

Fig. 1. Separation of monkey retina proteins on 2D gels. Proteins extracted from the peripheral retina and macula (300 μ g each) were isoelectrically focused at four different pH ranges; pH 3–10 (A), 4–7 (B), 5–8 (C), 7–10 (D). Then the IPG strips were separated on 12% SDS-page gels and stained by SYPRO Ruby. Forty spots marked by spot IDs were unique to the macula gel images and identified by LC-MS/MS. Boxed areas (a–f, Peripheral-SYPRO Ruby; a'–f', Macula-SYPRO Ruby) correspond to the enlarged images in Fig. 2. Two dimensional gels of peripheral retina were also stained by Bio-safe Coomassie. Forty-six spots marked by spot number were identified by LC-MS/MS.

salted prior to the IEF separation by Ready Prep 2D cleanup kit using TCA (trichloroacetic acid) acetone precipitation which resulted in successful separations. To obtain a further separation, the pH range of the 2D gel electrophoresis was narrowed to three ranges; 4–7, 5–8, and 7–10 (Fig. 1B–D). Among gel images for both the macula and peripheral retina, fluorescence from spots of abundant proteins were saturated and showed indistinct spot boundaries. Excess proteins contained in the samples were not concentrated at one spot by 2D gel electrophoresis and showed streaking and outliers. To exclude these proteins which were identified from seemingly macular specific spots, abundant proteins were identified. To clarify the outline of saturated spots, gels of peripheral retina were stained with Bio-safe Coomassie. Forty-nine proteins were identified from forty-six spots in the Coomassie stained gel image of the pH 3–10 range (Fig. 1A, Peripheral Coomassie). The proteins are listed in Table 1. Forty-eight known proteins from earlier proteomic studies of the retina were identified [1, 5, 15, 49, 50]. The neurofilament triplet L protein identified in our study has not been previously identified by the proteomic approach but it has been reported in a SAGE analysis [35]. The 49 proteins were expressed in both the macula and peripheral retina, while 26 proteins were identified from 40 spots in macula gel images (Table 2). Twenty-three of these were also reported in previous proteomic studies of the retina [1, 5, 10, 15, 22, 50]. The other three proteins are known to be ubiquitously expressed in cells [8, 11]. Therefore, these proteins were not macula specific but widely expressed in the retina.

Validation of macula enriched proteins

To obtain the relative expression levels of the identified proteins, western blot analysis was performed on the following five proteins identified by mass spectrometry: tropomyosin 1 α chain (Fig. 2A and 2E), γ -synuclein (Fig. 2B), E-FABP (Fig. 2C), arrestin-C (Fig. 2D), and hnRNPs A2/B1 (Fig. 2F). Arrestin-C has been identified as a cone photoreceptor-specific protein [33], and thus served as a positive control for this study. γ -Synuclein is a protein known to be up-regulated in cancer cells [20]. hnRNPs A2/B1 is also known to be up-regulated in carcinoma cells [42]. E-FABP is a reactive lipid scavenger [2]. Four proteins, including arrestin-C,

were confirmed to have higher expression in the macula by western blotting. Tropomyosin 1 α chain has been reported to have many isoforms by alternative splicing [34]. MS/MS data from spot M2 (Fig. 1A, Macula SY-PRO Ruby) identified the peptide sequence CAEL-EEELK, which corresponded to isoform 1 (skeletal muscle type) or isoform 5 (brain type, TMBR-3) of tropomyosin 1 α chain in the UniProtKB/Swiss-Prot database. Based on these data, western blotting was performed using two antibodies for tropomyosin 1 α chain. The anti-tropomyosin antibody TM311 detects 19 amino acids in exon 1a of the tropomyosin gene family in mammalian tissues, viz., alpha-, beta-, gamma-, delta- tropomyosin, including the skeletal muscle type but it does not detect the brain type (TMBR-3), because TMBR-3 doesn't contain exon 1a in transcription sequence. The other antibodies used were specific to the brain isoforms TMBR-1 and TMBR-3 [34]. Signals of TMBR-1 were not detected in samples from the two retinal regions by western blotting (data not shown). The signals of TMBR-3 were not significantly different, and the signals to TM311 were found to be different between the two regions.

Tissue localization of macula enriched proteins

To determine the location of the 5 proteins in the macula, immunohistochemistry was performed using antibodies against each protein (Fig. 3). Arrestin-C was detected in photoreceptor outer segments and the outer plexiform layer (Fig. 3B) as previously reported [33]. γ -Synuclein was detected in RGCs in the nerve fiber layer (Fig. 3D), which confirms the result of a previous study [43]. E-FABP was predominantly detected in the outer plexiform layer and external limiting membrane, which exists between the outer nuclear layer and the photoreceptor layer (Fig. 3G). Our observation is consistent with that of an earlier study by Kingma *et al.* reporting the localization of E-FABP to Müller cells [21], which are dense in the parafovea [7]. hnRNPs A2/B1 was located in the nucleus of cells in the retinal ganglion cell layer, the inner nuclear layer, the outer nuclear layer, and the RPE with different intensities (Fig. 3E). TM311 was detected in the choroidal layer (Fig. 3F), while tropomyosin Br-3 was located in photoreceptor inner segments and the outer plexiform layer (Fig. 3C). To determine the localization of tropomyosin detected by TM311

Table 1. Proteins identified in 46 spots of Coomassie-stained gel

Spot No. ^{a)}	Protein name	Database accession No. ^{b)}	MW (kDa) ^{c)}	pI ^{c)}	Sequence coverage (%)	No. of peptide
1	Heat shock protein HSP 90-alpha	P07900	84.5	4.94	10.53	7
1	Heat shock protein HSP 90-beta	P08238	83.1	4.97	6.09	4
2	Heat shock cognate 71 kDa protein	P11142	70.9	5.37	29.41	17
2	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A, ubiquitous isoform	P38606	68.3	5.35	20.75	10
2	Lamin B2	Q03252	67.7	5.29	17.67	9
2	Heat shock 70 kDa protein 1	P08107	70.1	5.48	16.54	9
2	Stress-70 protein, mitochondrial	P38646	73.7	5.87	9.57	5
3	Stress-70 protein, mitochondrial	P38646	73.7	5.87	8.25	4
3	Serum albumin	P02768	69.4	5.92	6.9	4
4	Serum albumin	P02768	69.4	5.92	6.9	3
5	Serum albumin	P02768	69.4	5.92	7.39	4
6	Serum albumin	P02768	69.4	5.92	3.94	2
7	Serotransferrin	P02787	77.1	6.81	3.72	2
8	Neurofilament triplet L protein	P07196	61.4	4.64	23.99	13
9	Calreticulin	P27797	48.1	4.29	15.59	6
10	Protein disulfide-isomerase	P07237	57.1	4.76	5.12	2
11	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	61.1	5.7	15.36	8
11	Pyruvate kinase, isozymes M1/M2	P14618	57.8	7.95	3.58	2
12	Vimentin	P08670	53.5	5.06	39.57	15
13	Vacuolar ATP synthase subunit B, brain isoform	P21281	56.5	5.57	5.09	2
14	Vacuolar ATP synthase subunit B, brain isoform	P21281	56.5	5.57	7.24	3
15	Tubulin alpha-3 chain	Q71U36	50.1	4.94	17.29	7
15	Tubulin alpha-1 chain	P68366	49.9	4.95	14.96	6
16	S-arrestin	P10523	45.1	6.14	3.7	1
17	S-arrestin	P10523	45.1	6.14	19.01	7
18	S-arrestin	P10523	45.1	6.14	22.96	8
19	Tubulin beta-2C chain	P68371	49.8	4.79	19.55	8
19	Tubulin beta-2 chain	P07437	49.7	4.78	18.92	8
19	Tubulin beta-3 chain	Q13509	50.4	4.83	16.89	7
19	Tubulin beta-6 chain	Q9BUF5	49.9	4.77	11.88	5
20	ATP synthase beta chain, mitochondrial	P06576	56.6	5.26	25.9	8
21	Gamma-enolase	P09104	47.1	4.91	12.47	5
22	Eukaryotic initiation factor 4A-II	Q14240	46.4	5.33	16.22	5
22	Eukaryotic initiation factor 4A-I	P60842	46.2	5.32	12.56	4
23	Alpha-enolase	P06733	47	6.99	31.41	9
24	Alpha-enolase	P06733	47	6.99	24.71	9
25	Alpha-enolase	P06733	47	6.99	14.32	6
26	Alpha-enolase	P06733	47	6.99	22.86	8
27	Actin, cytoplasmic 1	P60709	41.7	5.29	16.53	5
27	Actin, cytoplasmic 2	P63261	41.8	5.31	16.53	5
27	Actin, gamma-enteric smooth muscle	P63267	41.9	5.31	11.7	4
27	Actin, aortic smooth muscle	P62736	42	5.24	11.67	4
28	Creatine kinase B-type	P12277	42.6	5.34	14.17	4
29	Glutamine synthetase	P15104	41.9	6.42	6.45	3
30	Glutamine synthetase	P15104	41.9	6.42	24.73	8
31	Glutamine synthetase	P15104	41.9	6.42	6.45	2
32	L-lactate dehydrogenase B chain	P07195	36.5	5.72	7.51	2
33	L-lactate dehydrogenase B chain	P07195	36.5	5.72	27.03	7
34	L-lactate dehydrogenase B chain	P07195	36.5	5.72	39.04	11
35	Cellular retinaldehyde-binding protein	P12271	36.3	4.98	22.15	6
36	Inorganic pyrophosphatase	Q15181	32.7	5.54	11.76	3
36	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) beta subunit 1	P62873	37.2	5.6	6.49	2
37	Inorganic pyrophosphatase	Q15181	32.7	5.54	14.88	4
37	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) beta subunit 1	P62873	37.2	5.6	11.5	4
38	Malate dehydrogenase, mitochondrial	P40926	35.5	8.92	19.82	6
38	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04406	35.9	8.58	10.78	3
39	14-3-3 protein epsilon	P62258	29.2	4.63	14.51	3
40	14-3-3 protein zeta/delta	P63104	27.7	4.73	14.69	3
40	14-3-3 protein theta	P27348	27.8	4.68	14.69	3
40	14-3-3 protein gamma	P61981	28.2	4.8	13.82	3
41	Recoverin	P35243	23	5.06	10.05	2
42	ATP synthase delta chain, mitochondrial	P30049	17.5	5.38	5.36	1
43	Alpha crystallin A chain	P02489	19.9	5.77	16.76	3
44	Hemoglobin beta subunit	P68871	15.9	6.81	22.6	3
45	Hemoglobin beta subunit	P68871	15.9	6.81	22.6	3
46	Hemoglobin alpha subunit	P69905	15.1	8.73	23.4	3

^{a)}Spot numbers correspond to the numbers on gel images in Fig. 1 (Peripheral-Coomassie). ^{b)}Accession No. corresponds to UniProtKB/Swiss-prot database. ^{c)}MW and pI are theoretical scores.

