

# 博士論文

論文題目 脈絡膜血管新生モデルにおける補体 C3 または交感神経遮断による  
脈絡膜新生血管およびマクロファージの眼内浸潤に及ぼす影響

氏名 譚 雪

## 目次

|     |                                   |    |
|-----|-----------------------------------|----|
| 第1章 | 序論                                | 頁  |
| 1-1 | 滲出型加齢黄斑変性と脈絡膜新生血管                 | 5  |
| 1-2 | 今回の検討                             | 12 |
| 第2章 | 脈絡膜新生血管と炎症細胞との関連                  |    |
| 2-1 | 背景                                | 18 |
| 2-2 | 方法                                | 19 |
| 2-3 | 結果                                | 23 |
| 2-4 | 考察                                | 29 |
| 第3章 | 補体 C3 の脈絡膜新生血管およびマクロファージの眼内浸潤への関与 |    |
| 2-1 | 背景                                | 33 |
| 2-2 | 方法                                | 34 |
| 2-3 | 結果                                | 37 |
| 2-4 | 考察                                | 45 |
| 第4章 | 交感神経の脈絡膜新生血管およびマクロファージの眼内浸潤への関与   |    |
| 3-1 | 背景                                | 49 |
| 3-2 | 方法                                | 52 |
| 3-3 | 結果                                | 56 |
| 3-4 | 考察                                | 68 |
| 第5章 | 総合討論                              | 72 |
|     | 参考文献                              | 79 |
|     | 謝辞                                | 86 |

## 略語一覧

AMD: Age-related Macular Degeneration; 加齢黄斑変性

CNV: Choroidal Neovascularization; 脈絡膜新生血管

RPE: Retinal Pigment Epithelium; 網膜色素上皮

FITC: Fluorescein isothiocyanate

HE 染色: Haematoxylin and eosin staining; ヘマトキシリンエオジン染色

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor; 血管内皮増殖因子

VEGFR: VEGF receptor; 血管内皮増殖因子受容体

CCR2: CC ケモカイン受容体 2

## 第 1 章 序論



## 1-1 滲出型加齢黄斑変性と脈絡膜新生血管

滲出型加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration: AMD) は脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization: CNV) による網膜中心の黄斑部 (図 1、図 2) の滲出性変化を特徴とする進行性の疾患で [1]、欧米では以前より中途失明原因の第一位となっている [2]。本邦においても AMD は近年人口の高齢化により失明原因として年々増加している [3]。以前から明らかであった AMD の古典的な前駆病変として網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium: RPE) 障害や網膜色素上皮直下に生じるドルーゼンと呼ばれる老廃物の沈着等が挙げられる (図 3)。近年の研究により病態の背景は網膜色素上皮、ブルッフ膜を主座とする慢性的な炎症が原因となることがわかってきた。すなわち、視細胞代謝物質の残渣からなる老化色素リポフスチンの RPE への沈着を背景にした慢性的な RPE の機能不全がドルーゼンや RPE 異常等の前駆病変の形成を促し [4, 5]、この前駆病変がさらに進行すると、脈絡膜から新生血管が発生し、網膜に伸展すると推定されている (図 3、図 4)。形成された脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization: CNV) は未熟でバリア構造をもたず、このため、滲出性の変化や出血を来す (図 4)。惹起された視力低下は不可逆性であり、重篤な視力低下をきたす原因となる [1]。

