



Title	網膜色素上皮細胞におけるleucine-rich repeat kinase 2の影響
Author(s)	水門, 由佳
Description	配架番号 : 2956
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16646号
Issue Date	2025-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16646
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98256
Type	doctoral thesis
File Information	SUIMON_Yuka.pdf, 全文



学 位 論 文

網膜色素上皮細胞における leucine-rich repeat kinase 2の影響 (Impact of leucine-rich repeat kinase 2 on retinal pigment epithelial cells)

2025年9月

北海道大学

水門 由佳

学 位 論 文

網膜色素上皮細胞における leucine-rich repeat kinase 2の影響 (Impact of leucine-rich repeat kinase 2 on retinal pigment epithelial cells)

2025年9月

北海道大学

水門 由佳

目次

発表論文目録および学会発表目録1頁

要旨2頁

略語表5頁

緒言6頁

方法10頁

結果15頁

考察33頁

結論37頁

謝辞38頁

利益相反38頁

引用文献39頁

発表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。

Yuka Suimon, Moemi Nishimura, Miyuki Murata, Shiho Yoshida, Koichi Yokoi, Zhenyu Dong, Noriyuki Kuno, Shinobu Fujii, Zen-Ichi Tanei, Ichiro Yabe, Kousuke Noda, and Susumu Ishida.

Leucine-rich repeat kinase 2 promotes disintegration of retinal pigment epithelial cell: Implication in the pathogenesis of dry age-related macular degeneration

The American Journal of Pathology, 195(7):1294-1310, 2025.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 水門 由佳

網膜色素上皮細胞におけるleucine-rich repeat kinase 2過剰発現の影響

第26回眼科分子生物学会、2023年1月21日、京都。

2. 水門 由佳、村田 美幸、野田 航介、石田 晋

網膜色素上皮細胞におけるleucine-rich repeat kinase 2過剰発現の影響

第127回日本眼科学会総会、2023年4月6日～9日、東京。

3. 村田 美幸、水門 由佳、野田 航介、西村 萌美、横井 康一、吉田 志帆、石田 晋

Leucine-rich repeat kinase 2のキナーゼ活性亢進がマウスの網膜機能に及ぼす影響

第43回日本眼薬理学会、2023年11月11日～12日、札幌。

4. 水門 由佳

Leucine-rich repeat kinase 2のキナーゼ活性亢進がマウスの網膜機能に及ぼす影響

第28回眼科分子生物学会、2025年3月1日～2日、神戸。

要旨

【背景と目的】

加齢黄斑変性(age-related macular degeneration; AMD)は高齢者に生じる黄斑疾患であり、加齢に伴う網膜色素上皮(retinal pigment epithelium; RPE)の機能障害が一因と考えられている。RPEは脈絡膜からの親水性物質の供給を受けているが、加齢に伴いブルッフ膜の水透過性が低下し親水性物質の供給が低下する。また、RPEは加齢に伴い酸化ストレスを受ける。これらの加齢性変化はAMDの病態形成に関わると考えられている。一方、パーキンソン病(Parkinson's disease; PD)は主に中脳黒質におけるドパミン作動性ニューロンの脱落や変性を特徴とする神経変性疾患である。 α -synucleinは、PD患者の黒質における細胞内線維性凝集体であるレビー小体の主要成分の1つである。 α -synuclein凝集体は、ドパミン作動性ニューロンの機能障害と細胞死を促進することにより、PDの病態形成に重要な役割を果たしている。 α -synucleinに加えて、leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)もPDの病因に関与する分子として注目されている。LRRK2は、GTPaseドメインとセリン/スレオニンキナーゼドメインを含む分子量の大きな酵素タンパクであり、 α -synucleinとの相互作用が報告されている。

近年、疫学的研究によってAMD患者はPDを発症するリスクが高いことが示されており、両疾患の関連性が示唆されるようになった。しかし、これら2つの疾患に共通する病態機序は現時点で不明である。本研究では、PDの病態形成に重要な役割を果たすLRRK2と α -synucleinに注目し、AMDとPDに共通する病理学的特徴を探索する検討を行った。

【対象と方法】

ヒト眼球標本を用いて、LRRK2と α -synuclein、リン酸化 α -synucleinの免疫染色を行った。培養ヒト不死化RPE細胞hTERT-RPE1に対し、AMDの病態形成に関わる刺激として過酸化水素の投与および血清除去下での培養を行い、LRRK2と α -synucleinのmessenger ribonucleic acid (mRNA)発現量とタンパク量変化を定量的real-time polymerase chain reaction (PCR)、western blottingで解析した。LRRK2野生型(wild type; WT)と、キナーゼ活性の亢進が生じる変異であるLRRK2-G2019SをhTERT-RPE1に遺伝子導入して過剰発現させ、 α -synucleinのmRNA発現量、タンパク量とリン酸化の変化をreal-time PCR、western blottingで解析した。次に、LRRK2-G2019SをhTERT-RPE1に過剰発現させ、生存細胞数とアポトーシスの実行役であるcaspase 3/7活性を測定した。凝集化 α -synucleinをhTERT-RPE1に投与し、細胞数とcaspase 3/7活性を測定した。LRRK2と α -synucleinに介在する分子として、多数存在するRAB GTPase (RAB)のうち、RAB1A、RAB8A、RAB10、RAB12、RAB29、RAB35に注目した。hTERT-RPE1において、これらをsmall interfering ribonucleic acid (siRNA)でノックダウンし、 α -synucleinのmRNA発現量、タンパク量の変化をreal-time PCR、western blottingで検討した。さらに、LRRK2-G2019SをhTERT-RPE1で過剰発現させRABのタンパク量とリン酸化が変化するか検討した。最後に、LRRK2-G2019S transgenic (Tg)マウスを用いて眼底検査と病理組織学的解析によって網膜の形態を観察し、網膜電図によって網膜機能を解析した。

【結果】

LRRK2、 α -synuclein、リン酸化 α -synucleinがヒト眼球のRPE層に存在していた。2歳、39歳の検体よりも85歳、91歳の検体の方が全ての分子の染色シグナルの増強を認めた。

培養RPE細胞hTERT-RPE1に過酸化水素刺激を行うと、LRRK2のmRNA発現およびタンパク量が増加し、 α -synucleinのタンパク量が増加した。同様に、hTERT-RPE1に血清除去を行うとLRRK2のmRNA発現、タンパク量が増加し、 α -synucleinのタンパク量が増加した。hTERT-RPE1でLRRK2-WTとLRRK2-G2019Sをそれぞれ過剰発現させると α -synucleinタンパク量が増加したが、mRNA発現量は変化がなかった。hTERT-RPE1でLRRK2-G2019Sを過剰発現させるとcaspase 3/7活性が上昇し、細胞死が誘導された。 α -synuclein凝集体をhTERT-RPE1に投与してもcaspase 3/7活性が上昇し、細胞死が誘導された。hTERT-RPE1においてRAB1A、RAB8A、RAB10をsiRNAでノックダウンすると、 α -synucleinのタンパク量が増加した。さらに、LRRK2-G2019Sを過剰発現させたhTERT-RPE1において、RAB1A、RAB8A、RAB10のリン酸化が亢進した。

LRRK2-G2019S Tgマウスにおいて、RPEおよび視細胞死、色素脱失病変と同部位での脈絡膜菲薄化、網膜電図におけるa波・b波の振幅の低下を認めた。また、LRRK2-G2019S Tgマウスでは網脈絡膜、特にRPEにおける α -synucleinのタンパク量増加を認めた。

【考察】

本研究では、ヒト眼球切片を用いた免疫染色により、PDの病因に関与する主要な分子であるLRRK2、 α -synuclein、リン酸化 α -synucleinがヒトRPE層に存在することが示された。

*In vitro*実験においては、酸化ストレスと血清除去の両方が培養RPE細胞hTERT-RPE1におけるLRRK2のmRNA発現およびタンパク量を増加させ、 α -synucleinのタンパク量を増加させた。この結果から、AMDの病態形成に関与する刺激により、RPEにおいてLRRK2と α -synucleinのタンパク量が増加することが示された。さらに、hTERT-RPE1でLRRK2-WTおよびLRRK2-G2019Sを過剰発現させると、 α -synucleinの転写は増加することなく、同分子のタンパク量増加とリン酸化亢進が認められた。本結果から、LRRK2が α -synucleinの翻訳後制御を行うことが示された。さらに、LRRK2-G2019Sの過剰発現と α -synuclein凝集体の刺激により、RPEの細胞死が誘導された。本結果から、LRRK2が α -synucleinの増加を介してRPEの細胞死を誘導すると考えられた。LRRK2は、エンドソーム・ライソソーム分解経路を含む複数のポイントで、複数のRABタンパクをリン酸化することによって、小胞輸送を制御している。本研究では、RPEにおいてLRRK2がRAB1A、8A、10のリン酸化と機能修飾を介して α -synucleinの分解を阻害することを示した。加えて、LRRK2-G2019S Tgマウスを用いた実験結果から、LRRK2のキナーゼ活性の亢進によって α -synucleinがRPEで増加することにより、視細胞死と脈絡膜の菲薄化が生じた可能性が考えられた。つまり、LRRK2のキナーゼ活性亢進が網膜外層および脈絡膜の恒常性を破壊させ網膜機能を低下させることを示した。

【結論】

本研究は、AMDがPDと共通の病態メカニズムを有していることを示し、RPEの機能障害におけるLRRK2と α -synucleinの役割を明らかにした。また、LRRK2がAMDの病態生理に関する理解をさらに深めるための研究対象であることが示唆された。

略語表

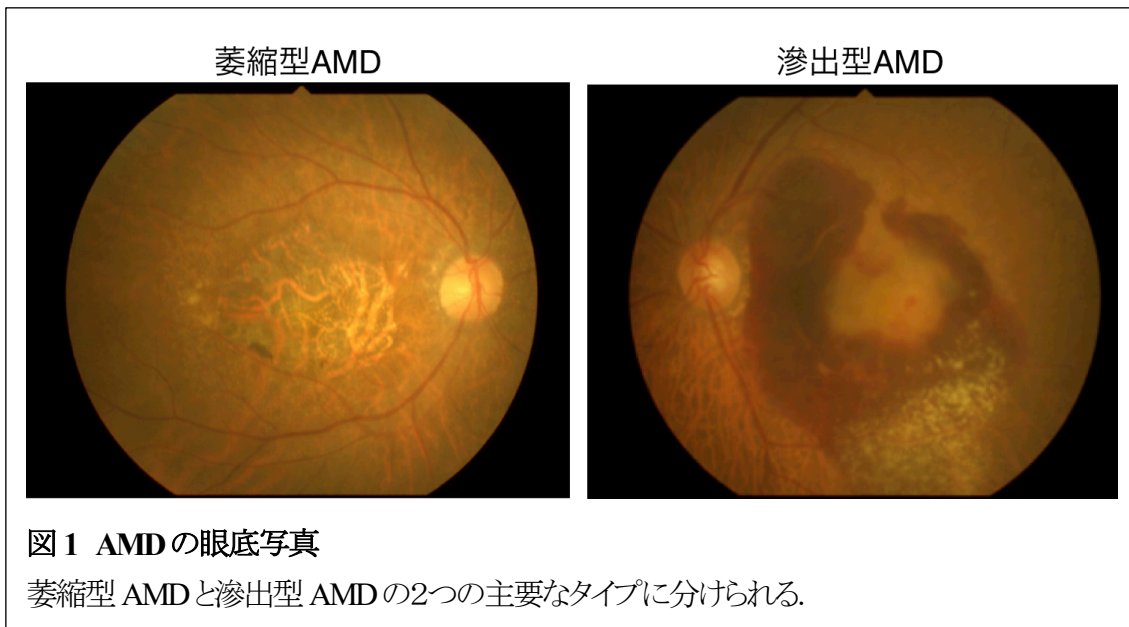
本文中および図表で使用した略語は以下のとおりである。

AMD	age-related macular degeneration
ANOVA	analysis of variance
BCA	bicinchoninic acid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
FBS	fetal bovine serum
GFP	green fluorescent protein
IgG	immunoglobulin G
LRRK2	Leucine-rich repeat kinase 2
mRNA	messenger ribonucleic acid
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PD	Parkinson's disease
PVDF	poly vinylidene di-fluoride
RAB	RAB GTPase
RNA	ribonucleic acid
RDCVF	rod-derived cone viability factor
RPE	retinal pigment epithelium
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering ribonucleic acid
Tg	transgenic
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
VEGF	vascular endothelial growth factor
WT	wild type

緒言

加齢黄斑変性について

加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration; AMD) は、50歳以上の高齢者に生じる加齢に基づく黄斑疾患であり、網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium; RPE) の地図状萎縮を伴う萎縮型AMDと、典型的には脈絡膜新生血管が生じて網膜出血や浮腫などの滲出性変化が生じる滲出型AMDの2つの主要なタイプに分けられる(図1)。AMDは先進国の高齢者における視覚障害の主な原因の一つであり(Vyawahare and Shinde, 2022)、我が国においても高齢化の進行とともに中途失明の大きな割合を占めるようになりつつある。このため、失明疾患であるAMDの発症メカニズムを明らかにし、有効な治療法を確立することは、眼科領域における急務である。



萎縮型AMD、滲出型AMDは共に、RPEの機能障害が一因であると考えられている(Vyawahare and Shinde, 2022)。RPEは、網膜と脈絡膜の間に存在している単層の色素上皮であり(図2)、視細胞にとって不可欠な複数の代謝・支持機能を有している(図3)。その中でも最も重要な機能の一つは、常に排出される視細胞外節の食食による取り込みと分解である(図3)。また、健全な状態ではRPEと網膜外層は脈絡膜からの親水性物質の供給によって恒常性が維持され、逆に脈絡膜毛細血管板はRPEからの血管内皮増殖因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)を含む複数のサイトカインの分泌によって恒常性が維持されている(Grisanti and Tatar, 2008)(図3)。

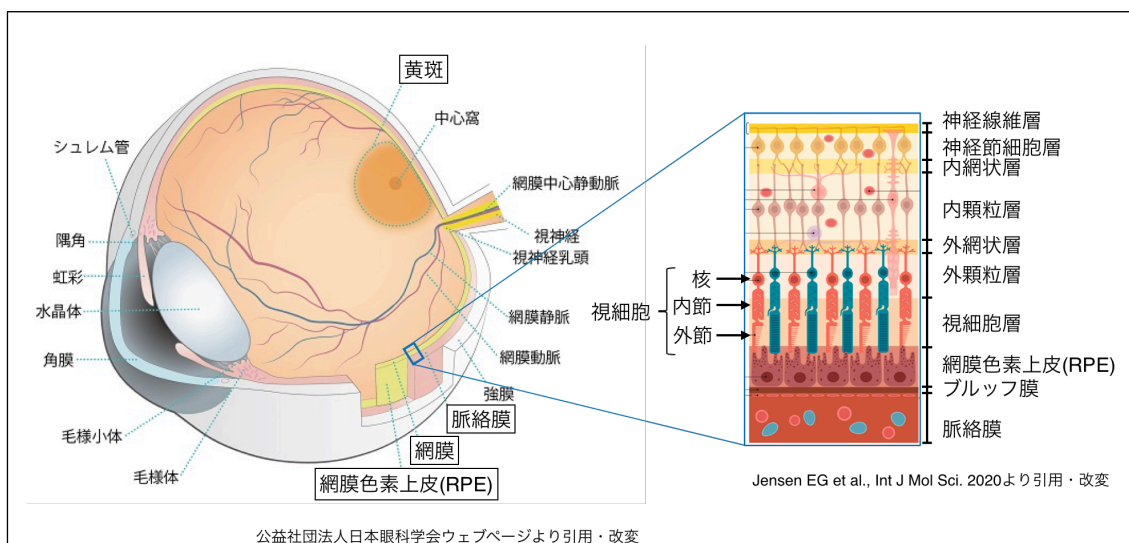
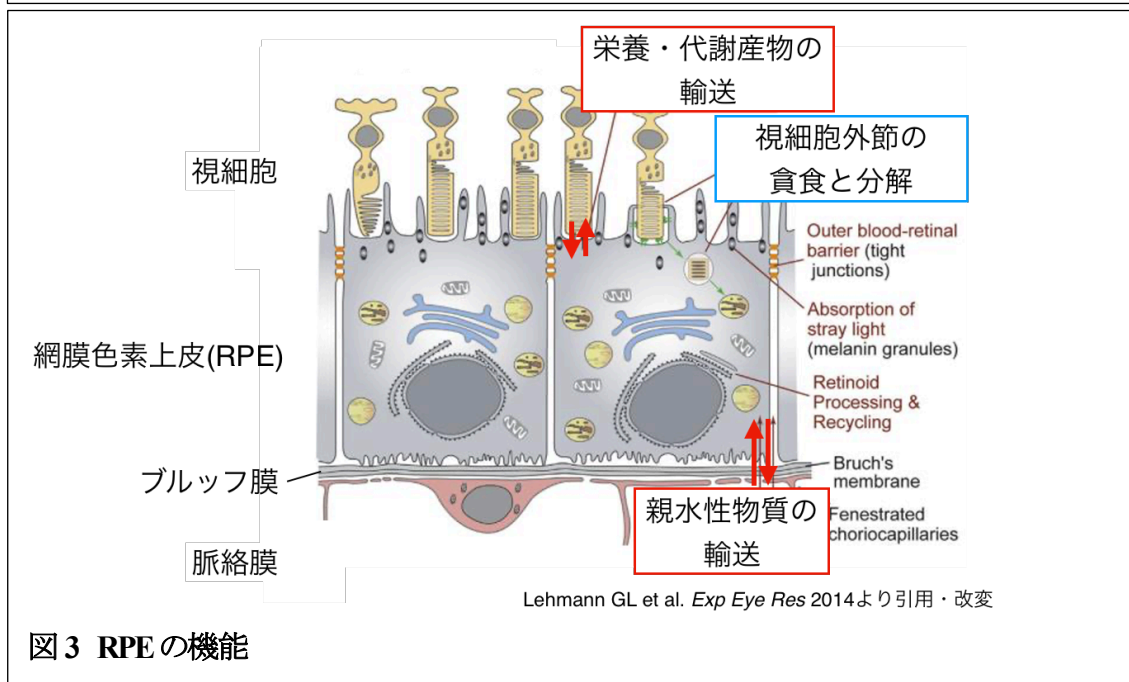


