



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_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 水門 由佳

学 位 論 文 題 名

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)

【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、タンパク量、 α -synucleinのリン酸化の変化を定量的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どうかを検討した。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-G2019Sを過剰発現させると 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綻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。