Table 2. Proteins identified in 40 spots detected only in macular gels

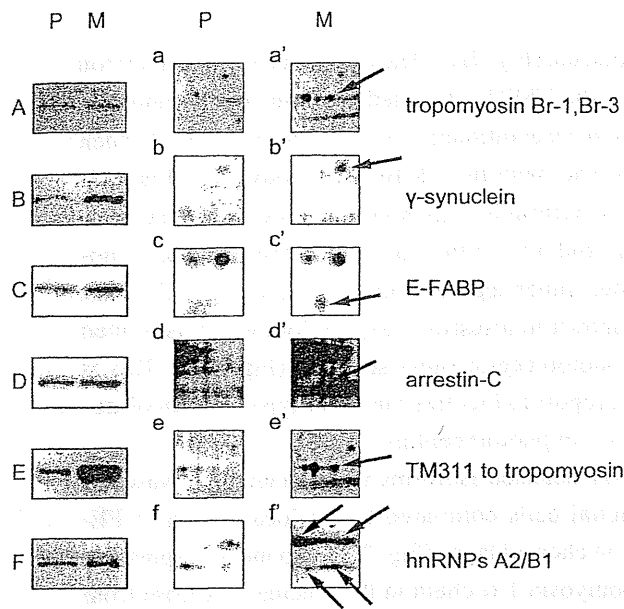
Spot No. ^{a)}	Protein name	Database accession No. ^{b)}	MW (kDa) ^{c)}	pI ^{c)}	Sequence coverage (%)	No. of peptide
M1	Pyruvate kinase, isozymes M1/M2	P14618	32.7	4.69	18.11	8
M2	Tropomyosin 1 alpha chain	P09493	32.7	4.69	13.73	5
M2	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	P07910	33.7	4.95	16.67	4
M3	Transaldolase	P37837	37.5	6.36	16.62	5
M3	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1	O95861	33.4	5.46	10.06	3
M4	Poly(rC)-binding protein 1	Q15365	37.5	6.66	16.85	5
M5	Crk-like protein	P46109	33.8	6.26	7.59	2
M6	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	P22626	37.4	8.97	4.53	1
M7	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	P22626	37.4	8.97	11.9	3
M8	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	P45880	38.1	6.32	9.8	3
M9	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	30.6	8.63	7.8	2
M10	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	30.6	8.63	15.6	3
M11	Endoplasmic reticulum protein ERp29	P30040	29	6.77	27.59	6
M12	Guanylate kinase	Q16774	21.6	6.11	13.27	2
M13	Guanylate kinase	Q16774	21.6	6.11	19.39	3
M14	Gamma-synuclein	O76070	13.3	4.97	12.6	1
M15	Fatty acid-binding protein, epidermal	Q01469	15	6.8	21.64	3
M16	Arrestin-C	P36575	42.8	5.53	14.95	4
M17	Arrestin-C	P36575	42.8	5.53	4.64	1
M18	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha	P50213	39.6	6.46	22.4	7
M18	Transaldolase	P37837	37.5	6.36	15.73	5
M19	Tropomyosin 1 alpha chain	P09493	32.7	4.69	14.79	3
M19	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	P07910	33.7	4.95	12.75	3
M20	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit	P11177	39.2	6.2	31.75	8
M21	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	P11413	59.1	6.44	5.84	3
M22	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	P11413	59.1	6.44	9.73	5
M23	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	P11413	59.1	6.44	12.65	6
M24	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	O00231	47.3	6.09	23.04	8
M25	Elongation factor Tu	P49411	49.5	7.26	10.62	4
M26	Elongation factor Tu	P49411	49.5	7.26	4.87	2
M27	Alpha-centractin	P61163	42.6	6.19	8.78	2
M28	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	P07910	33.7	4.95	16.01	4
M29	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	P07910	33.7	4.95	22.55	6
M30	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	P31942	36.9	6.37	11.27	3
M31	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	30.6	8.63	19.5	4
M31	Esterase D	P10768	31.5	6.54	4.61	1
M32	Pyruvate kinase, isozymes M1/M2	P14618	57.8	7.95	33.21	14
M33	Pyruvate kinase, isozymes M1/M2	P14618	57.8	7.95	29.43	13
M34	Aspartate aminotransferase	P17174	46.1	6.57	8.74	3
M35	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	P22626	37.4	8.97	9.92	3
M36	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	P22626	37.4	8.97	9.92	3
M37	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	P22626	37.4	8.97	7.37	2
M38	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	P22626	37.4	8.97	7.37	2
M39	Phosphoglycerate mutase 1	P18669	28.7	6.75	8.3	2
M40	Superoxide dismutase [Mn]	P04179	24.7	8.35	10.36	2

^{a)}Spot ID corresponds to the numbers on gel images in Fig. 1 (Macula-SYPRO Ruby). ^{b)}Accession No. corresponds to UniProtKB/Swiss-prot database. ^{c)}MW and pI are theoretical scores.

in the choroidal layer more specifically, sections were labeled with anti-PECAM1 antibody (Fig. 3H). PECAM1 is an adhesion molecule expressed at intercellular junctions between vascular endothelial cells [24] (Fig. 3J and 3K, green). Tropomyosin detected by TM311 (red) was expressed adjacent to PECAM1 (Fig. 3I and 3K).

Discussion

In this study, we identified and validated of proteins expressed in the macula and peripheral retina. The method, 2D gel electrophoresis, limits detection to proteins in aqueous soluble form. Nevertheless, a number



of proteins highly expressed in the macula were found.

One of the identified proteins was arrestin-C, which is known to be highly expressed in cone photoreceptors, which are densely located in the primate macula [6]. Previous SAGE analyses of the retina by Bowes Rickman *et al.* [3] have shown 1.4-fold higher transcription of arrestin-C in the macula compared to the peripheral

Fig. 2. Western blot of 5 proteins. Five micrograms of each sample from the peripheral retina and macula were loaded onto SDS-page gel (for γ -synuclein, 15 μ g loading). After transferring to a PVDF membrane, the proteins were detected with antibodies specific to tropomyosin Br-1, Br-3 (A), γ -synuclein (B), E-FABP (C), arrestin-C (D), TM311 to tropomyosin (E), hnRNPs A2/B1 (F). Pieces of gel images (a-f, a'-f') correspond with the boxed areas in Fig. 1 (Peripheral-SYPRO Ruby and Macula-SYPRO Ruby). Lane P, peripheral retina; Lane M, macula.

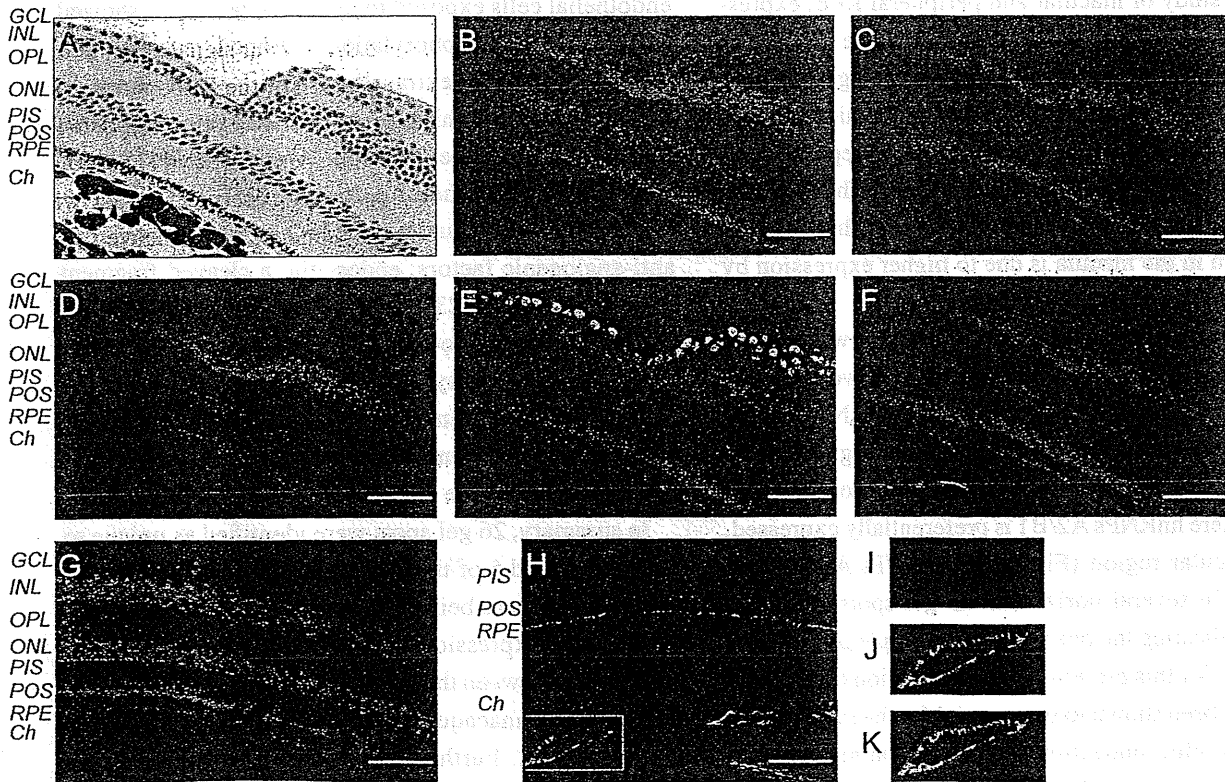


Fig. 3. Tissue localization of macula enriched proteins. Four-micrometer paraffin sections of monkey retina were stained with hematoxylin and eosin (A), other sections were labeled with antibodies specific to arrestin-C (B), tropomyosin Br-1, Br-3 (C), γ -synuclein (D), hnRNPs A2/B1 (E), TM311 to tropomyosin (F), and E-FABP (G). Tropomyosin was detected by TM311 in the choroidal layer (H). Boxed area in (H) is enlarged; labeled with antibodies specific to TM311 (red) (I), PECAM1 (green) (J), and merged (K). GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer; PIS, photoreceptor inner segment; POS, photoreceptor outer segment; RPE, retinal pigment epithelial; Ch, choroid. (Bar, 50 μ m)

retina in humans. Another protein that was identified in macular unique spots was 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1 (Table 2, M3), which has also been identified by SAGE as being highly expressed in cone photoreceptors [3]. Identification of these cone photoreceptor rich proteins indicates that the present proteomic analysis was methodologically effective for identifying proteins richly expressed in the macula. It also suggests the higher protein level in the macula may be due to a higher density of specific cell types expressing specific proteins. Previous studies have shown arrestin-C expression in cones [33], γ -synuclein expression in RGCs [43], and E-FABP expression in Müller cells [21]. Although these proteins have been identified in not only specific cell types or compartments in the retina [1, 10, 15, 22, 50], the majority were localized in particular cell layers in the retina (Fig. 3B, 3D, and 3G). In a comparative transcription study of macular and peripheral RPE, expression of E-FABP was 6.3-fold higher in the peripheral RPE compared to macular RPE in middle-aged humans [48]. Our immunostaining showed predominant localization of E-FABP in the neural retina, except the photoreceptors (Fig. 3G), which is consistent with the results of Kingma *et al.* [21]. Our observation of higher E-FABP expression in the macula is due to higher expression by the neural retina, not the RPE.

