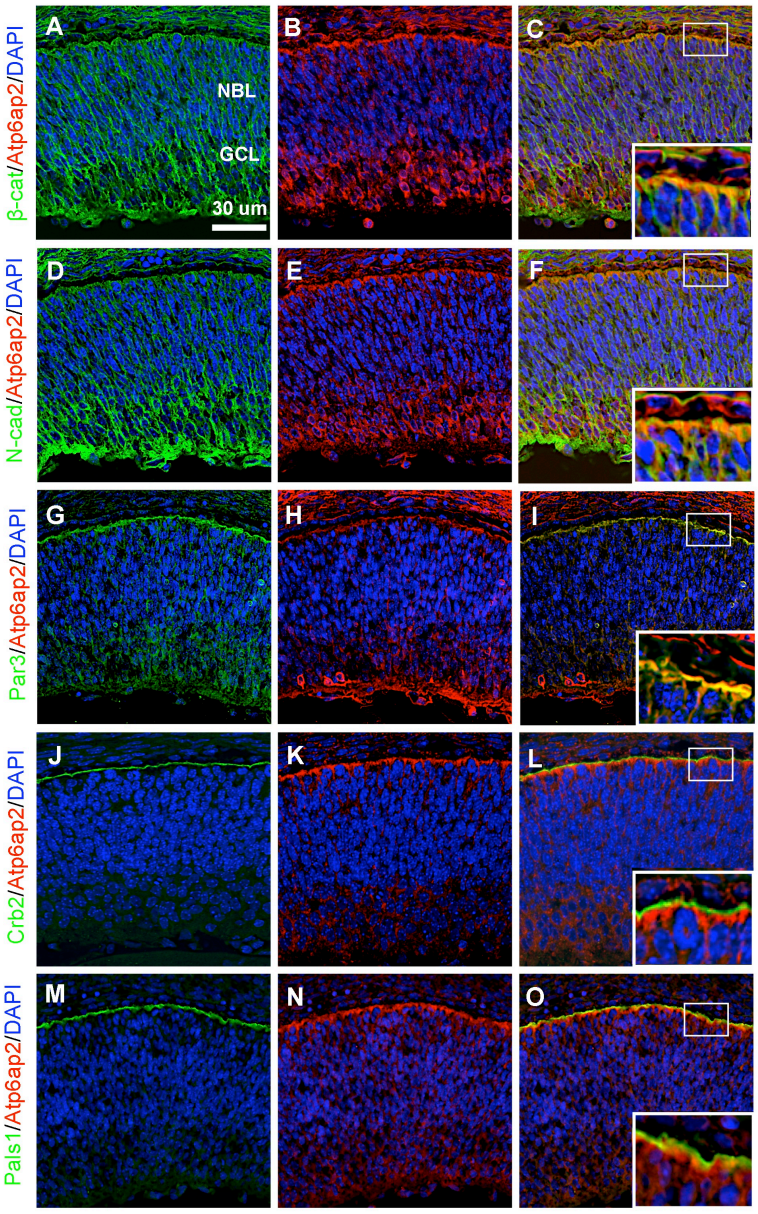


図 16　コントロールマウス網膜における細胞接着・極性分子の局在

胎児期 14.5 日目のコントロールマウス網膜での免疫組織染色。Atp6ap2 抗体（赤色）と ß-catenin（A-C　緑色）、N-cadherin（D-F　緑色）、Par3（G-I　緑色）、Crb2（J-L　緑色）、Pals1（M-O　緑色）抗体との二重染色。核（DAPI、青色）。神経芽層の頂端側で Atp6ap2 と ß-catenin、N-cadherin、Par3 が共局在。

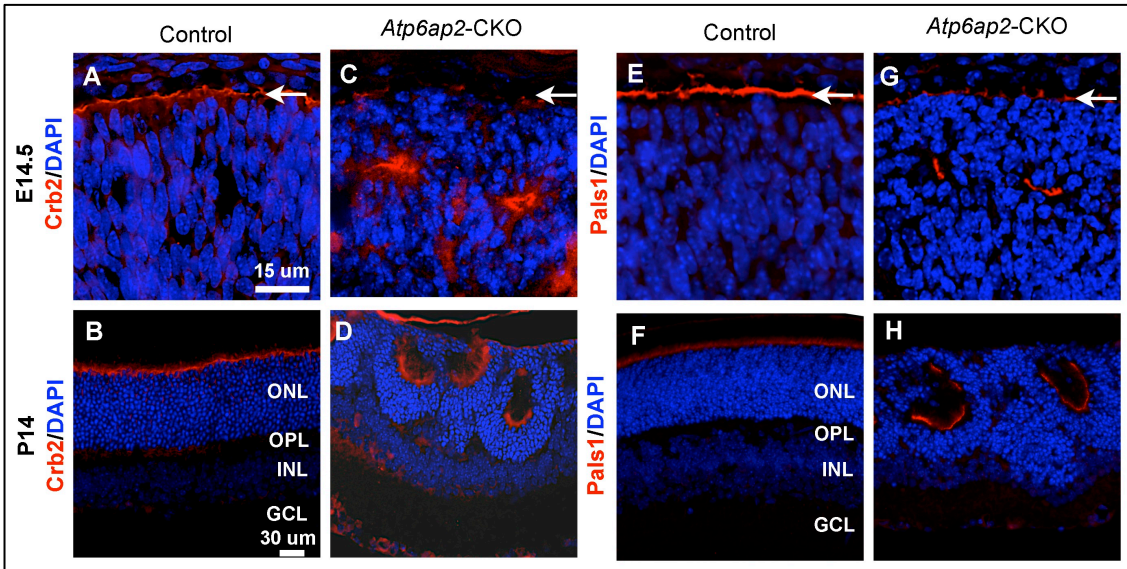


図 17　コントロールおよび視細胞特異的 *Atp6ap2/(P)RR* 欠損マウス網膜における Crb2 と Pals1 の局在

胎児期 14.5 日目、生後 14 日目のコントロールマウスおよび *Atp6ap2*-CKO マウス網膜での免疫組織染色。Crb2（A-D　赤色）、Pals1（E-H　赤色）。核（DAPI、青色）。コントロールマウス（A, B, E, F）では、これら分子は神経芽層頂端側や視細胞に局在していたが、*Atp6ap2*-CKO マウス（C, D, G, H）では局在異常であった。

一方、最近の報告で、Atp6ap2がWnt/ß-catenin シグナルにおいて必要であり、ショウジョバエのprotocadherinのFlamingoと共役することが示されている[87]。胎児期14.5日目の*Atp6ap2*-CKOマウス網膜では、接着[ß-catenin、N-cadherin、zona occludens (ZO)-1] また極性 (Par3、Par6、aPKCλ) 分子が神経芽層の頂端側より消失していた (図18A-L)。しかし、イムノブロット法を用いてタンパク発現量で確認したが、コントロールおよび*Atp6ap2*-CKOマウス網膜で明らかな差は認められなかった (図18M)。これらのことより、視細胞特異的な*Atp6ap2*の欠損は、細胞接着・極性分子の細胞内局在異常を引き起こしていると示唆された。

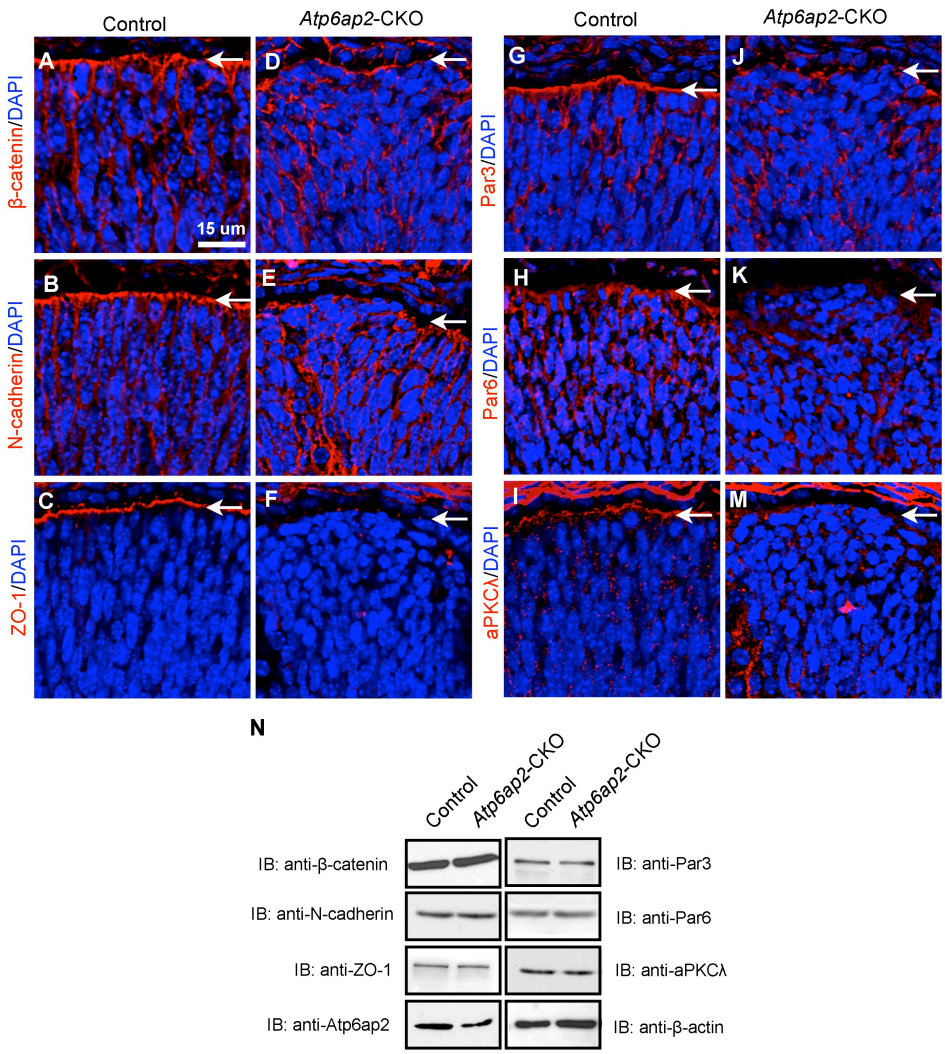


図 18　視細胞特異的 *Atp6ap2/(P)RR* 欠損マウス網膜における細胞接着・極性分子の局在

胎児期 14.5 日目のコントロールマウスおよび *Atp6ap2*-CKO マウス網膜での免疫組織染色。ß-catenin（A, D　赤色）、N-cadherin（B, E　赤色）、ZO-1（C, F 赤色）、Par3（G, J　赤色）、Par6（H, K　赤色）、aPKCλ（I, L　赤色）。核（DAPI、青色）。コントロールマウス（A-C, G-I）では、これら分子は神経芽層の頂端側に局在していたが、*Atp6ap2*-CKO マウス（D-F, J-L）では消失。M: イムノブロット法によるタンパク発現解析。コントロールマウスおよび *Atp6ap2*-CKO マウス網膜で、これら分子のタンパク発現量に変化はなかった。

2. 視細胞特異的 Atp6ap2/(P)RR 欠損マウス

④網膜前駆細胞への影響

網膜における細胞接着・極性分子の機能異常は、前駆細胞の網膜内での局在に異常が起こることが報告されている[78,79,81]。そこで*Atp6ap2*-CKOマウス網膜で、前駆細胞の局在を検討した。前駆細胞の検出には、有糸分裂のマーカーであるリン酸化ヒストンH3抗体を用いた。コントロールマウス網膜では、ß-cateninやN-cadherinが主に局在する神経芽層の頂端側に前駆細胞の陽性シグナルが検出された（図19A, B)。一方、*Atp6ap2*-CKOマウス網膜では前駆細胞が全層にわたって散在していた（図19C, D)。

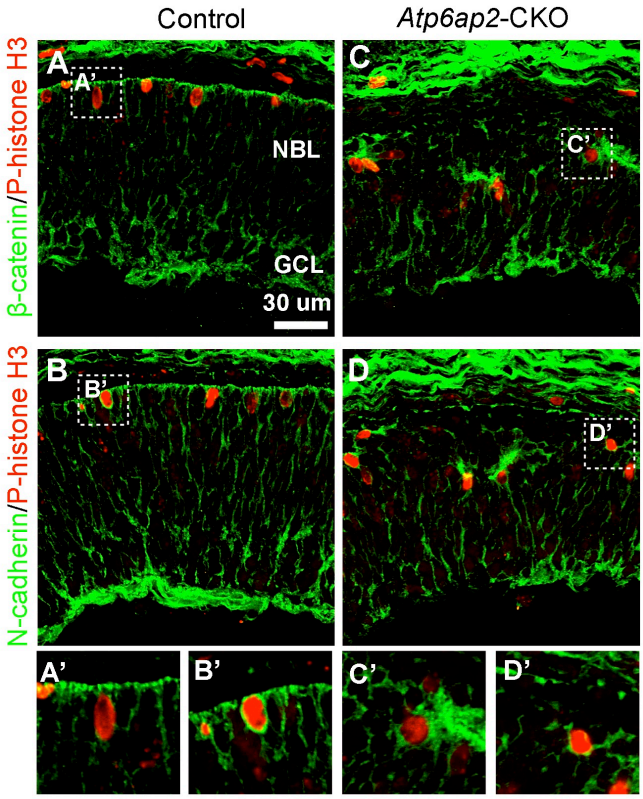


図 19　視細胞特異的 *Atp6ap2/(P)RR* 欠損マウス網膜における前駆細胞の局在

胎児期 14.5 日目のコントロールマウスおよび *Atp6ap2*-CKO マウス網膜での免疫組織染色。ß-catenin（A, C　緑色）、N-cadherin（B, D　緑色）、リン酸化ヒストン H3（前駆細胞、A-D、赤色）。*Atp6ap2*-CKO マウス網膜では前駆細胞が全層にわたって散在（C, D)。

さらに、抗α-tubulin 抗体を用い紡錘体の染色を行ったところ、紡錘分裂位置の異常も認められた（図 19E, F)。これらのことより、視細胞特異的 *Atp6ap2* 欠損マウス網膜における層構造の異常は、網膜前駆細胞の局在異常によるものだと示唆された。

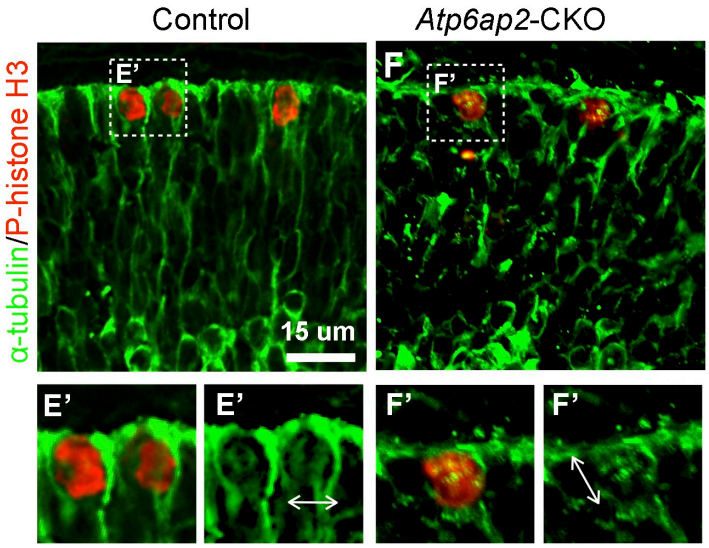


図 19　視細胞特異的 *Atp6ap2/(P)RR* 欠損マウス網膜における前駆細胞の局在

胎児期 14.5 日目のコントロールマウスおよび *Atp6ap2*-CKO マウス網膜での免疫組織染色。α-tubulin（E, F　緑色)、リン酸化ヒストン H3（前駆細胞、E-F　赤色）。*Atp6ap2*-CKO マウス網膜では前駆細胞の紡錘分裂位置の異常が認められた（F)。

3. Atp6ap2 と Par3 との共役

これまでの解析により Atp6ap2 が細胞接着・極性分子と共局在し(図 16A-I)、視細胞特異的 Atp6ap2 欠損マウス網膜で層構造の異常（図 14D-F）が認められたことから、Atp6ap2 と細胞接着・極性分子が共役しているのではないかと推察した。そこで、Atp6ap2 とそれら分子の共役を調べるため、マウス網膜のホモジネートと抗体を用いた免疫沈降法を行った。結果、Atp6ap2 は細胞極性分子の Par3 と共役し、その他（N-cadherin、ß-catenin、aPKCλ）とはしないことがわかった（図 20A)。

そして、Atp6ap2 と Par3 の共役を再検証するため、酵母を用いた Yeast two hydrid 法や培養細胞を用いた co-transfection/免疫沈降法を行った。結果、Yeast two hydrid 法では、*ATP6AP2* と *PAR3* 遺伝子をトランスフェクションした酵母は、栄養欠損培地でも成長が認められ、レポーター遺伝子の *Laz* の発現（青色）も認められた。さらに bait と prey を入れ替えても同様の結果が得られた（図 20B)。さらに、各ドメインを欠損させた *Atp6ap2* 遺伝子を作製し(図 20C)、どの部位が PAR3 との共役に関与しているか co-transfection/免疫沈降法と Yeast two hydrid 法にて検討を行ったところ、ATP6AP2 の N 末端部分が重要な役割を担っていることが明らかになった（図 20D, E)。