図2 眼球の構造

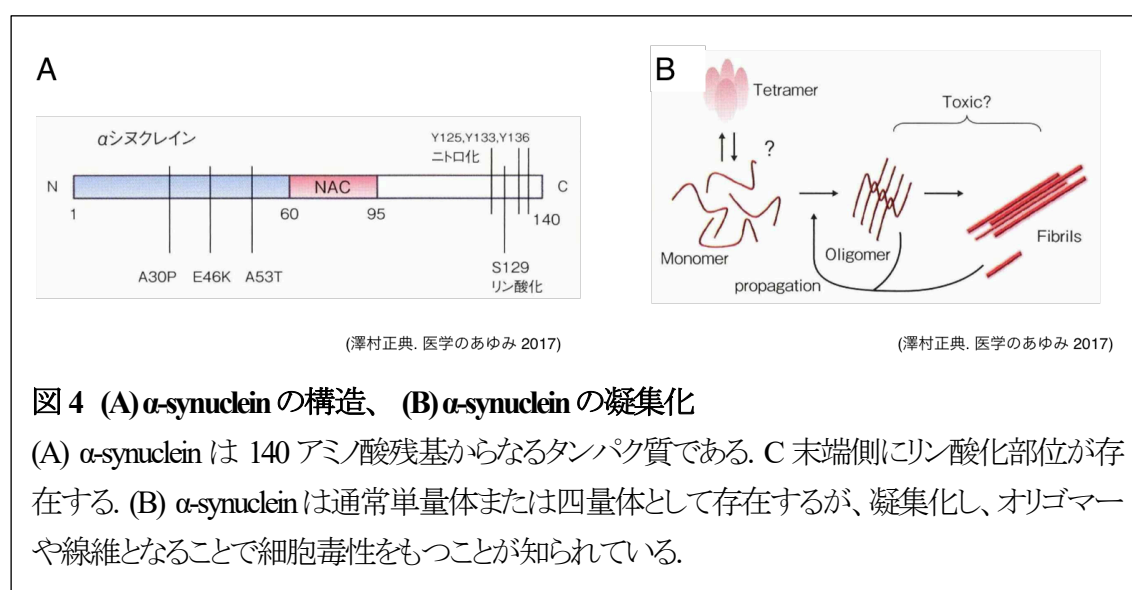
眼球の内側から網膜、RPE、ブルッフ膜、脈絡膜が存在する。



対照的に、老化条件下では加齢に伴う機能障害によって脂質に富む視細胞外節の貪食物が分解不可能となり、リポフスチンとしてRPEに徐々に蓄積する(Grisanti and Tatar, 2008)。また、加齢に伴う脂質代謝異常によってRPEとブルッフ膜の間に過剰な脂質沈着であるドルーゼンが生じる。さらに、脂質の沈着はブルッフ膜の肥厚を引き起こし(Okubo et al, 1999)、その水透過性を低下させることが明らかになっている(Moore et al, 1995)。その結果、RPEと脈絡膜間の親水性分子の相互交換を悪化させ、栄養欠乏や酸化ストレスなどの変化を引き起こし、最終的にAMDを発症すると考えられている。

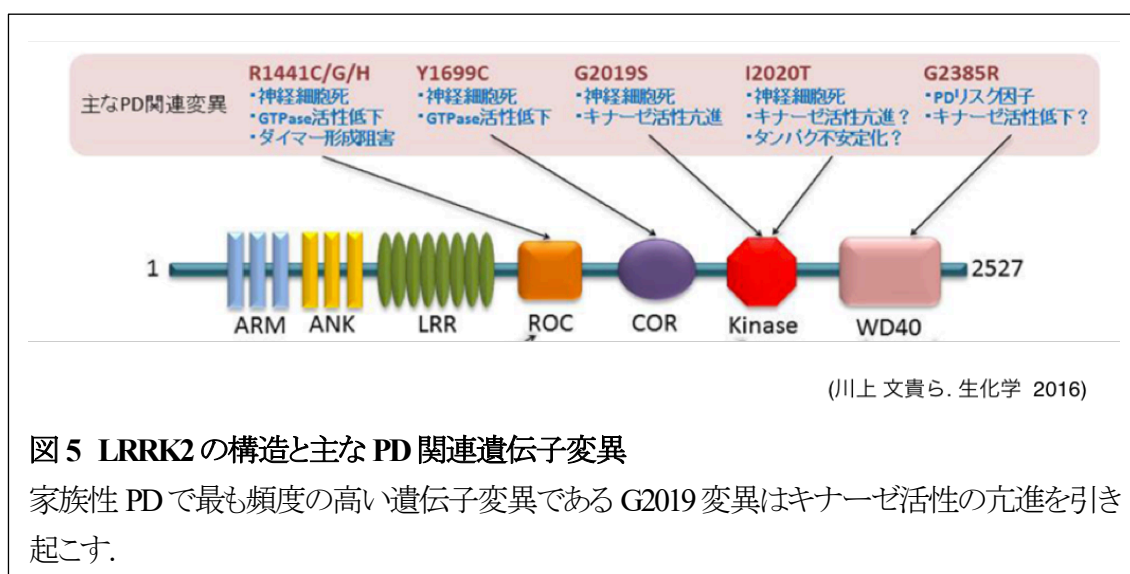
パーキンソン病について

パーキンソン病 (Parkinson's disease; PD) は、主に黒質におけるドーパミン作動性ニューロンの脱落や変性を特徴とし、運動障害や自律神経障害を来す神経変性疾患である (Miyasaki et al, 2002)。PD 患者では、臨床症状出現時には黒質のドーパミン作動性ニューロンの 40~60% が変性していると推定されている (Giguère et al, 2018)。 α -synuclein は、PD 患者の中脳黒質における細胞内線維性凝集体であるレビー小体の主要成分の 1 つであり、ドーパミン作動性ニューロンの機能障害と細胞死を促進することにより、PD の病態形成に重要な役割を果たしている。 α -synuclein は通常、単量体または四量体の形態で存在するが、オリゴマーや線維などの α -synuclein 凝集体は細胞内機能を損なうことが知られている (Rocha et al, 2018; Cascella et al, 2021) (図 4)。また、 α -synuclein のリン酸化がその凝集を促進することが報告されている (Smith et al, 2005)。レビー小体関連 α -synucleinopathy は PD 患者だけでなく、神経精神疾患のない高齢者の 31% にも存在し (Jellinger, 2004)、ドーパミン作動性ニューロンの減少は加齢によっても生じることから (von Linstow et al, 2020)、加齢は PD の発症と進行の危険因子である。



α -synuclein に加えて、leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) も PD の病因に関与する分子として注目されている (Zimprich et al, 2004)。LRRK2 は、GTPase ドメインとセリン/スレオニンキナーゼドメインを含む分子量の大きな酵素タンパクである (O'Hara et al, 2020) (図 5)。これまでの研究から、 α -synuclein と LRRK2 の相互作用が明らかとなっている (O'Hara et al, 2020)。例えば、LRRK2 は α -synuclein のセリン 129 を直接リン酸化し (Qing et al, 2009)、RAB GTPase (RAB) タンパク質のリン酸化を介してエンドソーム・ライソソーム経路を調節することで α -synuclein の細胞間伝達を制御していることが報告されている (O'Hara et al, 2020)。また、LRRK2-G2019S 変異は家族性 PD で最も頻度の高い遺伝子変異であり、キナーゼ活性を亢進させることで α -synuclein の蓄積と凝集を

引き起こすことも明らかとなっている(O'Hara et al, 2020)(図5)。



近年、疫学研究によって滲出型AMD患者ではその後PDを発症するリスクが有意に高いことが示され(Chung et al, 2014; Etrinan et al, 2018; Choi et al, 2020)、滲出型AMDとPDの関連が示唆されている。また、PD患者では脳体積と網膜外層の厚みに有意な正の相関があること(Uchida et al, 2020)、人工知能により眼底写真からPDを検出できることが報告され(Tran et al, 2024)、PD患者でも網膜の変化が生じることが示された。以上の既報から、我々はAMDとPDには共通する病態メカニズムが存在すると仮説を立てた。しかし、 α -synucleinやLRRK2を含むPD関連分子の網膜疾患における役割については、まだ十分に検討されていない。

本研究では、特にLRRK2と α -synucleinに焦点を当て、AMDとPDに共通する病態メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行なった。

方法

1. 臨床検体

眼球標本は、眼球摘出または眼窩内容除去術を受けた患者からインフォームド・コンセントを得て入手した。網膜芽細胞腫の2歳男児、結膜扁平上皮癌の39歳男性、結膜扁平上皮癌の85歳男性、眼瞼脂腺癌の91歳女性の患者の検体を使用した。本研究に使用した臨床検体は全て書面により同意を得た患者から採取しており、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(#021-0106)、「北海道大学病院における臨床研究の取り扱いに関する指針」に準じた。

2. 免疫染色

ヒトおよびマウス組織の包埋標本を脱パラフィンし、10mMクエン酸バッファー (pH6.0) を用いて電子レンジで抗原賦活化を行った。Delicate Melanin Bleach Kit (Polysciences, Warrington, PA, USA) を用いてメラニン色素を除去し、10% normal goat serum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で30分ブロッキングを行い、さらにDako REAL Peroxidase-Blocking Solution (Agilent, Santa Clara, CA, USA) で内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した後、4°Cで一晩一次抗体反応を行った。ヒト組織の一次抗体として、抗 α -synuclein抗体 (LB509, 1:20000, Abcam plc, Cambridge, UK)、抗リン酸化 α -synuclein抗体 (セリン129) (pSyn#64, 1:5000、富士フイルム和光純薬、大阪、日本)、抗LRRK2抗体 (MJFF2, 1:500, Abcam plc) を使用した。マウス組織の一次抗体として、抗 α -synuclein抗体 (E4U2F, 1:150, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、抗リン酸化 α -synuclein (セリン129) (ab51253, 5 μ g/ml, Abcam plc)、抗LRRK2抗体 (MJFF2, 1:500, Abcam plc) を使用した。続いて、EnVisionTM+ Dual Link System-HRP (Agilent) を用いて、室温で30分間二次抗体反応を行った。AEC基質としてImmPACT® AMEC Red Substrate (Vector Laboratories, Newark, CA, USA) を用い、ヘマトキシリンで対比染色し、BZ-9000蛍光顕微鏡 (キーエンス、大阪、日本) で撮影した。ヒト組織の免疫染色においては、ポジティブコントロールの組織として、LRRK2にはヒト腎尿細管、 α -synucleinおよびリン酸化 α -synucleinにはパーキンソン病患者のS状結腸の腸管粘膜下神経叢を用いた。

3. 細胞培養

培養ヒト不死化RPE(hTERT-RPE1)はAmerican Type Culture Collectionより購入し、10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS) を添加したDulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/F-12 (Thermo Fisher Scientific) で、37°C、CO₂濃度5%で培養した。

4. 定量的real-time polymerase chain reaction (PCR)

LRRK2、 α -synuclein、RAB1A、RAB8A、RAB10、RAB12、RAB29、RAB35 の messenger ribonucleic acid (mRNA) 発現量をreal-time PCRで測定した。hTERT-RPE1を6ウェルプレートに

4x10⁵ 個/ウェルで播種し、24時間培養を行なった。酸化ストレスとして、過酸化水素 (H₂O₂)100μMを添加し24時間後に細胞を回収した。血清除去刺激では、同様に細胞を播種した24時間後に無血清のDMEM/F12に培地交換し、さらに24時間経過した時点で細胞を回収した。また、LRRK2過剰発現の実験では哺乳類細胞用バキュロウイルスベクターである BacMamシステムを使用し、細胞を播種して24時間後に10%のBacMam LRRK2-WT reagentまたはBacMam LRRK2-G2019S reagent (Thermo Fisher Scientific)を添加し、24時間後にサンプルを回収した。Ribonucleic acid (RNA)の抽出には NucleoSpin RNA plus (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany)を用い、逆転写反応には GoScript reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA)を用いた。PCR に使用したプライマーは下記の通りである(表1)。解析には StepOnePlus Real-Time PCR システム (Thermo Fisher Scientific)を用いた。PCR条件は 95°C 2 分、95°C 15 秒、60°C 1 分を 40 サイクル施行し、ΔΔCt 法を用いて算出した。

表 1 本実験に用いたプライマー配列

Target gene		Sequence
human <i>LRRK2</i>	forward	5'-GGAAGTGGAGGAGGCCATATT-3'
	reverse	5'-TTCCGGTTGTAGCCCAATAC-3'
human <i>SNCA</i>	forward	5'-TGTAGGCTCCAAAACCAAGGAG-3'
	reverse	5'-CACTGTCTTCTGGGCTACTGC-3'
human <i>RAB1A</i>	forward	5'-ATTGGCGACTCAGGGGTTG-3'
	reverse	5'-CCACACCAATTGTGCTGATGTA-3'
human <i>RAB8A</i>	forward	5'-TCCGGAAGTGGATTTCGCAAC-3'
	reverse	5'-CTCCCCGTTCTTGGAAACT-3'
human <i>RAB10</i>	forward	5'-AGAGGCGCAATGGGTATCAT-3'
	reverse	5'-TCGTCCATATCACACTTGTTCCT-3'
human <i>RAB12</i>	forward	5'-TGGGATGCGGTTCTGTGAAG-3'
	reverse	5'-GCTCTGGTTGTAAACGACAGGAT-3'
human <i>RAB29</i>	forward	5'-AACAGGACCTAGACAGCAAGC-3'
	reverse	5'-CCAACCTGTGAAACCGTTCT-3'
human <i>RAB35</i>	forward	5'-AAGATCCGGACCGTGGAGA-3'
	reverse	5'-TGGTGACGTCGTAAACCACAA-3'
human <i>ACTB</i>	forward	5'-CGAGCACAGAGCCTCGCCTT-3'
	reverse	5'-AGCGCGGCGATATCATCATCC-3'

5. Western blotting

細胞およびマウス網脈絡膜組織からのタンパク抽出には1×Laemmli buffer (62.5mM Tris-HCl[pH6.8], 2% Sodium dodecyl sulfate (SDS), 10%グリセロール、0.01%ブROMOFENOLブルー、5% 2-メルカプトエタノール)を用いた。得られた細胞溶解液をそれぞれ氷上で5秒間、4回超音波破碎を行った後、4°C、15,000 x gで10分間遠心し、上清を回収した。タンパク定量はbicinchoninic acid (BCA)アッセイキット(Thermo Fisher Scientific)を用いて行い、サンプル濃度を2 mg/mLに揃えたのち、95°Cで3分間ボイルした。Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)を行い、蛋白を転写したpoly vinylidene di-fluoride (PVDF)メンブレンを5%スキムミルクで1時間ブロッキングした後、4°Cで一晩一次抗体反応を行った。使用した抗体と希釈倍率は以下の通りである。抗LRRK2抗体(MJFF2, 1:1000, Abcam plc)、抗 α -synuclein抗体(MJFR1, 1:1000, Abcam plc)、抗リン酸化 α -synuclein抗体(セリン129) (ab51253, 1:1000, Abcam plc)、抗RAB1A抗体(11671-1-AP, 1:1000, Proteintech, Rosemont, IL, USA)、抗RAB8A抗体(MJF-R22-79-3, 1:1000, Abcam plc)、抗体RAB10抗体(MJF-R23, 1:1000, Abcam plc)、抗RAB12抗体(68079-1-IG, 1:1000, Proteintech)、抗RAB29抗体(MJF-R30-124, 1:1000, Abcam plc)、抗RAB35抗体(11329-2-AP, 1:1000, Proteintech)、抗リン酸化RAB1A抗体(スレオニン75) (ABS2131, 1:250, Merck)、抗リン酸化RAB8A抗体(スレオニン72) (MJF-R20, 1:1000, Abcam plc)、抗リン酸化RAB10抗体(Thr73) (MJF-R21-22-5, 1:500, Abcam plc)。一次抗体反応後にメンブレンをTris-buffered saline with Tween 20 (0.1%Tween-20)で洗浄し、二次抗体で室温1時間反応させた。二次抗体には、peroxidase AffiniPure™ goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) (H+L) あるいはgoat anti-mouse IgG (H+L) (1:4000, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)を用いた。化学発光基質にはSuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific)を用いた。撮影にはiBright imaging system (Thermo Fisher Scientific)を用いた。

6. Cell Viability Assay

hTHRT-RPE1を 2×10^3 個/ウェルの密度で白壁透明底96ウェルプレートの個々のウェルに播種し、24時間培養した。2%のBacMam LRRK2 G2019S Reagentを投与し、LRRK2-G2019Sを細胞内で過剰発現させ、24時間、48時間、72時間培養した。コントロールとしてBacMam green fluorescent protein (GFP) transduction control (Thermo Fisher Scientific)を用いた。生存細胞数は、CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay (Promega)を用い、発光はマルチプレートリーダーinfinite 200 PRO (Tecan, Männedorf, Switzerland)にて測定した。