Immunostaining revealed hnRNPs A2/B1 was present in every retinal nucleus layer (Fig. 3E). However, western blots showed higher expression of hnRNPs A2/B1 in the macula than in the peripheral retina (Fig. 2F). This may be explained by a higher concentration of RGC layers, where hnRNPs A2/B1 is preferentially expressed, in the macular region (Fig. 3E). hnRNPs A2/B1 was identified in several horizontal 2D gel spots (Fig. 1D, box. f') indicating the possibility of multiple phosphorylation sites for this protein. Phosphorylation of hnRNPs A2/B1 has been shown to be essential for the myelination of the axon-glia connection [51]. A similar myelination role is expected for hnRNPs A2/B1 in the RGCs.

In this study, two types of antibodies for tropomyosin isoforms were used. The brain-type isoform of tropomyosin detected by TMBr-3 antibody was not differentially expressed between the macula and peripheral retina (Fig. 2A), however tropomyosin detected by TM311 antibody showed remarkably higher expression

in the macula (Fig. 2E). The difference in the expression level of the TM311-detected isoforms of tropomyosin resulted in an additional spot in the macula 2D gel which did not react with the TMBr-3 antibody. The TMBr-3-detected isoform is expressed in all regions of the brain [12, 41] and also in the outer plexiform layer and photoreceptor inner segments of the retina (Fig. 3C). This is in contrast to arrestin-C expression, which is limited to the photoreceptor outer segment (Fig. 3B). This is the first report to localize the brain-type isoform of tropomyosin in photoreceptors.

TM311 detected isoforms were localized to vascular endothelial cells compared to the localization of PECAM1 in choroid layer (Fig. 3H). Abundant expression of tropomyosin 1 α chain in the macula may arise from the higher capillary density in the choroidal layer of the fovea [30]. An earlier study, using human umbilical vein endothelial cells exposed to hydrogen peroxide, showed an increase in phosphorylation of tropomyosin through the activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway. Inhibition of the ERK pathway results in disruption of the endothelial layer and a two-fold increase in transendothelial permeability [17]. Tropomyosin has been previously described to interact with two anti-angiogenic factors, endostatin, a cleaved fragment of collagen XVIII [23], and high molecular weight kininogen [52]. Both proteins exhibit anti-angiogenic effect by binding to tropomyosin. Thus, tropomyosin may play an inhibitory role in increasing permeability or angiogenesis in the macula. Angiogenesis is a pathological finding often observed in the advanced stage of AMD [13].

In summary, 26 gel spots were identified as unique to the macula and 5 of these proteins were also confirmed by western blot as being richly expressed in the macula. Differential expression is likely due to morphological differences between the macula and the peripheral retina. The retina of macaque monkeys is almost identical to that of humans. Further understanding of these proteins should provide valuable information about the onset and progression of macular diseases in humans.

Acknowledgments

The authors thank Professor Duco Hamasaki for critical reading of the manuscript and helpful comments.

This study was funded in part by a grant to TI from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan and by a grant to HO from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (KAKENHI 19791305).

References

- Alge, C.S., Suppmann, S., Priglinger, S.G., Neubauer, A.S., May, C.A., Hauck, S., Welge-Lüssen, U., Ueffing, M., and Kampik, A. 2003. Comparative proteome analysis of native differentiated and cultured dedifferentiated human RPE cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44: 3629–3641.
- Bennaars-Eiden, A., Higgins, L., Hertzell, A.V., Kapphahn, R.J., Ferrington, D.A., and Bernlohr, D.A. 2002. Covalent modification of epithelial fatty acid-binding protein by 4-hydroxynonenal in vitro and in vivo. Evidence for a role in antioxidant biology. *J. Biol. Chem.* 277: 50693–50702.
- Bowes Rickman, C., Ebright, J.N., Zavodni, Z.J., Yu, L., Wang, T., Daiger, S.P., Wistow, G., Boon, K., and Hauser, M.A. 2006. Defining the human macula transcriptome and candidate retinal disease genes using EyeSAGE. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47: 2305–2316.
- Butt, R.H., Pfeifer, T.A., Delaney, A., Grigliatti, T.A., Tetzlaff, W.G., and Coorsen, J.R. 2007. Enabling coupled quantitative genomics and proteomics analyses from rat spinal cord samples. *Mol. Cell. Proteomics* 6: 1574–1588.
- Cavusoglu, N., Thierse, D., Mohand-Said, S., Chalmel, F., Poch, O., Van-Dorselaer, A., Sahel, J.A., and Leveillard, T. 2003. Differential proteomic analysis of the mouse retina: the induction of crystallin proteins by retinal degeneration in the rd1 mouse. *Mol. Cell. Proteomics* 2: 494–505.
- Curcio, C.A., Allen, K.A., Sloan, K.R., Lerea, C.L., Hurley, J.B., Klock, I.B., and Milam, A.H. 1991. Distribution and morphology of human cone photoreceptors stained with anti-blue opsin. *J. Comp. Neurol.* 312: 610–624.
- Distler, C. and Dreher, Z. 1996. Glia cells of the monkey retina—II. Müller cells. *Vision Res.* 36: 2381–2394.
- Dreyfuss, G., Kim, V.N., and Kataoka, N. 2002. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3: 195–205.
- El-Mofty, A., Gouras, P., Eisner, G., and Balazs, E.A. 1978. Macular degeneration in rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Exp. Eye Res.* 27: 499–502.
- Ethen, C.M., Reilly, C., Feng, X., Olsen, T.W., and Ferrington, D.A. 2006. The proteome of central and peripheral retina with progression of age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47: 2280–2290.
- Feller, S.M. 2001. Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene* 20: 6348–6371.
- Had, L., Faivre-Sarrailh, C., Legrand, C., Mery, J., Brugidou, J., and Rabie, A. 1994. Tropomyosin isoforms in rat neurons: the different developmental profiles and distributions of TM-4 and TMBr-3 are consistent with different functions. *J. Cell Sci.* 107: 2961–2973.
- Haddad, S., Chen, C.A., Santangelo, S.L., and Seddon, J.M. 2006. The genetics of age-related macular degeneration: a review of progress to date. *Surv. Ophthalmol.* 51: 316–363.
- Harwerth, R.S. and Smith, E.L. 3rd. 1985. Rhesus monkey as a model for normal vision of humans. *Am. J. Optom. Physiol. Opt.* 62: 633–641.
- Hauck, S.M., Schoeffmann, S., Deeg, C.A., Gloeckner, C.J., Swiatek-de Lange, M., and Ueffing, M. 2005. Proteomic analysis of the porcine interphotoreceptor matrix. *Proteomics* 5: 3623–3636.
- Hope, G.M., Dawson, W.W., Engel, H.M., Ulshafer, R.J., Kessler, M.J., and Sherwood, M.B. 1992. A primate model for age related macular drusen. *Br. J. Ophthalmol.* 76: 11–16.
- Houle, F., Rousseau, S., Morrice, N., Luc, M., Mongrain, S., Turner, C.E., Tanaka, S., Moreau, P., and Huot, J. 2003. Extracellular signal-regulated kinase mediates phosphorylation of tropomyosin-1 to promote cytoskeleton remodeling in response to oxidative stress: impact on membrane blebbing. *Mol. Biol. Cell* 14: 1418–1432.
- Ishibashi, K., Tian, J., and Handa, J.T. 2004. Similarity of mRNA phenotypes of morphologically normal macular and peripheral retinal pigment epithelial cells in older human eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45: 3291–3301.
- Ishibashi, T., Sorgente, N., Patterson, R., and Ryan, S.J. 1986. Pathogenesis of drusen in the primate. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 27: 184–193.
- Ji, H., Liu, Y.E., Jia, T., Wang, M., Liu, J., Xiao, G., Joseph, B.K., Rosen, C., and Shi, Y.E. 1997. Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing. *Cancer Res.* 57: 759–764.
- Kingma, P.B., Bok, D., and Ong, D.E. 1998. Bovine epidermal fatty acid-binding protein: determination of ligand specificity and cellular localization in retina and testis. *Biochemistry (Mosc)* 37: 3250–3257.
- Liu, Q., Tan, G., Levenkova, N., Li, T., Pugh, E.N. Jr., Rux, J.J., Speicher, D.W., and Pierce, E.A. 2007. The proteome of the mouse photoreceptor sensory cilium complex. *Mol. Cell. Proteomics* 6: 1299–1317.
- MacDonald, N.J., Shivers, W.Y., Narum, D.L., Plum, S.M., Wingard, J.N., Fuhrmann, S.R., Liang, H., Holland-Linn, J., Chen, D.H., and Sim, B.K. 2001. Endostatin binds tropomyosin. A potential modulator of the antitumor activity of endostatin. *J. Biol. Chem.* 276: 25190–25196.
- Matsubara, T.A., Murata, T.A., Wu, G.S., Barron, E.A., and Rao, N.A. 2000. Isolation and culture of rat retinal microvessel endothelial cells using magnetic beads coated with antibodies to PECAM-1. *Curr. Eye Res.* 20: 1–7.
- Monaco, W.A. and Wormington, C.M. 1990. The rhesus monkey as an animal model for age-related maculopathy. *Optom. Vis. Sci.* 67: 532–537.
- Nicolas, M.G., Fujiki, K., Murayama, K., Suzuki, M.T., Mineki, R., Hayakawa, M., Yoshikawa, Y., Cho, F., and Kanai, A. 1996. Studies on the mechanism of early onset macular degeneration in cynomolgus (*Macaca fascicularis*) monkeys. I. Abnormal concentrations of two proteins in the retina. *Exp. Eye Res.* 62: 211–219.