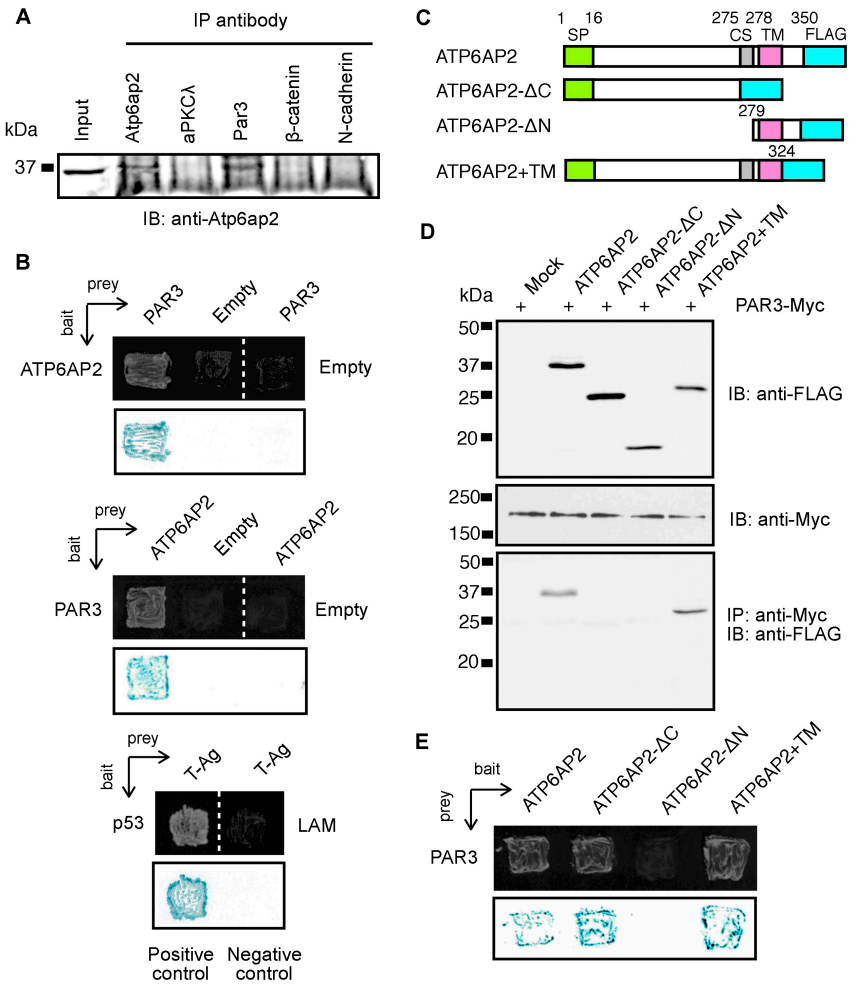


図 20　Atp6ap2 共役タンパクの検討

A: マウス網膜ホモジネートを用いた免疫沈降法。ホモジネートに各抗体を加え、免疫沈降をおこなった後、抗 Atp6ap2 抗体を用いたイムノブロット法を行った。B: 酵母 Known bait/known prey 試験。酵母に *ATP6AP2* 遺伝子および *PAR3* 遺伝子を導入し、酵母の成長を観察した。酵母内で発現した ATP6AP2 と PAR3 が共役することで、酵母は成長（上段）し、レポーター分子のβ-ガラクトシダーゼ活性も検出された（下段、青色）。C: ドメイン欠損 *ATP6AP2* 遺伝子の模式図。D: 培養細胞における co-transfection/免疫沈降法。細胞に *PAR3* 遺伝子および各種ドメイン欠損 *ATP6AP2* 遺伝子を導入し、免疫沈降法を行った。E: 酵母 Known bait/known prey 試験。*PAR3* 遺伝子および各種ドメイン欠損 *ATP6AP2* 遺伝子を導入し、再評価を行った。ATP6AP2 の N 末端部分が PAR3 との共役に関与。

4. Atp6ap2-Par3 複合体の局在

ER とゴルジ体は、タンパク質の合成・修飾において重要な場であり、分子の細胞内分布などにも大きな影響を及ぼす。Atp6ap2/(P)RR は、ER・ゴルジ体に局在することが報告されている[88]。そこで、anti-calreticulin 抗体(ER マーカー)とあ anti-58K Golgi タンパク抗体 (Golgi マーカー) を用い免疫染色を行った。結果、calreticulin シグナルは網膜全体に広く局在していたが、一方、58K Golgi タンパクは神経芽層の頂端側に局在していた。そして、これらのシグナルは Atp6ap2/(P)RR および Par3 のシグナルと共局在していた (図 21A-H)。しかしながら、β-catenin では calreticulin や 58K Golgi タンパクと共局在している頻度が少なく、特に神経芽層の頂端側で認められなかった (図 21I-N)。Par ファミリーが ER・ゴルジ体網よりエンドサイトーシス輸送を介して頂端側膜へ移動するという報告[89]とあわせ考えると、この結果は、PAR3 の頂端へ分布と細胞極性分子としての機能を発揮するための ER-ゴルジ系へ Atp6ap2/(P)RR 局在の生物学的意義における Atp6ap2/(P)RR の重要な役割を担っていると考えられる。

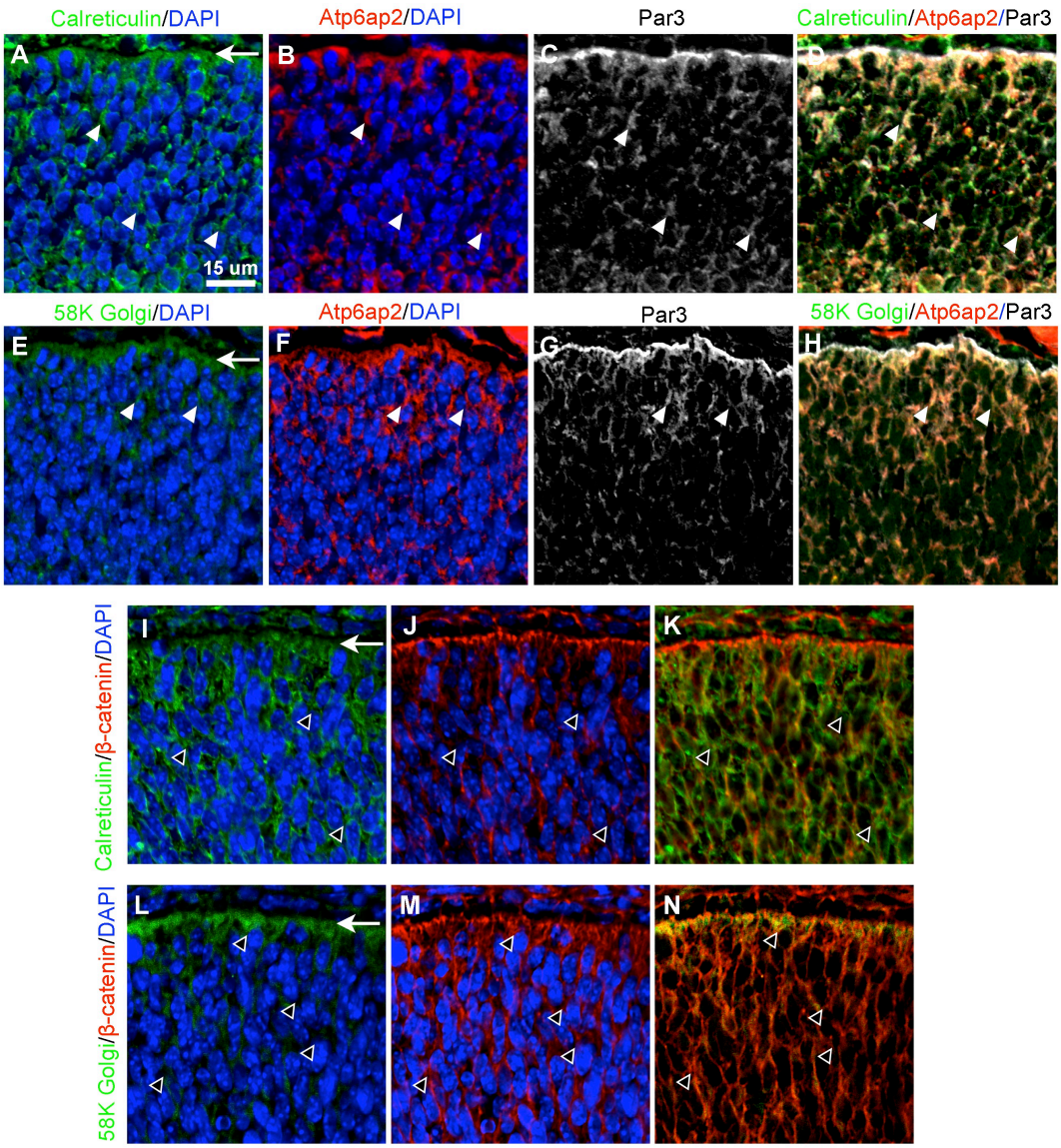


図 21　Atp6ap2-Par3 複合体の網膜局在

A-D；正常マウス胎児期 14.5 日目網膜における多重免疫組織染色。calreticulin (ER、緑色)、Atp6ap2 (赤色)、Par3 (グレイ色) と DAPI (青色)。 E-H；58K Golgi protein (Golgi、緑色) 、Atp6ap2 (赤色)、Par3 (グレイ色) と DAPI (青色)。白矢印にて ER-Golgi 網と頂端側での Atp6ap2-Par3 共局在を示す。 I-K； calreticulin (緑色), ß-catenin (赤色) と DAPI (青色)。L-N； 58K Golgi protein (緑色)、ß-catenin (赤色) と DAPI (青色)による多重染色。黒矢印は、ER-Golgi 網と ß-catenin の異なる局在を示す。

考察

本研究により、*Atp6ap2*-CKOマウスでは、視細胞への分化に影響は認められなかったが、視細胞を中心とした網膜の層構造が著明に障害され偽ロゼット形成を呈し、網膜電図における視機能低下が著明に認められた。さらに、発生期網膜においてATP6AP2/(P)RRは細胞極性分子のPar3と網膜頂端側で共局在し、免疫沈降法を用いた解析から、Atp6ap2とPar3が共役することを同定した。網膜発生期においてATP6AP2/(P)RRは、視細胞の層構造形成に関与する分子であることが示された（図22）[90]。

眼球はほぼ球形で、成人におけるその重量は約 7.4g、容積約 6.5ml、直径約 24mm である。その眼球には光を感受し伝達する透明な膜様構造物の網膜が眼底最内層に位置し、それを覆う外層の強膜、さらに光が通過する透光体としての角膜が前方にある。その他、網膜と強膜の間には色素（メラニンなど）や血管組織を有し、栄養補給と暗箱の役割を果たす脈絡膜や、カメラの絞りのように眼内に入る光量を調節する虹彩などがある [1,2,91]。また、眼の内容物としては、房水、水晶体、さらに硝子体が透光体として存在する。つまり、光は角膜、房水、水晶体、そして硝子体を通過した後、網膜で結像される（図 23)。その網膜は厚さわずか 0.2-0.3mm の感覚網膜 9 層と網膜色素上皮から構成される。感覚網膜には神経細胞の視細胞（錐体視細胞と杆体視細胞)、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞、神経節細胞に加えて、Müller グリア系細胞と血管系細胞が存在し、主に 3 つのニューロン系に分類される（図 24)。また、これら 6 種類の細胞は共通の網膜前駆細胞から発生することが示されている [92-94]。マウスでは、最初に神経節細胞が分化し、次ぎに水平細胞、錐体視細胞、アマクリン細胞がほとんど同時期に発生する。さらに発生後期にかけては杆体視細胞および双極細胞、最後にミューラーグリア細胞が発生する。マウスでは、胎児期 11.5 日目に網膜神経発生が始まり、生後 11 日目には分化が完了する。この分化の過程は、各細胞の分化に特異的な転写因子 [95,96] などの制御を受けて、規律良くコントロールされている [92-94]。また、網膜前駆細胞は、初期は一層で網膜を形成しているが、時間経過と共に神経上皮の頂端側と基底側に広がっていき、種々の細胞に分化して複数層の網膜となる。その過程では、頂端側の視細胞は Müller 細胞とカドヘリン分子などにより接着結合を形成し、そしてその形状および網膜組織の完全性において重要な役割を果たす。さらに、網膜の発生期には細胞極性に重要な役割を担う Partitioning defective 3 homolog (Par3)-Par6-atypical protein

kinase C（aPKC）λ複合体（すなわち、Par-aPKC システム）および Crumbs（Crb）2-protein associated with Lin Seven 1（Pals1）-Pals1-associated tight junction protein（Patj）複合体（すなわち、Crb-Pals1-Patj システム）が、接着結合と相互作用して細胞極性の構築・維持を行う。これらの細胞接着および極性分子の遺伝子欠損・変異は、網膜構造の重篤な崩壊をもたらすことが報告されている[79,81,82,85,86]。このように網膜の発生には多数の分子が時間的・空間的に複雑に絡み合うことにより、網膜構造を形成している。これにより成熟した網膜では、光情報が視細胞により受容され、電気シグナルへと変換される。このシグナルは続いてインターニューロンである双極細胞へと伝達され、さらに神経節細胞で活動電位になる。活動電位は視神経を通り、外側膝状体を経て、最後に大脳の視覚野と伝達される。双極細胞およびアマクリン細胞はこの経路を修飾する機能をもつ。杆体視細胞の外節には光受容に特化した領域があり、その中の円板膜には視物質であるロドプシンが存在する。ロドプシンはタンパク質部分（オプシン）と色素部分（11-シスレチナール）が結合した色素タンパク質である。ロドプシンは光を吸収するとメタロドプシン II という中間体を形成し、これがトランスデューシンを活性化する。GTP 結合タンパクであるトランスデューシンはα、β、γの 3 量体より構成されており、メタロドプシン II により活性化されると、αサブユニットとβγサブユニットの 2 つに分離し、同時に GDP と GTP の交換反応が起きる。このうちのαサブユニットはさらに次のホスホジエステラーゼを活性化し、それにより cGMP の加水分解が起きる。cGMP は外節の細胞膜における Na^+チャンネルを制御しているため、cGMP 濃度が低下するとこの Na^+チャンネルが閉鎖され、電位変化が発生してシグナルとなる。そして、そのシグナルは、視神経などを経て後頭葉の視覚中枢に伝達され、映像として認知される。以上のような過程を経て、我々の網膜は形成され、光を受容して、認識出来るようになる。この一連の流れを、視覚サイクル（visual cycle）という。

先にも述べたが、ATP6AP2/(P)RR は、当初 V-ATPase のアダプタータンパク（M9.2）として同定された[33,45]。v-ATPase は、複雑なサブユニット構造からなる超分子複合体で酵母の液胞において初めて見いだされ、哺乳類から細菌まで多くの生体膜に存在し、ATP によって作動するイオンポンプで、水素イオンを膜の逆側へと輸送するポンプとして機能している。そして、これによりオルガネラ内などの pH を制御している[47,97]。これまでに、ゼブラフィッシュにおいて v-ATPase 複

合体（*Atp6ap1*、*Atp6v0c*、*Atp6v0d1*、*Atp6v1e1*、*Atp6v1f*、*Atp6v1h*）の遺伝子変異体の眼の形態的解析が行われている。*Atp6v0c* を除くそれら変異体では網膜色素上皮や視細胞外節に形態異常・細胞死が認められているが、網膜層構造は正常である [98]。また、*Atp6v0a3* 遺伝子欠損マウスにおいても成体で視神経萎縮などが認められるが、網膜層構造は正常である [99]。ATP6AP2/(P)RR がそのリガンドとプロレニンと結合する場合、その N 末端領域は、細胞外に向く（すなわちタンパク質合成中は ER 内腔）か、切断型などの可溶型（P）RR として放出される [42,62,88]。しかし近年、ATP6AP2/(P)RR の C 末端領域が腎臓集合管の間在細胞のゴルジ装置内および管腔表面に存在することが報告された [100]（つまり、N 末端領域が細胞内）。尿の酸性化のための v-ATPase のためのアクセサリーサブユニットとして機能していると考えられる。未だ不明な点は残るが、ATP6AP2/(P)RR の細胞内局在は、N 末端領域は細胞内・外の両方に存在する。そのうち、細胞内に存在する ATP6AP2/(P)RR タンパク質の N 末端領域と PAR3 が相互作用していると考えられる。

また近年、この v-ATPase に関連した(P)RR/ATP6AP2 機能は、Wnt シグナル系において必須であることもアフリカツメガエルとショウジョバエを用いた研究により明らかとなった [48-50]。Wnt シグナルは、様々な生物種に保存されており、胚発生やガン、近年では老化などにも関連し数多くの機能を有していることが知られている [101-103]。その変異は、形態形成異常や発ガンなどに影響を及ぼす。網膜発生期における Wnt シグナルの関係については報告がある。発生期に網膜特異的な 2 種類の β-カテニン CKO マウス（β-catenin 遺伝子エクソン 2-6 欠損、エクソン 3 のみ欠損）を作製して、詳細な解析を行っている。Wnt シグナルでの β-カテニンは、リン酸化を受けて分解が促進されてシグナル伝達の制御がなされている。β-カテニンのエクソン 3 欠損では、β-カテニンの蛋白分解に繋がるリン酸化サイトが消失するので、分解が抑制される。結果、両方の CKO マウス共に網膜の層構造異常が認められたが、(Wnt シグナルが過剰に入っている) エクソン 3 欠損 CKO マウスで細胞の異常増殖、細胞分化に変化などは認められていない。このことより著者らは、この表現系は β-catenin の Wnt シグナル関連由来ではなく、両方の CKO マウスにおいて β-catenin が細胞間接着分子としての機能が欠損したためとしている。つまり、網膜発生に Wnt シグナルは関与していないと報告されている [104]。ただ、この実験系でも Cre は胎児期 12.5 日目から発現するため、さらに早期の網膜発生で Wnt シグナルが関与している可能

性はある。また、ATP6AP2/(P)RR が v-ATPase のアダプタータンパク質として機能するのはその C 末端側であるが、PAR3 との結合には N 末端側が必要であった（図 20)。さらに、*ATP6AP2/(P)RR* 遺伝子変異体は胎生致死である一方、その他 RAS および RAPS の構成分子（プロレニン、アンジオテンシン変換酵素、AT1R など）の遺伝子欠損を行ったマウスは出生・生育する[28,105,106]。これらのことから、ATP6AP2/(P)RR の細胞極性分子 PAR3 を介した網膜層構造への関与は、v-ATPase や RAS/RAPS とは独立した第三の生理的機能であると考えられる。

現在、網膜色素上皮細胞特異的な ATP6AP2/(P)RR コンディショナルノックアウトマウスを作製し、解析を行っている。この系では生後 10 日目から Cre の発現が始まる（つまり、生後 10 日目以降網膜色素上皮細胞で ATP6AP2/(P)RR が消失する)。これまでに生後 1 ヶ月のマウス網膜の形態学的解析を行ったが、視細胞特異的 Atp6ap2/(P)RR 欠損マウスのような顕著な表現系は見つかっていない（未発表データ)。このことから、Atp6ap2/(P)RR の細胞極性への関与は、視細胞発生期特異的な機能とも考えられる。

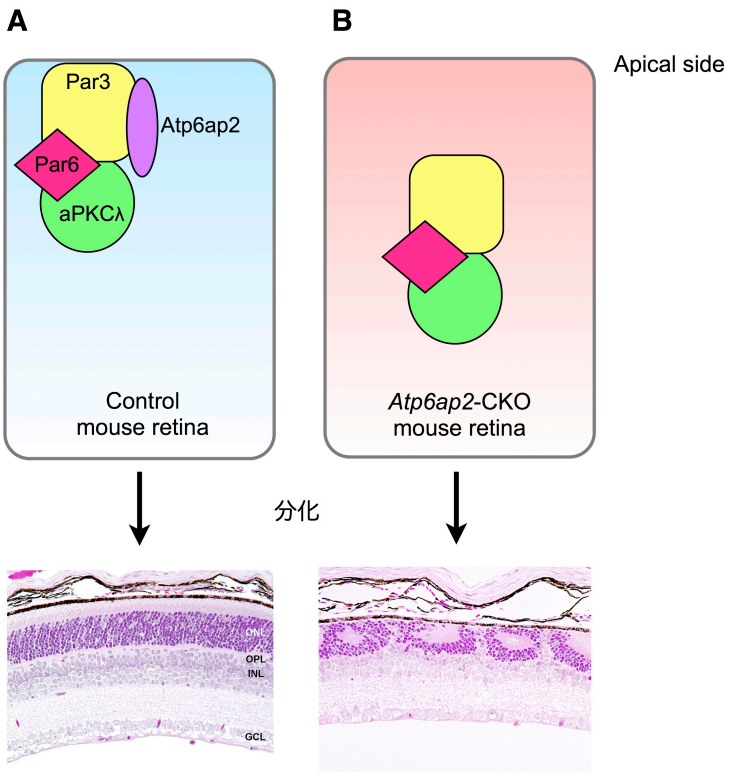


図 22　視細胞特異的 *Atp6ap2/(P)RR* 欠損マウス網膜の分化モデル

正常マウス網膜では、網膜前駆細胞での Atp6ap2 は細胞極性分子 Par3-Par6-aPKC 複合体と共に神経芽層の頂端側に局在し、適切な位置・方向での細胞分化などが行われて、層構造を形成する（A）。一方、*Atp6ap2* の欠損により、Par3-Par6-aPKCλ 複合体が細胞内で異常局在を示し、網膜前駆細胞が極性を失う。その結果、網膜前駆細胞が不適切な位置に存在する状態のまま、細胞分化が起こり、網膜構造の形成異常（B）に至ったと示唆される。