7. Caspase 3/7 Activity Assay

hTHRT-RPE1を 2×10^3 細胞/ウェルの密度で白壁透明底96ウェルプレートの個々のウェルに播種し、24時間培養した。2%のBacMam LRRK2 G2019S Reagentを投与し、LRRK2-G2019Sを細胞内で過剰発現させ、24時間、48時間、72時間培養した。コントロールとしてBacMam GFP

transduction controlを用いた。続いてCaspase 3/7 Assay reagent(Promega)を添加し、1.5時間インキュベートした後にマルチプレートリーダーinfinite 200 PROで発光を測定した。発光強度は、CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assayを用いて測定した生存細胞数で補正した。

α -synuclein添加実験においては、hTHRT-RPE1を 1.5×10^3 細胞/ウェルの密度で白壁透明底96ウェルプレートの個々のウェルに播種し、24時間培養したのち、20 $\mu\text{g/ml}$ の組換えヒト α -synuclein凝集体蛋白 (SPR-322, StressMarq Biosciences Inc., Victoria, Canada)を加え、24時間、48時間、72時間後のcaspase 3/7活性を測定した。

8. 細胞数の測定

hTERT-RPE1を透明底96ウェルプレートに 1.5×10^3 細胞/ウェルの密度で播種し、24時間培養した。20 $\mu\text{g/ml}$ の組換えヒト α -synuclein凝集体蛋白およびコントロールとしてphosphate-buffered saline (PBS) を添加し、24時間、48時間、72時間培養した。細胞核をCell Count Normalization Kit (#C544, Dojindo, Kumamoto, Japan)の核染色試薬(Hoechst 33342)で染色した。1ウェルあたり3カ所を撮影し、画像解析ソフトImage Jを用いて細胞数をカウントし、平均値を算出した。

9. RAB small interfering ribonucleic acid (siRNA)によるRNA干渉

RAB1A、RAB8A、RAB10、RAB12、RAB29、およびRAB35遺伝子の発現を抑制するためのsiRNAオリゴヌクレオチド(RAB1A siRNA-1, Silencer select siRNA ID: s229381; RAB1A siRNA-2, Silencer select siRNA ID: s229381; RAB8A siRNA-1, Silencer select siRNA ID: s8680; RAB8A siRNA-2, Silencer select siRNA ID: s8681; RAB10 siRNA-1, Silencer select siRNA ID: s21390; RAB10 siRNA-2, Silencer select siRNA ID: s21392; RAB12 siRNA-1, Silencer select siRNA ID: s47368; RAB12 siRNA-2, Silencer select siRNA ID: s47370; RAB29 siRNA-1, Silencer select siRNA ID: s17082; RAB29 siRNA-2, Silencer select siRNA ID: s17083; RAB35 siRNA-1, Silencer select siRNA ID: s21707; RAB35 siRNA-2, Silencer select siRNA ID: s21708)とネガティブコントロールsiRNAオリゴ(Silencer select negative control No. 1)をThermo Fisher Scientific社から購入した。hTERT-RPE1に、Lipofectamine RNAiMAX試薬(Thermo Fisher Scientific)を用いて10 nMのsiRNAを導入し、48時間後にreal-time PCRでmRNA発現量を、72時間後にwestern blottingでタンパク量を解析した。

10. マウス

メスC57/BL6J (CLEA Japan, Tokyo, Japan)およびメスC57BL/6J-transgenic(Tg) (LRRK2^{G2019S}) 2AMjff/J (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)を用いた。マウスの両眼を眼底検査および網膜電図で観察し、眼球摘出を行った。各マウスの片眼はSUPER FIX (KURAO, 大阪, 日本)で固定し、免疫組織化学的解析のためにパラフィン包埋した。もう片眼は網膜・RPE・脈絡膜からなる組織に分離し、western blottingに用いた。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定」に準拠し(承認番号: 22-0100)、Association for

Research in Vision and Ophthalmologyで定められた動物実験ガイドラインに基づいて実施された。

11. 眼底検査

マウスを5週齢から29週齢まで4週毎に、ケタミン/キシラジン麻酔で鎮静後、ミドリンP(0.5% トロピカミド+0.5%フェニレフリン塩酸塩、参天製薬、大阪、日本)を点眼して散瞳し、眼底検査を行った。眼底写真はCX-1デジタル網膜カメラ(キャノンメディテックサプライ株式会社、川崎、日本)で撮影した。

12. TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色

マウス眼球検体の切片を脱パラフィン後、ApopTag® Fluorescein In situ Apoptosis Detection Kit (S7110, Merck)を用いてTUNEL染色し、BZ-9000蛍光顕微鏡で撮影した。

13. 網膜電図

マウスを12時間明室と12時間暗室のサイクルで飼育し、網膜電図測定を行う前に一晩暗順応させた。麻酔と散瞳の後、 $0.001\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ と $10\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ の光刺激に対する網膜電図を記録した。その後、10分間の明順応下で $10\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ の光刺激に対する網膜電図を記録した。すべての網膜電図は小動物用全視野光刺激装置(有限会社メイヨー、愛知、日本)、および誘発反応記録装置PuREC(有限会社メイヨー)を用いて測定した。

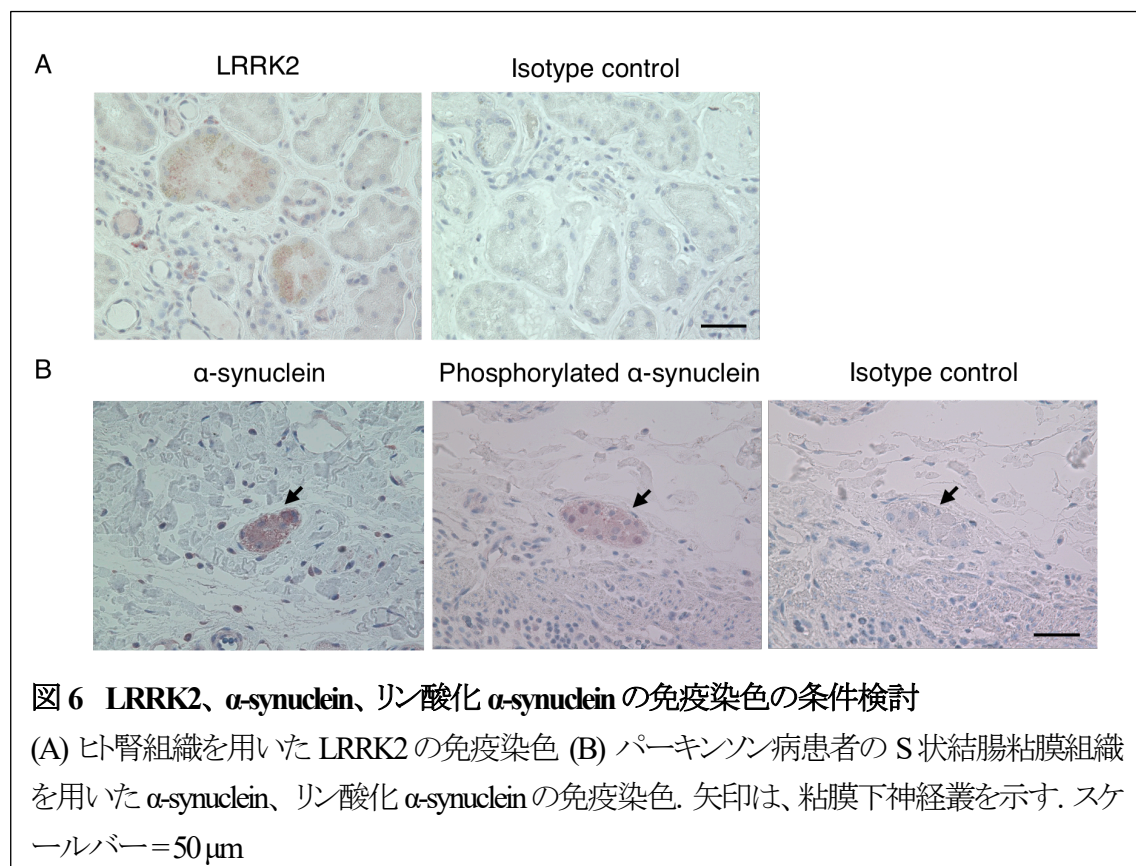
14. 統計解析

全ての結果は平均値±標準誤差で示した。また、2群間の比較にはStudent's *t*-testを用い、多群間での比較にはone-way analysis of variance (ANOVA)に引き続いてTukey-Kramer法を用いた。*p*値が0.05未満を呈した場合に統計学的に有意差があると評価した。

結果

1. LRRK2、 α -synuclein、リン酸化 α -synucleinのヒトRPEにおける局在

LRRK2、 α -synuclein、リン酸化 α -synucleinがヒトRPEに存在するかどうかを調べるため、まずヒト眼球標本を用いてこれらの分子の免疫染色を行うこととした。使用する抗体の条件検討のため、ポジティブコントロールの組織としてLRRK2にはヒト腎組織、 α -synucleinおよびリン酸化 α -synucleinにはPD患者のS状結腸粘膜組織を用いて検討を行った。LRRK2は腎尿細管で陽性像を認め、 α -synucleinおよびリン酸化 α -synucleinはPD患者の粘膜下神経叢で陽性像を認めた(図6)。



次に、ヒト眼球標本でリン酸化 α -synucleinの免疫染色を行った。RPEは褐色のメラニン色素を有するため基質として赤色に発色するAECを用いたが、それでもなおRPEのメラニン色素のため陽性か否かの判断が困難であった(図7)。そこで、ヒト眼球標本でメラニン脱色を行った上で、免疫染色を行うこととした。

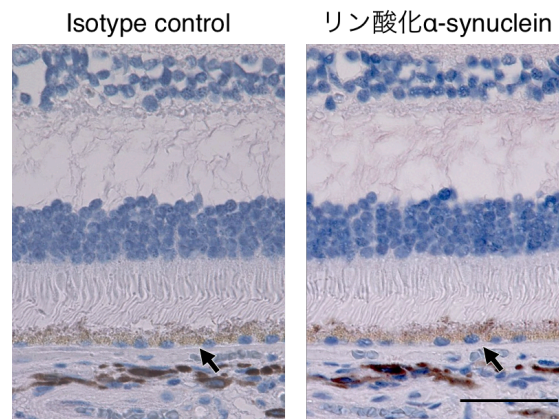
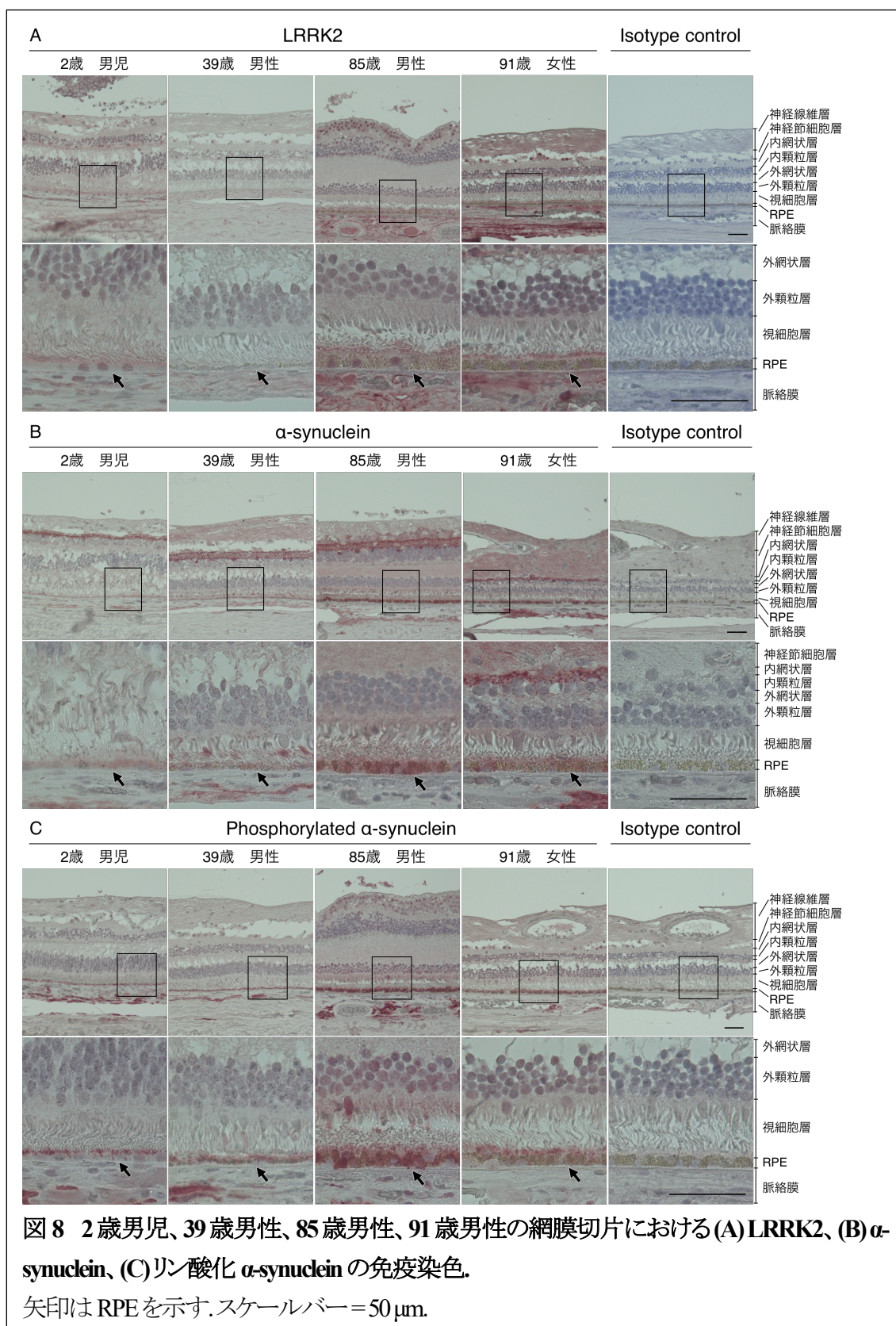


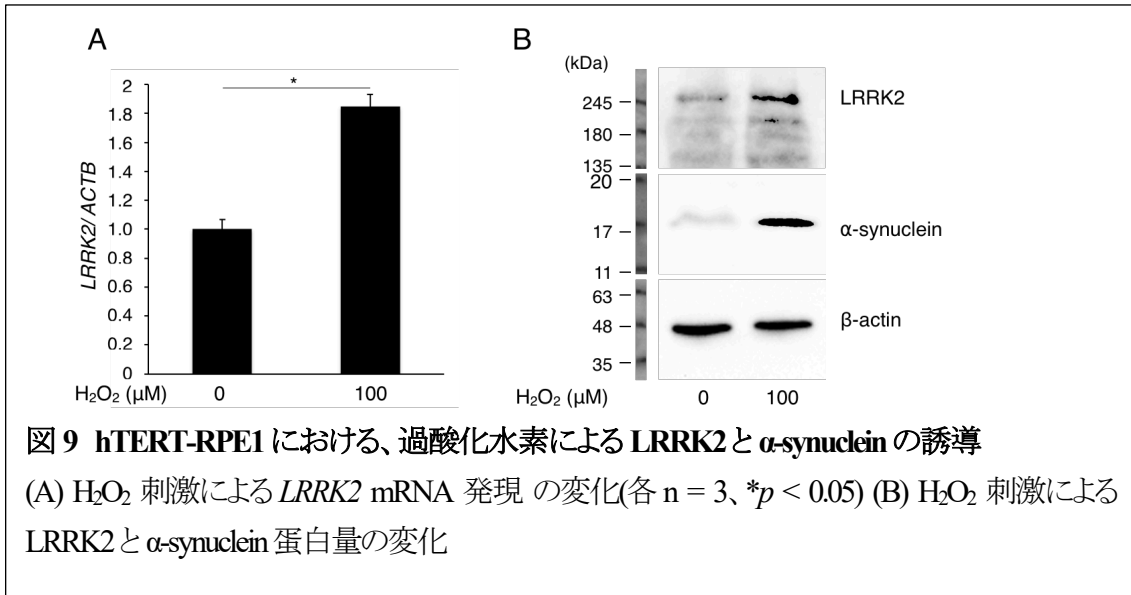
図7 メラニン脱色なしで行ったヒト眼球標本におけるリン酸化 α -synuclein の免疫染色
矢印は、RPEを示す.スケールバー=50 μ m

上記の条件検討後に、ヒト眼球標本を用いてLRRK2、 α -synuclein、リン酸化 α -synucleinの免疫染色を行った。LRRK2の陽性像は神経網膜の全層とRPEで認められた(図8A)。 α -synucleinの陽性像は、神経線維層、神経節細胞層、内網状層、内顆粒層、視細胞外節、RPEで観察された(図8B)。リン酸化 α -synucleinの陽性像は、RPEで観察された(図8C)。