27. Nicolas, M.G., Fujiki, K., Murayama, K., Suzuki, M.T., Shindo, N., Hotta, Y., Iwata, F., Fujimura, T., Yoshikawa, Y., Cho, F., and Kanai, A. 1996. Studies on the mechanism of early onset macular degeneration in cynomolgus monkeys. II. Suppression of metallothionein synthesis in the retina in oxidative stress. *Exp. Eye Res.* 62: 399–408.
28. Nishizawa, Y., Komori, N., Usukura, J., Jackson, K.W., Tobin, S.L., and Matsumoto, H. 1999. Initiating ocular proteomics for cataloging bovine retinal proteins: microanalytical techniques permit the identification of proteins derived from a novel photoreceptor preparation. *Exp. Eye Res.* 69: 195–212.
29. Ordy, J.M., Brizee, K.R., and Hanschek, J. 1980. Visual acuity and foveal cone density in the retina of the aged rhesus monkey. *Neurobiol. Aging* 1: 133–140.
30. Oyster, C.W. 1999. *The Human Eye: Structure and Function*, Sinauer Associates Inc., Massachusetts.
31. Provis, J.M., Penfold, P.L., Cornish, E.E., Sandercoe, T.M., and Madigan, M.C. 2005. Anatomy and development of the macula: specialisation and the vulnerability to macular degeneration. *Clin. Exp. Optom.* 88: 269–281.
32. Radeke, M.J., Peterson, K.E., Johnson, L.V., and Anderson, D.H. 2007. Disease susceptibility of the human macula: differential gene transcription in the retinal pigmented epithelium/choroid. *Exp. Eye Res.* 85: 366–380.
33. Sakuma, H., Inana, G., Murakami, A., Higashide, T., and McLaren, M.J. 1996. Immunolocalization of X-arrestin in human cone photoreceptors. *FEBS Lett.* 382: 105–110.
34. Schevzov, G., Vrhovski, B., Bryce, N.S., Elmir, S., Qiu, M.R., O'Neill, G.M., Yang, N., Verrills, N.M., Kavallaris, M., and Gunning, P.W. 2005. Tissue-specific tropomyosin isoform composition. *J. Histochem. Cytochem.* 53: 557–570.
35. Sharon, D., Blackshaw, S., Cepko, C.L., and Dryja, T.P. 2002. Profile of the genes expressed in the human peripheral retina, macula, and retinal pigment epithelium determined through serial analysis of gene expression (SAGE). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 315–320.
36. Snodderly, D.M., Auran, J.D., and Delori, F.C. 1984. The macular pigment. II. Spatial distribution in primate retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25: 674–685.
37. Snodderly, D.M., Brown, P.K., Delori, F.C., and Auran, J.D. 1984. The macular pigment. I. Absorbance spectra, localization, and discrimination from other yellow pigments in primate retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25: 660–673.
38. Snodderly, D.M., Weinhaus, R.S., and Choi, J.C. 1992. Neural-vascular relationships in central retina of macaque monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Neurosci.* 12: 1169–1193.
39. Stafford, T.J. 1974. Maculopathy in an elderly sub-human primate. *Mod. Probl. Ophthalmol.* 12: 214–219.
40. Stafford, T.J., Anness, S.H., and Fine, B.S. 1984. Spontaneous degenerative maculopathy in the monkey. *Ophthalmology* 91: 513–521.
41. Stamm, S., Casper, D., Lees-Miller, J.P., and Helfman, D.M. 1993. Brain-specific tropomyosins TMB-1 and TMB-3 have distinct patterns of expression during development and in adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 9857–9861.
42. Sueoka, E., Goto, Y., Sueoka, N., Kai, Y., Kozu, T., and Fujiki, H. 1999. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 as a new marker of early detection for human lung cancers. *Cancer Res.* 59: 1404–1407.
43. Surguchov, A., McMahan, B., Masliah, E., and Surgucheva, I. 2001. Synucleins in ocular tissues. *J. Neurosci. Res.* 65: 68–77.
44. Suzuki, M.T., Terao, K., and Yoshikawa, Y. 2003. Familial early onset macular degeneration in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Primates* 44: 291–294.
45. Umeda, S., Ayyagari, R., Allikmets, R., Suzuki, M.T., Karoukis, A.J., Ambasudhan, R., Zernant, J., Okamoto, H., Ono, F., Terao, K., Mizota, A., Yoshikawa, Y., Tanaka, Y., and Iwata, T. 2005. Early-onset macular degeneration with drusen in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) pedigree: exclusion of 13 candidate genes and loci. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: 683–691.
46. Umeda, S., Ayyagari, R., Suzuki, M.T., Ono, F., Iwata, F., Fujiki, K., Kanai, A., Takada, Y., Yoshikawa, Y., Tanaka, Y., and Iwata, T. 2003. Molecular cloning of ELOVL4 gene from cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Exp. Anim.* 52: 129–135.
47. Umeda, S., Suzuki, M.T., Okamoto, H., Ono, F., Mizota, A., Terao, K., Yoshikawa, Y., Tanaka, Y., and Iwata, T. 2005. Molecular composition of drusen and possible involvement of anti-retinal autoimmunity in two different forms of macular degeneration in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *FASEB J.* 19: 1683–1685.
48. van Soest, S.S., de Wit, G.M., Essing, A.H., ten Brink, J.B., Kamphuis, W., de Jong, P.T., and Bergen, A.A. 2007. Comparison of human retinal pigment epithelium gene expression in macula and periphery highlights potential topographic differences in Bruch's membrane. *Mol. Vis.* 13: 1608–1617.
49. Wang, Y.D., Wu, J.D., Jiang, Z.L., Wang, Y.B., Wang, X.H., Liu, C., and Tong, M.Q. 2007. Comparative proteome analysis of neural retinas from type 2 diabetic rats by two-dimensional electrophoresis. *Curr. Eye Res.* 32: 891–901.
50. West, K.A., Yan, L., Shadrach, K., Sun, J., Hasan, A., Miyagi, M., Crabb, J.S., Hollyfield, J.G., Marmorstein, A.D., and Crabb, J.W. 2003. Protein database, human retinal pigment epithelium. *Mol. Cell. Proteomics* 2: 37–49.
51. White, R., Gonsior, C., Kramer-Albers, E.M., Stohr, N., Huttelmaier, S., and Trotter, J. 2008. Activation of oligodendroglial Fyn kinase enhances translation of mRNAs transported in hnRNP A2-dependent RNA granules. *J. Cell Biol.* 181: 579–586.
52. Zhang, J.C., Donate, F., Qi, X., Ziats, N.P., Juarez, J.C., Mazar, A.P., Pang, Y.P., and McCrae, K.R. 2002. The antiangiogenic activity of cleaved high molecular weight kininogen is mediated through binding to endothelial cell tropomyosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 12224–12229.

7-6 眼科と補体

岩田 岳

独立行政法人国立病院機構東京医療センター臨床研究センター分子細胞生物学研究部 部長

はじめに

ヒトは情報の約8割を視覚情報に依存しており、生涯を通じて視機能を維持することは生活の質(QOL)を維持することに直結する重要な課題である。眼は外界に直接開かれていることから、感染や傷害からこの器官を守る必要があり、自然免疫系の重要な一角である補体が重要な役割を果たしている。眼は免疫特権部位 (immune privileged site) と呼ばれる臓器に分類され、通常の免疫炎症反応が起こると透明性を維持できなくなるため、炎症反応を最小限に抑え、眼の透明性と微細構造を保護する特性を備えている¹⁾。

補体は角膜や硝子体の炎症に関与し、さらに最近の研究から、加齢黄斑変性や緑内障などの有病率の高い眼科疾患の発症にも関与することが明らかにされてきた。特に補体の遺伝子多型が加齢黄斑変性の発症リスクを高めることが統計学的に証明され、眼球内の補体を抑制するための薬が複数の製薬会社で研究されている。本章では眼における補体の関与について、特に加齢黄斑変性を中心に、最近の知見を紹介する。

1. 眼の基本的構造と機能

眼球はほぼ球形であり、前方の角膜から後極の強膜までの距離は新生児で約17mm、成人では約24mmである。角膜、前房、虹彩などから構成される前眼部、水晶体、硝子体などの中間透光体、そして網膜、脈絡膜、視神経乳頭から構成される後眼部に分けられる(図1)。光は透明な角膜で屈折し、虹彩によって光量が調整されながら眼の中に取り込まれる。毛様体の筋肉によって水晶体の厚みが増えることによって光はさらに屈折

変化を起こして、無色・透明なゲル状の硝子体を通過し、網膜に結像する。網膜のほぼ中央に位置する黄斑の中心には視細胞が集中する中心窩が存在し、この高密度な視細胞の存在によって、一部の霊長類や鳥類には高い解像度の中心視力が確保された。視細胞で受容した光刺激は電気信号に変換されて、視神経、視交叉、視索を経て、後頭葉の視覚中枢に伝達され、映像として認知される。視神経は直径約3mmの神経の束であり、眼球を出ると有髄神経線維となって周囲からのノイズを遮断している。角膜から網膜までを保護する最外層の強膜は太さの不均一な膠原線維を中心とした細胞外基質で構成されている。

2. 眼における補体の存在

ヒトの主要な情報源である視覚情報を生涯にわたって受け取るために、眼は外界からの様々な危険に対して保護機能が用意されている。角膜から網膜までを光が通過するためには、規則的な分子・細胞の配列を乱すような炎症反応は大きな障害となる。眼の保護だけでなく、免疫特権部位としての機能を維持するためにも補体は重要な役割を担っている。これまでの研究報告によると、正常な眼球においてもiC3bやMACの存在が確認されており、補体は持続的に機能しているが、その活性は膜結合型補体制御因子によって厳密に制御されている²⁾。角膜、房水、涙液、そして網膜では古典経路と副経路と、これを制御するためのC1阻害因子(C1-INH)、DAF、MCP、CD59、I因子、H因子などの存在が確認されている³⁾。iC3bとそのレセプターは免疫特権部位を維持するために直接関与している⁴⁾。また、これらの補

ラットの大腿部皮下に注射し、12～14日後に虹彩、毛様体の炎症から始まり、16～19日後には網膜の炎症を誘発する方法である。C3bとCR3との相互作用が発症機序に深く関係していると考えられており、抗CR3抗体を静注することによってモデル動物の発症を予防できることが報告されている。補体の活性化は複数のサイトカイン、ケモカイン、接着分子の発現を上昇させ、同時にIFN- γ 、IL-10、IP-10、ICAM-1、LECAM-1などが減少することから、ぶどう膜炎の発症には補体制御蛋白質一群の関与が考えられる。