図 1 眼球の解剖

眼球模式図

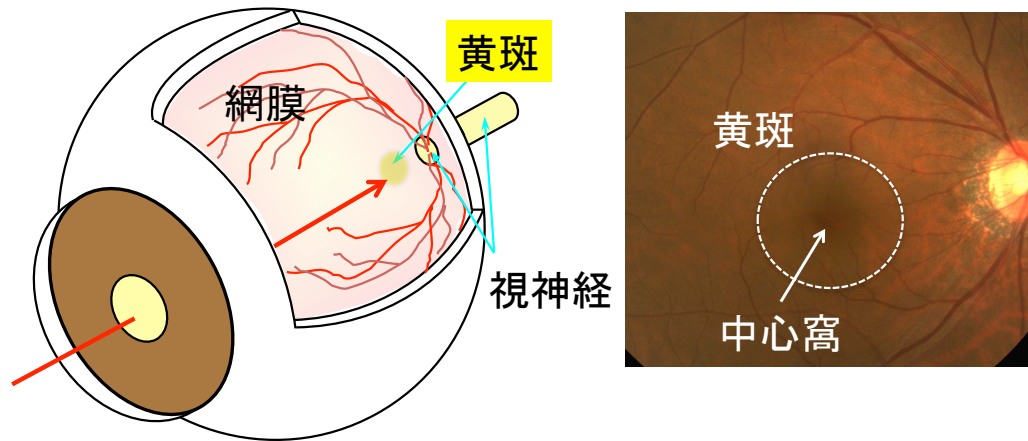


図 2 眼球および網膜脈絡膜断層像

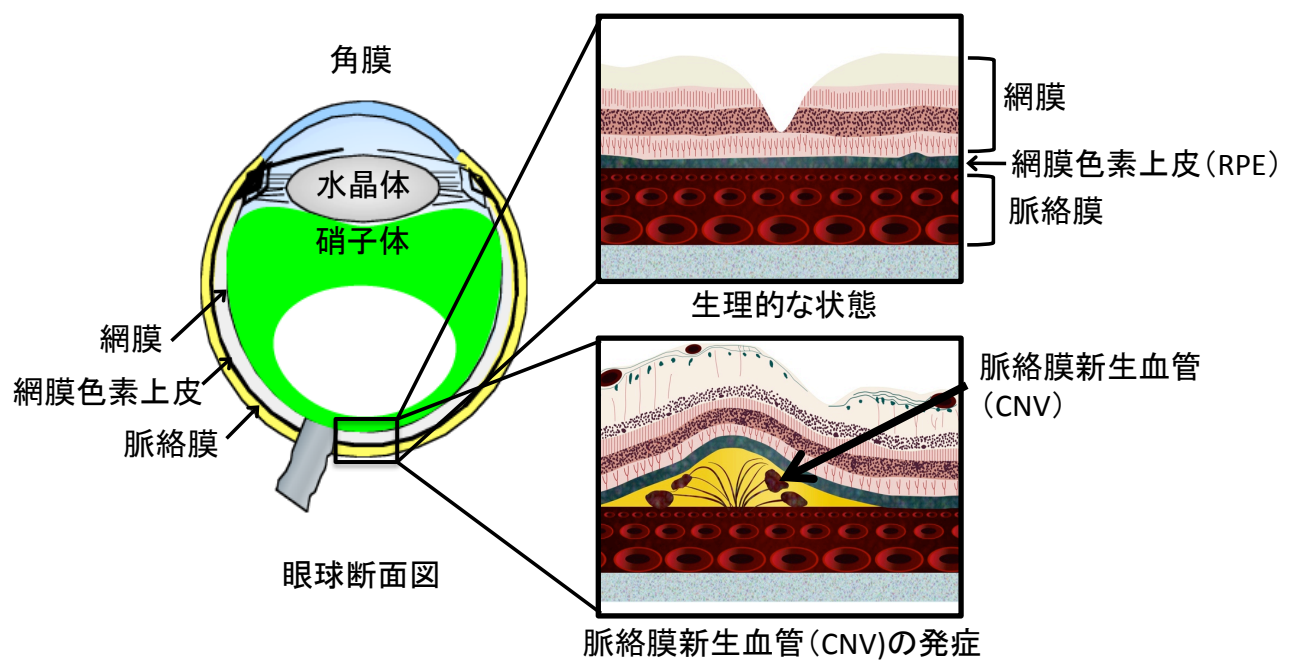