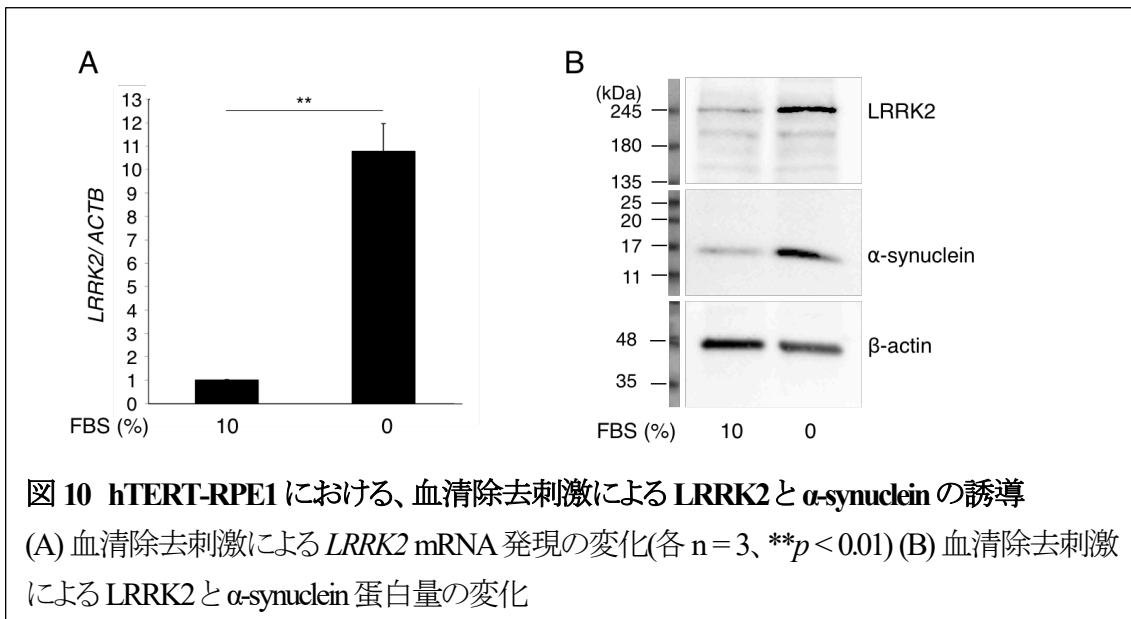


2. RPEにおけるAMD病態形成に関わる刺激によるLRRK2と α -synucleinの誘導

RPEがAMDの病態に関与する刺激を受けた際のLRRK2と α -synucleinの変化を調べるために、培養ヒト不死化RPE細胞hTERT-RPE1を酸化ストレスとして過酸化水素で刺激した。また、脈絡膜からRPEへの親水性物質の供給低下を模倣するために血清除去を行った。過酸化水素刺激により、LRRK2のmRNA発現は84%増加し、タンパク量も増加し(図9AB)、 α -synucleinのタンパク量も増加した(図9B)。



さらに、血清除去刺激によってLRRK2のmRNA発現は約11倍に増加し、タンパク量も増加した(図10AB)。また、 α -synucleinのタンパク量が増加した(図10B)。



3. LRRK2過剰発現による α -synucleinのタンパク量の増加

次に、LRRK2の増加が α -synucleinのタンパク量増加に関連しているかどうかを調べるために、LRRK2野生型 (wild type; WT) と、キナーゼ活性の亢進が生じる変異型であるLRRK2-G2019SをそれぞれBacMamシステムを用いてhTERT-RPE1に遺伝子導入し、過剰発現させた。LRRK2-WT、LRRK2-G2019Sの過剰発現の有効性は、real-time PCRで検証した(図11)。

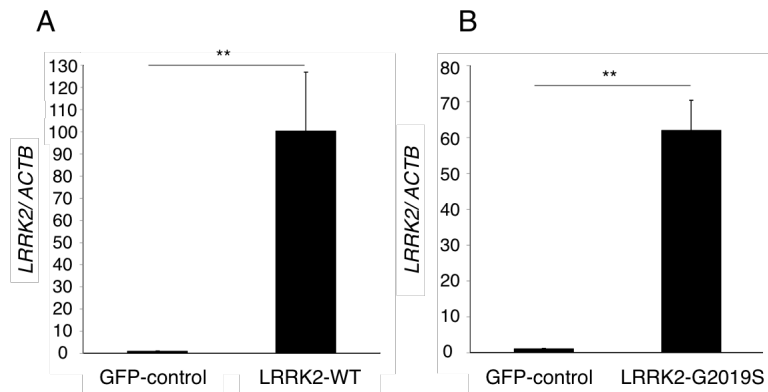
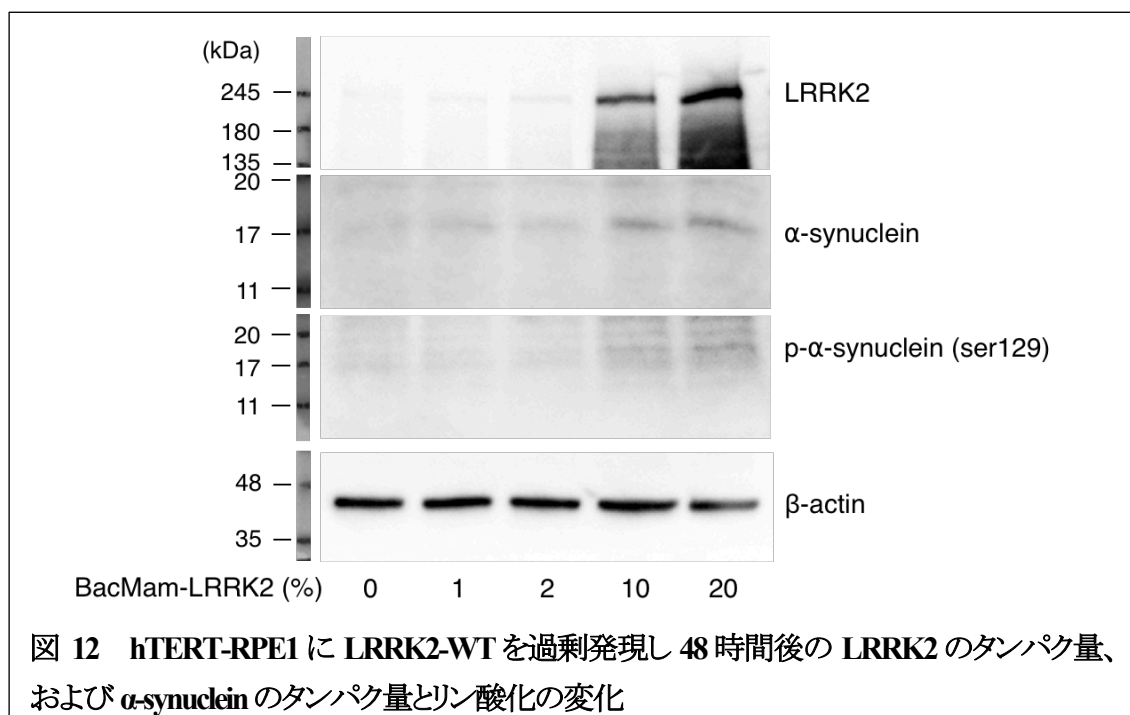


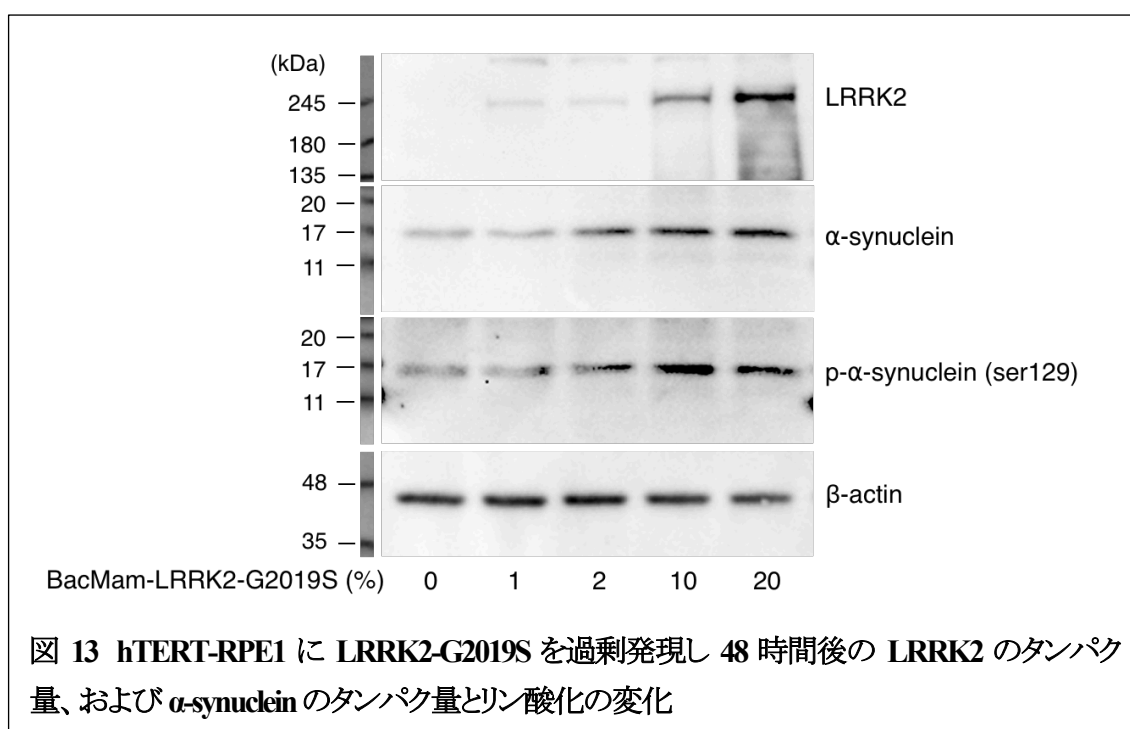
図 11 hTERT-RPE1 に GFP control、LRRK2-WT、LRRK2-G2019S を過剰発現し 24 時間後の *LRRK2* mRNA 発現

(A) GFP control および LRRK2-WT (B) GFP control および LRRK2-G2019S (各 n = 3、** $p < 0.01$)

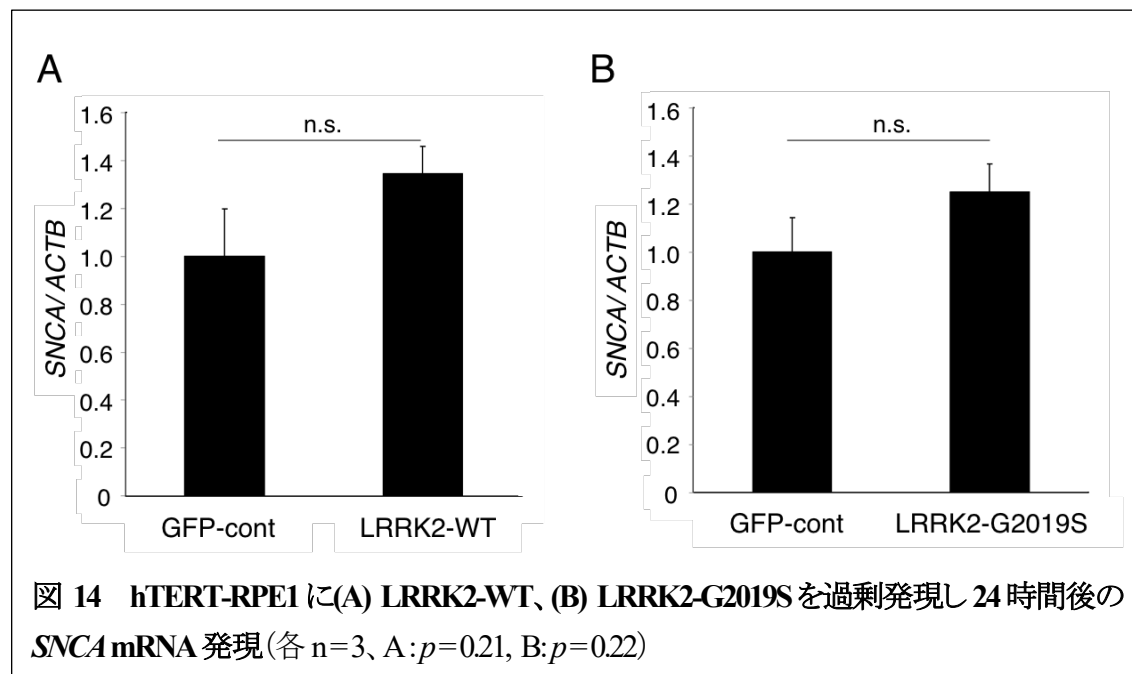
LRRK2-WTの過剰発現により、遺伝子導入48時間後に α -synucleinのタンパク量とリン酸化が増加した(図12)。



LRRK2-G2019Sを過剰発現させると、 α -synucleinのタンパク量とリン酸化がLRRK2-WT過剰発現時に比べてさらに増加した(図13)。

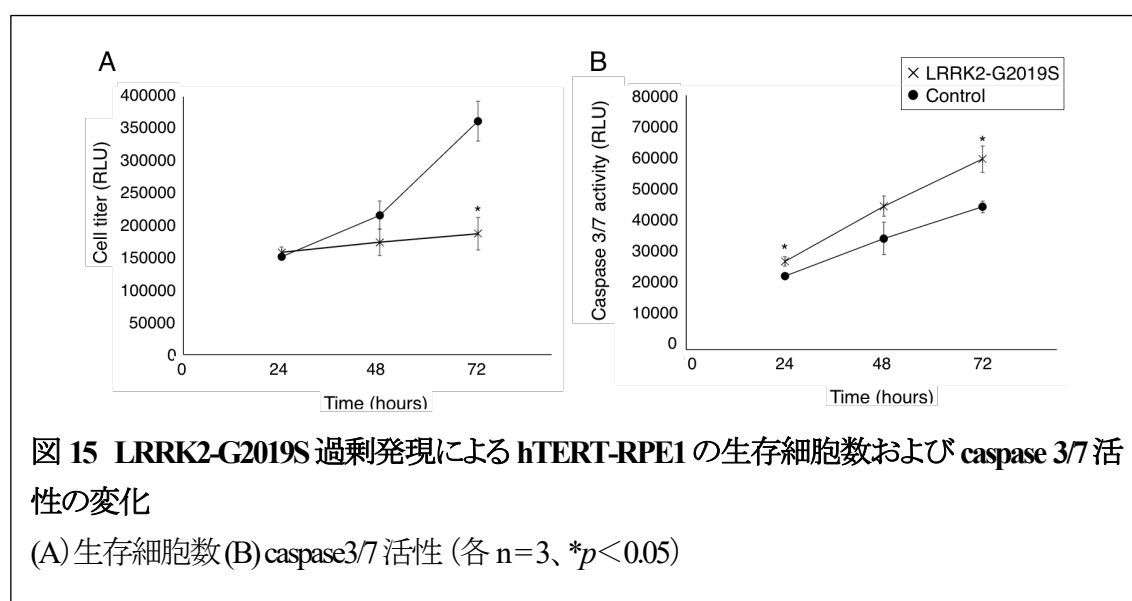


しかし、LRRK2-WTおよびLRRK2-G2019Sの過剰発現によって α -synuclein (*SNCA*) mRNA発現量は変化しなかった(図14)。本結果は、LRRK2過剰発現によって*SNCA* mRNAのde novo合成を介さず、 α -synucleinのタンパク量とリン酸化が増加することを示した。

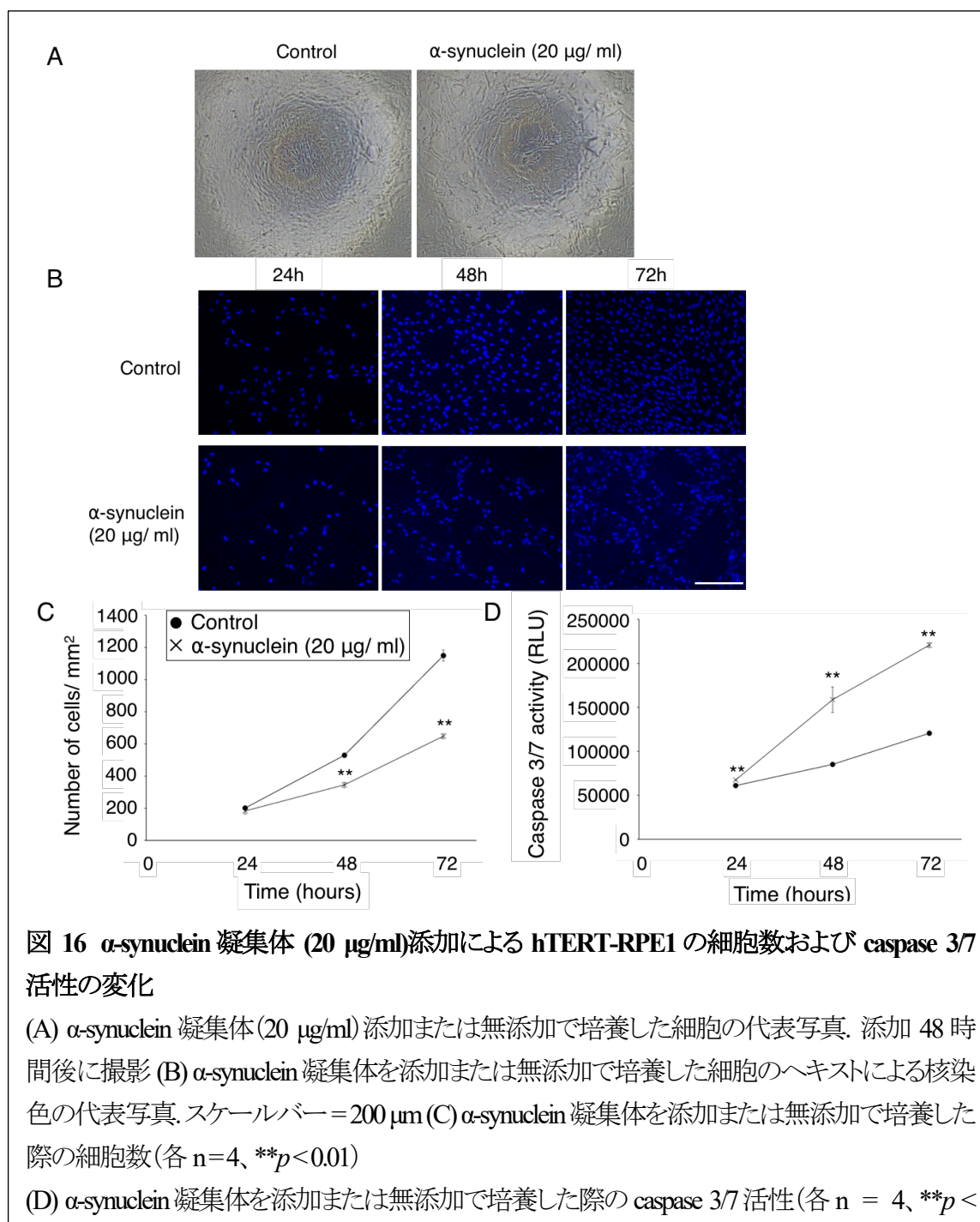


4. LRRK2過剰発現によるRPE細胞死の誘導

RPEに対するLRRK2発現増加の影響を評価するため、Bacmamシステムを用いた遺伝子導入によりLRRK2-G2019Sを過剰発現させ、遺伝子導入したhTERT-RPE1における生存細胞数とアポトーシスの実行役であるcaspase 3/7活性を評価した。hTERT-RPE1におけるLRRK2-G2019Sの過剰発現は、生存細胞数を著しく低下させ(図15A)、caspase 3/7活性を上昇させた(図15B)。