5. 糖尿病網膜症と補体

糖尿病網膜症は糖尿病の3大合併症の1つで、中途失明原因1位の眼科疾患である。糖尿病を主要原因として、網膜毛細血管の増殖とこれを構成する周辺細胞の脱落および内皮細胞の浸透性の増加によって、未熟な血管から血液が漏れてくることにより、広範囲の視神経障害が発生する。この疾患においても補体の関与が報告されている。MACやC3dの免疫染色は陽性であるが、古典経路やレクチン経路に関係するC1qやC4の免疫染色は確認されていないことから、副経路の関与が示唆されている。しかしながら、糖尿病患者の硝子体中にB因子、C3、C4b、C9などが検出されていることから、発症晩期においては古典経路の活性化も発生していることになる。

6. 視神経シナプスの構築と緑内障における補体

緑内障は、視細胞が光から変換した電気信号を脳に伝える視神経が障害され、高眼圧あるいは正常眼圧において、視神経乳頭の陥凹、視神経の委縮、特徴的な視野狭窄を来す疾患として定義されている。眼圧を十分に下げることによって進行を防止あるいは遅延させることができることが多いが、根源的な治療法ではなく、その発症原因の解明が急務である。近年行われた日本緑内障学会と岐阜県多治見市による疫学調査(多治見スタ

ディー)によると、40歳以上における有病率は5%で、70歳以上の高齢者になると15%に上昇すると報告されている。また角膜と虹彩の間(隅角)が開放状態の開放隅角緑内障患者において、その9割が正常眼圧であったと報告されている。初期には自覚症状がほとんど現れないので、潜在的な患者数は多いと予測されている。

緑内障の障害は神経節細胞の萎縮が主原因であるが、近年の研究によって視神経シナプスの形成から緑内障による視神経の消失においても補体が関係していることが明らかになってきた。神経節細胞はその発生過程で網膜から視覚情報を処理する外側膝状体(lateral geniculate nucleus: LGN)へ投射し、シナプスを形成するが、生後数週間は必要なシナプスを選択的に残して残りは消失する。C1qあるいはC3の欠損マウスではこの選択が阻害され、精巧に機能する視神経が形成されないことが明らかにされた⁵⁾。また、緑内障のマウスモデルを用いて外側膝状体の切片を観察するとC1qの発現が抑制されていることが報告されている。

7. 加齢黄斑変性と補体

加齢黄斑変性は中心視野が障害される加齢性の眼科疾患で、厚生労働省によって難治性疾患に指定されている。米国では失明率が最も高い疾患であり、わが国でも生活の欧米化や急速な高齢化、そして診断法の確立によって患者数は増加している。黄斑の中心に位置する中心窩には色を感じる錐体細胞が高い密度で存在し、これによってヒトは高い解像度の中心視力を得ている。中心窩では大量の視覚情報が通過・処理されており、この生理機能を維持するために、血管の豊富な脈絡膜と神経網膜との間で盛んに酸素、栄養素、老廃物の交換が行われている。網膜と脈絡膜の境界には網膜色素上皮細胞が存在し、分子輸送に加えて視細胞の貪食作用や各種因子の分泌機能などを併せもって網膜の恒常性を維持している。この細胞層が老化によって機能低下すると、細胞内で十分に

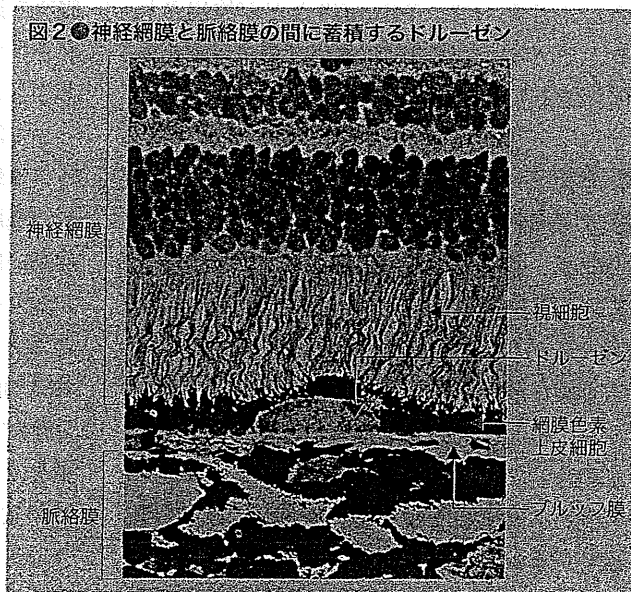
分解・処理できず、これが細胞外へ放出されて、ドルーゼンとして網膜色素上皮細胞とブルッフ膜の間に蓄積する(図2)。

ドルーゼンの蓄積が黄斑を中心に広範囲に及ぶと、これに接する網膜色素上皮細胞は徐々に萎縮し、黄斑部の視細胞も障害されて萎縮型加齢黄斑変性となる。これは脈絡膜から視細胞に向かって黄斑部で血管新生が起こる滲出型加齢黄斑変性と区別される。萎縮型は白人での頻度が高く、滲出型は日本人に多いことが知られている。ドルーゼンの生成メカニズムはまだ十分に解明されていないが、遺伝子多型、視細胞を保護する不飽和脂質(DHA)の光酸化分子に対する自己抗体、アミロイドβの蓄積によるマクロファージの誘導、ウイルス感染による炎症など複数の原因が考えられている。この結果、ドルーゼンや網膜色素上皮細胞に補体の活性化が確認されており、患者の網膜切片の免疫染色によって補体関連分子の陽性反応が観察されている。萎縮型の患者の一部は滲出型へ移行することが知られているが、その詳細なメカニズムは不明のままである。加齢黄斑変性のリスク因子として、遺伝子、加齢に加えて、喫煙、肥満、青色光などが知られている。

加齢黄斑変性と補体との関連が注目されたのは、患者の網膜切片において、ドルーゼンや網膜色素上皮細胞に補体の活性因子や抑制因子が免疫染色によって確認されてからである⁶⁾。さらに、その数年後にはアメリカ人の患者を対象に行われた全ゲノム関連解析(genome wide association study: GWAS)によって、H因子(CFH)、B因子(CFB)、C2、C3などの遺伝子多型(single nucleotide polymorphism: SNP)が発症と相関することが明らかにされた⁷⁾。この中でも、特にH因子のY402H(rs1061170)の遺伝子多型は白人やヨーロッパ系インド人において多くの患者について相関したのに対して、日本人や中国人ではY402Hの相関は観察されず、I62V(rs800292)が一

部の患者で相関する程度であった⁸⁾。今後のアジア人におけるH因子の遺伝子多型が注目される。Y402HはH因子の反復配列(short consensus repeats: SCRs)の7番目にあり、C3b、C反応性蛋白(C-reactive protein)、グリコサミノグリカンとの結合部位に位置し、副経路の制御に影響すると考えられる。H因子のノックアウトマウス(*cfh*^{-/-})では視細胞の障害、網膜におけるC3の蓄積、ブルッフ膜の菲薄化が観察されている。

以上の事実から、補体の活性化を抑制することによって加齢黄斑変性を治療することが考えられ、多くの補体抑制薬が臨床試験でその薬効が評価されている。黄斑は一部の霊長類と鳥類にしか存在しないために、厳密には一般的な実験動物(マウス、ラット、モルモット)では黄斑に関する実験はできない。筆者らは独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターとの共同研究によって、若年で患者と同成分のドルーゼンを生成する遺伝性の黄斑変性カニクイザルを解析している。この疾患サルにおいて、ヒトと同様にドルーゼンや網膜色素上皮細胞において補体の活性化が観察されている⁹⁾。筆者らは補体を抑制することによってドルーゼンの生成を抑制あるいは消滅できるか、C3b(Compstatin、John Lambris)

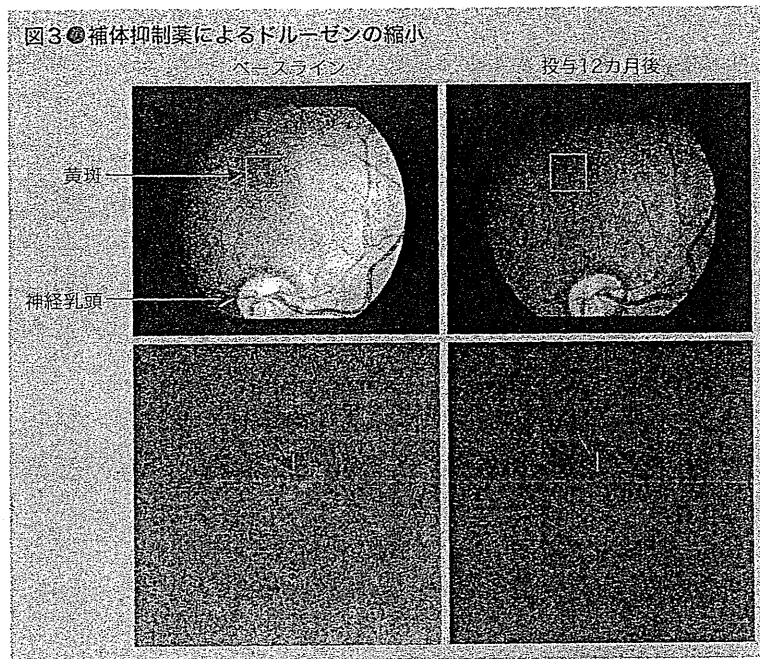


およびC5b (AcPepA、岡田秀親) 抑制薬の効果を研究中である。先行している Compstatin については、実験に用いた4頭全頭について、一部のドルーゼンについて消失していく様子が観察された(図3)。AcPepAについても同様な研究結果が期待されている。

おわりに

補体は眼を感染から守る防御機構であると同時に視神経の構築にもたずさわる重要な役割を果たしている。本項で紹介したように、補体は多くの眼科疾患に関与しており、診断への応用のほか、補体の活性化を制御することによる予防法や治療

法が期待されている。すでに他の疾患用に開発された補体抑制薬が眼科疾患への応用を目的として、数多くの臨床試験が進行中である。しかしながら、眼の特性からこれらのすべての薬が利用できるわけではなく、また患者の負担を軽減するためにも、その投与方法の工夫が必要と考えられる。情報の約8割を担う視機能の維持は生活の質と直結しており、眼における補体の機能をさらに深く研究する必要を訴えたい。



文 献

- 1) Niederkorn JY. Immune privilege in the anterior chamber of the eye. *Crit Rev Immunol* 2002; 22(1): 13-46.
- 2) Sohn JH, et al. Chronic low level complement activation with the eye is controlled by intraocular complement regulatory proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(11): 3492-3502.
- 3) Bora NS, et al. Differential expression of the complement regulatory proteins in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34(13): 3579-3584.
- 4) Sohn JH, et al. Tolerance is dependent on complement C3 fragment iC3b binding to antigen-presenting cells. *Nat Med* 2003; 9(2): 206-212.
- 5) Stevens B, et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 2007; 131(6): 1164-1178.
- 6) Mullins RF, et al. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J* 2000; 14(7): 835-846.
- 7) Klein RJ, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 2005; 308(5720): 385-389.
- 8) Goto, et al. Genetic analysis of typical wet-type age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in Japanese population. *J Ocul Biol Dis Infor* 2009; 2(4): 164-175.
- 9) Umeda S, et al. Molecular composition of drusen and possible involvement of anti-retinal autoimmunity in two different forms of macular degeneration in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *FASEB J* 2005; 19(12): 1683-1685.
- 10) Chi Z, et al. Suppression of drusen formation by compstatin, a peptide inhibitor of complement C3 activation, on cynomolgus monkey with early-onset macular degeneration. *Current Topics on Complement and Eye Disease. Adv Exp Med Biol* 2010; 703: 127-135.