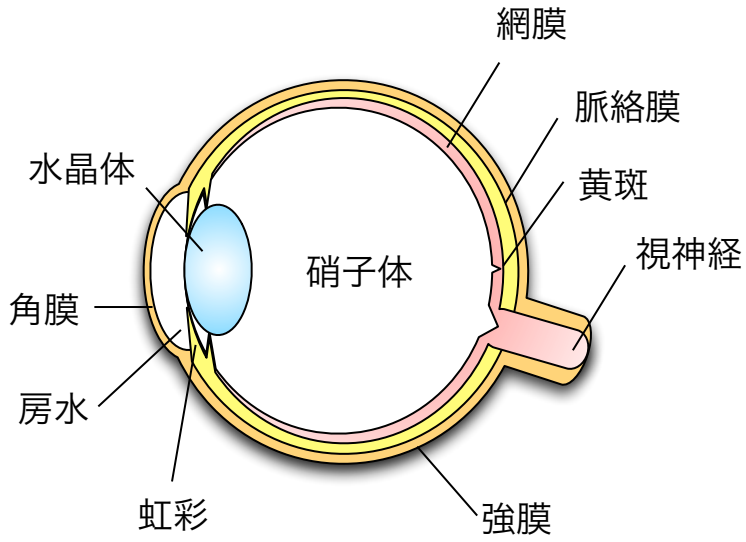


図 23　眼球の構造

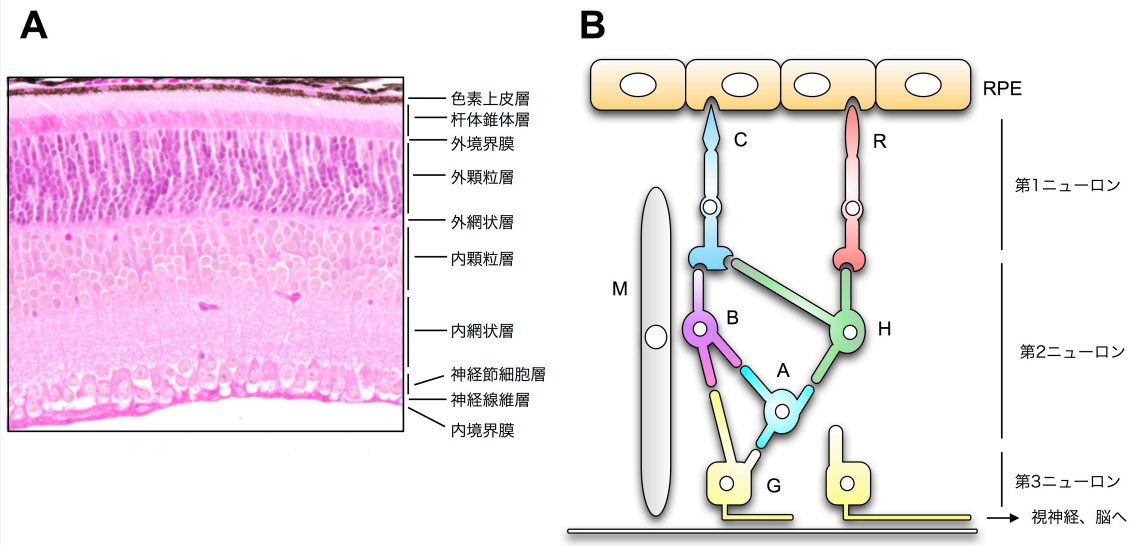


図 24　網膜構造とニューロン

A；マウス網膜のヘマトキリン・エオジン染色。B；網膜ニューロンの模式図。RPE、網膜色素上皮；Cm錐体視細胞；R、杆体視細胞；H、水平細胞；B、双極細胞；A、アマクリン細胞；G、神経節細胞；M、ミューラーグリア細胞。

結論

Atp6ap2/(P)RR は、視細胞の発生においては細胞極性に関わる重要な役割を担っていると示唆された。

第 3 章

(プロ)レニン受容体/ATP6AP2 のグルコース代謝への関与

ATP6AP2/(pro)renin receptor contributes to glucose metabolism via stabilizing the pyruvate dehydrogenase E1 ß subunit.

緒言

RAS の上流に位置する ATP6AP2/(P)RR は、プロレニンとの結合により組織 RAS および ATP6AP2/(P)RR の細胞内伝達シグナル（ERK1/2 など）の活性化が網膜病態を惹起すること[受容体結合プロレニン系（RAPS）]が報告されている。最近、我々は糖尿病網膜症などの患者より採取した臨床検体を用いた解析の結果、ATP6AP2/(P)RR は糖尿病網膜症の疾患病態に関与する重要な分子であることを第 1 章で示した[41-43]。一方、ATP6AP2/(P)RR は RAPS の活性化以外に、ATP 依存性プロトンポンプ vacuolar H^+-ATPase のアダプタータンパクとしての機能を有することが報告されている。これにより ATP6AP2/(P)RR 機能は、v-ATPase に関連した正常発生や炎症病態などに様々な作用を持つ Wnt シグナルにおいて、Wnt 受容体リン酸化に必須であることも明らかとなって、V-ATPase に関連する多彩な生理的・病理的意義が ATP6AP2/(P)RR の機能と関連している可能性が指摘されていた[48-50]。さらに近年、視細胞特異的な *Atp6ap2/(P)RR* コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析より、Atp6ap2/(P)RR が網膜発生において細胞極性分子の Par3（partitioning defective 3 homolog）と共役し、視細胞の細胞極性に関与する重要な役割を担っていることを第 2 章で明らかにした[55]。しかしながら、成体網膜における ATP6AP2/(P)RR の生理的な機能解析を行った報告はない。そこで、本研究では、成体網膜における ATP6AP2/(P)RR の生理的機能解析を行った。

成体マウス網膜における ATP6AP2/(P)RR 共役タンパク質を同定するため、抗 ATP6AP2/(P)RR 抗体を用いた免疫沈降/質量分析解析(IP/MS)を行った。さらにイーストツーハイブリッド法の Known bait/known prey テスト、co-transfection /co-IP、免疫染色法などにより IP/MS 結果を検証した。また、ヒト網膜色素上皮細胞を用いて siRNA による *ATP6AP2* 遺伝子ノックダウンを行い、共役タンパク質の機能や糖代謝システムへの影響を解析した。

マウス網膜と抗 Atp6ap2/(P)RR 抗体を用いた IP/MS 解析の結果、Atp6ap2/(P)RR タンパク質を含めピルビン酸脱水素酵素 E1β サブユニット(Pdhb)（解糖系と TCA サイクルをつなぐ酵素の一つ）などの 9 種類のタンパクを同定することが出来た。そして、それらの共役は、酵母を用いた Known bait-known prey 解析や培養細胞を使った co-transfection/co-IP 解析などにより検証し、Pdhb と直接共役することを確認した。またマウス網膜において Atp6ap2 と Pdhb が、網膜色素上皮細胞（RPE）、視細胞内節と神経節細胞で共局在していること

を確認した。そして、ATP6AP2/(P)RR と PDHB の共役による生理的な機能・役割を解明するため、培養細胞を用い siRNA による *ATP6AP2* 遺伝子ノックダウンを行い、PDH をはじめとする糖代謝機能への影響を検討した。結果、*ATP6AP2* 遺伝子ノックダウン RPE 細胞では、PDH 酵素活性とアセチル-CoA 濃度の減少が認められた。一方で乳酸濃度は上昇していた。また、イムノブロット法で *ATP6AP2* 遺伝子ノックダウン RPE 細胞での PDHB タンパク発現を確認したところ減少していた（mRNA レベルで変化はなかった）。これまでの報告で、PDHB タンパクはチロシンリン酸化が上昇するとユビキチン化によるタンパク質分解へ誘導されることがわかっている。そこで、*ATP6AP2* 遺伝子ノックダウン RPE 細胞での PDHB タンパクのリン酸化を検討したところリン酸化は上昇しており、チロシンキナーゼ阻害剤で処理で PDHB タンパクの減少が回復した。以上の結果より、ATP6AP2/(P)RR は、PDHB タンパクのリン酸化を制御し、そのタンパク質安定性に関与していると考えられる。また、*ATP6AP2* ノックダウン RPE 細胞では、PDH 酵素活性が低下しているため糖代謝経路が好気性から嫌気性様代謝にシフトしており、グルコース負荷により活性酸素（ROS）が抑制されていた。そして、この現象は、RAPS や RAS 抑制剤による影響を受けなかったことから、それらからは独立した機能であると示唆される。一方、ヒト胎児腎臓由来細胞でも同様に *ATP6AP2* 遺伝子ノックダウンによる PDH 酵素活性への影響などを検討したが、RPE 細胞で見られたような変化は認められなかった。

ATP6AP2/(P)RR は、網膜における血管新生など病態形成において機能するのみならず、生理的にも重要な役割を担っていると考えられる。

実験方法

1．マウスおよび細胞

本実験におけるマウスの扱いは「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に則しておこなった。また Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) で定められたガイドラインに基づいて実施した。

C57BL/6J マウスを日本クレア (Tokyo, Japan)、ヒト胎児由来腎臓 (human embryonic kidney、HEK293T) およびヒト網膜色素上皮細胞 (human retinal pigment epithelium、hTERT-RPE1) は American Type Culture Collection (Manassas, VA) より購入した。細胞はそれぞれ 10%ウシ胎児血清 (Life Technologies, Carlsbad, CA) を添加した DMEM および DMEM/F12 培地(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)で 37℃、5% CO_2 濃度で培養をした。

2．試薬と細胞処理

ATP6AP2 遺伝子の発現を抑制するため、2 種類の siRNA オリゴ (siRNA-1, HSC.RNAI.N005765.12.1; siRNA-2, HSC.RNAI.N005765.12.2) と陰性コントロール siRNA オリゴ(DS NC1)を Integrated DNA Technologies (Coralville, IA)より購入した。これら siRNA は、Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Life Technologies)を用い、プラスミド DNA は HilyMax (Dojindo, Kumamoto, Japan) または Nucleofector 2b 装置 (Lonza, Basel, Switzerland) を用い遺伝子導入を行った。また遺伝子組換え体の取り扱いは、「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」に則しておこなった。

細胞は、siRNA 導入 24 時間後、500 μM AG18 のチロシンキナーゼ 阻害剤 (Millipore, Billerica, MA)で 37℃、24 時間処理を行った。培地で洗浄後、細胞を回収してイムノブロッティング法での解析に使用した。

プロレニンと (プロ) レニン受容体の結合を阻害するデコイペプチド (PRRB、NH_2-RIFLKRMPSI-COOH) [42] は、 GeneDesign 社(大阪府茨木市)に合成・精製を依頼した。

3．プラスミド DNA 構築と変異導入

ヒト *ATP6AP2* cDNA (GenBank No. NM_005765)は、FLAG-tag を付加して pCI vector (Promega, Madison, WI)にクローニングした。全ての *ATP6AP2* 変異体は、real-time polymerase chain reaction (PCR)法を用いて作製した。ヒト *PDHX*、*PDHA1*、*PDHB*、*DLD*、*DLAT* cDNA (GenBank No. NM_000284, NM_000925, NM_003477,

NM_001931, NM_000108) は DNASU Plasmid Repository (Tempe, AZ) より購入し、Myc-tag を持つ pCMV-Tag 3B vector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) に Gateway システムシステム(Life Technologies)を用いてクローニングをした。全ての DNA コンストラクトは、使用前に配列の確認を行った。

4. 免疫沈降法

マウス網膜を細胞溶解バッファー [Tris buffered saline (TBS)、1% NP-40、プロテアーゼ阻害剤 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)]にてホモジナイズした。サンプルを Protein G beads (Life Technologies)と 4℃で 1 時間プレインキュベーションした後、抗体を加え 4℃で一昼夜インキュベーションした。ビーズを細胞溶解バッファーで 3 回洗浄後、SDS バッファーでタンパクサンプルを溶解・溶出させた。

5. 質量分析

質量分析は、株式会社日本バイオサービス (埼玉県朝霞市) に依頼して行った。具体的には、免疫沈降サンプルを 4-15% Mini-PROTEAN TGX gels (Bio-Rad, Hercules, CA)にて電気泳動後、 Mass silver stain kit (Wako Pure Chemical Industries)を用いて銀染色を行った。ゲル断片は、トリプシン消化を 30℃で一昼夜行った。その後、ペプチド断片を Ziptip c18 (Millipore)にて脱塩をし、nanoLC-MS/MS systems (DiNa HPLC system, KYA Technologies, Tokyo, Japan; QSTAR XL, Life Technologies)で解析を行った。得られたデータは、MascotSearch によるタンパク質同定を行った。

6. Known-bait/known-prey yeast two-hybrid 解析

Known-bait/known-prey 解析は、Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System (Clontech, Mountain View, CA)のマニュアルに従い行った。*ATP6AP2* と PDHB およびその他 PDH 複合体遺伝子を bait vector pGBKT7 または prey vector pGADT7 (Clontech)にクローニングした。酵母 AH109 株に、bait そして prey ベクターを順次遺伝子導入した。bait 遺伝子導入株は [minus-tryptophan (*TRP*) selection]、prey 遺伝子導入株は[minus-leucine (*LEU*) selection] 栄養欠損培地で選別をした。bait/prey 遺伝子導入株は[minus-*TRP*, -*LEU*, -histidine (*HIS*), -adenosine (*ADE*) selection]栄養欠損培地で選別を行い、さらに *lac Z*

遺伝子の発現を ß-galactosidase 活性の filter lift assay にて確認した。プレート上に培養した酵母をワットマン濾紙に複写を作り、液体窒素で凍結させた。濾紙を乾燥後、X-gal 溶液（0.1mg/ml X-Gal、60mM Na2HPO4、40mM NaH2PO4, 10mM KCl、1mM MgSO4）を浸透させ、30℃で 30 分間反応をさせた。

7. イムノブロット解析

細胞および網膜組織溶解サンプルをポリアクリルアミドゲルにて泳動・分離後、PVDF（polyvinylidene fluoride）膜に転写した。5%スキムミルクでブロッキングを行い、各種 1 次抗体 [anti-ATP6AP2 抗体、 anti-ヒト PDHB 抗体（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）；anti-PDHA1 抗体、anti-マウス PDHB 抗体、anti-DLAT 抗体、anti-HSP90 抗体（Abcam, Cambridge, MA)；anti-Na^+/K^+-ATPase α1 抗体 (Millipore)； anti-phosphotyrosine 抗体 (PY99, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)； anti-ß-actin 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)； anti-FLAG と anti-Myc 抗体 (Wako Pure Chemical Industries)]と反応させた。Horseradish peroxidase 標識 2 次抗体と反応後、シグナルを enhanced chemoluminescence (Western Lightning Ultra, Perkin Elmer, Waltham, MA)で発光させ、 LAS-4000 mini camera system (Fujifilm, Tokyo, Japan)で検出した。バンドの強度は、 ImageJ software (NIH, Bethesda, MD)にて解析を行った。

8. 蛍光免疫染色

眼球を 4%パラホルムアルデヒド（PFA）で氷上 30 分固定した後、スクロースにて脱水し、Frozen Section Compound (Leica, Exton, PA)に包埋して凍結切片を作製した。切片は 5%正常ヤギ血清(Life Technologies)と 0.05% Triton X-100 を含有する Phosphate buffered saline (PBS)で室温 1 時間かけてブロッキングをおこなった。その後、以下の抗体を用いて一次抗体反応をおこなった [rabbit anti-Atp6ap2 抗体、mouse anti-Pdh 抗体 (Sigma-Aldrich)]。0.05% Triton X-100/PBS で 5 分 3 回洗浄した後、Alexa Fluor 488 または 546 (Life Technologies)をラベルした二次抗体で蛍光標識し、核は 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI, Lonza, Basel, Switzerland)で染色した。切片は FluoView 1000 confocal microscope (Olympus, Tokyo, Japan)で観察した。

9. 免疫電子顕微鏡

免疫電子顕微鏡解析は、株式会社 東海電子顕微鏡解析（愛知県名古屋市）に依頼して行った。具体的には、眼球を 4%PFA/0.2%グルタルアルデヒド溶液にて固定した後、上記に示した方法に従い凍結切片作製をした後、一次抗体（anti-Atp6ap2 抗体）との反応を行った。そして、gold particles 標識 2 次抗体 (Nanoprobes, Yaphank, NY) と反応させ、GOLDENHANCE EM Formation (Nanoprobes) でシグナルの検出を行った。そして染色切片は、2% osmium tetroxide で固定し、エタノールにて脱水後、resin (Quetol-812, Nisshin EM, Tokyo, Japan) を浸透させ、60℃48 時間かけてポリマライズ化した。ブロックを ultramicrotome(ULTRACUT UC, Leica)にて厚さ 80 nm の切片を作製し、Lead stain solution (Sigma-Aldrich) で 2 次染色を行った。切片は透過型電子顕微鏡 JEM-1400Plus (JEOL, Tokyo, Japan) で観察した。

10. 免疫組織染色

眼球を 4%PFA で固定し、パラフィン包埋後に切片を作製した。キシレンとエタノールで脱パラフィンした後、10 mM クエン酸バッファー (pH6.0) 内で電子レンジを用いて抗原賦活化を行った。切片は 5% 正 常ヤギ血清と 0.05% Triton X-100 を含有する PBS で室温 1 時 間かけてブロッキングをおこなった。1 次抗体の抗-ATP6AP2 抗体 (Sigma-Aldrich) と反応させた後、ImmPACT VIP Peroxidase Substrate Kit (Vector Lab, Burlingame, CA) を用いて発色反応を行った。陰性コントロールには Normal rabbit IgG を使用し、切片は BIOREVO (Keyence, Osaka, Japan) で観察した。

11. 細胞分画

マウス網膜より Mem-PER Plus Membrane Protein Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) を用い、マニュアルに従って膜および細胞質画分を精製した。