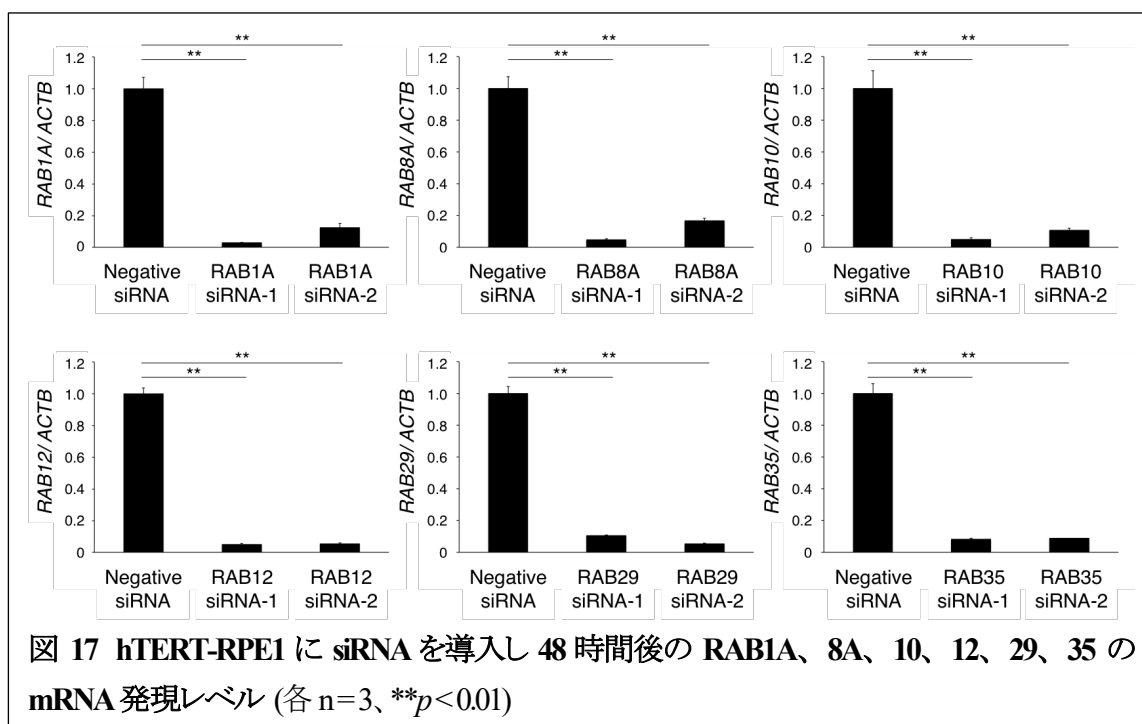


次に、RPEの生存能とcaspase 3/7活性に対する α -synuclein凝集体の影響を調べるため、 α -synuclein凝集体をhTERT-RPE1に添加した。 α -synuclein凝集体で刺激後、細胞数は48時間で33%、72時間で43%減少した(図16A-C)。caspase 3/7活性は24、48、72時間でそれぞれ11、86、83%増加した(図16D)。これらの結果から、LRRK2のキナーゼ活性の増加が α -synucleinのタンパク量を増加させることによってRPEの細胞死を引き起こすことが示唆された。



5. RPEにおける、LRRK2による α -synucleinのタンパク量増加の機序

LRRK2の過剰発現が α -synucleinタンパク量を増加させる機序を探るため、 α -synucleinの分解に関与する分子を同定しようと考えた。先行研究において、LRRK2はリン酸化を介してRAB35の機能を阻害し、エンドソーム・ライソソームにおける凝集化 α -synucleinの分解を抑制することが報告されている(O'Hara et al, 2020; Bae and Lee, 2020)。我々は、LRRK2の基質として報告され、hTERT-RPE1で高発現しているRAB1A、RAB8A、RAB10、RAB12、RAB29、RAB35に注目した。RPEにおける α -synucleinの分解に関与するRABを解明するため、まずRAB1A、RAB8A、RAB10、RAB12、RAB29、RAB35のノックダウンがhTERT-RPE1における α -synucleinタンパク量に及ぼす影響を調べた。RABはそれぞれ2種類のsiRNAでノックダウンした。RABノックダウンの有効性は、real-time PCR (図17) およびwestern blotting (図18) で確認した。hTERT-RPE1において、RAB1A、RAB8A、RAB10をノックダウンすると、 α -synucleinのタンパク量が増加した(図18)。



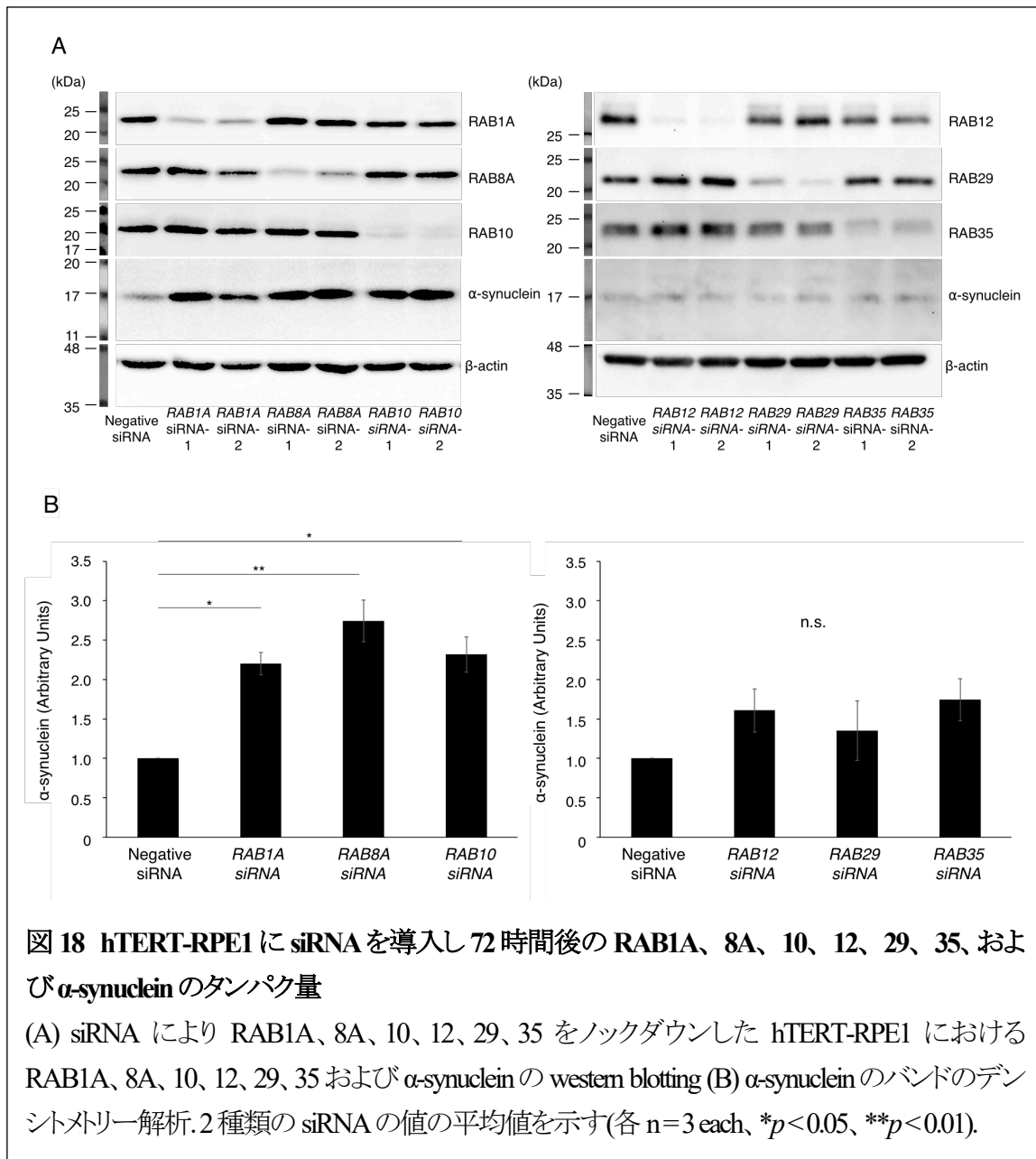


図 18 hTERT-RPE1 に siRNA を導入し 72 時間後の RAB1A、8A、10、12、29、35、および α -synuclein のタンパク量

(A) siRNA により RAB1A、8A、10、12、29、35 をノックダウンした hTERT-RPE1 における RAB1A、8A、10、12、29、35 および α -synuclein の western blotting (B) α -synuclein のバンドのデンスิตロメリー解析. 2 種類の siRNA の値の平均値を示す (各 $n=3$ each, * $p<0.05$, ** $p<0.01$).

RPEにおいてRAB1A、RAB8A、RAB10がLRRK2の基質であるかどうかを明らかにするため、Bacmamシステムを用いてLRRK2-G2019Sを過剰発現させたhTERT-RPE1において、RAB1A、RAB8A、RAB10のタンパク量とリン酸化を検討した。LRRK2-G2019Sの過剰発現により、RABのタンパク量は変化しなかったが、RAB1A、RAB8A、RAB10のリン酸化が、それぞれ150、50、66%増加した(図19)。本結果から、LRRK2がRAB1A、8A、10のリン酸化を介してRPEにおける α -synucleinの分解を阻害することが示唆された。

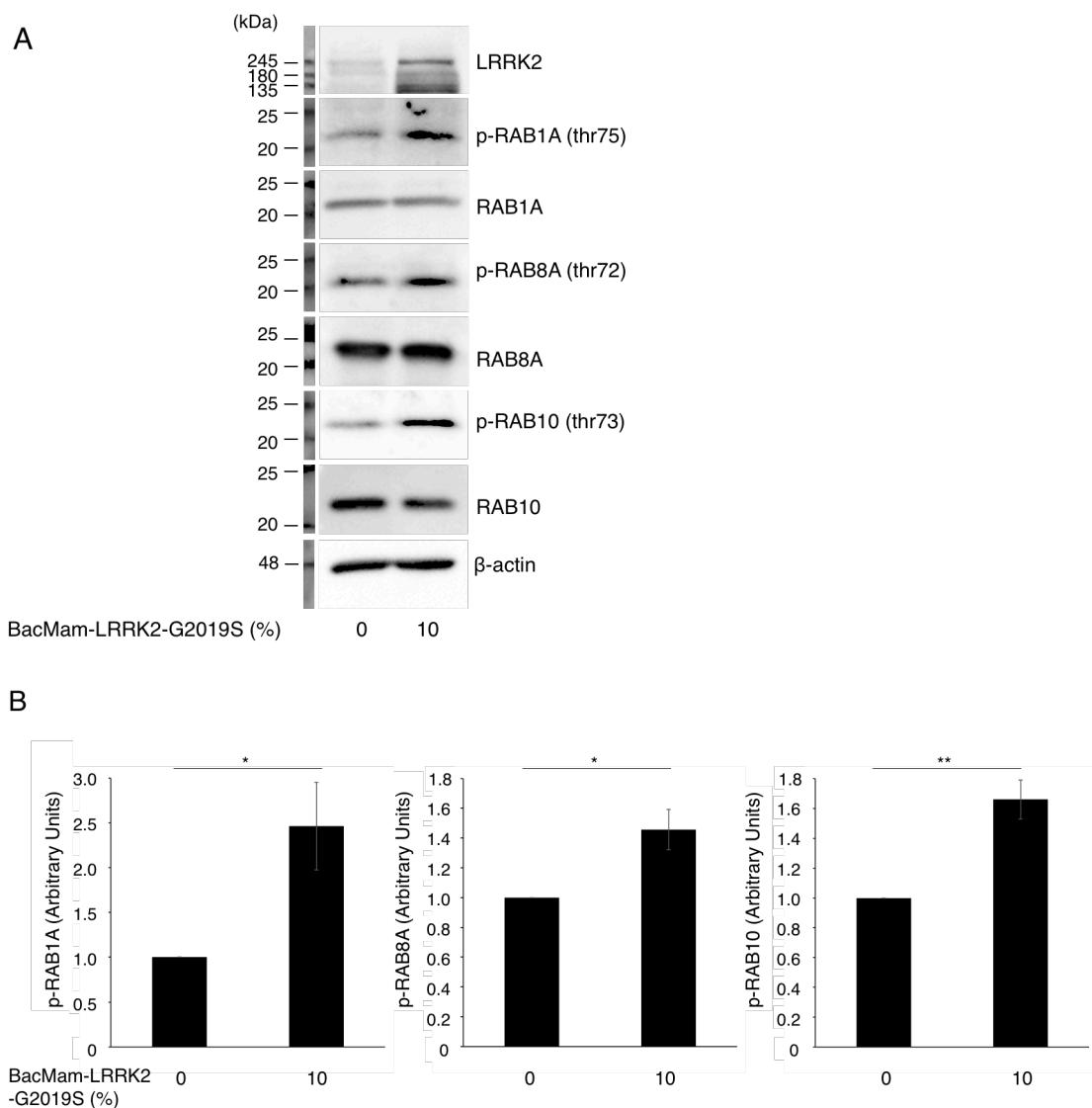


図 19 hTERT-RPE1 に LRRK2-G2019S を過剰発現し 48 時間後の RAB1A、8A、10 のタンパク量とリン酸化の変化

(A) LRRK2-G2019S を過剰発現した hTERT-RPE1 における RAB1A、8A、10 の総タンパクとリン酸化タンパクの western blotting (B) リン酸化 RAB1A、リン酸化 RAB8A、リン酸化 RAB10 のバンドのデンストメトリー解析(各 n=3、* $p<0.05$ 、** $p<0.01$)

6. *LRRK2-G2019S*Tgマウスにおける眼球の形態学的変化

*LRRK2-G2019S*TgマウスとWTマウスのRPEおよび脈絡膜の形態学的変化を5週齢から29週齢まで4週ごとに眼底検査で評価し、さらに眼球摘出後に免疫染色およびwestern blottingを行った。

眼底検査では、*LRRK2-G2019S*TgマウスおよびWTマウスともに、年齢依存的に眼底周辺部に脱色素病変が観察された。しかし、*LRRK2-G2019S*TgマウスではWTマウスと比較して脱色素病変のサイズが大きく、視神経乳頭に近い位置に存在した(図20)。

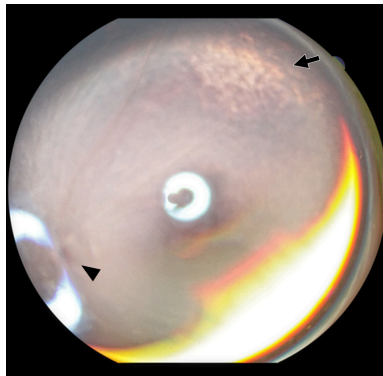


図 20 *LRRK2-G2019S*Tg マウス眼底の脱色素病変の代表写真

22 週齢の *LRRK2-G2019S*Tg マウスの鼻上側に脱色素病変を認めた。矢頭は視神経乳頭を、矢印は脱色素病変を示す。

脈絡膜組織のTUNEL染色で、*LRRK2-G2019S*Tgマウスでは外顆粒層とRPEでTUNEL陽性のアポトーシス細胞がそれぞれ10倍と5倍増加していた(図21、22)。