視力・色覚を司る黄斑の生理機能と黄斑変性の分子メカニズム

岩田 岳

ヒトは情報の8割を視覚に依存すると考えられており、眼は重要な感覚器官である。眼の中でも特に網膜の中心に位置して視細胞が高い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。黄斑には周辺網膜に存在する視神経や毛細血管がなく、凹型構造となって視細胞が網膜表面に近づくことにより、感度がより高くなっている。この特殊な構造こそが、逆に組織的な脆弱性を生み、多くの黄斑疾患の病巣となっている。

キーワード ● 網膜, 黄斑, 視細胞, 中心窩, 加齢黄斑変性, オカルト黄斑ジストロフィー

はじめに

角膜、水晶体、そして硝子体を通過した光は網膜に結像するが、光を感じる視細胞は網膜内に均一に存在するわけではなく、黄斑に集中している(図1A)。黄斑の中心には感度は低い色覚を司る錐体細胞(cone)が集中し、そのすぐ周辺には色覚はないが感度の高い桿体細胞(rod)が取り巻く。黄斑疾患には浮腫、剥離、嚢腫、萎縮、変性などのさまざまな障害の形態があり、複数の要因によって発症するが、そのなかでも世界的に有病率の高い難治性疾患(厚生労働省認定)として加齢黄斑変性(age-related macular degeneration)がある。米国では中途失明の原因として第1位であり、日本でも急速な高齢化によって患者数が増加している。加齢黄斑変性は遺伝子、加齢、喫煙、肥満、青色光など複数の要因によって発症することが疫学調査によって明らかにされており、この10年間に発症機序が徐々に明らかになってきた。さらに、黄斑の変性症としては強い近視に起きやすい新生血管黄斑症、若

年層にも起きる突発性脈絡膜新生血管、そして遺伝的要因のみで発症する黄斑ジストロフィー(先天性黄斑変性)がある。本稿ではこれらの黄斑変性症のなかでも多因子疾患の加齢黄斑変性と、黄斑部の錐体機能のみが著しく低下するメンデル遺伝形式の黄斑ジストロフィー(macular dystrophy)の一種であるオカルト黄斑ジストロフィー(occult macular dystrophy: 三宅病)の原因遺伝子解明についてご紹介する。

黄斑部の組織構造と環境

厚さわずか0.1~0.3 mmの網膜は感覚網膜9層と網膜色素上皮細胞から構成され、感覚網膜には神経細胞の視細胞、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞、神経節細胞に加えて、グリア系細胞と血管系細胞が存在する。検眼鏡的には黄斑は視神経乳頭の中心から4 mm耳側に位置し、直径1.5~2.0 mmの黄色を呈する円周を指し、この中心の直径約0.35 mm(中心窩)は神経節細胞や内顆粒層が周囲に移動して浅く陥凹し、

Visual function of the macula and molecular mechanism of the macular diseases

Takeshi Iwata: Division of Molecular & Cellular Biology, National Institute of Sensory Organs, National Hospital Organization Tokyo Medical Center (国立病院機構東京医療センター臨床研究センター(感覚器センター)分子細胞生物学研究部)

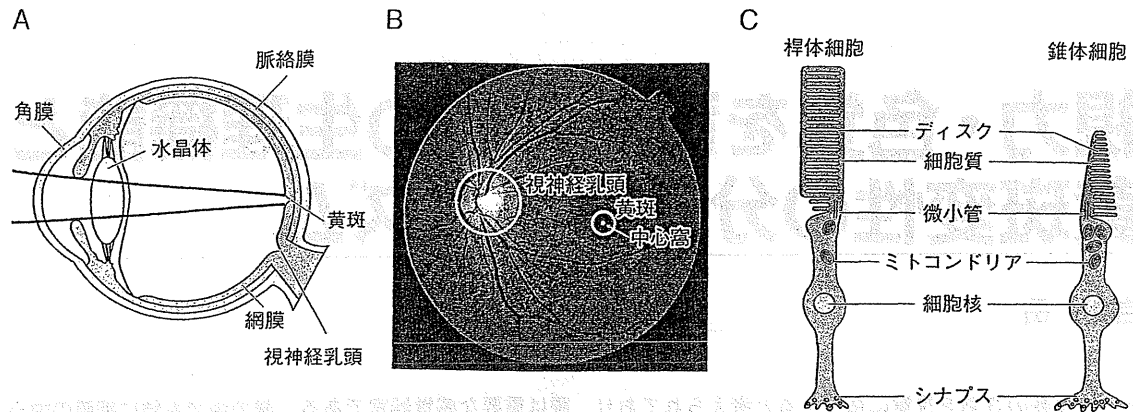


図1 眼球の構造と視細胞

A) 角膜と水晶体を通過した光は黄斑で焦点を結ぶ。B) ヒトの眼底像。C) 視細胞（桿体細胞と錐体細胞）の構造。円盤状のディスク上に桿体細胞ではロドプシン、錐体細胞では赤、緑、青のいずれかのオプシンが存在する。中心窩では主に赤と緑のオプシンを発現する錐体細胞が集中して存在し、少し外れると桿体細胞数が顕著に増加する

無血管な領域であり、錐体細胞のみが網膜の表面に位置する構造になっている（図1 B, C）。黄斑は魚類にはじまり、爬虫類、鳥類へと受け継がれたが、哺乳類の登場時にはいったん消失し、霊長類で再現したことが知られている。霊長類の周辺網膜では神経節細胞-双曲細胞-視細胞のシナプス様式は1:多:多々となっているのに対し、中心小窩（中心窩の中央部分）では1:1:1となっており、ここでは最高の視力が確保されるが、少しでも中心小窩からずれると急激に視力は低下する。錐体細胞は桿体細胞に比べて細胞当たりのエネルギー代謝が約8倍異なり、ミトコンドリアの数も細胞当たりでは20倍も異なることが知られている¹⁾。すなわち黄斑の中心は無血管でありながら活発に代謝・機能を維持しなければならない環境になっており、栄養や酸素の供給が不足すると容易に機能が低下する危険性がある。

2 加齢黄斑変性と全ゲノム相関解析

視細胞では、その生理機能を維持するために血管の豊富な脈絡膜との間で酸素、栄養素、老廃物の交換が盛んに行われている。網膜色素上皮細胞は視細胞と脈絡膜の間を隔てるように位置し、分子輸送や視細胞の貪食作用、そして各種生体因子の分泌機能などによ

って網膜の恒常性を維持している。網膜色素上皮細胞の老化によってこれらの機能が低下すると細胞内に細胞毒性のあるリポフスチンや基底膜側に黄色のドルーゼン^{※1}が蓄積する。これらの蓄積はやがて網膜色素上皮細胞の萎縮（萎縮型加齢黄斑変性）や黄斑部における血管新生（滲出型加齢黄斑変性）となって、視細胞が障害され、中心視力が著しく低下する。

近年、遺伝子多型（SNP）チップを用いた多因子疾患の全ゲノム相関解析（genome wide association study: GWAS）が盛んに行われているが、加齢黄斑変性はその最初の成功例である。アメリカ人患者を対象にしたマイクロサテライトマーカーによる全ゲノム相関解析において強い相関のあった領域については、SNPチップによって染色体1番に存在する補体H因子の遺伝子多型が疾患と強く相関することが報告された²⁾³⁾。このなかでも特にH因子のY402H（rs1061170）の遺伝子多型は白人、ヨーロッパ系インド人において多くの患者について相関したのに対して、日本人や中国人ではY402Hの相関は観察されず、I62V（rs800292）が一部の患者で相関する程度であった⁴⁾⁵⁾。今後の他のアジア人