12. RNA 抽出およびリアルタイム PCR

細胞および網膜から TRIzol Reagent を用いて RNA を回収し、GoScrip Reverse Transcriptase(Promega) と oligo dT(20) primers を用いて RNA の逆転写をおこなった。プライマー [*ATP6AP2* (forward 5'-AGG CAG TGT CAT TTC GTA CC-3',

reverse 5'-GCC TTC CCT ACC ATA TAC ACT C-3')、*PDHB* (forward 5'-GCA TAC AAG GTT AGT CGA GGG-3', reverse 5'-ATA AAT TCA CAA ATG GGC CGC-3'、*HPRT1* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*; forward 5'-ACC CCA CGA AGT GTT GGA A-3', reverse 5'-AAG CAG ATG GCC ACA GAA CT-3')]、GoTaq qPCR Master Mix(Promega)、を使用し、StepOnePlus Real-Time PCR System(Life Technologies)を用いて real-time PCR を施行した。反応条件は 95℃ 2 分, 続いて 95℃ 15 秒、60℃ 60 秒が 40 サイクルとした。Threshold cycle (C_T) 値は StepOnePlus Real-Time PCR System のプログラムにより自動的に測定された。既報[56]にもとづいて、内因性コントロール *HPRT1* を用いて各サンプル中の遺伝子の相対的発現量をΔΔCT 法で算出した。

13. PDH 活性、アセチル-CoA および乳酸レベル測定

細胞に siRNA またはプラスミド DNA を遺伝子導入 48 時間後、PDH Enzyme Activity Assay Kit (Millipore)、Acetyl-CoA Assay Kit (Biovision, Milpitas CA) を用い、マニュアルに従って測定した。PDH アッセイには、精製ミトコンドリア画分を用いた。また遺伝子導入 24 時間後、培地を phenol red 非含有培地に変換し、さらに 24 時間培養した培養上清を用いて、乳酸濃度を測定した。測定には、Lactate Assay Kit (Biovision)を使用した。PDH 活性とアセチル-CoA 測定はタンパク濃度で、乳酸測定は細胞数で補正を行った。

14. 細胞内活性酸素 (ROS) レベル測定

細胞内 ROS 測定には、5-(and-6)-chloromethyl-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H_2DCFDA, Life technologies) を使用した。5.5mM グルコース濃度培地で 4 日間培養後、5.5 または 30mM グルコース濃度培地で培養した。その際、siRNA の遺伝子導入や最終濃度 10 μM valsartan (Sigma-Aldrich) または 1 μM PRRB の添加を行った。浸透圧調整群は、5.5 mM グルコースに 24.5 mM マンニトールを加えた培地を使用した。そして、48 時間後、細胞を 10 μM CM-H_2DCFDA と 1 μg/ml Hoechst 33258 (Lonza) で 37℃30 分間インキュベーションをした後、余剰の蛍光試薬を除去するため培地で細胞を洗浄した。蛍光強度は、Infinite F200 PRO (Tecan, Männedorf, Switzerland) を用い、CM-H_2DCFDA (λex, 485 nm and λem, 535 nm) と DNA (λex, 360 nm and λem, 465 nm) で測定した。

15. 統計解析

結果は平均値±標準誤差で示した。また各群間の比較検討は Student’s *t*-test または Tukey-Kramer post hoc test を用いて解析し、P 値が 0.05 を下回った場合に統計学的に有意差ありとした。

実験結果

1. 網膜における Atp6ap2/(P)RR 共役タンパクの同定

マウス網膜における Atp6ap2/(P)RR 共役タンパクを同定するため、抗 Atp6ap2 抗体を用いた免疫沈降法（IP）を行った。得られた溶出タンパクを電気泳動にて分離後、銀染色により検出を行った（図 25A）。結果、陰性コントロールと比較して抗 Atp6ap2/(P)RR 抗体沈降検体に、約 35 と 65kDa 付近に特異的なバンドが 2 本検出された。

これら 2 本のバンドを切り出し・精製を行った後、質量分析（MS）により含有タンパクの解析を行ったところ、Atp6ap2/(P)RR と v-ATPase のサブユニットを含む 9 種類のタンパクの同定が出来た（表 2）。興味深い事に得られた共役候補タンパクの中には、TCA サイクルにおいてピルビン酸をアセチル-CoA に変換する PDH 複合体を形成する Dlat (dihydrolipoamide S-acetyltransferase)、Pdhb (PDH E1 ß subunit)と Pdha1 (PDH E1α subunit)が含まれていた。

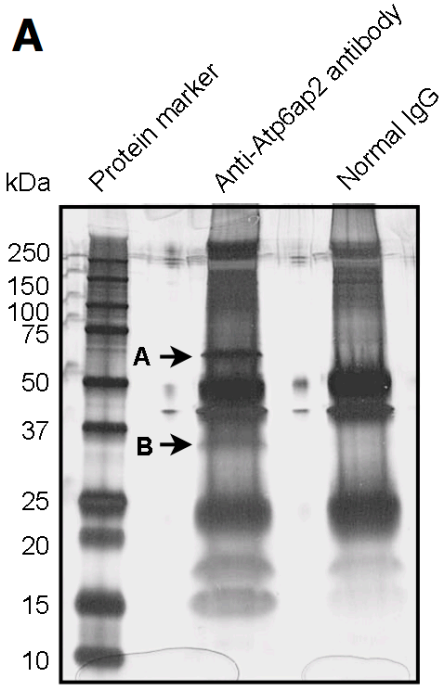


図 25A　免疫沈降法マウス網膜ホモジネートと抗 Atp6ap2 抗体を用いた免疫沈降。約 35 (B) と 65kDa (A) 付近に特異的なバンドが 2 本検出された。

表 2: Atp6ap2 共役候補タンパクリスト

Gel band #	Identified protein	Gene name	Molecular mass (Da)	No. of peptides	Accession number
A1	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	Dlat	67,942	26	Q8BMF4
A2	Actin-binding LIM protein 2	Ablim2	68,107	1	Q8BL65
B1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	Pdhb	38,937	14	Q9D051
B2	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	Pdha1	43,232	5	P35486
B3	(Pro)renin receptor	Atp6ap2	39,092	10	Q9CYN9
B4	60S ribosomal protein L6	Rpl6	33,510	1	P47911
B5	60S acidic ribosomal protein P0	Rplp0	34,216	1	P14869
B6	F-actin-capping protein subunit alpha-2	Capza2	32,967	2	P47754
B7	V-type proton ATPase subunit d 1	Atp6v0d1	40,301	3	P51863

2. ATP6AP2/(P)RR と PDHB の共役

IP /MS 解析の結果を検証するため、追加実験を行った。まず、PDH 複合体を構成する分子[PDHX (PDH component X)、PDHA1、PDHB、DLD (dihydrolipoamide dehydrogenase)、DLAT]の中から ATP6AP2/(P)RR の直接の共役タンパクを同定するため、ATP6AP2/(P)RR を bait、PDH 複合体構成分子を prey とした yeast two hybrid 法の Known-bait/known-prey 解析を行った。結果、ATP6AP2/(P)RR と PDHB を有した酵母は最少栄養培地プレート上で成長し、*lacZ* の発現が認められたが、その他 PDH 複合体構成分子では酵母の成長は認められなかった（図 25B）。このことより、ATP6AP2/(P)RR と PDHB が直接共役していると考えられた。

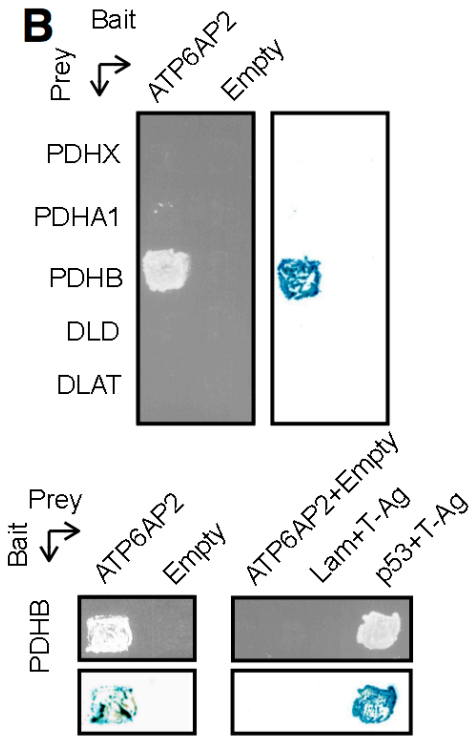


図 25B　酵母 known bait/known prey 解析

ATP6AP2/(P)RR と PDHB 遺伝子導入のみにおいて、酵母が成長し、lacZ 発現（青色）が認められた。

次に、ATP6AP2/(P)RR と PDHB の共役を確認するため、マウス網膜溶解サンプルを用いた IP を行った。サンプルを抗 Atp6ap2/(P)RR 抗体で IP を行い、抗 Pdhb 抗体を使用したイムノブロット法を行った。結果、予想分子質量に特異的なバンドが検出された（図 25C）。

さらに、培養細胞を用いた co-transfection/co-IP を行った。FLAG タグを付加した *ATP6AP2/(P)RR* 遺伝子、Myc タグを付加した *PDHB* 遺伝子を HEK293T 細胞に遺伝子導入し、抗タグ抗体による IP を行った。結果、PDHB と ATP6AP2/(P)RR の共役が確認出来た（図 25D）。さらに、PDHB との共役ドメインを同定するため、C 末端を欠損した ATP6AP2 遺伝子(ATP6AP2-ΔC)および N 末端(ATP6AP2-ΔN)を作製し、co-transfection/co-IP を行った。結果、ATP6AP2-ΔN では PDHB との共役が消失した（図 25D）。このことより、PDHB との共役には ATP6AP2 の N 末端側を介して行われていることがわかった。

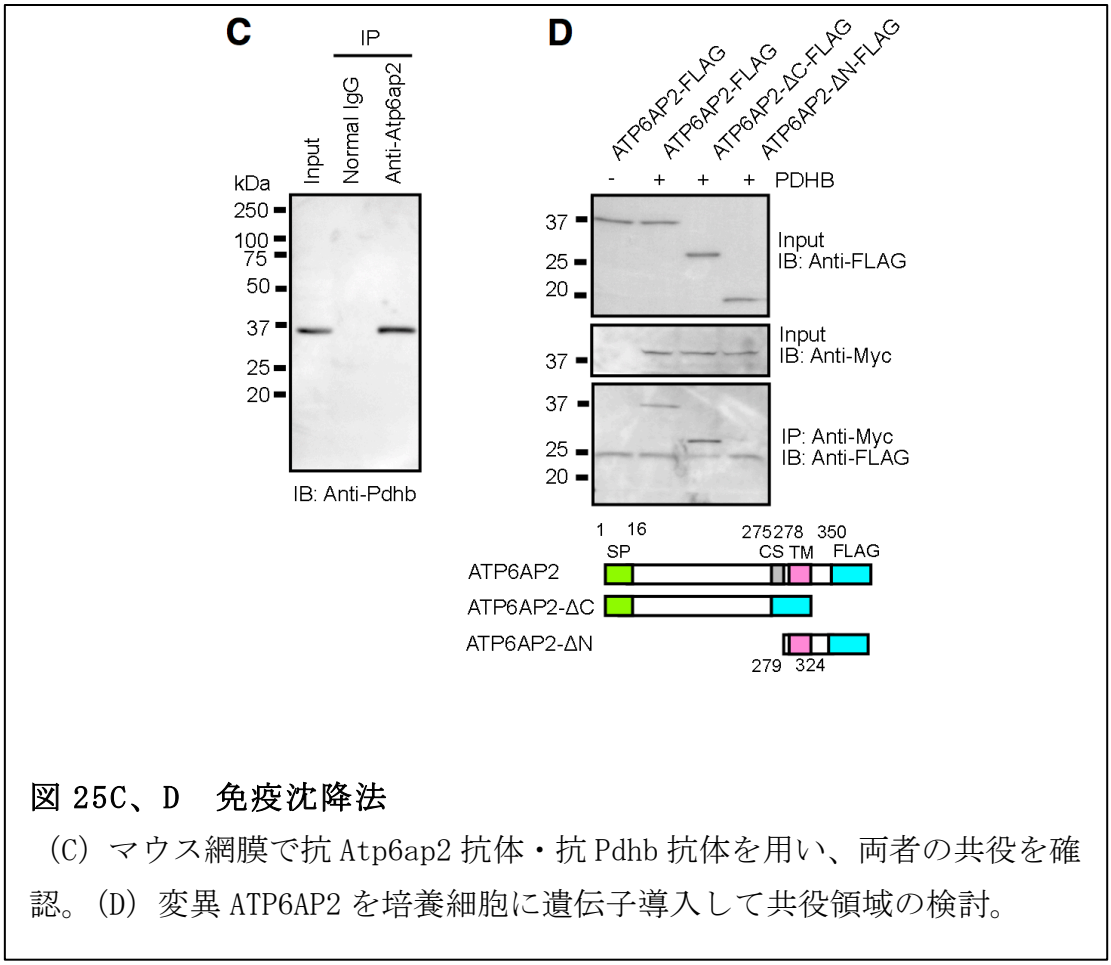


図 25C、D　免疫沈降法

（C）マウス網膜で抗 Atp6ap2 抗体・抗 Pdhb 抗体を用い、両者の共役を確認。（D）変異 ATP6AP2 を培養細胞に遺伝子導入して共役領域の検討。

3. マウス網膜における Atp6ap2/(P)RR と Pdhb 局在解析

これまでに我々は、Atp6ap2/(P)RR が成体マウス網膜において恒常的に幅広く発現・局在していることを報告しているが [54]、Pdhb に関して報告がない。網膜における Atp6ap2/(P)RR と Pdhb 共局在を解析するため、蛍光免疫染色法を行った。結果、Pdhb 陽性シグナルは、RPE、視細胞（内節）と神経節細胞に認められ、そのほとんどが Atp6ap2/(P)RR と共局在していた（図 26A-C）。

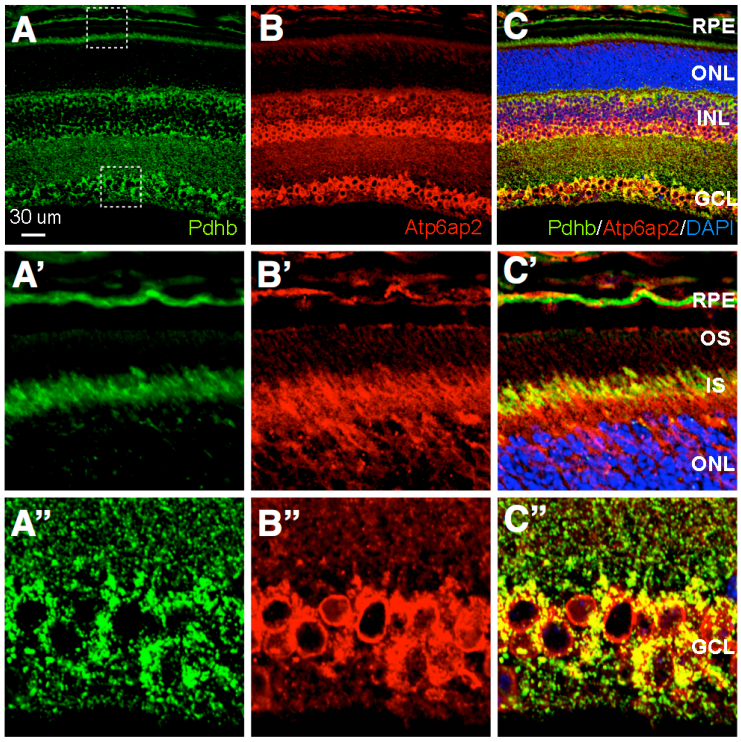


図 26A-C　蛍光免疫組織染色

抗 Pdhb 抗体（緑色）、抗 Atp6ap2 抗体（赤色）、DAPI（核、青色）を用いた免疫染色。RPE、網膜色素上皮；ONL、外顆粒層；INL、内顆粒層；GCL、神経節細胞層；OS、視細胞外節；IS、視細胞内節。

細胞内における Atp6ap2/(P)RR の詳細な局在を解析するため、マウス網膜における免疫電顕微鏡解析を行った。結果、Atp6ap2/(P)RR シグナルは RPE をはじめとする細胞の細胞質に認められた（図 26D）。また、マウス網膜抽出タンパクを分画してイムノブロット法を行ったところ、Atp6ap2 は細胞質と膜画分の両方に局在していた（図 26E）。

PDH を介した糖代謝における Atp6ap2/(P)RR の機能を解析するため、眼における高い酸化能を有する主要な細胞である RPE 細胞 [107] を以降の実験に使用した。実際、ヒト RPE 組織で、ATP6AP2/(P)RR は発現・局在していることを確認した（図 26F、G）。

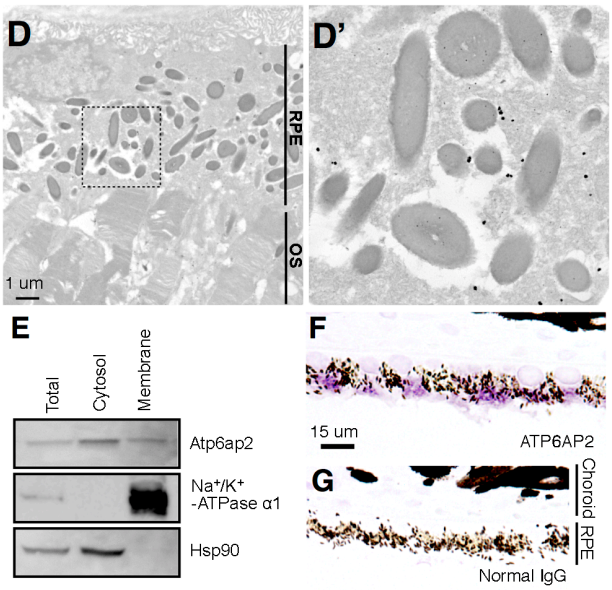


図 26D-G　網膜における ATP6AP2 の局在

(D, D')マウス RPE での免疫電子顕微鏡解析。細胞質に Atp6ap2 陽性シグナル（黒色点）が観察。(E)マウス網膜細胞分画後、イムノブロット法による Atp6ap2 の発現解析。細胞質、膜画分に Atp6ap2 が分布(Na+/K+-ATPase α1、細胞膜マーカー；Hsp90、細胞質マーカー)。(F)ヒト RPE 組織での抗 Atp6ap2 抗体免疫組織染色（紫色、Atp6ap2 シグナル)。陰性コントロール(G)。

4. ATP6AP2/(P)RR ノックダウン細胞における PDH 活性、アセチル-CoA、乳酸濃度

ATP6AP2/(P)RR と PDHB の共役による生理的機能を解明するため、siRNA を用いた *ATP6AP2* 遺伝子ノックダウンによる PDH への影響を検討した。ATP6AP2/(P)RR に対する 2 種類の siRNA（siRNA-1、-2）を使用したが、両者ともに有意に発現量を抑制した（siRNA-1, fold change = 0.12；siRNA-2, fold change = 0.16）（図 27A）。