図 3 CNV 進行の模式図

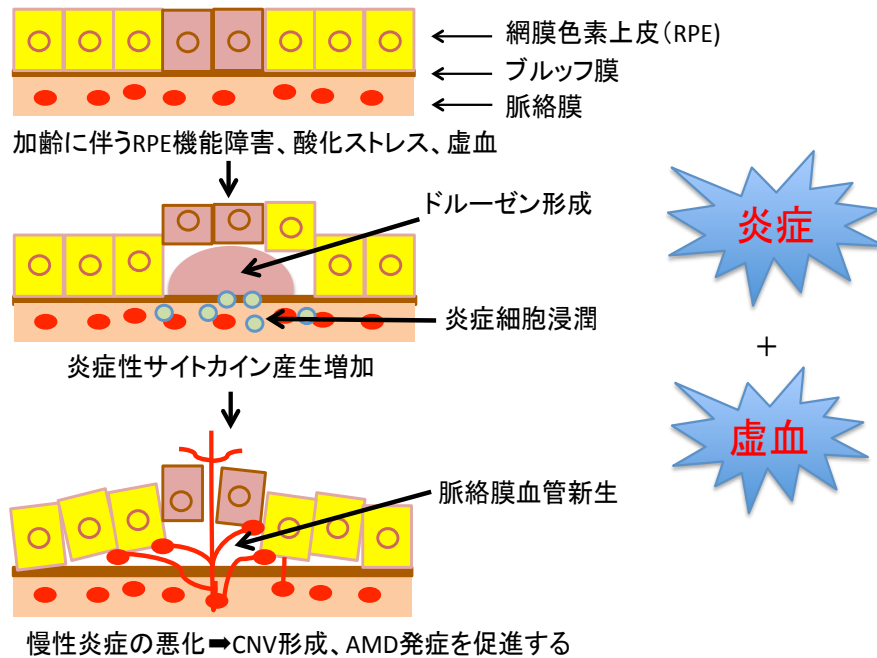
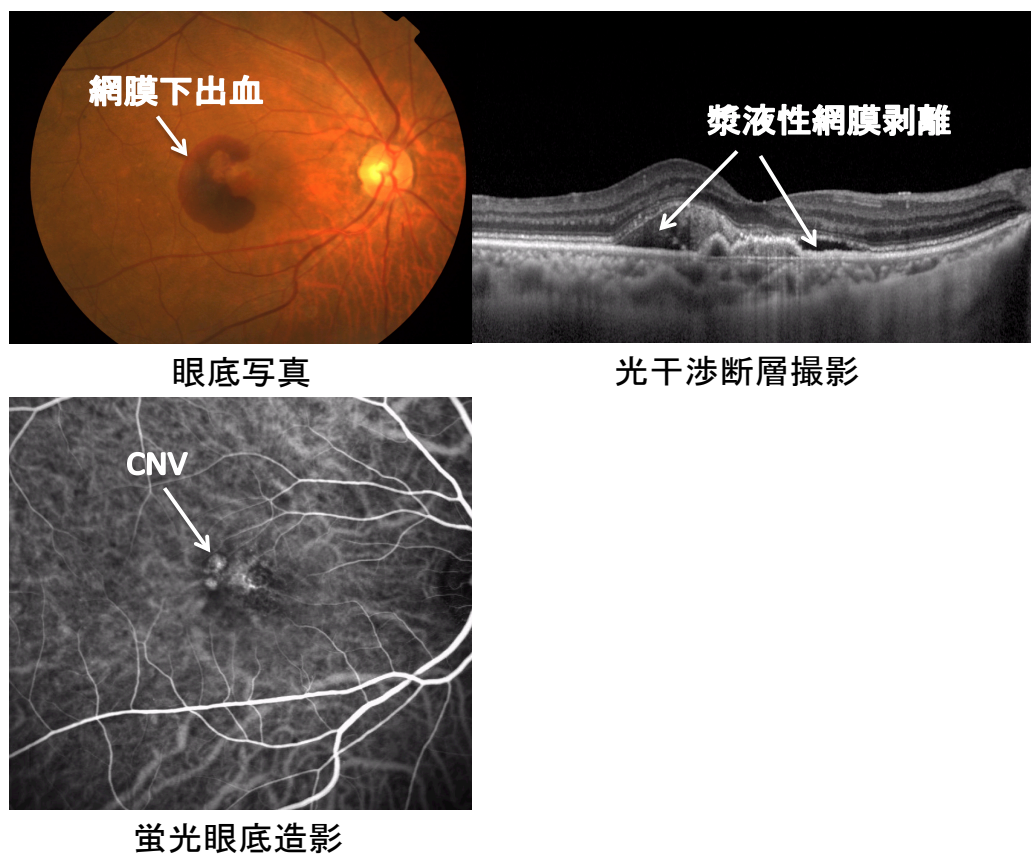