※1 ドルーゼン

ブルッフ膜^{※2}と網膜色素上皮細胞の間に蓄積する黄色あるいは白色の物質。その構成成分は脂質、補体、アミロイド、クリスタリンなど多岐にわたる

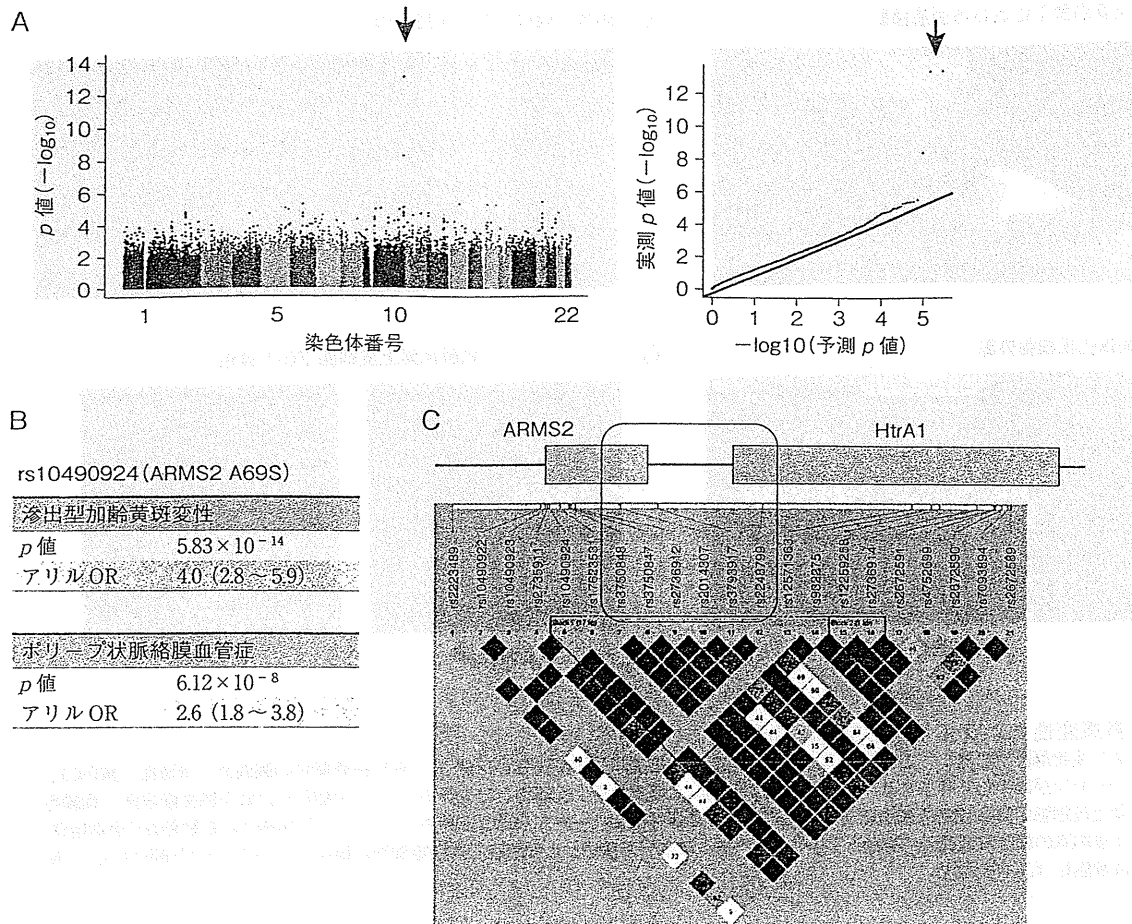


図2 日本人滲出型加齢黄斑変性の全ゲノム相関解析
 A) 全ゲノム相関解析によって染色体10番に強い相関が観察された (→)。 B) この領域のタグSNP rs10490924の加齢黄斑変性およびポリープ状脈絡膜血管症におけるp値とオッズ比 (OR)。 C) rs10490924と連鎖不平衡 (linkage disequilibrium) を共有する領域はARMS2からHtrA1の2遺伝子にまたがり、いずれの遺伝子が疾患に関与するのか研究されている (Aは文献9より転載)

※2 補体副経路

副経路は病原体表面で直接C3の分解が行われることで開始する補体活性経路の1つ。肝臓でつくられたC3は血液中でC3aとC3bに分解される。C3bは病原体の細胞膜に結合し、これにB因子が結合する。さらにこの複合体はD因子によって分解され、BaおよびC3転換酵素Bbとなる。C3bBb複合体はC3をさらにC3aとC3bに分解し、病原体表面のC3bBbは増加する。C3b複合体はC3bBbC3bとなり、これはC5をC5aとC5bに分解し、C5b、C6、C7、C8、C9からなる複合体は細胞膜障害性複合体 (membrane attack complex : MAC) を形成し、病原体の細胞膜に穴を開け、浸透圧の変化によって細胞を溶解する。H因子はC3bに結合することで副経路に抑制的に働く。

※3 ブルッフ膜

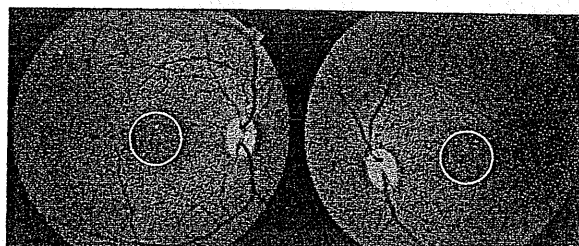
膠原線維を主体とする無細胞性の層構造。網膜色素上皮と脈絡膜が接する。網膜-脈絡膜間の物質交換の通路となっている。

口におけるH因子の遺伝子多型解析が注目されている。Y402HはH因子の反復配列 (short consensus repeats : SCRs) の7番目にあり、C3b、C反応性タンパク質 (C-reactive protein)、グリコサミノグリカンとの結合部位に位置し、補体副経路※2の制御に影響すると考えられる。H因子のノックアウトマウス (*cfh*^{-/-}) は視細胞の障害、網膜におけるC3の蓄積、ブルッフ膜※3の菲薄化が観察されている⁶⁾。さらに、染色体10番ではLOC387715/ARMS2 (age-related maculopathy susceptibility 2) とHtrA1 (HtrA serine peptidase 1)

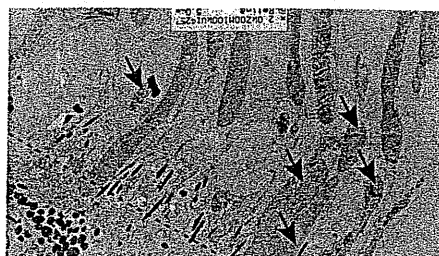
A 全身麻酔下における眼底撮影



B 両眼に観察される黄斑部のドルーゼン



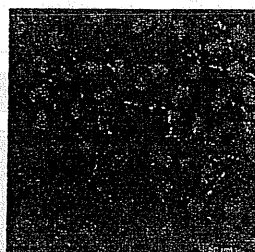
C 未消化視細胞外節



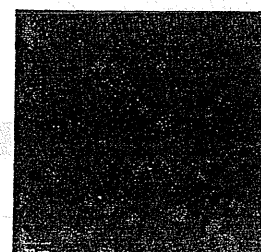
疾患個体

D

網膜色素上皮細胞 ZO-1 染色



正常個体



疾患個体

図3 黄斑変性カニクイザルの病理学的解析

A) 全身麻酔下における眼底撮影 (医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター)。B) 疾患個体の眼底像。黄斑部に黄色のドルーゼンが集中して存在する。C) 疾患サルの網膜と網膜色素上皮細胞との境界 (-----) を撮影した電子顕微鏡写真。網膜色素上皮細胞の貪食作用の機能低下によって未消化の桿体細胞 (→) 外節が観察された。D) 正常個体と疾患個体の網膜色素上皮細胞の細胞接着機能の観察。ZO-1 染色 (緑) によって疾患サルの細胞では接着機能が破綻していることが観察された。青は細胞核 (DAPI染色)

遺伝子領域における遺伝子多型が強く相関した⁷⁾。われわれは日本人に多くみられる滲出型黄斑変性のみを集め、独自に全ゲノム相関解析を行ったところ、染色体1番のCFH領域は相関せず、染色体10番のLOC387715/ARMS2のみが相関することを明らかにした(図2)⁸⁾⁹⁾。この領域に存在する2つの遺伝子の片方/両方が加齢黄斑変性のリスクを高めるのか、現時点では明らかにされていない。LOC387715/ARMS2遺伝子はマウスには存在せず、ヒトLOC387715/ARMS2を発現するトランスジェニックマウスを作製したところ血管新生に関する抑制効果が観察されている。また、HtrA1のノックアウトマウスでは高齢でも網膜の形態的な異常は観察されていない。加齢黄斑変性は多因子疾患であることから、その再現にはこれらのマウスに環境的なストレスを加える必要があり、現在実験が行われている。

③ 黄斑変性霊長類モデルの解析

ドルーゼンの蓄積が黄斑を中心に広範囲に及ぶと、これに接する網膜色素上皮細胞は徐々に萎縮し、黄斑部の視細胞も障害されて萎縮型加齢黄斑変性となる。これは脈絡膜から視細胞に向かって黄斑部で血管新生が起こる滲出型加齢黄斑変性と区別される。萎縮型は白人での頻度が高く、滲出型は日本人に多いことが知られている。ドルーゼンの生成メカニズムはまだ十分に解明されていないが、遺伝子多型、視細胞を保護する不飽和脂質(DHA)の光酸化分子に対する自己抗体¹⁰⁾、アミロイドβの蓄積による補体活性化¹¹⁾、サイトメガロウイルス感染による炎症¹²⁾¹³⁾、ケモカインの亢進や補体の活性化^{14)~16)}など複数の原因が考えられている。このなかでも特に、ドルーゼンや網膜色素上皮細胞に補体の活性化が確認されており、患者の網膜切片の免

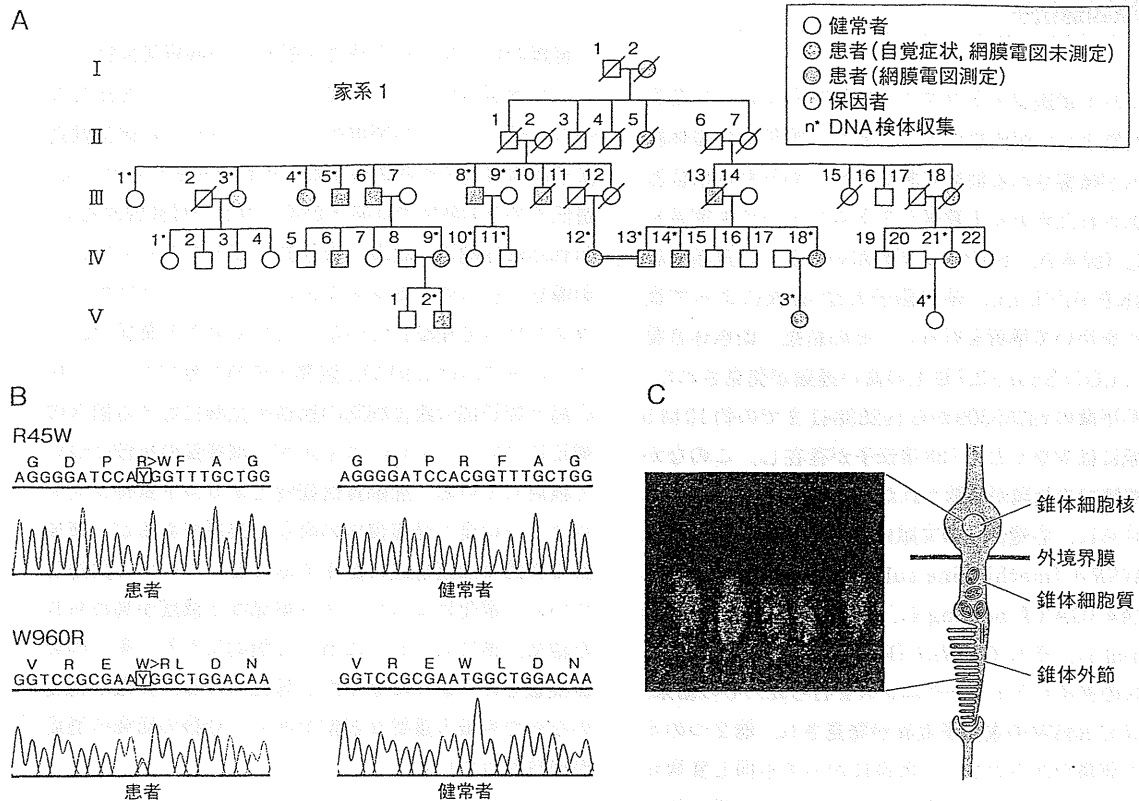


図4 オカルト黄斑ジストロフィーとRP1L1遺伝子

A) オカルト黄斑ジストロフィーの家系。この優性遺伝の家系を用いて SNP HiTLink連鎖解析法を行い、8番染色体短腕に連鎖領域がマッピングされた。B) 患者に観察されたRP1L1 R45WとW960R遺伝子変異。2つの変異はコントロール876人では検出されなかった。C) RP1L1の免疫染色(緑)。RP1L1のN末端に対して作製された抗体を用いて行われた。視細胞の外境界膜から外節にかけて染色された。赤はロドプシンの免疫染色。桿体細胞の外節が染色されている。