そして、*ATP6AP2/(P)RR*遺伝子ノックダウン RPE 細胞における PDH 酵素活性、アセチル-CoA、乳酸濃度を測定した。結果、PDH 酵素活性（(control = 1.32 ΔOD_{450}/mg protein/min, siRNA-1 = 1.16 ΔOD_{450}/mg protein/min, siRNA-2 = 1.17 ΔOD_{450}/mg protein/min)）(図 27B)とアセチル-CoA 濃度(control = 11.77 pmol/mg protein, siRNA-1 = 7.15 pmol/mg protein, siRNA-2 = 7.96 pmol/mg protein)（図 27D）は減少し、一方で乳酸濃度（control = 2.51 $\mu M/10^6$ cells, siRNA-1 = 3.49 $\mu M/10^6$ cells, siRNA-2 = 3.48 $\mu M/10^6$ cells）（図 27C）は上昇していた。しかし、*ATP6AP2/(P)RR* を過剰発現（ATP6AP2, fold change = 3.6）させても酵素活性などに変化はなかった[PDH 酵素活性(Mock = 1.23 ΔOD_{450}/mg protein/min, ATP6AP2 = 1.18 ΔOD_{450}/mg protein/min)、乳酸濃度(Mock = 2.52 $\mu M/10^6$ cells, ATP6AP2 = 2.38 $\mu M/10^6$ cells)]（図 27E-G）。また、ヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞で *ATP6AP2* 遺伝子をノックダウン（siRNA-1, fold change = 0.14；siRNA-2, fold change = 0.10）したが、酵素活性などに変化はなかった[PDH 酵素活性（control = 0.46 ΔOD_{450}/mg protein/min, siRNA-1 = 0.47 ΔOD_{450}/mg protein/min, siRNA-2 = 0.45 ΔOD_{450}/mg protein/min)、乳酸濃度(control = 1.87 $\mu M/10^6$ cells, siRNA-1 = 1.95 $\mu M/10^6$ cells, siRNA-2 = 1.97 $\mu M/10^6$ cells)]（図 27H-J）。これらのことより、ATP6AP2/(P)RR は、ピルビン酸へ変換を好気的代謝（すなわち、アセチル CoA）に制御をする PDH 活性に関与していると考えられる。また、内在性に存在する ATP6AP2/(P)RR 量でその役割は飽和しており、細胞特異的な機能と示唆された。

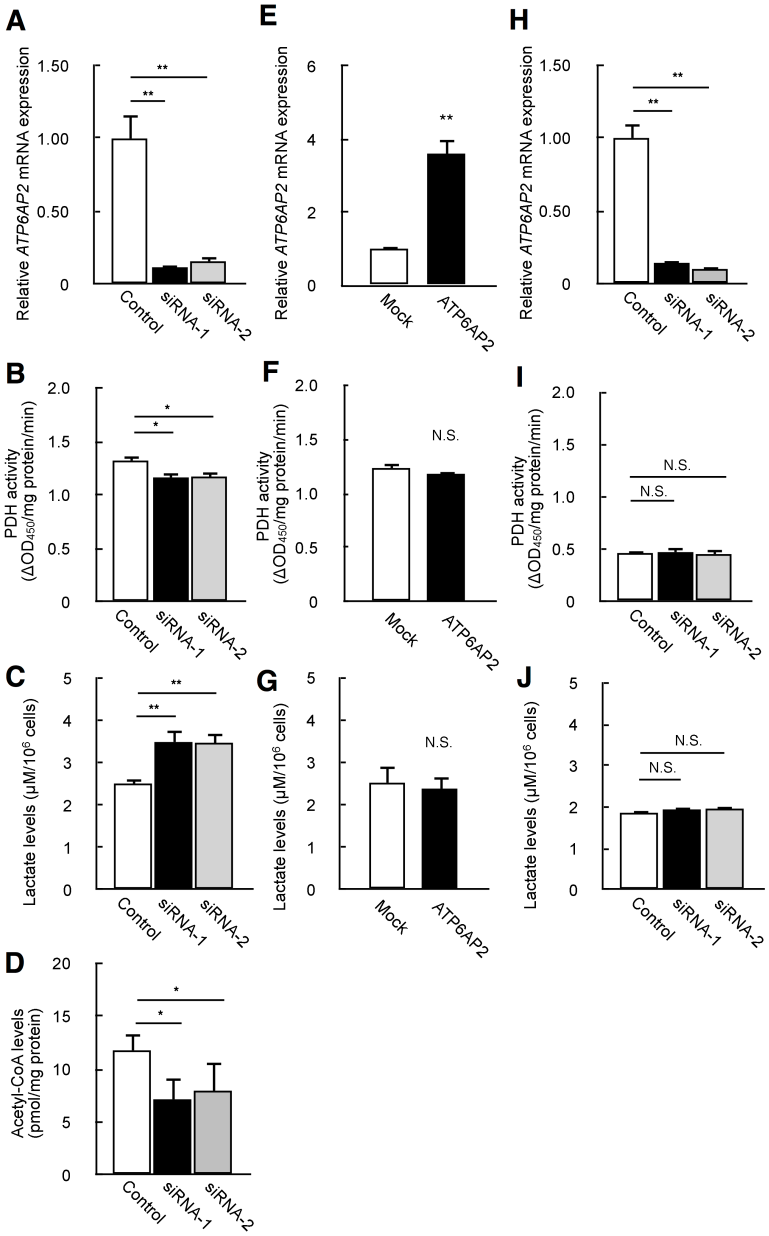


図 27　*ATP6AP2* 遺伝子ノックダウン細胞解析

(A-D) *ATP6AP2* 遺伝子ノックダウン RPE 細胞。PDH 活性とアセチル-CoA レベルが減少、乳酸レベルは上昇。(E-G) *ATP6AP2* 過剰発現 RPE 細胞。PDH 活性と乳酸レベルに変化なし。(H-J) *ATP6AP2* 遺伝子ノックダウン HEK293T 細胞。PDH 活性と乳酸レベルに変化なし。n = 6-14, *, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$、N.S. 有意差なし。

5. *ATP6AP2/(P)RR* 遺伝子ノックダウンによる PDHB タンパクへの影響

ATP6AP2/(P)RR 遺伝子ノックダウンによる PDHB タンパクへの安定性などへの影響を検討した。*ATP6AP2* ノックダウン細胞においては、*PDHB* mRNA レベルは変化が認められなかった（siRNA-1, fold change = 0.97；siRNA-2, fold change = 1.02）が、タンパクの発現量が減少していた（siRNA-1, relative intensity = 0.49 ± 0.12；siRNA-2, relative intensity = 0.60 ± 0.18）（図 28A、B）。

また、既報で PDHB タンパクはチロシンリン酸化により安定性が減少することが報告されている[108]。そこで、*ATP6AP2/(P)RR* 遺伝子ノックダウン RPE 細胞での PDHB タンパクのリン酸化を検討したところ、上昇していた（siRNA-1, relative intensity = 1.24 ± 0.10*；siRNA-2, relative intensity = 1.25 ± 0.21*、* $p < 0.05$）（図 28C）。さらに、ノックダウン細胞をチロシンキナーゼ阻害剤（AG18）で処理をしたところ、PDHB タンパクの減少が回復した（siRNA-1, relative intensity = 0.55 ± 0.12*；siRNA-2, relative intensity = 0.65 ± 0.08*；control+AG18, relative intensity = 0.98 ± 0.14；siRNA-1+AG18, relative intensity = 0.94 ± 0.09；siRNA-2+AG18, relative intensity = 0.99 ± 0.05、* $p < 0.05$）（図 28D）。これらのことより、ATP6AP2/(P)RR は、PDHB タンパクのリン酸化を制御し、その安定性に関与していると示唆された。

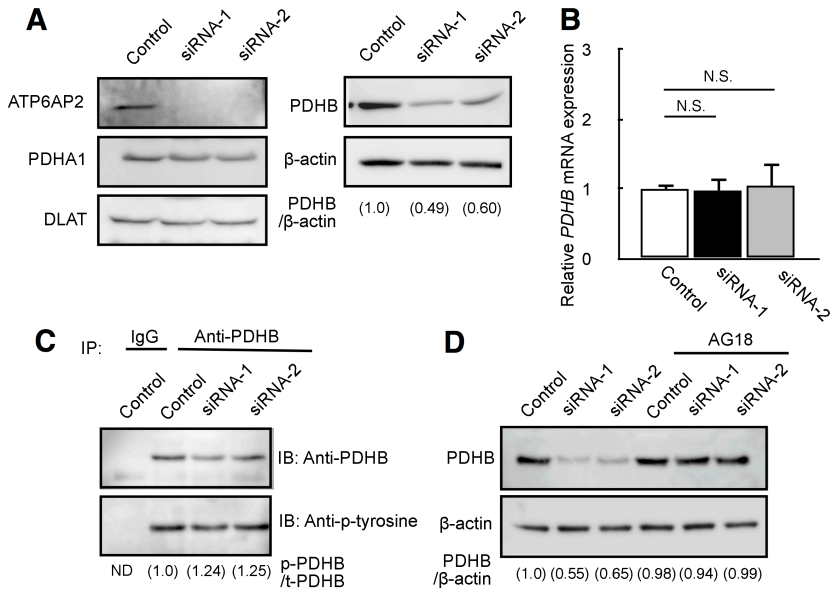


図 28　*ATP6AP2* 遺伝子ノックダウン細胞での PDHB タンパク

ATP6AP2 遺伝子ノックダウン RPE 細胞では、(A)PDHB タンパクレベルが減少。(B)*PDHB* 遺伝子発現は変化なし。(C)PDHB タンパクのリン酸化が亢進。(D)AG18(チロシンキナーゼ阻害剤)処理により、PDHB タンパクレベルが回復。n = 3-4。

6. *ATP6AP2/(P)RR* 遺伝子ノックダウンによる ROS 産生への影響

PDH 複合体は、解糖系からミトコンドリアにおける好気性代謝に関与しており、過剰のグルコースは呼吸鎖を介して ATP と共に ROS (reactive oxygen species) の産生を促す[109]。そこで、ATP6AP2/(P)RR が PDHB を介してグルコース誘導酸化ストレスに関与しているのではないかと考え、*ATP6AP2/(P)RR* 遺伝子ノックダウン RPE 細胞でのグルコース負荷による ROS 産生を測定した。結果、グルコース負荷により上昇した ROS (control siRNA = 135.2%) は、*ATP6AP2/(P)RR* 遺伝子ノックダウンにより抑制された (siRNA-1 = 113.9%, siRNA-2 = 115.1%) (図 29A)。さらに、RAS 抑制剤のバルサルタン (control siRNA = 135.4%, siRNA-1 = 113.4%, siRNA-2 = 114.7%)、RAPS 抑制剤の PRRB[42] (control siRNA = 134.4%, siRNA-1 = 112.9%, siRNA-2 = 111.5%) を添加したが、グルコース負荷により ROS 産生に変化は認められなかった (図 29B)。これらのことより、*ATP6AP2/(P)RR* 遺伝子ノックダウンによる ROS 産生抑制は、RAS および RAPS 非依存性であると考えられた。

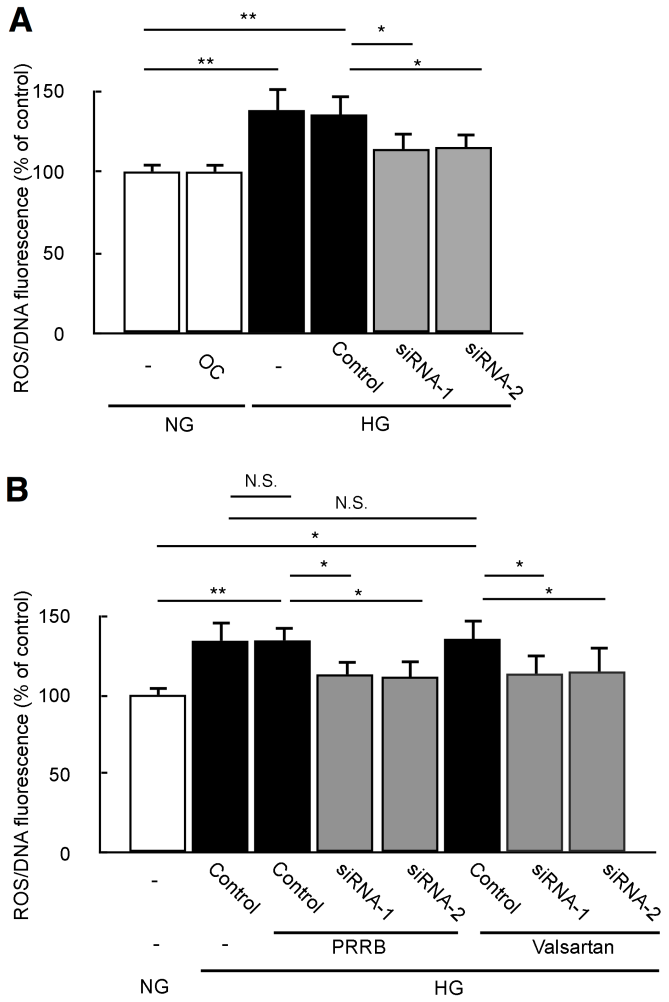


図 29　*ATP6AP2* 遺伝子ノックダウン細胞での ROS 産生

グルコース負荷により亢進した ROS 産生が *ATP6AP2* 遺伝子ノックダウンにより減少(A)。RAPS 阻害剤の PRRB および RAS 抑制薬の Valsartan を添加しても変化なし（B)。NG,　通常グルコース；HG, 高グルコース；OC、浸透圧コントロール、n = 12、* < 0.05、** < 0.01、N.S.有意差なし。

考察

本研究により ATP6AP2 つまり（プロ）レニン受容体が、グルコース代謝経路で解糖系と TCA サイクルをつなぐ酵素の一つ、ピルビン酸脱水素酵素 E1 の β サブユニット（PDHB）と会合していることを同定した。さらに、siRNA により *ATP6AP2/(P)RR* 遺伝子をノックダウンした網膜色素上皮細胞では、PDHB タンパク質の安定性が低下し、それにより細胞内のピルビン酸脱水素酵素複合体の酵素活性やそれに続くアセチル-CoA 産生量が減少し、乳酸レベルが上昇することを明らかにした。また、これにより活性酸素の産生も抑制された（図 30）。一方、腎臓由来の細胞で同様の実験を行ったが、このような変化は認められなかった。*ATP6AP2/(P)RR* 遺伝子を RPE 細胞でノックダウンすることによりあたかも嫌気性代謝様にエネルギー代謝がシフトした。

酸素の存在下で好気的代謝によって炭水化物を効率よく燃焼し、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化を介して ATP を大量に産生することができる。酵素複合体である PDH 複合体により、ピルビン酸からアセチル CoA を生成する過程は、細胞内のエネルギー代謝および酸塩基平衡を調節するために不可欠である。PDH 複合体は、E3 結合タンパク質 PDHX、PDH（E1）、DLAT（E2）および DLD（E3）を含む 3 の成分より構成されている。E1 酵素は 2 つの E1α サブユニット(PDHA1)と 2 つの E1 βのサブユニット(PDHB)から構成されるヘテロテトラマーであり、ピルビン酸脱炭酸のための補因子としてチアミンピロリン酸を使用する。この複合体の遺伝子変異は、乳酸アシドーシスの主な原因となる [110,111]。PDHB は幅広く発現している分子であるが、興味深い事に今回の結果は、網膜特異的な現象であった。既報で、*PDHB* 遺伝子を欠損したゼブラフィッシュの詳細な形態学的、行動学的、生理学的解析を行ったが、網膜特異的な phenotype（運動視、光感知低下、網膜細胞死など）を示したという報告がある [112]。原因は、糖代謝機能が低下し、その結果、エネルギーが不足して光感知が損失して運動視が低下していた。一方で、*Pdha*、*Dld*、*Dlat* 遺伝子を欠損したマウスもしくはゼブラフィッシュは、胎生または成熟前に死亡した [113-115]。PDH 複合体のこれらのサブユニットに依存するミトコンドリア酸化経路の全身性のエネルギー欠損のためである。しかし、*Dlat* 変異ゼブラフィッシュも、生存期間においては網膜の機能不全が観察されている。網膜は体内の中で最も酸素・ATP 消費量が高く，エネルギー代謝が活発な組織である [116,117]。それは、視覚サイクルで大量のエネルギーが必要なためである。酸素消費量は 13ml 酸素/100g 組織/分であるのに対し、脳は 3ml

酸素/100g 組織/分と 4 倍以上高く[118-124]、ATP 消費量も 1 ニューロン当たり、網膜 11.75 mW/g で 10.5 mW/g の脳より高く[125]、またグルコース消費量も中枢神経系より高い[126]。ヒトは、外界から得る情報の 8 割を視覚に依存すると考えられている。我々の眼は、第 2 章記述の視覚サイクルを介して暗所の中ではわずか 1 個の光分子をも感知することが可能である一方、明るい太陽光の下でも良好な視力を得ることが出来るほどのダイナミックレンジの広い感度を持つ、重要な感覚器官である。網膜には、光を受容する視細胞が約 1 億個あり、中でも特に網膜の中心に位置して光を受容する視細胞が高密度で存在する黄斑は、視力と色覚を司る重要な部位である。網膜の最外層に位置する網膜色素上皮細胞は、全体として一層の円柱（六角形）状の上皮細胞で、視細胞への栄養供給、視細胞外節の貪食、視物質の還元、ポンプ機能など多様な機能を有する[127]。この網膜色素上皮細胞は、近年様々な難治性網脈絡膜疾患（例えば、加齢黄斑変性など）に関連して注目を集めている細胞である（また、本研究にも使用した細胞株でもある)。このようにエネルギー代謝のみならず様々な代謝が活発な組織であることから、活性酸素が生じ易い組織であると考えられる。そのため、他臓器に比べピルビン酸脱水素酵素複合体の酵素活性低下などのグルコース代謝経路の異常が顕著に表れたものと示唆される。

急性および慢性的な過剰グルコース負荷は、エネルギー代謝の著明な変化をもたらす。好気性状態下では、細胞質での解糖系生成物としてのピルビン酸の急速な増加は、PDH によって媒介されピルビン酸からアセチル CoA への変換、それに続きミトコンドリア NADH 依存性 ATP 合成がおこなわれる。そしてその際に、余剰なスーパーオキシドも産生されてそれが酸化ストレスに繋がり、糖尿病の病因となる[128,129]。ATP6AP2 阻害による抗酸化効果は、PDH 活性の減少に起因しており、細胞内のエネルギー代謝が好気性から嫌気性様にシフトしたためと考えられる。本結果は、既報の PDH 活性阻害によりミトコンドリア ROS 産生が抑制された報告[130-132]と一致する。さらに、RAPS 関連経路の関与を排除するための阻害実験により、PDH によって媒介される好気的代謝及び ROS 生成における ATP6AP2/(P)RR の調節的役割が確認された。

進化の過程で、呼吸と循環システムによるエネルギー産生は取り巻く環境の酸素濃度に併せて、効率良くおこなえるよう変化してきた。脊椎動物の眼におけるエネルギー代謝は、脈絡膜のよく発達した血管系から十分な酸素の供給を受ける事が出来る網膜（特に RPE と視細胞）で特に活発である。一方、無脊椎