図 4 AMD 症例の臨床像



上述のように炎症が滲出型 AMD における新生血管の病態形成と強く関連しているが、炎症細胞群の中でも、動物モデルを用いた検討で特にマクロファージが重要であると考えられる様になってきた[6]。しかしながら、マクロファージの役割の詳細については未だに明らかとなっていない。レーザー誘発 CNV 動物モデルではマクロファージおよび顆粒球が新生血管周囲の組織へ浸潤し、さらにこれらの炎症細胞を除去することにより、CNV が抑制されることが報告されている[7, 8]。一方、マクロファージの眼内投与により CNV サイズが縮小したため、マクロファージが血管新生抑制作用を持つとの報告もある[9, 10]。この様にマクロファージの CNV への作用は極めて複雑で、用いられる実験動物の週齢またはマクロファージのサブタイプや年齢に依存する可能性が考えられる。さらに、マクロファージ以外の炎症細胞の加齢黄斑変性に対する影響についても未だに議論がある。近年、加齢黄斑変性の動物モデルにおいて酸化ストレスの最終産物である  $\omega$ -2-カルボキシエチル-ピロール (CEP) の免疫誘導により、インターロイキン 17 (IL-17) とインターフェロン  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 産生 T 細胞がマクロファージの分化を誘導し、CNV 形成に促進的に働くことが報告されている[11]。一方、T 細胞の CNV 形成への影響が少ないとの報告をしているグループもある[12]。ま

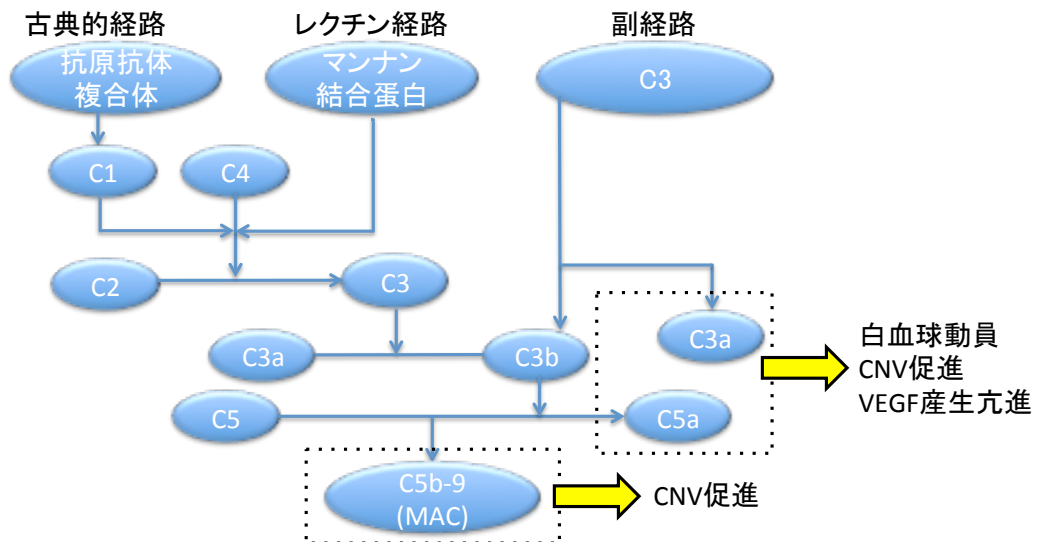
た、レーザー光凝固後に B 細胞の眼内への浸潤は認められないとの報告がある [12]。このように、リンパ球の血管新生への関与も未だに明らかになっていない。

マウスにおいて、血液中の炎症性単球由来のマクロファージは形態や機能により、3つのサブタイプ ( $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$ 、 $\text{Ly6C}^{\text{int}}$  と  $\text{Ly6C}^{\text{lo}}$  細胞) に分けられる [13]。 $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$  細胞は従来の M1 単球・マクロファージに近い形質を持ち、組織へ遊走し、炎症を惹起し、抗菌、抗ウイルス作用を発揮する [14-16]。一方、 $\text{Ly6C}^{\text{lo}}$  細胞は抗炎症、創傷治癒等の作用がある M2 単球・マクロファージに近い形質を持っていると考えられている [17-19]。 $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$  単球は CC ケモカイン受容体 2 (CCR2) を介して骨髄から血液へ流入し、 $\text{Ly6C}^{\text{lo}}$  細胞へ分化する [20, 21]。さらに、 $\text{Ly6C}^{\text{lo}}$  マクロファージはケモカイン受容体 CX3CR1 を介して組織へリクルートされ、組織マクロファージとして存在すると考えられている [22]。しかし、一方で最近の研究では組織マクロファージは卵黄嚢または胎児肝細胞に由来することがあり、さらに局所で自己再生することがあると示されている [23-25]。 $\text{Ly6C}^{\text{int}}$  単球・マクロファージは定常状態において  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$  サブタイプから  $\text{Ly6C}^{\text{lo}}$  サブタイプに分化する過程で見られる不安定な中間状態であると考えられている [13]。これらの