疫染色によって補体関連分子の陽性反応が観察されている。萎縮型の患者の一部は滲出型へ移行することが知られているが、その詳細なメカニズムは不明のままである。前述のように、加齢黄斑変性リスク因子として、遺伝子、加齢に加えて、喫煙、肥満、青色光などが知られている。

さて、以上の事実から補体の活性化を抑制することによって、加齢黄斑変性を治療することが考えられ、多くの補体抑制薬について臨床試験でその薬効が評価されている。黄斑は一部の霊長類と鳥類にしか存在しないために、厳密には一般的な実験動物(マウス、ラット、モルモット)では黄斑に関する実験はできない。そこでわれわれは独立行政法人医薬基盤研究所霊長類

医科学研究センターとの共同研究によって、若年で患者と同成分のドルーゼンを生成する遺伝性の黄斑変性カニクイザルを解析している(図3)¹⁷⁾。この疾患サルにおいて、ヒトと同様にドルーゼンや網膜色素上皮細胞において補体の活性化が観察されている^{18) 19)}。われわれは補体を抑制することによってドルーゼンの生成を抑制あるいは消滅できるか、C3b抑制薬(Compstatin, John Lambrisによって開発)およびC5b抑制薬(AcPepA, 岡田秀親によって開発)の効果を研究中である。先行しているCompstatinについては実験に用いた4頭全頭について、一部のドルーゼンについて消失していく様子が観察された²⁰⁾。

4 オカルト黄斑ジストロフィーの原因遺伝子

オカルト黄斑ジストロフィーは日本人によって発見された数少ない眼疾患の1つであり、黄斑部の錐体細胞のみが障害される病気である^{21) 22)}。われわれは佐渡で発見されたオカルト黄斑ジストロフィーの大家系を調査し(図4A)、SNPチップを用いた新しい連鎖解析法(SNP HiTLink, 福田陽子と辻省次によって開発)²³⁾を用いて解析を行った。その結果、染色体8番短腕にLOD Score 3.7以上の高い連鎖が発見された。連鎖不平衡のrs265309からrs263841までの約10Mbの領域には少なくとも128遺伝子が存在し、このなかから網膜での発現が確認された22の遺伝子が抽出された。さらに、各遺伝子の文献による情報から4つの候補、*MSRA* (methionine sulfoxide reductase A), *GATA4* (GATA binding 4), *PCMI* (pericentriolar material 1), そして*RPIL1* (RP1-like 1) が選択され、これらのダイレクトシークエンスを行った。その結果、*RPIL1* にR45Wの遺伝子変異が発見され、他2つのオカルト黄斑ジストロフィー家系においても同じ変異が発見された。さらに1家系においてW960R変異が発見された(図4B)²⁴⁾。

RPIL1 は網膜色素変性の原因遺伝子*RPI* に類似する遺伝子としてクローニングされ、多くの患者がスクリーニングされたが遺伝子変異は発見されなかった^{25) 26)}。*RPIL1* のN末端に対して作製された抗体を用いて免疫染色を行った結果、視細胞の微小管に特異的な染色が観察された(図4C)。この結果はマウスで行われた同様な染色と類似する結果である²⁷⁾。視細胞の微小管は高度に分化しており、細胞体と外節の間の輸送機能を担うと同時に視細胞を光軸に沿って細胞の傾きを修正する機能がある²⁸⁾。R45WおよびW960Rの遺伝子変異によってこの機能が阻害されると、中心窩の錐体細胞は光軸に対して斜め方向に傾き、感光性は著しく低下する可能性がある。また、錐体細胞はエネルギー消費量が桿体細胞に比べて大きいことから、変異によって微小管の機能が阻害され、細胞輸送が最も盛んな中心窩において、錐体細胞が機能できない状態になっている可能性もある。今後の基礎研究の結果が期待される。

■ おわりに

黄斑変性のなかから多因子疾患の加齢黄斑変性とメンデル遺伝のオカルト黄斑ジストロフィーを対比しながらご紹介した。相関解析によって得られた感受性遺伝子は環境因子や習慣因子などの影響を受けるために、遺伝子だけの研究では答えが得られない可能性がある。われわれは喫煙、肥満、青色光などのストレスによる影響をこれらのトランスジェニック・ノックアウトマウスを使って検証している。またオカルト黄斑ジストロフィーにおける*RPIL1* 変異との整合性について、中心窩と周辺部の錐体細胞の構造や光軸に対する傾きの補正について、さらにエネルギー消費量の比較について検討している。加齢黄斑変性とオカルト黄斑ジストロフィーは全く発症機序の異なる疾患であるが、黄斑部の特殊な凹型構造に由来することについては共通している。進化によって、より集光性と感度が高められた結果、逆にストレスに対して脆弱になり、多くの黄斑疾患を伴うようになったと考えられる。黄斑は視覚のなかでも最も重要な部位であり、今後の研究の進展が期待されている。

文献

- 1) Hoang, Q. V. et al. : *Vis. Neurosci.*, 19 : 395-407, 2002
- 2) Klein, R. J. et al. : *Science*, 308 : 385-389, 2005
- 3) Hageman, G. S. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102 : 7227-7232, 2005
- 4) Okamoto, H. et al. : *Mol. Vis.*, 12 : 156-158, 2006
- 5) Gotoh, N. et al. : *Hum. Genet.*, 120 : 139-143, 2006
- 6) Pickering, M. C. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 : 9649-9654, 2006
- 7) Dewan, A. et al. : *Science*, 314 : 989-992, 2006
- 8) Yoshida, T. et al. : *Mol. Vis.*, 13 : 545-548, 2007
- 9) Goto, A. et al. : *J. Ocul. Biol. Dis. Infor.*, 2 : 164-175, 2009
- 10) Hollyfield, J. G. et al. : *Nature Med.*, 14 : 194-198, 2008
- 11) Yoshida, T. et al. : *J. Clin. Invest.*, 115 : 2793-2800, 2005
- 12) Vannas, M. et al. : *Eye Ear Nose Throat. Mon.*, 50 : 189-194, 1971
- 13) Miller, D. M. et al. : *Am. J. Ophthalmol.*, 138 : 323-328, 2004
- 14) Ambati, J. et al. : *Nature Med.*, 9 : 1390-1397, 2003
- 15) Nozaki, M. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 : 2328-2333, 2006
- 16) Takeda, A. et al. : *Nature*, 460 : 225-230, 2009
- 17) Suzuki, M. T. et al. : *Primates*, 44 : 291-294, 2003
- 18) Umeda, S. et al. : *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46 : 683-691, 2005
- 19) Umeda, S. et al. : *FASEB J.*, 46 : 1683-1685, 2005

- 20) Chi, Z. et al. : Adv. Exp. Med. Biol., 703 : 127-135, 2010
- 21) Miyake, Y. et al. : Am. J. Ophthal., 108 : 292-299, 1989
- 22) Miyake, Y. et al. : Am. J. Ophthal., 122 : 644-653, 1996
- 23) Fukuda, Y. et al. : BMC Bioinformatics, 10 : 121, 2009
- 24) Akahori, M. et al. : Am. J. Hum. Genet., 87 : 424-429, 2010
- 25) Conte, I. et al. : Europ. J. Hum. Genet., 11 : 155-162, 2003
- 26) Bowne, S. J. et al. : Mol. Vis., 9 : 129-137, 2003
- 27) Yamashita, T. et al. : J. Neurosci., 29 : 9748-9760, 2009
- 28) Eckmiller, M. S. : Prog. Retin. Eye Res., 23 : 495-522, 2004

参考図書

- 『An introduction to the biology of vision』 (James T. McIlwain / 編), Cambridge University Press, 1996
- 『The first steps in seeing!』 (Robert W. Rodieck / 著), Sinauer Associates, 1998
- 『Animal eyes!』 (Michael F. Land & Dan-Eric Nilsson / 著), Oxford University Press, 2002
- 『Visual perception, A clinical orientation 4th Ed.』 (Steven H. Schwartz / 著), McGraw-Hill Medical, 2010

Profile

著者プロフィール


岩田 岳 : 1983年, 名城大学農学部農芸化学科卒業。'88年, 同大学院農学研究科卒業, 農学博士。'88~'89年, 米国国立衛生研究所 (NIH) / 国立眼研究所 (NEI) 研究員。'89年, マイアミ大学バスコンパルメー眼研究所研究員。'91年, 米国国立衛生研究所 (NIH) / 国立眼研究所 (NEI) 研究員。'99年, 国立病院東京医療センター臨床研究部主任研究員。2005年, 独立行政法人国立病院機構東京医療センター感覚器センター (NISO) 室長。'07年, 独立行政法人国立病院機構東京医療センター感覚器センター (NISO) 分子細胞生物学研究部部長。現在に至る。

Book Information

基礎から学ぶ 生物学・細胞生物学 第2版

著 / 和田 勝

好評発売中



- ◆ 高校で生物を習っていない学生にも最適な入門書
- ◆ 各章の内容が一目でわかる「概略図」など、イメージしやすい図表が満載
- ◆ 今回の改訂では、章末問題や最新の話題のコラムを新たに追加

多数の採用実績をもつ好評教科書が改訂!

- ◆ 定価(本体3,000円+税)
- ◆ 2色刷り B5判 317頁
- ◆ ISBN978-4-7581-2018-0

発行 **羊土社**