動物では視細胞が前面に位置する（つまり、前後逆に）。興味深い事に、PDHB と共役をする ATP6AP2/(P)RR の N 末端側のタンパク配列は、脊椎動物以降で高く保存されている [133]。つまり、脊椎動物（または少なくとも哺乳動物）における Atp6ap2 の N 末端配列は、Pdhb タンパク分解を抑えて PDH 酵素活性を確保することによって、網膜における高い酸素消費量を可能にしていると考えられる。

ATP6AP2/(P)RR は、糖尿病性網膜症を含む、炎症および血管新生など臓器損傷の分子病態に関与し、RAPS の活性化に重要な役割を果たしている。本研究で、ATP6AP2/(P)RR の N 末端側タンパクがプロレニンと同様に PDHB と共役して、異なった経路（RAPS の活性化とミトコンドリア ROS 産生）を介して病態形成を惹起しているのではないかと考えられる。ATP6AP2/(P)RR の C 末端側は、生理的機能に必要な v-ATPase の一部を構成している [51-53] ので N 末端断片を創薬ターゲットにすれば、生理的機能への影響を抑えて疾患の治療薬開発に繋がるのではないかと考えられる。

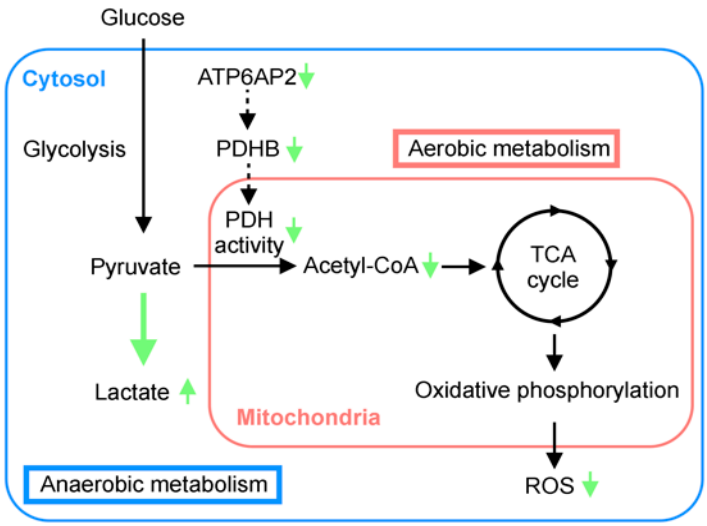


図 30　ATP6AP2 とグルコース代謝

ATP6AP2 の機能を抑制すると，PDHB タンパクの安定性が低下し，それに引き続いてアセチル-CoA 産生量が低下するため，最終的に活性酸素も減少するなど嫌気性糖代謝のように経路が変化したと示唆される。

結論

網膜において、（プロ）レニン受容体（ATP6AP2）がピルビン酸脱水素酵素（糖代謝関連酵素の一つ）を介してグルコース代謝経路、ひいてはエネルギー産生に関与していることを明らかにした。

総括

・第一章

レニン・アンジオテンシン系、さらにその上流に位置する(プロ)レニン受容体/ATP6AP2 は受容体結合プロレニン系(RAPS)を介して糖尿病網膜症における慢性炎症・病理的血管新生、つまり疾患の進行に関与する重要な分子である可能性が示された。

・第二章

網膜発生段階において（プロ）レニン受容体/Atp6ap2 は生理的機能として、細胞極性制御分子 PAR3 を介して、視細胞の層構造形成（極性）に関与する分子であると示唆された。

・第三章

成体網膜において（プロ）レニン受容体/ATP6AP2 は生理的機能として、PDHB（ピルビン酸脱水素酵素 E1βサブユニット）の安定化に関与してグルコース代謝経路に関連している可能性が示された。一方、この機能は糖負荷によるミトコンドリア酸化ストレスという病態形成にも寄与する可能性が示された。

今日、ライフスタイルの欧米化、飲酒、喫煙などが原因となり発症する生活習慣病（糖尿病、肥満、脂質代謝異常、高血圧、慢性腎臓病など）の急増が、超高齢社会に突入した日本において重要な問題になっている[134,135]。生活習慣病の病態背景には、慢性炎症や血管新生などが存在し、それらはガン（発がん、浸潤、転移)、神経疾患（アルツハイマー病、パーキンソン病)、自己免疫疾患（慢性関節リウマチ)、動脈硬化性疾患（虚血性心疾患、脳卒中）などとも関連する重要な病理的所見である。そして、これらの病因・病態の連鎖および合併症を一連の流れとしてとらえる「メタボリックドミノ」[136] という考え方も提唱されるようになった（図 31)。メタボリックドミノでは、最上流に生活習慣の乱れが存在し、その乱れがドミノ倒し引き起こすトリガーとなって肥満やインスリン抵抗性などの共通の基礎病態を惹起する。その結果として高血圧・高脂血症・食後高血糖が生じてくる。全身では、さらに動脈硬化症が進行して、虚血性心疾患、脳血管障害、下肢閉塞性動脈硬化症などの大血管障害を合併する。また糖尿病発症により高血糖が持続することで、細小血管障害が進行して腎

症・網膜症・神経障害を合併する。眼では網膜症（微小血管瘤，網膜出血など)、細動脈狭細化、動静脈交叉現象、網膜静脈拡張などの網膜血管の異常所見がみられるようになる[137]。最後にドミノが総崩れになると、心不全、痴呆、脳卒中、下肢切断、腎透析や失明に至る。また、近年罹患者数が急増している AMD の発症にも生活習慣病がその疾患発症の大きな病因になっていることが明らかになっている[138-144]。アメリカでは現在 2,000 万人以上の患者がみられ、高齢者のQOV(quality of vision)に多大な障害をもたらしている。このメタボリックドミノにおいて、最上流に位置する肥満から最下流の血管合併症による臓器障害に至るまで、全ての段階で RAS が連続的に関与しており、さらにその関与の程度はメタボリックドミノの下流の病態になればなるほど大きいことが近年明らかになっている[145,146]。

炎症とは、急性炎症（発赤・腫脹・疼痛を３主徴とする）の古典的概念として知られている[147-149]。一方、近年の生活習慣病の増加により、様々な標的臓器に軽度の慢性炎症が遷延し、組織リモデリングから機能障害を来たすことが指摘されている。このような慢性炎症は、マクロで観察される３主徴が明らかでなく「ミクロの炎症」とも呼ばれるが、糖尿病や動脈硬化など生活習慣病における臓器障害には、程度の差こそあれ急性炎症と同じく白血球浸潤を伴う。急性・慢性炎症を問わず、炎症組織への白血球浸潤は、臓器へとリクルートされた炎症細胞が血管壁にローリング・接着・血管外遊走という複数のステップを必要とし[150]、多くの分子メカニズムを共有している[6,147]。また、血管新生には古くは血管透過性因子 vascular permeability factor (VPF)として発見されたVEGF が責任分子として明らかにされており、血管内皮細胞やマクロファージなどに存在する VEGF 受容体（VEGFR-1、VEGFR-2）に結合する。それにより血管内皮細胞の増殖のみならず、炎症細胞での走化因子 monocyte chemotactic protein（MCP）-1 や接着因子 intercellular adhesion molecule（ICAM）-1 の発現を誘導し、病態組織へのさらなる炎症細胞のリクルートを促進する。このように糖尿病を含めた生活習慣病の病態には炎症・血管新生が密接に関与しており[151,152]、その発症と進行には RAS の活性化を伴うことが明らかとなってきた[153-155]。

RAS は、古くは生物が海から陸へと進化する過程で塩分と水分を体内に保持するために発達した循環ホルモンシステム（循環 RAS）として知られており、その阻害剤は高血圧治療薬として広く使われている。しかし、近年では臓器局所に RAS 関連分子が発現・局在しており、臓器局所では細胞の分化・増殖など組織修

復などの役割を担っている（組織 RAS）ことが明らかになっている。飢餓の時代に塩分保持など生命維持に必須の役割を担ってきた RAS は、飽食の現代では生活習慣病を進行させる病態因子として働いている。AT1-R シグナルの下流でレドックス感受性転写因子の nuclear factor (NF)-κB が活性化し、様々な炎症関連分子が発現誘導されるためと考えられている [156,157]。実際に臨床では，RAS 抑制薬は高血圧治療としてだけでなく、糖尿病腎症など臓器保護の目的でも使用されるようになっている。

臨床研究における RAS と糖尿病網膜症の関連性を述べる報告はいつくかある（表 3)。血糖値のコントロールに加えて、ACE 阻害薬（captopril）や交感神経β遮断薬（Atenolol）による厳格な血圧コントロールにより糖尿病網膜症の発症・進行が有意に抑制することが UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) にて報告された [70]。また、The EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Mellitus (EUCLID) Study では、正常血圧の 1 型糖尿病患者に対する ACE 阻害薬（lisinopril）がプラセボ群と比較して糖尿病網膜症の非増殖期から増殖期への進行を抑制することが報告された [72]。さらに、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬（ARB）である candesartan の糖尿病網膜症に与える影響をみた大規模臨床試験である DIabetic REtinopathy Candesartan Trials (DIRECT) においても、高血圧のない 1 型糖尿病および高血圧をコントロールされた 2 型糖尿病患者において、ARB (candesartan)の網膜症に対する発症予防効果および進行抑制効果がそれぞれ報告され [71,74]、糖尿病における ARB の網膜保護効果に大きな関心が集まった。さらに、1 型糖尿病患者を対象とした RAS Study (RASS)でも ACE 阻害薬（enalapril）または ARB（losartan）による網膜症抑制効果が報告され [73]、ACE 阻害薬または ARB の種類を問わず RAS 抑制薬のクラスエフェクトであることが決定的となった。一方、増殖糖尿病網膜症や糖尿病黄斑浮腫の硝子体中では VEGF 濃度が上昇しており、興味深いことに Ang II 濃度と正相関している [64,158]。さらに、Ang II は AT1-R を介して VEGF や ICAM-1 の発現を増加させることが明らかとなっている [159]。このように糖尿病網膜症患者の眼内において組織 RAS が活性化し、Ang II は VEGF などの炎症関連分子を誘導して、血管新生・炎症を惹起していることを示す。

また、これまでに我々は、ストレプトゾトシン（streptozotocin：STZ）誘導糖尿病モデルをはじめとし、実験的ぶどう膜炎・網膜炎モデルやレーザー誘導脈絡膜血管新生モデル動物を用いて、眼内における炎症・血管新生と組織 RAS

との関係を明らかにした[21-25]。STZ 誘導糖尿病モデルでは、網膜における Ang II や AT1-R の発現が上昇しており、RAS の活性化が認められた。ここに ARB（telmisartan または valsartan）を投与することによりすることにより、高血糖で亢進していた網膜血管への白血球接着は有意に抑制された。さらに網膜における AT1R シグナル下流で VEGF や ICAM-1 発現も抑制された[21]。これらのことより、糖尿病網膜症では RAS が活性化しており、AT1-R を介するシグナルが病態形成に大きく関与していることが示唆された。

厳格な血糖コントロールは糖尿病網膜症の進行を防ぐ上で重要であるが、ACE 阻害薬などによる高血圧の是正でも網膜症の進行抑制につながることが報告されている。一方、RAS の抑制による網膜保護効果には高血圧の是正とは関係ないメカニズムもある。実際、糖尿病患者には低レニン血症であるため循環 RAS は抑制されているが[160]、正常血圧の糖尿病患者に RAS 抑制薬を投与しても網膜症の進行が抑えられる[72]。このため糖尿病患者では、循環 RAS とは独立して、レニンに依存しない組織 RAS の活性化が起こると推測されていたが、その活性化メカニズムは不明であった。

(P)RR/ATP6AP2 は、プロレニンと結合するとタンパク切断などなく（レニンに変換されることなく）プロレニンの立体構造変化のみが起こり、レニン活性中心の露出の結果、レニンと同程度の酵素活性を発揮させる。さらに、プロレニンと(P)RR/ATP6AP2 が結合すると、RAS 非依存性に直接(P)RR/ATP6AP2 の細胞内シグナルとして ERK1/2 の活性化が起きることが明らかになった[33,161]。これまでに我々は、STZ 糖尿病モデル動物を用いて網膜病態と RAPS の関係について検討を行い、その分子メカニズムを明らかにした。糖尿病により誘導された網膜血管への白血球接着は、(P)RR/ATP6AP2 阻害薬（PRRB）（図 32）の投与により減少し、その細胞内メカニズムとして炎症性サイトカインの発現が抑制された。さらに興味深いことに AT1-R ノックアウトマウス（つまり組織 RAS を有さないマウス）を用いた同様の実験においても、PRRB 投与により病態が改善した。そこで我々は、組織 RAS と受容体細胞内シグナルの二つの経路を活性化させる(P)RR/ATP6AP2 を中心としたこの系を RAPS と提唱した[28,40]。このことから、(P)RR/ATP6AP2 が糖尿病網膜症をはじめとする眼疾患の血管新生・炎症に深く関与していることを示唆する結果となった[28,161]。

そして本論文の第 1 章の研究成果で、糖尿病網膜症患者より採取された臨床検体を用いた解析結果においても、(P)RR/ATP6AP2 の血管活動性つまり疾患の病

態形成への関与について明らかになった。(P)RR/ATP6AP2 が中心となり活性化する RAPS は、網膜疾患（糖尿病網膜症）のみならず腎臓や心血管など生活習慣病の標的臓器の炎症病態にも関与することが明らかになっている [38,161,162]。実際、最近我々は網脈絡膜疾患のみならず、眼表面の結膜や涙腺などの眼周囲組織に発生するリンパ腫の一種、結膜節外辺縁帯 B 細胞性リンパ腫の病態形成においても(P)RR/ATP6AP2 および RAS/RAPS が線維芽細胞増殖因子（FGF）-2 やマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-2、9、-14 の発現を制御して B 細胞性リンパ腫の線維化・転移などに関与していることを報告した [163]。さらに本邦の途中失明第一位である緑内障の線維柱帯における病態形成への関与を示唆するデータも得られている（未発表データ）。また、その他動物実験モデルと臨床研究の結果から RAS の抑制が悪性腫瘍の増殖および転移を減少させるという報告 [164-167] もあり、RAS 阻害は古典的な心血管作用の独立した有用な治療戦略を示唆させる。これら研究成果を踏まえ現在我々は、RAPS 阻害剤、つまり(P)RR 阻害剤開発を行っている。しかし、創薬研究をおこなって行く上で、予期せぬ副作用などを回避するためにも標的分子(P)RR の生理的機能を充分に理解しておくは必要不可欠である。しかしながら、(P)RR/ATP6AP2 の網膜における生理的な機能解析を行った報告はこれまでにはなかった。

本論文の第 2 章と第 3 章の研究成果により、(P)RR/ATP6AP2 の網膜発生期および成体期における新たな生理的機能が明らかになった。これらにより、副作用を（全てとはいかないが）予測・回避することが可能になり、より良い治療の実現につながることが期待される。過食の現代社会では，高いエネルギー代謝を営む細胞（特に網膜）が酸化ストレスの産生源になってしまうという皮肉を生んでいる。この意味で，眼において効率よいエネルギー産生を補助する(P)RR/ATP6AP2 の役割は諸刃の剣となっていると示唆される。糖尿病網膜症の病態形成において重要な病理的要因の一つが、酸化ストレスである。糖尿病の高血糖により酸化ストレス（ミトコンドリア ROS）が発生し [168]、それが網膜組織・血管に対して傷害を与える。それにより血管障害によって網膜が酸欠状態に陥り、その結果として起こる炎症や血管新生によって出血や網膜剥離などの視機能障害が起こる [169]。そして、最終的には失明に至る。第 3 章の結果より、(P)RR/ATP6AP2 の機能亢進は PDH 酵素活性の安定化に繋がり、ROS 産生を促す。したがって、眼疾患において(P)RR/ATP6AP2 を分子ターゲットとする治療戦略は、将来的に RAPS 阻害以外としても有望な選択肢となる可能性がある。

現在、眼科領域の分子標的療法では抗 VEGF 療法が（途中失明の第 2 位）糖尿病網膜症、（第 4 位）加齢黄斑変性のほか、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞症、病的近視における脈絡膜新生血管に対して臨床応用されており、4 種類の抗 VEGF 治療薬（ranibizumab、bevacizumab、pegaptanib、aflibercept）が存在する[9-15]。ただし、薬剤により適応疾患の違いはがある。各々に製剤的特徴（分子特異性、持続性など）があるが、全てに共通して、病態抑制のため長期に渡り複数回の硝子体注射が必要である。反復投与によって眼局所では感染症や網膜萎縮など[170,171]、全身性では脳梗塞・脳卒中・心筋梗塞などの脳血管イベントに対するリスク・副作用が問題なっている[172-174]。これらは、VEGF の生理的作用（血管内皮細胞生存など）の阻害によると考えられる。また、近年の報告では抗 VEGF 治療薬に抵抗を示す症例もある[175,176]。その詳細なメカニズムなどは明らかになっていないが、この臨床病期には他の炎症関連分子も動いているため、抗 VEGF 療法のみで病態を制御することには限界があるのではないかと考えられる。

今後さらなる(P)RR/ATP6AP2 の生活習慣病に伴う網膜病態と視機能の病態生理について理解が深まることで、抗加齢医学をはじめとして幅広い分野の研究が活性化され、我が国の医学の発展に貢献することが予想される。新薬である直接レニン阻害薬 aliskiren をはじめとする既存の RAS 抑制薬では、(P)RR/ATP6AP2 からの細胞内シグナルは阻害できないことから、(P)RR/ATP6AP2 は生活習慣病における病態形成の上流経路で早期介入出来る（臓器保護のための）共通の創薬ターゲットとして注目されている。VEGF は進行期病態のメインプレーヤーであり網膜 RAPS および硝子体 RAS 活性化の下流で動く分子である。(P)RR/ATP6AP2 を創薬ターゲットとした研究は、多くの病態分子を抑制できる上流での介入戦略として、より効率の良い治療の実現につながることが期待される。

これまでに、(P)RR/ATP6AP2 の阻害薬としてプロレニン分子のハンドル領域ペプチド[（プロ）レニン受容体阻害薬、PRRB]が唯一開発され、我々を含め様々な疾患モデル動物実験などで使われてその病態抑制の有効性は証明されている（図 32）[26-30,37,38,40,42,60,161,177]。しかしながら、ペプチド製剤であるため溶解性・安定性などの問題が多数あり、直接の臨床応用は難しい。そこで我々は、臨床応用を視野に入れ、阻害薬の安定性を考慮して非ペプチド性阻害薬開発に向け、低分子化合物ライブラリーからの探索に加え、ペプチドミメティック、中和抗

