

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

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

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

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