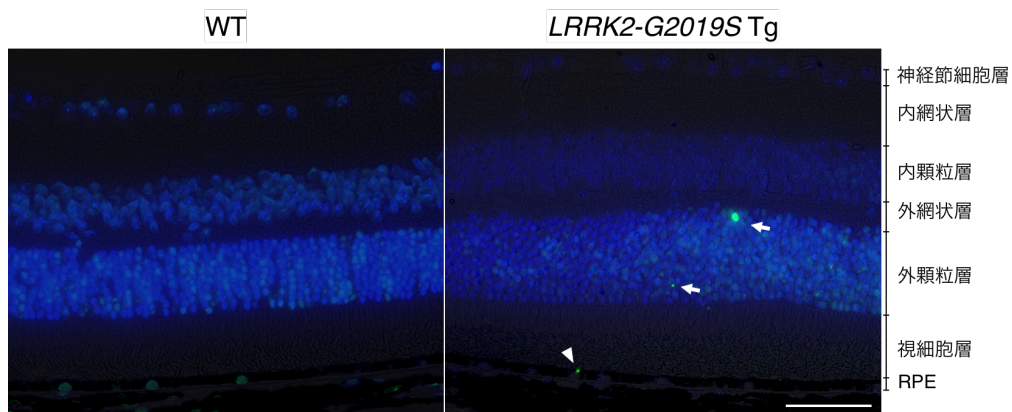


図 21 WT マウスと *LRRK2-G2019S*Tg マウスの網膜組織における TUNEL 染色の代表写真

視細胞(矢印)およびRPE(矢頭)にTUNEL陽性細胞が認められた。スケールバー=50 μ m

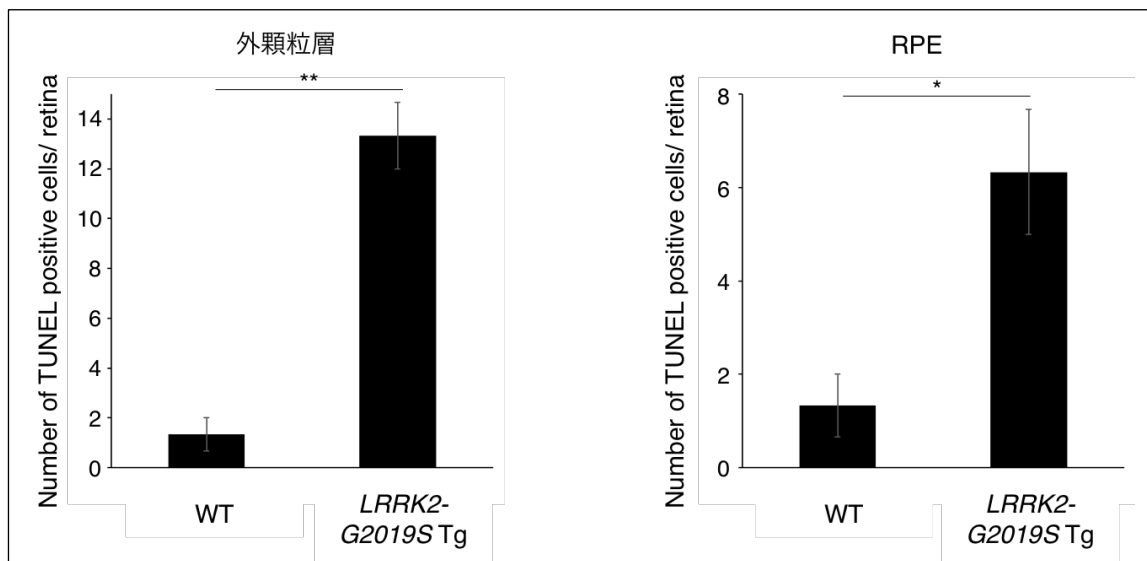


図 22 WT マウスと *LRRK2-G2019S* Tg マウスの外顆粒層、RPE における TUNEL 陽性細胞数 (各 n=3, * $p<0.05$, ** $p<0.01$)

ヘマトキシリン・エオジン染色において、色素脱失病変部に一致して視神経乳頭から1500 μm 以内の位置に脈絡膜の菲薄化が認められた(図23)。これらの結果から、*LRRK2*のキナーゼ活性の亢進により、マウスのRPEおよび視細胞の細胞死と、それに引き続いて脈絡膜菲薄化が生じることが示唆された。

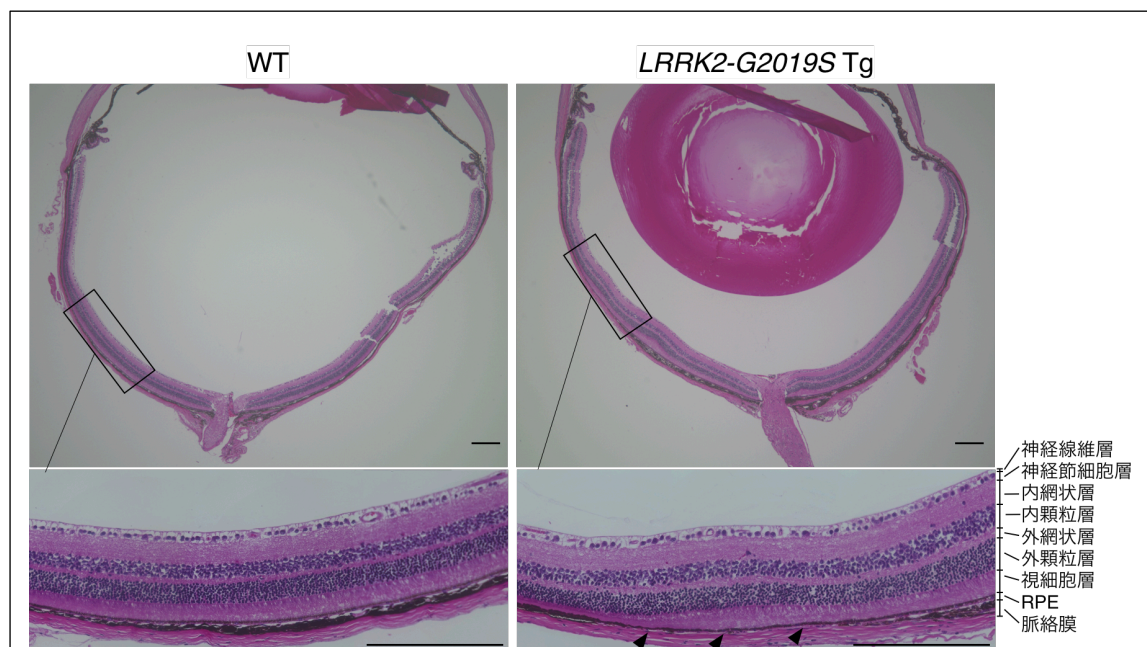
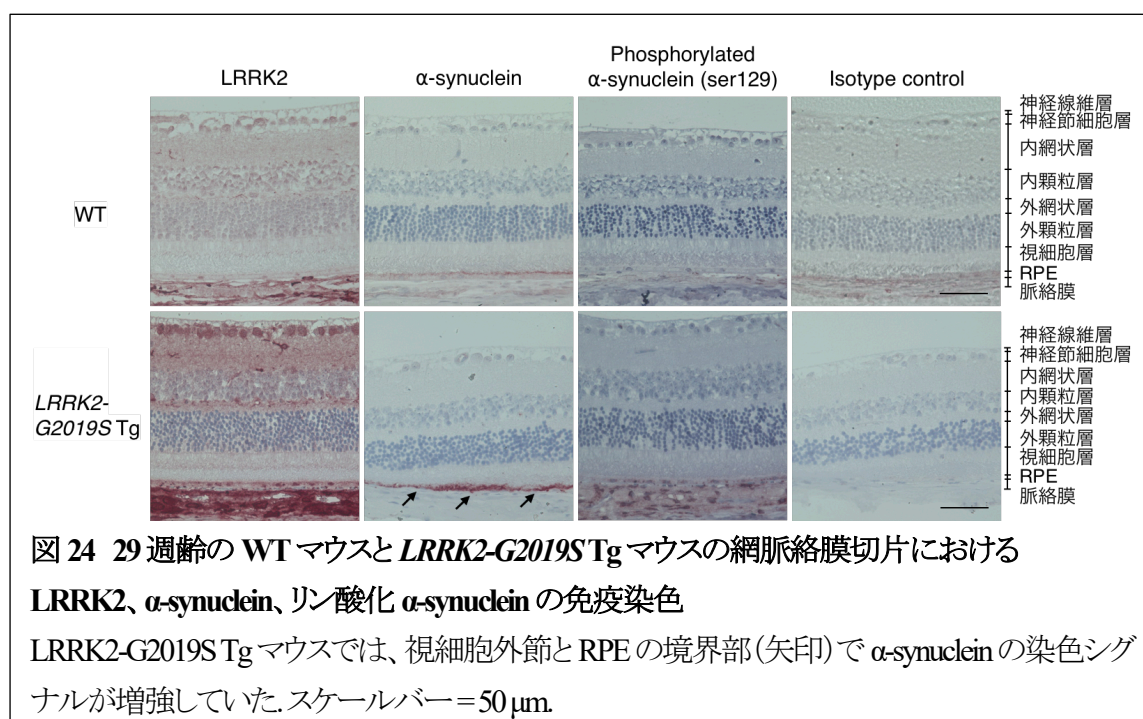


図 23 図 20 で示した *LRRK2-G2019S* Tg マウス眼球上鼻側の色素脱失病変部、および WT マウス代表眼の組織学的所見

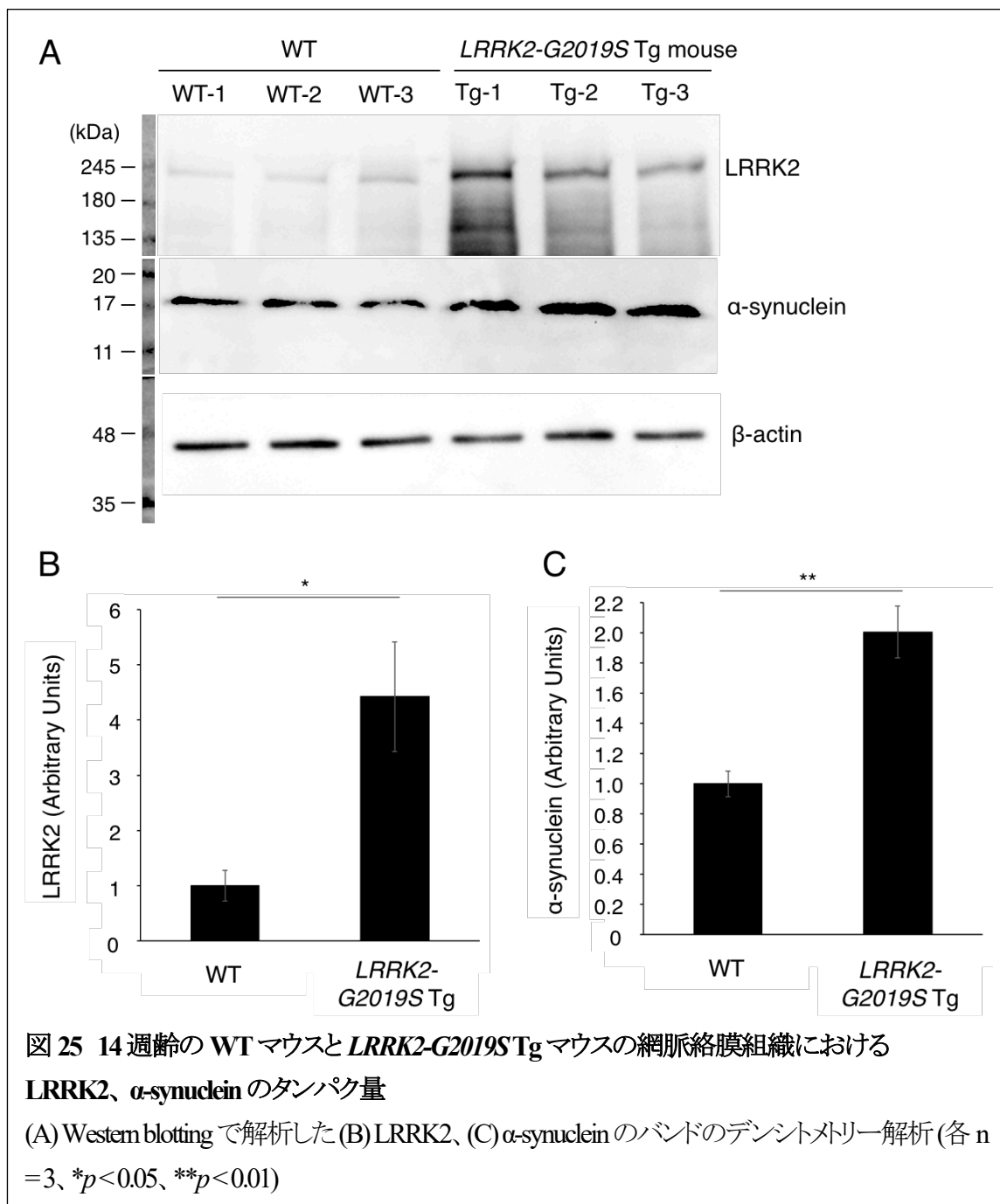
矢頭は菲薄化した脈絡膜を示す。ヘマトキシリン・エオジン染色。スケールバー = 200 μm 。

7. *LRRK2-G2019S* Tgマウスの脈絡膜組織における α -synucleinの増加

*LRRK2*のキナーゼ活性の上昇が α -synucleinのタンパク量およびリン酸化を増加させるかについて検討するために、*LRRK2-G2019S* TgマウスおよびWTマウスの眼球標本において、 α -synuclein、リン酸化 α -synuclein(セリン129)の免疫染色を行った。*LRRK2-G2019S* Tgマウスでは、WTマウスに比べて神経節細胞層、内顆粒層、RPE、脈絡膜で*LRRK2*の染色シグナルが増加した(図24)。また、*LRRK2-G2019S* Tgマウスでは α -synucleinの染色シグナルがWTマウスに比べて視細胞外節とRPEの境界部で増強していた(図24)。 α -synucleinの染色シグナルが増加した領域は、脈絡膜の菲薄化領域に一致していた。リン酸化 α -synucleinの染色シグナルは、WTマウスに比べて*LRRK2-G2019S* TgマウスのRPEおよび脈絡膜で増加していた(図24)。

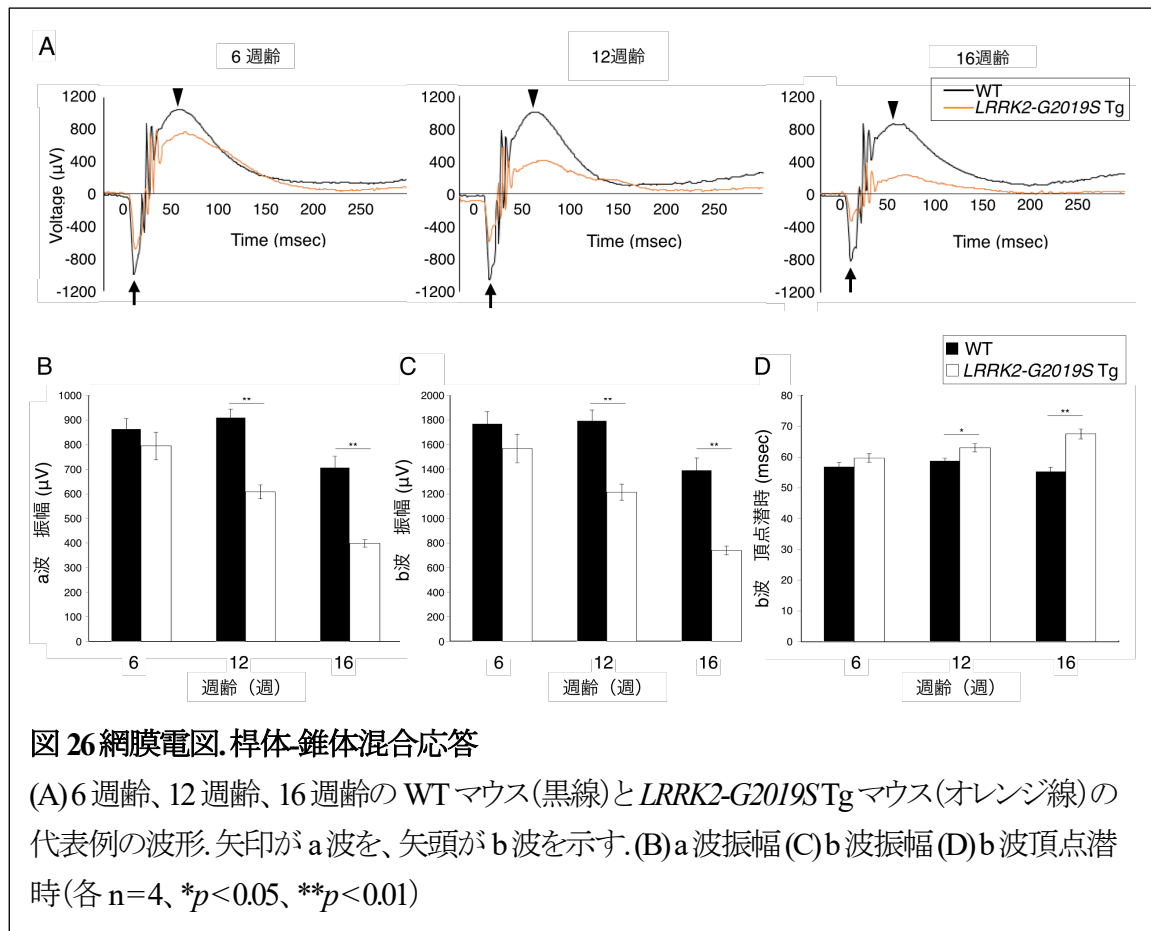


さらに、*LRRK2-G2019S* Tgマウスの網脈絡膜組織では、WTマウスと比較してLRRK2のタンパク量が4倍、 α -synucleinのタンパク量が2倍に増加していた(図25)。これらの結果から、LRRK2のキナーゼ活性の上昇によって脈絡膜組織とRPE層において α -synucleinのタンパク量が増加したことが示された。