体や核酸有機化学を応用した核酸医薬の技術などを駆使して効果的な分子認識剤の開発を行っている。眼球は局所投与に適した半閉鎖空間であり、全身への安全性の懸念が少ないことから新薬開発に有利な臓器と言える。さらに、(P)RR/ATP6AP2 の阻害薬は予防医療的な介入戦略でもあるため、合併症が進行してから受ける費用の嵩む外科的治療の減少につながることが予想され、医療費の削減から医療経済的にも有益と考えられる。超高齢社会を迎えた我が国では、眼をはじめとする感覚器や循環器臓器の健康を維持することは、Quality of Life の向上に直結する重要課題となっている。特に、加齢や生活習慣病に伴う加齢黄斑変性や糖尿病網膜症といった網脈絡膜疾患はいまだ失明原因の上位を占めている。(P)RR/ATP6AP2 の阻害は、視力を損なう前からより早期に介入する予防医学的な側面を持ち合わせた治療戦略であり、生活習慣が急増する現代において、将来的に健康社会の実現に寄与すべく理にかなっていると考えられる。

本研究をはじめとし、眼科創薬が起点となって幅広い分野の研究が活性化され、我が国の医療水準向上の貢献に一助とでもなることを望む。

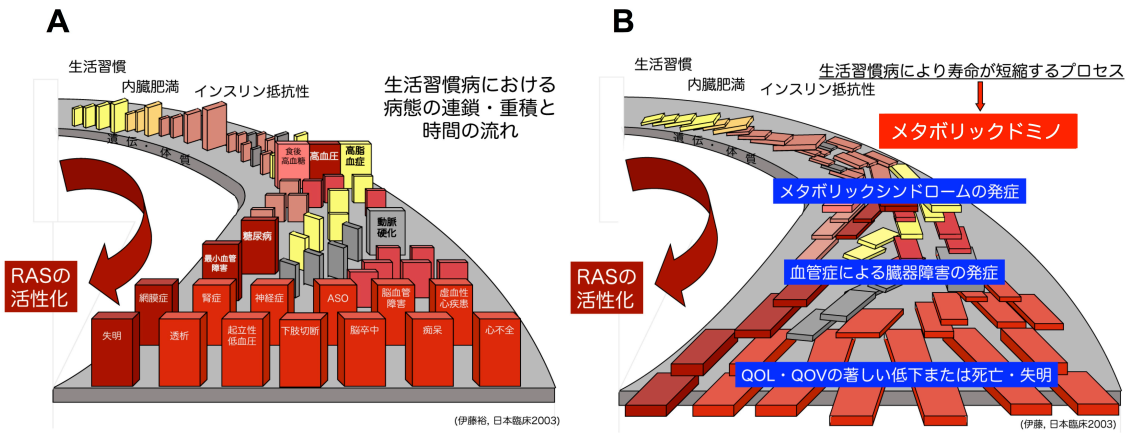


図 31　メタボリックドミノ

A；メタボリックシンドロームの病因、病態の連鎖および合併症を一連の流れとしてとらえる考え方。生活習慣の乱れからドミノ倒しのように内蔵肥満から数々の臓器障害へと連鎖・重積する過程がイメージできる。このメタボリックドミノにおいて、最上流に位置する肥満から最下流の心血管イベント、血管合併症の発症に至るまで、そのすべての段階で RAS が連続的に関与しており、さらにその関与の程度はメタボリックドミノの下流になるほど大きい。

B；ドミノが総崩れになると、心不全、痴呆、脳卒中、下肢切断、腎透析、失明などにより、QOL/QOV の著しい低下または死亡が待っている。

表 3：RAS 抑制薬の糖尿病糖尿病網膜症に対する抑制効果

臨床試験	糖尿病の分類	ARB	ACE 阻害薬
EUCLID（1998）	1 型	−	リシノプリル
DIRECT（2008）	1 型	カンデサルタン	−
DIRECT（2008）	2 型	カンデサルタン	−
RASS（2009）	1 型	ロサルタン	エナラプリル

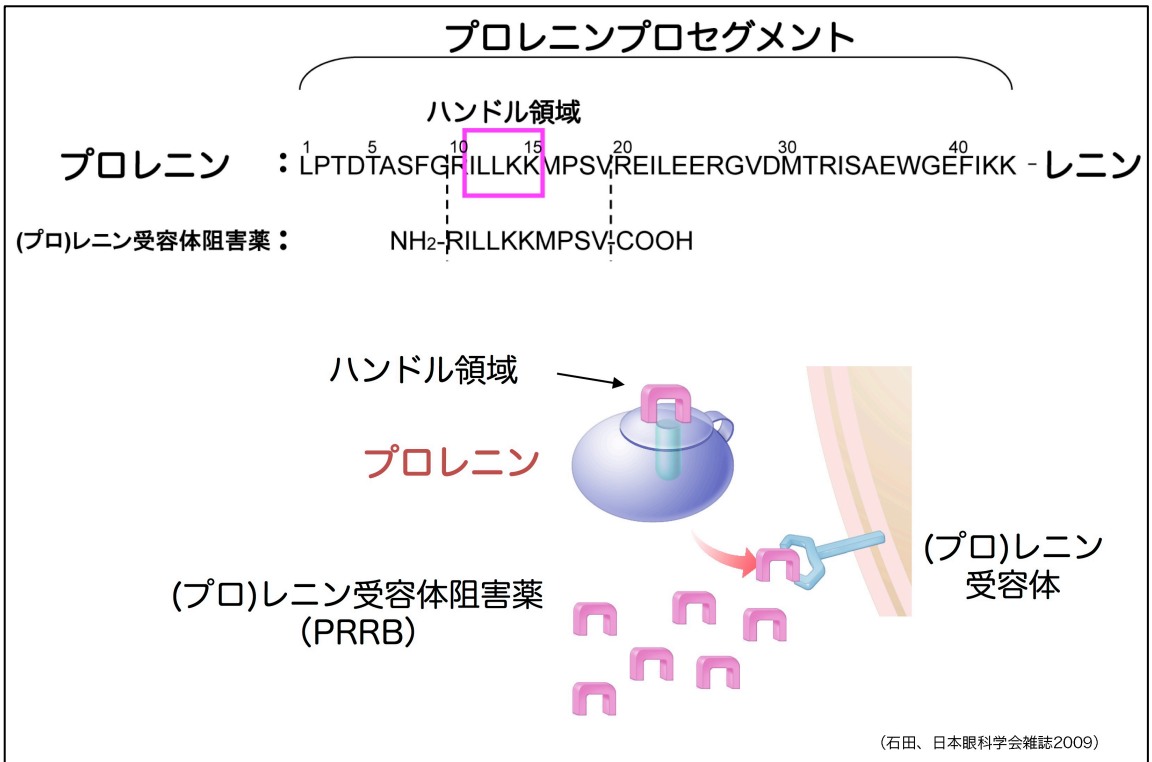


図 32　(P)RR/ATP6AP2 の阻害

(P)RR/ATP6AP2 阻害剤（PRRB）は、プロレニン分子のプロセグメントのハンドル領域（受容体結合部位）に相当するアミノ酸配列で作製したデコイペプチドである。PRRB はプロレニンと競合して(P)RR/ATP6AP2 に結合することにより、(P)RR/ATP6AP2 の機能を阻害する。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂き、御指導と御校閲を賜りました北海道大学大学院医学研究科眼科学分野　石田　晋教授に深甚なる謝意を表します。また本研究全般にわたって御支援等を賜りました野田航介准教授をはじめとする研究室ならびに医局スタッフ・秘書に心より感謝の意を表します。

また本研究は、文部科学省 先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム補助金、文部科学省科学研究費　研究活動スタート支援（研究課題番号：22890007）ならびに若手（B）（研究課題番号：24791823）、公益財団法人東京生化学研究会　平成 22 年度研究奨励金、財団法人難病医学研究財団　平成 22 年度医学研究奨励助成金、トミーデジタル株式会社・BioLegend Japan 株式会社 BioLegend/Tomy Digital Biology Research Grant、財団法人北海道科学技術総合振興センター　平成 22 年度ノーステック財団研究開発助成事業（タレント補助金）、北海道大学　平成 22 年度若手研究者自立支援助成金　重点配分経費研究支援事業、公益信託三島済一記念眼科研究　平成 23 年度国際交流基金研究助成金、公益財団法人武田科学振興財団　2011 年度医学系研究奨励(生活習慣病)、SIGMA-ALDRICH Co. CompoZr Zinc Finger Nuclease Award Program、公益財団法人伊藤医薬学術交流財団 平成 24 年度 海外学会等出席研究交流助成金、公益財団法人秋山記念生命科学振興財団 平成 24 年度研究助成奨励金、一般財団法人横山臨床薬理研究助成基金　平成 24 年度研究助成、公益財団法人鈴木謙三記念医科学応用研究財団　調査研究助成金、公益信託参天製薬創業者記念眼科医学研究基金、小野がん研究助成基金　平成 24 年度研究助成金、公益財団法人武田科学振興財団　2013 年度医学系研究奨励（生活習慣病）、公益信託三島済一記念眼科研究　平成 25 年度国内研究助成金、一般社団法人血圧とホルモン科学協会　第 2 回レニン関連研究助成金、一般社団法人血圧とホルモン科学協会　第 3 回レニン関連研究助成金、北海道大学　平成 26 年度若手研究者自立支援助成金　重点配分経費研究支援事業の助成により実施された研究である。

引用文献

1 Ryan, S. J. *Retina*. 3rd edn, (Mosby, 2001).

2 丸尾敏夫, 臼井正彦 & 本田孔士. *眼科学*. (文光堂, 2011).

3 Hong, T. *et al.* Long-term changes in visual acuity in an older population over a 15-year period: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* **120**, 2091-2099 (2013).

4 Sommer, A. *et al.* Racial differences in the cause-specific prevalence of blindness in east Baltimore. *N Engl J Med* **325**, 1412-1417 (1991).

5 VanNewkirk, M. R. *et al.* The prevalence of age-related maculopathy: the visual impairment project. *Ophthalmology* **107**, 1593-1600 (2000).

6 Ishida, S. *et al.* VEGF164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization. *J Exp Med* **198**, 483-489 (2003).

7 Campochiaro, P. A. Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases. *Prog Retin Eye Res* (2015).

8 Miller, J. W., Le Couter, J., Strauss, E. C. & Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor a in intraocular vascular disease. *Ophthalmology* **120**, 106-114 (2013).

9 Do, D. V. *et al.* The DA VINCI Study: phase 2 primary results of VEGF Trap-Eye in patients with diabetic macular edema. *Ophthalmology* **118**, 1819-1826 (2011).

10 Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor and age-related macular degeneration: from basic science to therapy. *Nat Med* **16**, 1107-1111 (2010).

11 Heier, J. S. *et al.* Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **119**, 2537-2548 (2012).

12 Hurwitz, H. *et al.* Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* **350**, 2335-2342 (2004).

13 Ng, E. W. *et al.* Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 123-132 (2006).

14 Rosenfeld, P. J. *et al.* Ranibizumab for neovascular age-related

macular degeneration. *N Engl J Med* **355**, 1419-1431 (2006).

15 Tabernero, J. *et al.* Aflibercept versus placebo in combination with fluorouracil, leucovorin and irinotecan in the treatment of previously treated metastatic colorectal cancer: prespecified subgroup analyses from the VELOUR trial. *Eur J Cancer* **50**, 320-331 (2014).

16 Kanda, A. [(Pro) renin receptor in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy]. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi* **118**, 916-926 (2014).

17 Lieu, C., Heymach, J., Overman, M., Tran, H. & Kopetz, S. Beyond VEGF: inhibition of the fibroblast growth factor pathway and antiangiogenesis. *Clin Cancer Res* **17**, 6130-6139 (2011).

18 Braun-Menendez, E., Fasciolo, J. C., Leloir, L. F. & Munoz, J. M. La substancia hypertensora de la sangre del rinon isquemiado. *Revista Society of Argentine Biologists* **15**, 420-425 (1939).

19 Skeggs, L. T., Jr., Lentz, K. E., Kahn, J. R., Shumway, N. P. & Woods, K. R. The amino acid sequence of hypertensin. II. *J Exp Med* **104**, 193-197 (1956).

20 *レニン・アンジオテンシン系のすべて*. Vol. Vol. 228, No. 5, 2009 (医歯薬出版, 2009).

21 Nagai, N. *et al.* Suppression of diabetes-induced retinal inflammation by blocking the angiotensin II type 1 receptor or its downstream nuclear factor-kappaB pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**, 4342-4350 (2007).

22 Nagai, N. *et al.* Selective suppression of pathologic, but not physiologic, retinal neovascularization by blocking the angiotensin II type 1 receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 1078-1084 (2005).

23 Nagai, N. *et al.* Angiotensin II type 1 receptor-mediated inflammation is required for choroidal neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 2252-2259 (2006).

24 Nagai, N. *et al.* Suppression of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis by blocking the angiotensin II type 1 receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 2925-2931 (2005).

25 Kurihara, T. *et al.* Angiotensin II type 1 receptor signaling contributes

to synaptophysin degradation and neuronal dysfunction in the diabetic retina. *Diabetes* **57**, 2191-2198 (2008).

26 Satofuka, S. *et al.* Role of nonproteolytically activated prorenin in pathologic, but not physiologic, retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**, 422-429 (2007).

27 Satofuka, S. *et al.* (Pro)renin receptor promotes choroidal neovascularization by activating its signal transduction and tissue renin-angiotensin system. *Am J Pathol* **173**, 1911-1918 (2008).

28 Satofuka, S. *et al.* (Pro)renin receptor-mediated signal transduction and tissue renin-angiotensin system contribute to diabetes-induced retinal inflammation. *Diabetes* **58**, 1625-1633 (2009).

29 Satofuka, S. *et al.* Pathologic roles of prorenin and (pro)renin receptor in the eye. *Front Biosci* **13**, 3884-3895 (2008).

30 Satofuka, S. *et al.* Suppression of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis by inhibiting nonproteolytic activation of prorenin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 2686-2692 (2006).

31 Luetscher, J. A., Bialek, J. W. & Grislis, G. Human kidney cathepsins B and H activate and lower the molecular weight of human inactive renin. *Clin Exp Hypertens A* **4**, 2149-2158 (1982).

32 Wang, P. H. *et al.* Identification of renal cathepsin B as a human prorenin-processing enzyme. *J Biol Chem* **266**, 12633-12638 (1991).

33 Nguyen, G. *et al.* Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* **109**, 1417-1427 (2002).

34 Derkx, F. H., Schalekamp, M. P. & Schalekamp, M. A. Two-step prorenin-renin conversion. Isolation of an intermediary form of activated prorenin. *J Biol Chem* **262**, 2472-2477 (1987).

35 Leckie, B. J. & McGhee, N. K. Reversible activation-inactivation of renin in human plasma. *Nature* **288**, 702-705 (1980).

36 Sealey, J. E. & Laragh, J. H. "Prorenin" in human plasma? *Circ Res* **36**, 10-16 (1975).

37 Suzuki, F. *et al.* Human prorenin has "gate and handle" regions for its non-proteolytic activation. *J Biol Chem* **278**, 22217-22222 (2003).

38 Ichihara, A. *et al.* Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin. *J Clin Invest* **114**, 1128-1135 (2004).

39 Sakoda, M. *et al.* (Pro)renin receptor-mediated activation of mitogen-activated protein kinases in human vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* **30**, 1139-1146 (2007).

40 Satofuka, S., Kanda, A. & Ishida, S. Receptor-associated prorenin system in the pathogenesis of retinal diseases. *Front Biosci* **4**, 1449-1460 (2012).

41 Kanda, A. & Ishida, S. Vitreous renin-angiotensin system is mediated by soluble (pro)renin receptor in diabetic retinopathy: new implication of receptor-associated prorenin system. *Twn J Ophthalmol* **3**, 51-53 (2013).

42 Kanda, A., Noda, K., Saito, W. & Ishida, S. (Pro)renin receptor is associated with angiogenic activity in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia* **55**, 3104-3113 (2012).

43 Kanda, A., Noda, K., Saito, W. & Ishida, S. Vitreous renin activity correlates with vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *British Journal of Ophthalmology* **97**, 666-668 (2013).

44 Amsterdam, A. *et al.* Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12792-12797 (2004).

45 Ludwig, J. *et al.* Identification and characterization of a novel 9.2-kDa membrane sector-associated protein of vacuolar proton-ATPase from chromaffin granules. *J Biol Chem* **273**, 10939-10947 (1998).

46 Adams, D. S. *et al.* Early, H+-V-ATPase-dependent proton flux is necessary for consistent left-right patterning of non-mammalian vertebrates. *Development* **133**, 1657-1671 (2006).

47 Nishi, T. & Forgac, M. The vacuolar (H+)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 94-103 (2002).

48 Buechling, T. *et al.* Wnt/Frizzled signaling requires dPRR, the Drosophila homolog of the prorenin receptor. *Curr Biol* **20**, 1263-1268

(2010).

49 Cruciat, C. M. *et al.* Requirement of prorenin receptor and vacuolar H+-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling. *Science* **327**, 459-463 (2010).

50 Hermle, T., Saltukoglu, D., Grunewald, J., Walz, G. & Simons, M. Regulation of Frizzled-dependent planar polarity signaling by a V-ATPase subunit. *Curr Biol* **20**, 1269-1276 (2010).

51 Kinouchi, K. *et al.* The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H+-ATPase assembly in murine cardiomyocytes. *Circ Res* **107**, 30-34 (2010).

52 Oshima, Y. *et al.* Prorenin receptor is essential for normal podocyte structure and function. *J Am Soc Nephrol* **22**, 2203-2212 (2011).

53 Riediger, F. *et al.* Prorenin receptor is essential for podocyte autophagy and survival. *J Am Soc Nephrol* **22**, 2193-2202 (2011).

54 Kanda, A. *et al.* Atp6ap2/(pro)renin receptor interacts with Par3 as a cell polarity determinant required for laminar formation during retinal development in mice. *J Neurosci* **33**, 19341-19351 (2013).

55 Kanda, A., Noda, K. & Ishida, S. ATP6AP2/(pro)renin receptor contributes to glucose metabolism via stabilizing the pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit. *J Biol Chem* **290**, 9690-9700 (2015).

56 Kanda, A. *et al.* Age-related macular degeneration-associated variants at chromosome 10q26 do not significantly alter ARMS2 and HTRA1 transcript levels in the human retina. *Mol Vis* **16**, 1317-1323 (2010).

57 Ausubel, F. M. *et al. Current Protocols in Molecular Biology*. (John Wiley & Sons, Inc., 1989).

58 Biswas, K. B. *et al.* Qualitative and quantitative analyses of (pro)renin receptor in the medium of cultured human umbilical vein endothelial cells. *Hypertens Res* **34**, 735-739 (2010).

59 Otani, A. *et al.* Angiotensin II-stimulated vascular endothelial growth factor expression in bovine retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 1192-1199 (2000).

60 Ichihara, A. *et al.* Possible roles of human (pro)renin receptor suggested by recent clinical and experimental findings. *Hypertens Res*

33, 177-180 (2010).

61 Cousin, C. *et al.* Soluble form of the (pro)renin receptor generated by intracellular cleavage by furin is secreted in plasma. *Hypertension* **53**, 1077-1082 (2009).

62 Yoshikawa, A. *et al.* The (pro)renin receptor is cleaved by ADAM19 in the Golgi leading to its secretion into extracellular space. *Hypertens Res* **34**, 599-605 (2011).