サブタイプの役割は細胞が存在する環境に依存する可能性が考えられるが、未だに議論が多く、明確に解明されていない。

近年のゲノム解析により加齢黄斑変性においては補体の代替経路による活性化が重要であると考えられる様になってきた。すなわち加齢に伴う補体活性化により RPE に炎症が誘発され、その結果として RPE およびその基底膜の間に老廃物であるドルーゼンが形成されることが示されてきた[5, 26]。さらに、組織学的検討では AMD の前駆病変のドルーゼン近傍に補体成分 C3 の異常沈着が示されている[27]。C3 は血液中で加水分解され、分解産物の C3a、C3b およびその下流の分解産物である C5a を産生するが、これらが好中球やマクロファージの組織への動員を誘導することが報告されている[28, 29]。レーザー誘発 CNV のマウスモデルを用いた検討では C3a および C5a が血管新生を促進し、さらに RPE における VEGF の発現を上昇させることが明らかになっている[30] (図 5)。また、C3b の活性化により、補体経路の活性化が進むと最終的には膜侵襲複合体 C5b-9 (MAC) が形成されるが、動物モデルにおいては MAC の抑制により CNV が縮小することが示されている[31]。

図 5 補体経路の CNV への関与



組織損傷後、炎症性単球は主に骨髄および血液から組織へ動員される[32]。

近年の研究で、脾臓は単球のリザーバーとして機能し、虚血性心筋梗塞後、交感神経刺激により脾臓由来の単球、マクロファージが損傷組織へ浸潤し炎症を促進することが示された[33]。また、以前の検討ではラットで頸部交感神経節を切断することにより、脈絡膜血流増加、血管サイズ増大が見られると報告されている[34]が、交感神経の血管新生への関与に関してはほとんど検討されていない。

## 1-2 今回の検討

今回の研究では以下の3点について検討を行った。

### 1. CNV と炎症細胞との関連

まず、炎症細胞のCNVへの関与を調べるために野生型マウス(WT)にレーザーを照射し、CNVを誘発させたモデルを作成した。このモデルを用いて、フローサイトメトリー解析にてレーザー光凝固前後における網膜およびRPE/脈絡膜の炎症細胞の経時変化を検討した結果、レーザー光凝固後にCD4<sup>+</sup>T細胞、B220<sup>+</sup>B細胞、顆粒球および単球・マクロファージの3つのサブタイプ(Ly6C<sup>hi</sup>、Ly6C<sup>int</sup>、Ly6C<sup>lo</sup>)が増加することが明らかになった。一方、CD8<sup>+</sup>T細胞には変化が認められなかった。これらの結果からCNV形成過程においてリンパ球、顆粒球、単球・マクロファージが関与している可能性が示唆されたため、次に各炎症細胞を欠失したノックアウトマウスまたは薬剤にて炎症細胞が除去されたマウスを用い、CNV面積を比較検討した。CNV面積は炎症性単球の組織へのリクルートが抑制されるCCR2ノックアウトマウスおよびクロドロネート腹腔内投与により作成されたマクロファージ枯渇マウスにおいてコントロールと比較して有意に縮小したが、CD4遺伝子欠損マウスまたはT細胞とB細胞の両方が存在しないRag2ノックアウトマウ



スでは有意な変化を認めなかった。この結果より、T細胞およびB細胞はCNV形成への関与が少なく、単球・マクロファージがCNV形成に関与することが明らかになった。

## 2. 補体 C3 の CNV およびマクロファージの眼内浸潤への関与

WT および C3 ノックアウトマウス ( $C3^{-/-}$ ) のレーザー誘発 CNV モデルを用いて、レーザー光凝固後 7 日目に CNV 面積を比較検討した結果、WT と比較して  $C3^{-/-}$  マウスで CNV 面積が有意に縮小することが明らかになった。また、フローサイトメトリー解析にてレーザー光凝固前後における網脈絡膜および末梢血単球・マクロファージのサブタイプ ( $Ly6C^{hi}$ 、 $Ly6C^{int}$ 、 $Ly6C^{lo}$ ) の経時変化を検討したところ、WT と比較して  $C3^{-/-}$  マウス末梢血  $Ly6C^{hi}$  単球の割合が増加する一方で、眼内  $Ly6C^{hi}$ 、 $Ly6C^{int}$  および  $Ly6C^{lo}$  マクロファージはいずれもレーザー光凝固後に有意に低い割合を示した。さらに、網脈絡膜から採取した  $Ly6C^{hi}$  および  $Ly6C^{lo}$  細胞について RT-PCR 法を用いて VEGF 発現量を検討した結果、VEGF は主に  $Ly6C^{hi}$  細胞由来であり、WT と比較して  $C3^{-/-}$  マウスの眼内における VEGF 発現増加が抑制されることが明らかになった。