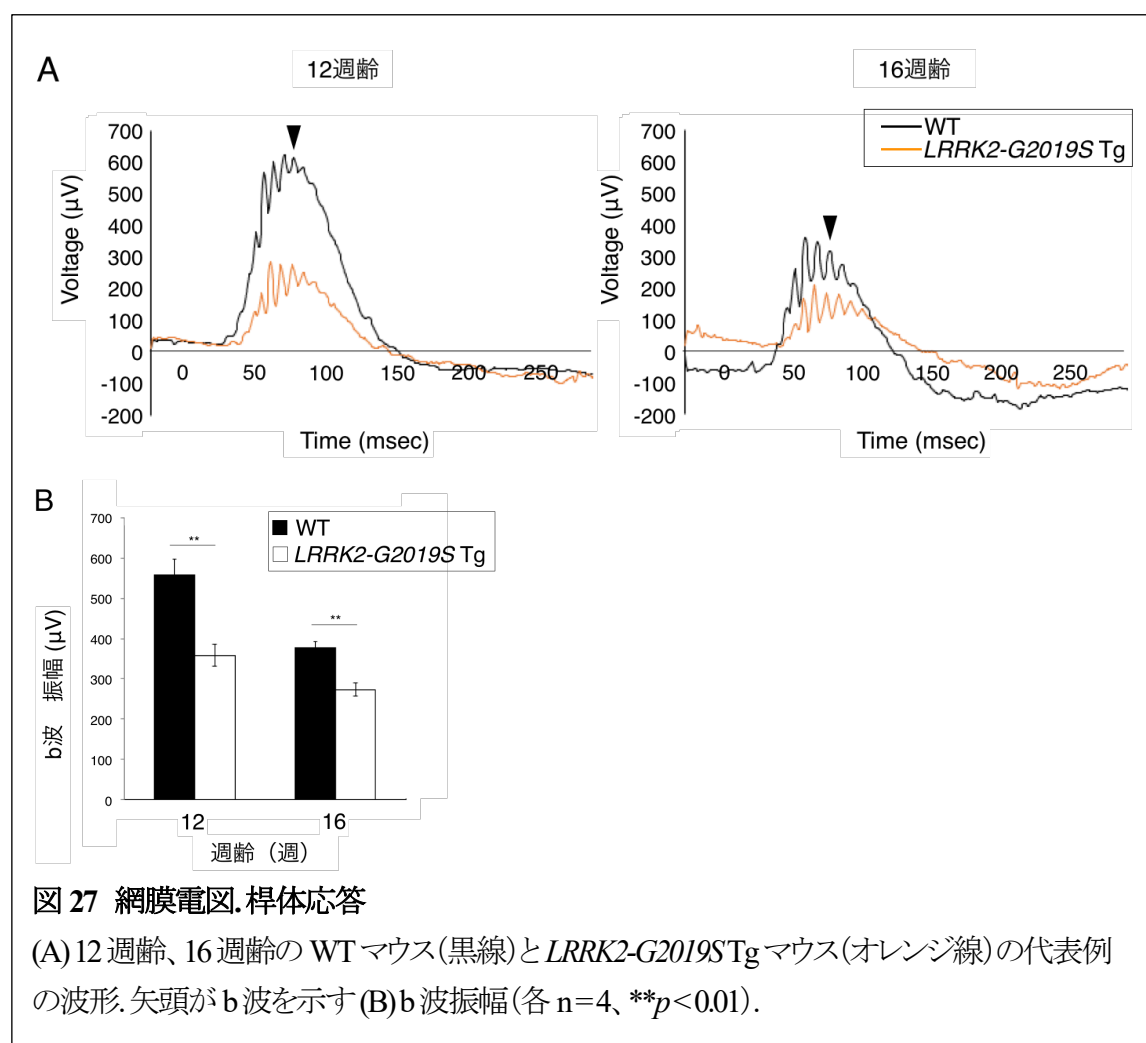


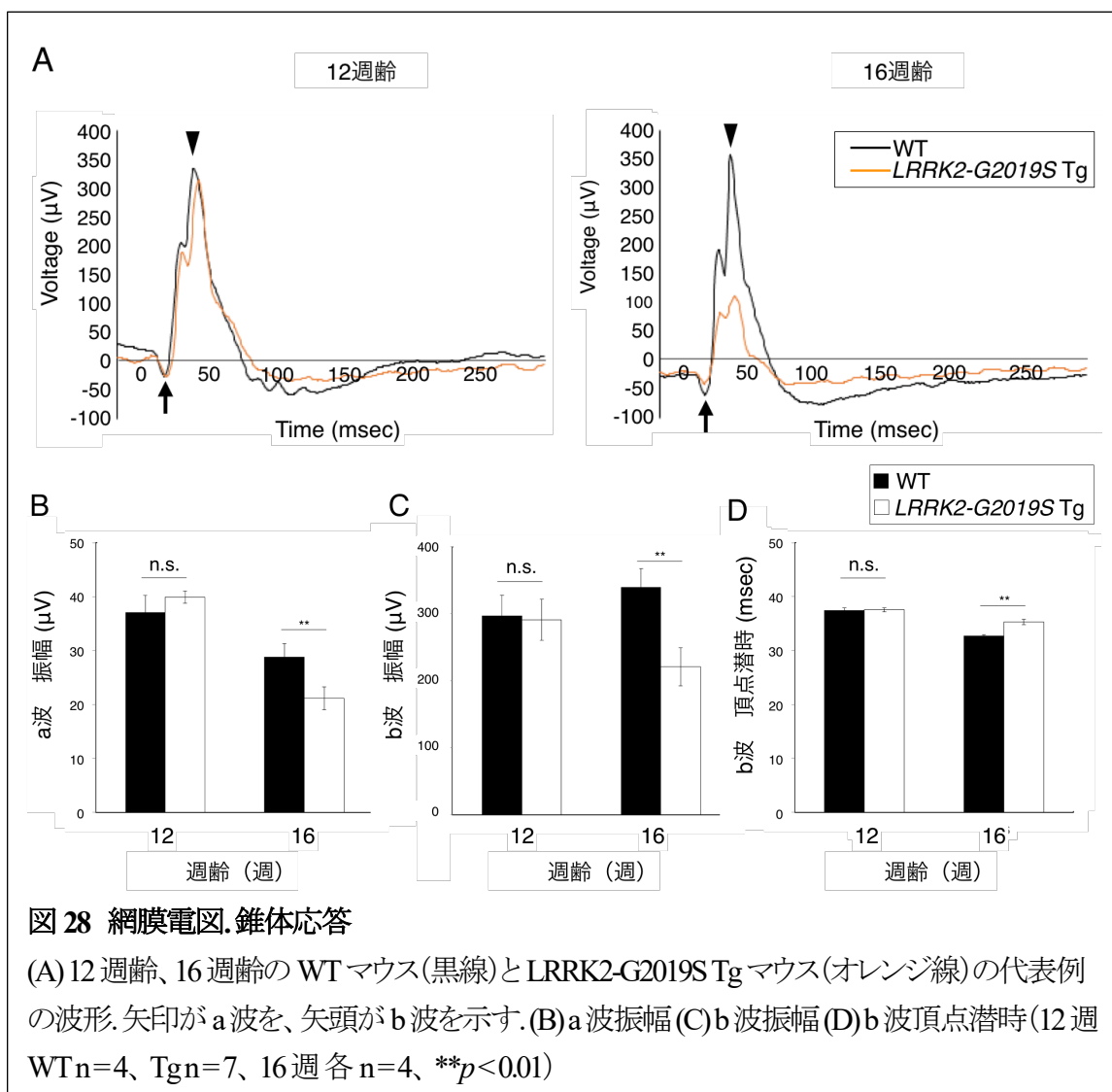
8. *LRRK2-G2019S* Tgマウスにおける網膜機能障害

*LRRK2*のキナーゼ活性亢進が網膜機能に及ぼす影響を評価するため、*LRRK2-G2019S* TgマウスとWTマウスで網膜電図を測定した。暗順応下 $10\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ の光刺激で誘発される桿体-錐体混合応答では、*LRRK2-G2019S* TgマウスではWTマウスと比較して、a波の振幅が12週齢と16週齢でそれぞれ33%と44%減少し(図26AB)、b波の振幅が12週齢と16週齢でそれぞれ32%と47%減少した(図26AC)。さらに、b波の頂点潜時は*LRRK2-G2019S* Tgマウスでは12週齢と16週齢でそれぞれ7%と22%延長した(図26AD)。



暗順応下 $0.001\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ の光刺激で誘発される桿体応答では、*LRRK2-G2019S* Tgマウスでは12週齢と16週齢でb波の振幅がそれぞれ36%と25%減少した(図27)。一方、明順応下 $10\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ の光刺激で誘発される錐体応答では、12週齢ではa波とb波の振幅に有意差は認められなかったものの、16週齢で*LRRK2-G2019S* Tgマウスのa波とb波の振幅がそれぞれ27%と35%減少し、b波の頂点潜時が8%延長した(図28)。これらの結果から、*LRRK2*のキナーゼ活性の亢進はマウスの網膜電図において桿体応答、次いで錐体応答の振幅を減少させ、頂点潜時を延長させることが示された。





考察

本研究から明らかになったことは、以下の通りである(図29)。(1) ヒトRPEにはLRRK2、 α -synucleinおよびリン酸化 α -synucleinが局在する。(2) RPEにおいて血清飢餓および酸化ストレスによりLRRK2と α -synucleinが誘導される。(3) RPEにおいてLRRK2-WTとLRRK2-G2019Sの過剰発現により α -synucleinのタンパク量は増加し、リン酸化が亢進する。(4) LRRK2-G2019S過剰発現によりcaspase 3/7活性が増加し、RPEの細胞死が誘導される。(5) α -synuclein凝集体の投与により、caspase 3/7活性が増加し、RPEの細胞死が誘導される。(6) LRRK2は、RPEにおいてRAB1A、RAB8A、RAB10のリン酸化を介して α -synucleinの分解を阻害する。(7) *LRRK2-G2019S* Tg マウスではRPEおよび視細胞のアポトーシスが増加し、脈絡膜が菲薄化する。(8) *LRRK2-G2019S* TgマウスのRPE層では、 α -synucleinが増加する。(9) *LRRK2-G2019S* Tgマウスでは、網膜電図で振幅の低下と潜時延長を認める。本結果から、これまでの疫学研究(Chung et al, 2014; Etminan et al, 2018; Choi et al, 2020)から推測されたAMDとPDに共通する病態メカニズムの存在が示された。

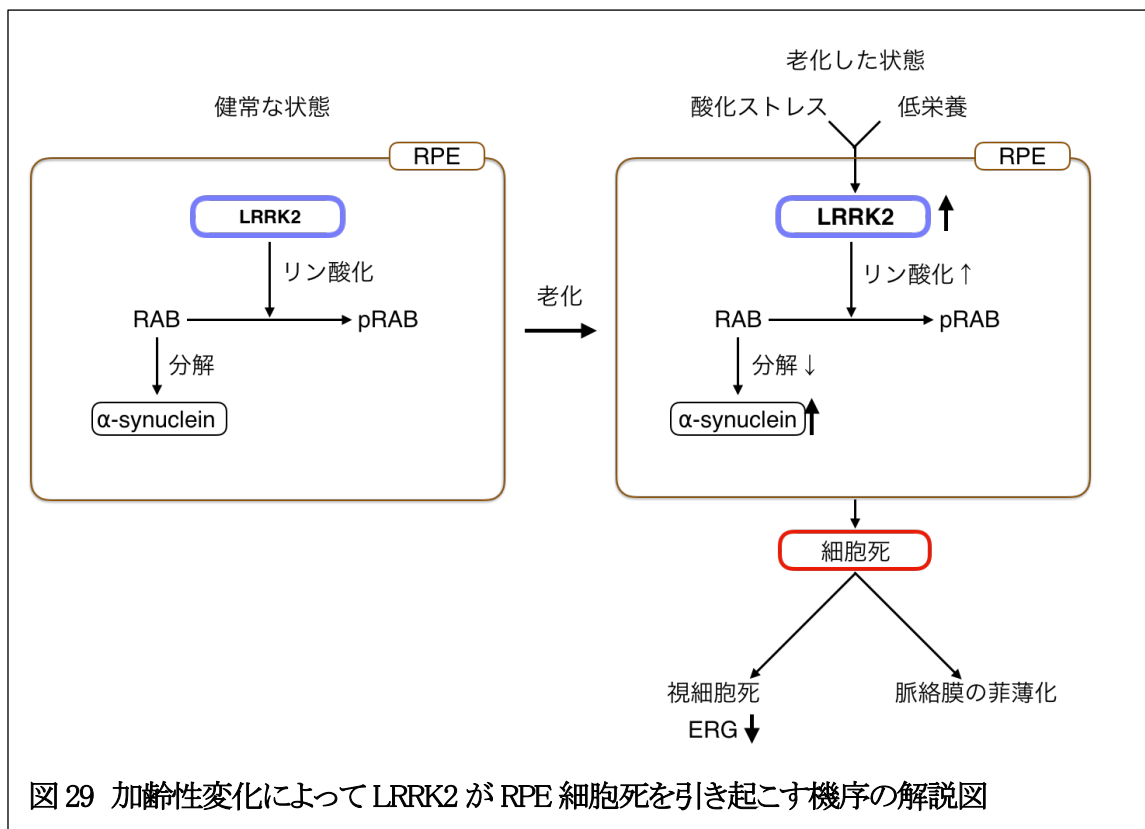


図29 加齢性変化によってLRRK2がRPE細胞死を引き起こす機序の解説図

網膜は神経網膜と単層の色素性細胞であるRPEから構成されており、網膜のさらに外側には脈絡膜が存在する。ヒト眼球切片におけるLRRK2の免疫染色の報告は我々が渉猟する限りない。一方、 α -synucleinの染色像はヒト健常眼・PD患者の網膜において神経節細胞層・内網状層・内顆粒層・視細胞外節に認められること(Veys et al, 2019)、リン酸化 α -synucleinの染色像がPD病患者において神経節細胞層の軸索と細胞体に認められること(Veys et al, 2019)が示されてきたが、RPEにおける α -synuclein、リン酸化 α -synucleinの存在については明らかにされていない。本研究では、LRRK2、 α -synucleinとリン酸化 α -synucleinがヒトRPEの細胞質に局在することを示した。さらに、全ての分子の染色シグナルは加齢とともに増加していた。これらの結果から、PDの病態に関与する主要な分子がヒトRPEに存在することが示された。ただし、本研究で利用したヒト眼球標本は、原疾患の治療のために眼球摘出術または眼窩内容除去術を行い、保管していたものだったため、摘出時期および固定時間が異なっていた。このことが、染色シグナルの程度に影響を与えた可能性は否定できない。

AMDの病態メカニズムは未だ十分に解明されていないが、最近の研究から網膜外層と脈絡膜における酸化ストレス、軽度の炎症、栄養輸送の障害など、加齢に伴う変化がAMDの発症に関与していると考えられている(Grisanti and Tatar, 2008; Vyawahare and Shinde, 2022)。本研究では、過酸化水素による酸化ストレスによって培養RPE細胞hTERT-RPE1におけるLRRK2のmRNA発現およびタンパク量が増加し、さらに α -synucleinのタンパク量が増加した。また、脈絡膜からの親水性物質の供給低下を模した刺激として培養RPEを血清除去し培養すると、LRRK2のmRNA発現およびタンパク量が増加し、さらに α -synucleinのタンパク量が増加した。この結果から、AMDの病態形成に関与する刺激により、RPEにおいてLRRK2と α -synucleinのタンパク量が増加することが示された。さらに、LRRK2-WTおよび家族性PDで最も多い遺伝子変異でありキナーゼ活性の亢進を示すLRRK2-G2019Sを培養RPE細胞で過剰発現させると、転写が増加することなく、 α -synucleinのタンパク量の増加とリン酸化の亢進が認められた。本結果から、LRRK2が α -synucleinの翻訳後制御を行うことが示された。さらに、LRRK2-G2019Sの過剰発現と α -synuclein凝集体の刺激により、培養RPE細胞でcaspase 3/7活性が上昇し細胞死が誘導された。 α -synucleinは、ミトコンドリア機能障害(O'Hara et al, 2020; Du et al, 2020)、小胞体機能障害(Du et al, 2020)、オートファジー機能障害(O'Hara et al, 2020)、核内転写制御因子の変化(Wong and Krainc, 2017)、シナプス機能障害(Du et al, 2020; Wong and Krainc, 2017)を介して細胞傷害を引き起こすことが知られている。本結果から、LRRK2が α -synucleinの増加を介してRPEの細胞死を誘導すると考えられた。

また、LRRK2はエンドソーム・ライソソーム分解経路を含む複数のポイントで、複数のRABタンパクをリン酸化することによって小胞輸送を制御している(Bae and Lee, 2020)。ヒト神経芽細胞を用いた実験では、LRRK2-RAB35経路の活性化によって α -synucleinがライソソームでの分解を回避して分泌経路に導かれ、 α -synucleinの伝播が促進されたと報告されている(Bae et al, 2018)。しかし、RPEにおけるLRRK2、RAB、 α -synucleinの関係性についてはこれまで検討がな

されていない。LRRK2の基質となるRAB蛋白として、RAB1A、3、8A、10、12、29、35、43などが報告されており(Bae and Lee, 2020; O'Hara et al, 2020)。本研究ではその中でhTERT-RPE1で遺伝子発現レベルの高い、RAB1A、8A、10、12、29、35に着目した。本研究の結果から、RPEにおいてLRRK2がRAB1A、8A、10をリン酸化することでその機能を変化させ、 α -synucleinの分解を阻害すると考えられた。RAB1は、オートファジー調節の機能を有し(Bae and Lee, 2020)、ラット褐色細胞腫由来の細胞でRAB1aは α -synucleinの分泌を促進したと報告されている(Ejlertsen et al, 2013)。また、RAB8は、early endosomeからtubular endosomeの形成を制御しており(Bae and Lee, 2020)、RAB8aをノックアウトさせた神経細胞では不溶性 α -synucleinが増加したと報告されている(Mamais et al, 2023)。さらに、RAB10は、小胞体、小胞輸送、オートファジーの調節を行っており、ヒト腎臓細胞において活性酸素種によって活性化したLRRK2がRab10をリン酸化しその機能を抑制することで、小胞輸送を抑制し、 α -synucleinを蓄積させたと報告されている(Di Maio et al, 2018)。本結果は、これらの先行研究の結果と矛盾がなかった。本研究では、我々の知りうる限り、RPEにおけるLRRK2による α -synucleinタンパク制御メカニズムを初めて明らかにした。