63 Danser, A. H. *et al.* Renin, prorenin, and immunoreactive renin in vitreous fluid from eyes with and without diabetic retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab* **68**, 160-167 (1989).

64 Funatsu, H., Yamashita, H., Nakanishi, Y. & Hori, S. Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* **86**, 311-315 (2002).

65 Gao, B. B., Chen, X., Timothy, N., Aiello, L. P. & Feener, E. P. Characterization of the vitreous proteome in diabetes without diabetic retinopathy and diabetes with proliferative diabetic retinopathy. *J Proteome Res* **7**, 2516-2525 (2008).

66 Gao, B. B. *et al.* Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nat Med* **13**, 181-188 (2007).

67 Group, A. S. *et al.* Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. *N Engl J Med* **363**, 233-244 (2010).

68 Keech, A. C. *et al.* Effect of fenofibrate on the need for laser treatment for diabetic retinopathy (FIELD study): a randomised controlled trial. *Lancet* **370**, 1687-1697 (2007).

69 Gupta, A., Gupta, V., Thapar, S. & Bhansali, A. Lipid-lowering drug atorvastatin as an adjunct in the management of diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol* **137**, 675-682 (2004).

70 Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 39. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ* **317**, 713-720 (1998).

71 Chaturvedi, N. *et al.* Effect of candesartan on prevention

(DIRECT-Prevent 1) and progression (DIRECT-Protect 1) of retinopathy in type 1 diabetes: randomised, placebo-controlled trials. *Lancet* **372**, 1394-1402 (2008).

72 Chaturvedi, N. *et al.* Effect of lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type 1 diabetes. The EUCLID Study Group. EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Lancet* **351**, 28-31 (1998).

73 Mauer, M. *et al.* Renal and retinal effects of enalapril and losartan in type 1 diabetes. *N Engl J Med* **361**, 40-51 (2009).

74 Sjolie, A. K. *et al.* Effect of candesartan on progression and regression of retinopathy in type 2 diabetes (DIRECT-Protect 2): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **372**, 1385-1393 (2008).

75 石田晋 & 神田敦宏. 【糖尿病性合併症を考慮した高血圧治療】 高血圧と糖尿病性合併症　糖尿病網膜症と高血圧　Ra 系阻害薬の可能性. *月刊糖尿病* **5**, 65-69 (2013).

76 Nishida, A. *et al.* Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci* **6**, 1255-1263 (2003).

77 Yuki, K. *et al.* Retinal ganglion cell loss in superoxide dismutase 1 deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**, 4143-4150 (2011).

78 Horne-Badovinac, S. *et al.* Positional cloning of heart and soul reveals multiple roles for PKC lambda in zebrafish organogenesis. *Current Biology* **11**, 1492-1502 (2001).

79 Koike, C. *et al.* Function of atypical protein kinase C lambda in differentiating photoreceptors is required for proper lamination of mouse retina. *J Neurosci* **25**, 10290-10298 (2005).

80 Malicki, J., Jo, H. & Pujic, Z. Zebrafish N-cadherin, encoded by the glass onion locus, plays an essential role in retinal patterning. *Dev Biol* **259**, 95-108 (2003).

81 Masai, I. *et al.* N-cadherin mediates retinal lamination, maintenance of forebrain compartments and patterning of retinal neurites. *Development* **130**, 2479-2494 (2003).

82 Omori, Y. & Malicki, J. oko meduzy and related crumbs genes are

determinants of apical cell features in the vertebrate embryo. *Current Biology* **16**, 945-957 (2006).

83 Wei, X. *et al.* The zebrafish Pard3 ortholog is required for separation of the eye fields and retinal lamination. *Dev Biol* **269**, 286-301 (2004).

84 Wei, X. & Malicki, J. nagie oko, encoding a MAGUK-family protein, is essential for cellular patterning of the retina. *Nat Genet* **31**, 150-157 (2002).

85 Alves, C. H. *et al.* Loss of CRB2 in the mouse retina mimics human retinitis pigmentosa due to mutations in the CRB1 gene. *Human Molecular Genetics* **22**, 35-50 (2013).

86 Cho, S. H. *et al.* Genetic ablation of Pals1 in retinal progenitor cells models the retinal pathology of Leber congenital amaurosis. *Human Molecular Genetics* **21**, 2663-2676 (2012).

87 Hermle, T., Guida, M. C., Beck, S., Helmstadter, S. & Simons, M. Drosophila ATP6AP2/VhaPRR functions both as a novel planar cell polarity core protein and a regulator of endosomal trafficking. *EMBO Journal* (2013).

88 Schefe, J. H. *et al.* A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein. *Circulation Research* **99**, 1355-1366 (2006).

89 Shivas, J. M., Morrison, H. A., Bilder, D. & Skop, A. R. Polarity and endocytosis: reciprocal regulation. *Trends Cell Biol* **20**, 445-452 (2010).

90 Kanda, A. Atp6ap2 is required for laminar formation during retinal development in mice. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi* (In press).

91 神田敦宏 & 石田晋.【感覚とその異常】感覚の基礎知識　視覚. *Clinical Neuroscience* **33**, 504-506 (2015).

92 Marquardt, T. & Gruss, P. Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends Neurosci* **25**, 32-38 (2002).

93 Masland, R. H. The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* **4**, 877-886 (2001).

94 Swaroop, A., Kim, D. & Forrest, D. Transcriptional regulation of

photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* **11**, 563-576 (2010).

95 Kanda, A. & Swaroop, A. A comprehensive analysis of sequence variants and putative disease-causing mutations in photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3. *Mol Vis* **15**, 2174-2184 (2009).

96 Kanda, A., Friedman, J. S., Nishiguchi, K. M. & Swaroop, A. Retinopathy mutations in the bZIP protein NRL alter phosphorylation and transcriptional activity. *Hum Mutat* **28**, 589-598 (2007).

97 Forgac, M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 917-929 (2007).

98 Nuckels, R. J., Ng, A., Darland, T. & Gross, J. M. The vacuolar-ATPase complex regulates retinoblast proliferation and survival, photoreceptor morphogenesis, and pigmentation in the zebrafish eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**, 893-905 (2009).

99 Kawamura, N., Tabata, H., Sun-Wada, G. H. & Wada, Y. Optic nerve compression and retinal degeneration in Tcirg1 mutant mice lacking the vacuolar-type H-ATPase a3 subunit. *PLoS One* **5**, e12086 (2010).

100 Advani, A. *et al.* The (Pro)renin receptor: site-specific and functional linkage to the vacuolar H+-ATPase in the kidney. *Hypertension* **54**, 261-269 (2009).

101 Endo, Y. & Rubin, J. S. Wnt signaling and neurite outgrowth: insights and questions. *Cancer Sci* **98**, 1311-1317 (2007).

102 Lai, S. L., Chien, A. J. & Moon, R. T. Wnt/Fz signaling and the cytoskeleton: potential roles in tumorigenesis. *Cell Res* **19**, 532-545 (2009).

103 Logan, C. Y. & Nusse, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 781-810 (2004).

104 Fu, X., Sun, H., Klein, W. H. & Mu, X. Beta-catenin is essential for lamination but not neurogenesis in mouse retinal development. *Dev Biol* **299**, 424-437 (2006).

105 Clark, A. F. *et al.* Renin-1 is essential for normal renal juxtaglomerular cell granulation and macula densa morphology. *J*

Biol Chem **272**, 18185-18190 (1997).

106 Yanai, K. *et al.* Renin-dependent cardiovascular functions and renin-independent blood-brain barrier functions revealed by renin-deficient mice. *J Biol Chem* **275**, 5-8 (2000).

107 Strauss, O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* **85**, 845-881 (2005).

108 Han, Z., Zhong, L., Srivastava, A. & Stacpoole, P. W. Pyruvate dehydrogenase complex deficiency caused by ubiquitination and proteasome-mediated degradation of the E1 subunit. *J Biol Chem* **283**, 237-243 (2008).

109 Piconi, L. *et al.* Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes Metab Res Rev* **22**, 198-203 (2006).

110 Brown, G. K., Otero, L. J., LeGris, M. & Brown, R. M. Pyruvate dehydrogenase deficiency. *J Med Genet* **31**, 875-879 (1994).

111 Lissens, W. *et al.* Mutations in the X-linked pyruvate dehydrogenase (E1) alpha subunit gene (PDHA1) in patients with a pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *Hum Mutat* **15**, 209-219 (2000).

112 Maurer, C. M., Schonthaler, H. B., Mueller, K. P. & Neuhauss, S. C. Distinct retinal deficits in a zebrafish pyruvate dehydrogenase-deficient mutant. *J Neurosci* **30**, 11962-11972 (2010).

113 Johnson, M. T. *et al.* Inactivation of the murine pyruvate dehydrogenase (Pdha1) gene and its effect on early embryonic development. *Mol Genet Metab* **74**, 293-302 (2001).

114 Johnson, M. T., Yang, H. S., Magnuson, T. & Patel, M. S. Targeted disruption of the murine dihydrolipoamide dehydrogenase gene (Dld) results in perigastrulation lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14512-14517 (1997).

115 Taylor, M. R., Hurley, J. B., Van Epps, H. A. & Brockerhoff, S. E. A zebrafish model for pyruvate dehydrogenase deficiency: rescue of neurological dysfunction and embryonic lethality using a ketogenic diet. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4584-4589 (2004).

116 Wong-Riley, M. T. Energy metabolism of the visual system. *Eye Brain*

2, 99-116 (2010).

117 Kur, J., Newman, E. A. & Chan-Ling, T. Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Prog Retin Eye Res* **31**, 377-406 (2012).

118 Anderson, B., Jr. & Saltzman, H. A. Retinal Oxygen Utilization Measured by Hyperbaric Blackout. *Arch Ophthalmol* **72**, 792-795 (1964).

119 Birol, G., Wang, S., Budzynski, E., Wangsa-Wirawan, N. D. & Linsenmeier, R. A. Oxygen distribution and consumption in the macaque retina. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H1696-1704 (2007).

120 Kety, S. S. & Schmidt, C. F. The Nitrous Oxide Method for the Quantitative Determination of Cerebral Blood Flow in Man: Theory, Procedure and Normal Values. *J Clin Invest* **27**, 476-483 (1948).

121 Stefansson, E. *et al.* Quantitative measurements of retinal edema by specific gravity determinations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **28**, 1281-1289 (1987).

122 Ames, A., 3rd & Li, Y. Y. Energy requirements of glutamatergic pathways in rabbit retina. *J Neurosci* **12**, 4234-4242 (1992).

123 Laughlin, S. B., de Ruyter van Steveninck, R. R. & Anderson, J. C. The metabolic cost of neural information. *Nat Neurosci* **1**, 36-41 (1998).

124 Stone, J., van Driel, D., Valter, K., Rees, S. & Provis, J. The locations of mitochondria in mammalian photoreceptors: relation to retinal vasculature. *Brain Res* **1189**, 58-69 (2008).

125 Sarpeshkar, R. *Ultra low power bioelectronics: fundamentals, biomedical applications, and bio-inspired systems*. (Cambridge University press, 2010).

126 Sperber, G. O. & Bill, A. Blood flow and glucose consumption in the optic nerve, retina and brain: effects of high intraocular pressure. *Exp Eye Res* **41**, 639-653 (1985).

127 Kanda, A. & Ishida, S. in *Neuroprotection and Neuroregeneration for Retinal Diseases.* (ed T Nakazawa) 227-238 (Springer Japan, 2014).

128 Du, X. *et al.* Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest* **112**, 1049-1057 (2003).

129 Rahimi, R., Nikfar, S., Larijani, B. & Abdollahi, M. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother* **59**, 365-373 (2005).

130 Kumar, V., Kota, V. & Shivaji, S. Hamster sperm capacitation: role of pyruvate dehydrogenase A and dihydrolipoamide dehydrogenase. *Biol Reprod* **79**, 190-199 (2008).

131 Starkov, A. A. *et al.* Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci* **24**, 7779-7788 (2004).

132 Tretter, L. & Adam-Vizi, V. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci* **24**, 7771-7778 (2004).

133 Burckle, C. & Bader, M. Prorenin and its ancient receptor. *Hypertension* **48**, 549-551 (2006).

134 Alberti, K., Zimmet, P. & Shaw, J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation. *Diabetic medicine* **23**, 469-480 (2006).

135 Ishida, S. [Lifestyle-related diseases and anti-aging ophthalmology: suppression of retinal and choroidal pathologies by inhibiting renin-angiotensin system and inflammation]. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi* **113**, 403-422; discussion 423 (2009).

136 伊藤裕. メタボリックドミノとは—生活習慣病の新しいとらえ方—. *日本臨床* **61**, 1837-1843 (2003).

137 石田晋. 【糖尿病網膜症診療の最前線】 糖尿病網膜症における薬物療法. *Diabetes Frontier* **22**, 377-384 (2011).

138 Kanda, A., Abecasis, G. & Swaroop, A. Inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* **92**, 448-450 (2008).

139 Kanda, A. *et al.* A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with

age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16227-16232 (2007).

140 Swaroop, A., Chew, E. Y., Rickman, C. B. & Abecasis, G. R. Unraveling a multifactorial late-onset disease: from genetic susceptibility to disease mechanisms for age-related macular degeneration. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **10**, 19-43 (2009).

141 McKay, G. J. *et al.* Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration: a pooled analysis of 15 studies. *Hum Mutat* **32**, 1407-1416 (2011).

142 McKay, G. J. *et al.* Variations in apolipoprotein E frequency with age in a pooled analysis of a large group of older people. *Am J Epidemiol* **173**, 1357-1364 (2011).

143 Chen, W. *et al.* Genetic variants near TIMP3 and high-density lipoprotein-associated loci influence susceptibility to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 7401-7406 (2010).

144 Stanton, C. M. *et al.* Complement factor D in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**, 8828-8834 (2011).

145 Remuzzi, G., Perico, N., Macia, M. & Ruggenenti, P. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*, S57-65 (2005).

146 神田敦宏 & 石田晋. 【超高齢社会におけるアンチエイジングと ras】 糖尿病網膜症と ras. *Angiotensin Research* **11**, 190-193 (2014).

147 Kanda, A., Noda, K., Oike, Y. & Ishida, S. Angiopoietin-like protein 2 mediates endotoxin-induced acute inflammation in the eye. *Lab Invest* **92**, 1553-1563 (2012).

148 Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428-435 (2008).

149 Medzhitov, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* **140**, 771-776 (2010).

150 Noda, K., Nakao, S., Ishida, S. & Ishibashi, T. Leukocyte adhesion molecules in diabetic retinopathy. *J Ophthalmol* **2012**, 279037 (2012).

151 Adamis, A. P. *et al.* Increased vascular endothelial growth factor

levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* **118**, 445-450 (1994).

152 Malecaze, F. *et al.* Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* **112**, 1476-1482 (1994).

153 Brenner, B. M. *et al.* Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* **345**, 861-869 (2001).

154 Takahashi, N. *et al.* Increased energy expenditure, dietary fat wasting, and resistance to diet-induced obesity in mice lacking renin. *Cell Metab* **6**, 506-512 (2007).

155 石田晋 & 神田敦宏. 【生活習慣病が関連する眼疾患における炎症病態】生活習慣病と慢性炎症におけるレニン-アンジオテンシン系の病態意義. *日本の眼科* **85**, 130-135 (2014).

156 Mitra, A. K., Gao, L. & Zucker, I. H. Angiotensin II-induced upregulation of AT(1) receptor expression: sequential activation of NF-kappaB and Elk-1 in neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**, C561-569 (2010).

157 Touyz, R. M. & Schiffrin, E. L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* **52**, 639-672 (2000).

158 Funatsu, H. *et al.* Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema and other retinal disorders. *Am J Ophthalmol* **133**, 537-543 (2002).

159 Otani, A., Takagi, H., Suzuma, K. & Honda, Y. Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced angiogenic activity in retinal microcapillary endothelial cells. *Circ Res* **82**, 619-628 (1998).

160 Luetscher, J. A., Kraemer, F. B., Wilson, D. M., Schwartz, H. C. & Bryer-Ash, M. Increased plasma inactive renin in diabetes mellitus. A marker of microvascular complications. *N Engl J Med* **312**, 1412-1417

(1985).

161 Ichihara, A. *et al.* Contribution of nonproteolytically activated prorenin in glomeruli to hypertensive renal damage. *J Am Soc Nephrol* **17**, 2495-2503 (2006).

162 Susic, D., Zhou, X., Frohlich, E. D., Lippton, H. & Knight, M. Cardiovascular effects of prorenin blockade in genetically spontaneously hypertensive rats on normal and high-salt diet. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**, H1117-H1121 (2008).

163 Ishizuka, E. T., Kanda, A., Kase, S., Noda, K. & Ishida, S. Involvement of the receptor-associated prorenin system in the pathogenesis of human conjunctival lymphoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **56**, 74-80 (2014).

164 Ager, E. I., Neo, J. & Christophi, C. The renin-angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis* **29**, 1675-1684 (2008).

165 George, A. J., Thomas, W. G. & Hannan, R. D. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat Rev Cancer* **10**, 745-759 (2010).

166 Ino, K. *et al.* Manipulating the angiotensin system--new approaches to the treatment of solid tumours. *Expert Opin Biol Ther* **6**, 243-255 (2006).

167 Lever, A. F. *et al.* Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet* **352**, 179-184 (1998).

168 Giacco, F. & Brownlee, M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* **107**, 1058-1070 (2010).

169 石田晋. 【糖尿病と網膜症】 糖尿病網膜症の分子病態　サイトカインを中心に. *月刊糖尿病* **2**, 33-42 (2010).

170 Lois, N., McBain, V., Abdelkader, E., Scott, N. W. & Kumari, R. Retinal pigment epithelial atrophy in patients with exudative age-related macular degeneration undergoing anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Retina* **33**, 13-22 (2013).

171 Rofagha, S. *et al.* Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: a multicenter cohort study (SEVEN-UP). *Ophthalmology* **120**, 2292-2299 (2013).

172 Moorthy, S. & Cheung, N. Cerebrovascular accidents and ranibizumab. *Ophthalmology* **116**, 1834-1835; author reply 1835 (2009).

173 van der Reis, M. I. *et al.* A systematic review of the adverse events of intravitreal anti-vascular endothelial growth factor injections. *Retina* **31**, 1449-1469 (2011).

174 Bressler, N. M. *et al.* Cerebrovascular accidents in patients treated for choroidal neovascularization with ranibizumab in randomized controlled trials. *Retina* **32**, 1821-1828 (2012).

175 Lux, A., Llacer, H., Heussen, F. M. & Joussen, A. M. Non-responders to bevacizumab (Avastin) therapy of choroidal neovascular lesions. *Br J Ophthalmol* **91**, 1318-1322 (2007).

176 Otsuji, T. *et al.* Initial non-responders to ranibizumab in the treatment of age-related macular degeneration (AMD). *Clin Ophthalmol* **7**, 1487-1490 (2013).

177 Ishizuka, E. T., Kanda, A., Kase, S., Noda, K. & Ishida, S. Involvement of the receptor-associated prorenin system in the pathogenesis of human conjunctival lymphoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **56**, 74-80 (2015).