本研究において、LRRK2の基質としてRAB、 α -synucleinに着目したが、LRRK2の基質となるタンパクは他にも多数報告されている(Jeong and Lee, 2020)。また、LRRK2の機能として今回着目したRABのリン酸化を介するエンドソーム・ライソソームの調節以外に、細胞骨格のリモデリング、ミトコンドリア機能調節、免疫や炎症への関与も報告されている(Usmani et al, 2021)。本研究でLRRK2-G2019Sの過剰発現によりRPE細胞死が誘導された機序として、 α -synucleinによる毒性以外にLRRK2が関与するその他の複数の経路も関与している可能性は否定できない。LRRK2-G2019S過剰発現によるRPE細胞死のその他の機序を明らかにするためには追加の検討が必要である。

LRRK2の機能を明らかにするため、これまでLRRK2変異のTgマウスや、ノックインマウス、ノックアウトマウスが作られ、脳のドーパミン作動性ニューロン、認知・行動、肺、腎臓などについて研究されてきたが(Herzig et al, 2011; Chen et al, 2012; Volta et al, 2015; Yue et al, 2015; Ramonet et al, 2011)、それらの眼球や視機能についての検討は渉猟する限りない。本研究では、我々の知りうる限り、初めてLRRK2-G2019S Tgマウスの眼底、網脈絡膜組織、網膜機能について報告した。LRRK2-G2019S Tgマウスでは、眼底に色素脱失病変、視細胞やRPEにアポトーシスが生じており、網脈絡膜組織、特に、RPEで α -synucleinの増加を認めた。本結果は、本研究の*in vitro*実験の結果と一致している。また、本結果は、前頭葉特異的にLRRK2-G2019Sを過剰発現させたコンディショナルTgマウスでは同部位で α -synuclein凝集体が増加したという先行研究の結果(Xiong et al, 2017)とも一致している。さらに、本研究ではLRRK2-G2019S Tgマウスの眼底の色素脱失病変部において脈絡膜の菲薄化を認めた。RPEはVEGFを分泌し、視細胞と脈絡膜毛細血管板の恒常性の維持に重要な役割を果たしており、RPEの萎縮によって脈絡膜毛細血管板の萎縮が生じることから(Grisanti and Tatar, 2008)、本研究でも、RPE障害に続発して脈絡膜の萎縮が生じた可能性が考えられる。さ

らに、RPEは視細胞外節の貪食と分解、脈絡膜から視細胞への栄養などの物質の輸送などの機能を有し、視細胞の恒常性と機能を維持している(Grisanti and Tatar, 2008)ことから、RPE細胞死に続発して視細胞死が生じた可能性が考えられる。組織学的所見と同様に、*LRRK2-G2019S* Tgマウスでは網膜電図で桿体応答の振幅の低下、および潜時延長を引き起こし、その後錐体応答の振幅の低下および潜時延長を引き起こした。マウスの視細胞は桿体細胞が97%、錐体細胞が3%を占めるとされ、両細胞は網膜全体に分布している(Carter-Dawson and LaVail, 1979)。錐体細胞は割合が少ないために影響が出づらく、初期は桿体細胞の障害のみが認められた可能性が考えられる。桿体細胞は錐体細胞の生存に不可欠なrod-derived cone viability factor (RDCVF)を分泌するため(Léveillard et al, 2004; Nag, 2021)、*LRRK2-G2019S* Tg mouseでは、まず桿体細胞死が生じ、RDCVF分泌低下により錐体細胞死が生じた可能性が考えられる。以上から、*LRRK2*のキナーゼ活性の亢進によってRPEの消失が生じ、それに続いて視細胞死と脈絡膜の菲薄化が生じた可能性が考えられた。また、この変化は α -synucleinタンパクの増加による可能性が考えられた。ただし、本研究で用いた*LRRK2-G2019S* Tgマウスは、*LRRK2-G2019S*をRPE特異的に過剰発現したものではないため、視細胞死や脈絡膜菲薄化がRPE細胞死に続発して生じるという機序だけでなく、視細胞や脈絡膜を構成する細胞自体における*LRRK2*の機能亢進に起因する可能性も否定できない。

本研究の問題点として、AMD患者の眼球切片は入手困難であったため、それを用いた組織学的検討は行っておらず、*LRRK2*、 α -synuclein、リン酸化 α -synucleinとAMDとの直接的な関連性は明らかにできなかった。また、ヒトおよびTgマウスの網脈絡膜組織の α -synucleinが凝集体なのかを明らかにしていない。今後、AMD患者の眼球切片が入手できれば、免疫組織学的検討を行いたい。また、現在、 α -synuclein凝集体の解析方法を検討中である。

結論

本研究では以下の新知見が得られた。

- 1) ヒトRPEにはLRRK2、 α -synucleinおよびリン酸化 α -synucleinが存在する。
- 2) RPEにおいて、血清飢餓および酸化ストレスによってLRRK2および α -synucleinが誘導される。
- 3) RPEにおいて、LRRK2の過剰発現によって α -synucleinのタンパク量とリン酸化が増加する。
- 4) LRRK2の過剰発現はcaspase 3/7活性を増加させ、RPE細胞死を引き起こす。
- 5) α -synuclein凝集体もcaspase 3/7活性を増加させ、RPE細胞死を誘導する。
- 6) LRRK2は、RPEにおいてRAB1A、RAB8A、RAB10のリン酸化を介して α -synucleinの分解を阻害する。
- 7) LRRK2-G2019S Tgマウスでは、RPEおよび視細胞のアポトーシスが増加し、脈絡膜が菲薄化する。
- 8) LRRK2-G2019S TgマウスのRPE層では、 α -synucleinが増加する。
- 9) LRRK2-G2019S Tgマウスでは、網膜電図において振幅の低下と潜時延長が生じる。

本研究は、AMDがPDと共通の病態メカニズムを有していることを示し、RPEの機能障害におけるLRRK2と α -synucleinの役割を明らかにした。RPEの機能障害は最終的にRPE-脈絡膜複合体の老化に伴う機能破綻を引き起こし、AMDの疾患進行を促進すると考えられる。AMDとPDに共通病態が存在することは、両者の病態機序の解明、発症予防、治療法の開発をさらに進める一助になると考える。

また、本研究の結果からLRRK2がAMDの病態生理に関する理解をさらに深めるための研究対象の一つであることが示され、将来的にAMDの治療のターゲットになることが期待される。滲出型AMDに対しては抗VEGF薬の硝子体注射や光線力学療法など治療法の選択肢があるが、これらを用いても病勢を制御できず、視力維持が困難な症例が多く存在する。また、萎縮型AMDに対する有効な治療法は未だ存在しないため、その治療法開発は現在の眼科領域におけるアンメットメディカルニーズである。まずは、LRRK2抑制によってRPEの機能障害が軽減できるかを検討するために、今後はLRRK2阻害剤を用いた検討を行っていきたい。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂き、多大なるご指導とご校閲を賜りました北海道大学大学院医学研究院眼科学教室 石田晋教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究にあたって直接ご指導を賜りました同教室 野田航介客員教授、村田美幸助教に厚く御礼を申し上げます。また、免疫染色についてのご助言をしてくださった北海道大学大学院医学研究院 神経病態学分野 神経内科学教室 矢部一郎教授、病理学講座 腫瘍病理学教室 種井善一助教に厚く御礼を申し上げます。また、動物実験の助言と支援をしてくださった吉田志帆技術補佐員、動物実験・免疫染色について支援をしてくださった西村萌美大学院生、動物実験について支援をしてくださった横井康一大学院生に心より感謝申し上げます。さらに研究を遂行するにあたり、環境を整えてくださった廣瀬育代技術補佐員、堀尾瑠奈技術補佐員に厚く御礼を申し上げます。最後に、公私ともにサポートして下さいました医局員、医局秘書、大学院の諸先輩方、大学院の仲間達、家族に心からの感謝を申し上げます。

利益相反

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究(B) (21H03091、23K21479)、株式会社デ・ウエスタン・セラピテクス研究所、AMOジャパン株式会社より助成を受けた。

引用文献

Bae E-J, Kim D-K, Kim C, Mante M, Adame A, Rockenstein E, Ulusoy A, Klinkenberg M, Jeong GR, Bae JR, et al (2018) LRRK2 kinase regulates α -synuclein propagation via RAB35 phosphorylation. *Nature Communications* 9, 3465.

Bae E-J and Lee S-J (2020) The LRRK2-RAB axis in regulation of vesicle trafficking and α -synuclein propagation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1866, 165632.

Carter-Dawson LD and LaVail MM (1979) Rods and cones in the mouse retina. II. Autoradiographic analysis of cell generation using tritiated thymidine. *J Comp Neurol* 188, 263-272.

Cascella R, Chen SW, Bigi A, Camino JD, Xu CK, Dobson CM, Chiti F, Cremades N and Cecchi C (2021) The release of toxic oligomers from α -synuclein fibrils induces dysfunction in neuronal cells. *Nature Communications* 12, 1814.

Chen CY, Weng YH, Chien KY, Lin KJ, Yeh TH, Cheng YP, Lu CS and Wang HL (2012) (G2019S) LRRK2 activates MKK4-JNK pathway and causes degeneration of SN dopaminergic neurons in a transgenic mouse model of PD. *Cell Death Differ* 19, 1623-1633.

Choi S, Jahng WJ, Park SM and Jee D (2020) Association of Age-Related Macular Degeneration on Alzheimer or Parkinson Disease: A Retrospective Cohort Study. *Am J Ophthalmol* 210, 41-47.

Chung SD, Ho JD, Hu CC, Lin HC and Sheu JJ (2014) Increased risk of Parkinson disease following a diagnosis of neovascular age-related macular degeneration: a retrospective cohort study. *Am J Ophthalmol* 157, 464-469.e461.

Di Maio R, Hoffman EK, Rocha EM, Keeney MT, Sanders LH, De Miranda BR, Zharikov A, Van Laar A, Stepan AF, Lanz TA, et al (2018) LRRK2 activation in idiopathic Parkinson's disease. *Science Translational Medicine* 10, eaar5429.

Du XY, Xie XX and Liu RT (2020) The Role of α -Synuclein Oligomers in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* 21.

Ejlertskov P, Rasmussen I, Nielsen TT, Bergström AL, Tohyama Y, Jensen PH and Vilhardt F (2013)

Tubulin polymerization-promoting protein (TPPP/p25 α) promotes unconventional secretion of α -synuclein through exophagy by impairing autophagosome-lysosome fusion. *J Biol Chem* 288, 17313-17335.

Etminan M, Samii A and He B (2018) Risk of Parkinson's disease in patients with neovascular age-related macular degeneration. *J Curr Ophthalmol* 30, 365-367.

Giguère N, Burke Nanni S and Trudeau LE (2018) On Cell Loss and Selective Vulnerability of Neuronal Populations in Parkinson's Disease. *Front Neurol* 9, 455.

Grisanti S and Tatar O (2008) The role of vascular endothelial growth factor and other endogenous interplayers in age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 27, 372-390.

Herzig MC, Kolly C, Persohn E, Theil D, Schweizer T, Hafner T, Stemmelen C, Troxler TJ, Schmid P, Danner S, et al (2011) LRRK2 protein levels are determined by kinase function and are crucial for kidney and lung homeostasis in mice. *Hum Mol Genet* 20, 4209-4223.

Jellinger KA (2004) Lewy body-related alpha-synucleinopathy in the aged human brain. *J Neural Transm (Vienna)* 111, 1219-1235.

Jensen EG, Jakobsen TS, Thiel S, Askou AL., and Corydon TJ (2020) Associations between the Complement System and Choroidal Neovascularization in Wet Age-Related Macular Degeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 21.

Jeong GR and Lee BD (2020) Pathological Functions of LRRK2 in Parkinson's Disease. *Cells* 9.

Lehmann GL, Benedicto I, Philp NJ, and Rodriguez-Boulan E (2014). Plasma membrane protein polarity and trafficking in RPE cells: past, present and future. *Exp Eye Res.* 2014 Sep;126:5-15.

Léveillard T, Mohand-Saïd S, Lorentz O, Hicks D, Fintz AC, Clérin E, Simonutti M, Forster V, Cavusoglu N, Chalmel F, et al (2004) Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. *Nat Genet* 36, 755-759.

Miyasaki JM, Martin W, Suchowersky O, Weiner WJ and Lang AE (2002) Practice parameter: initiation of treatment for Parkinson's disease: an evidence-based review: report of the Quality Standards Subcommittee

of the American Academy of Neurology. *Neurology* 58, 11-17.

Moore DJ, Hussain AA and Marshall J (1995) Age-related variation in the hydraulic conductivity of Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 1290-1297.

Nag TC (2021) Pathogenic mechanisms contributing to the vulnerability of aging human photoreceptor cells. *Eye (Lond)* 35, 2917-2929.

O'Hara DM, Pawar G, Kalia SK and Kalia LV (2020) LRRK2 and α -Synuclein: Distinct or Synergistic Players in Parkinson's Disease? *Frontiers in neuroscience* 14, 577-577.

Okubo A, Rosa RH, Jr., Bunce CV, Alexander RA, Fan JT, Bird AC and Luthert PJ (1999) The relationships of age changes in retinal pigment epithelium and Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 443-449.

Qing H, Wong W, McGeer EG and McGeer PL (2009) Lrrk2 phosphorylates alpha synuclein at serine 129: Parkinson disease implications. *Biochem Biophys Res Commun* 387, 149-152.

Ramonet D, Daher JP, Lin BM, Stafa K, Kim J, Banerjee R, Westerlund M, Pletnikova O, Glauser L, Yang L, et al (2011) Dopaminergic neuronal loss, reduced neurite complexity and autophagic abnormalities in transgenic mice expressing G2019S mutant LRRK2. *PLoS One* 6, e18568.

Rocha EM, De Miranda B and Sanders LH (2018) Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 109, 249-257.

Smith WW, Margolis RL, Li X, Troncoso JC, Lee MK, Dawson VL, Dawson TM, Iwatsubo T and Ross CA (2005) Alpha-synuclein phosphorylation enhances eosinophilic cytoplasmic inclusion formation in SH-SY5Y cells. *J Neurosci* 25, 5544-5552.

Tran C, Shen K, Liu K, Ashok A, Ramirez-Zamora A, Chen J, Li Y and Fang R (2024) Deep learning predicts prevalent and incident Parkinson's disease from UK Biobank fundus imaging. *Sci Rep* 14, 3637.

Uchida A, Pillai JA, Bernel R, Jones SE, Fernandez H, Leverenz JB, Srivastava SK and Ehlers JP (2020) Correlation between brain volume and retinal photoreceptor outer segment volume in normal aging and neurodegenerative diseases. *PloS one* 15, e0237078-e0237078.

Usmani A, Shavarebi F and Hiniker A (2021) The Cell Biology of LRRK2 in Parkinson's Disease. *Mol Cell Biol* 41.

Veys L, Vandenabeele M, Ortuño-Lizarán I, Baekelandt V, Cuenca N, Moons L and De Groef L (2019) Retinal α -synuclein deposits in Parkinson's disease patients and animal models. *Acta Neuropathologica* 137, 379-395.

Volta M, Cataldi S, Beccano-Kelly D, Munsie L, Tatarnikov I, Chou P, Bergeron S, Mitchell E, Lim R, Khinda J, et al (2015) Chronic and acute LRRK2 silencing has no long-term behavioral effects, whereas wild-type and mutant LRRK2 overexpression induce motor and cognitive deficits and altered regulation of dopamine release. *Parkinsonism Relat Disord* 21, 1156-1163.

von Linstow CU, DeLano-Taylor M, Kordower JH and Brundin P (2020) Does Developmental Variability in the Number of Midbrain Dopamine Neurons Affect Individual Risk for Sporadic Parkinson's Disease? *Journal of Parkinson's Disease* 10, 405-411.

Vyawahare H and Shinde P (2022) Age-Related Macular Degeneration: Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Cureus* 14, e29583.

Wong YC and Krainc D (2017) α -synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. *Nat Med* 23, 1-13.

Xiong Y, Neifert S, Karuppagounder SS, Stankowski JN, Lee BD, Grima JC, Chen G, Ko HS, Lee Y, Swing D, et al (2017) Overexpression of Parkinson's Disease-Associated Mutation LRRK2 G2019S in Mouse Forebrain Induces Behavioral Deficits and α -Synuclein Pathology. *eNeuro* 4.

Yue M, Hinkle KM, Davies P, Trushina E, Fiesel FC, Christenson TA, Schroeder AS, Zhang L, Bowles E, Behrouz B, et al (2015) Progressive dopaminergic alterations and mitochondrial abnormalities in LRRK2 G2019S knock-in mice. *Neurobiology of Disease* 78, 172-195.

Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, et al (2004) Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44, 601-607.

川上文貴,市川 尊文(2016)生化学 88,248-252.

澤村正典,上村 紀仁,高橋良輔(2017) α シヌクレイン凝集・伝播と細胞死. 医学のあゆみ 262, 585-589

眼 の 構 造 . In 公 益 社 団 法 人 日 本 眼 科 学 会 ,
<https://www.nichigan.or.jp/public/disease/structure/item01.html>(2024年5月31日参照)