### 3. 交感神経の CNV およびマクロファージの眼内浸潤への関与

交感神経  $\beta 3$  受容体遮断薬投与、脾臓交感神経除神経を行ったマウスのレーザー誘発 CNV モデルを用いて交感神経の CNV 形成への作用を検討したところ、コントロール群と比較して  $\beta 3$  ブロッカー投与または脾臓神経除神経マウスで CNV 面積が有意に縮小することが明らかになった。また、脾臓摘出マウスにおいても CNV が抑制された。さらに、フローサイトメトリー解析にて脾臓神経除神経マウスの眼内および末梢血マクロファージサブタイプの割合を検討した結果、眼内マクロファージの割合はレーザー照射前においてコントロール群と比較して脾臓神経除神経マウスのいずれのサブタイプにおいても有意な減少が認められ、さらに、レーザー光凝固後 3 日目において  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$  細胞は有意に低い割合を示した。一方、末梢血中においてはレーザー照射前後で  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$ 、 $\text{Ly6C}^{\text{int}}$  と  $\text{Ly6C}^{\text{lo}}$  単球のいずれにおいても脾臓神経除神経マウスとコントロール群の間に有意差が認められなかった。また、同様に脾臓摘出マウスの眼内および末梢血単球・マクロファージの割合の経時変化を検討したところ、コントロール群と比較してレーザー照射前およびレーザー光凝固後 3 日目において眼内  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$  細胞の割合に有意な減少を認め、眼内  $\text{Ly6C}^{\text{int/lo}}\text{CD64}^+$  細胞がレーザー照射前およびレーザ

一光凝固後 3、7 日目のすべての測定時期で少ないことが明らかになった。一方、Ly6C<sup>lo</sup> 細胞においては両群間に有意差を認めなかった。末梢血に関してはコントロール群と比較して脾臓摘出マウスにおいて Ly6C<sup>int</sup> 細胞の割合はレーザー照射前およびレーザー光凝固後 3、7 日目に有意な減少が認められ、Ly6C<sup>lo</sup> 細胞の割合はレーザー光凝固後 7 日目に有意に低かった。しかしながら、Ly6C<sup>hi</sup> 細胞では両群間に有意差が認められなかった。次に、WT マウスの脾臓から採取した Ly6C<sup>hi</sup> 細胞を脾臓神経除神経マウスに尾静脈注射により移入し CNV 面積を比較検討したところ、コントロール群と比較して脾臓神経除神経マウスで CNV 面積が有意に減少したが、Ly6C<sup>hi</sup> 細胞を移入したマウスでは CNV 面積が再び増大した。さらに WT マウス (Ly5.2) より作成したコントロール、脾臓神経除神経マウスおよび脾臓摘出マウスの各々に Ly5.1 マウスの脾臓より採取した Ly6C<sup>hi</sup> 細胞を移入した。結果、コントロールと比較して脾臓神経除神経マウスおよび脾臓摘出マウスでは Ly5.1 マウス由来 Ly6C<sup>hi</sup> 細胞の眼内への動員が抑制されることが明らかになった。これらの結果から CNV モデルにおいては、脾臓はマクロファージを主体とした炎症に関連するものの、従来報告されているように単球・マクロファージのリザーバーとして損傷組織に細胞を浸潤させる機能を有するの

ではなく、間接的に単球・マクロファージの組織への走化を促進することが示

唆された。

## 第 2 章 脈絡膜新生血管と炎症細胞との関連

## 2-1 背景

脈絡膜新生血管 (CNV) の形成過程で炎症細胞が重要な役割をはたしている [35]。好中球は動物モデルで血管新生を促進することが報告されている。リンパ球、単球およびマクロファージの血管新生への関与については、未だに議論が多く明らかになっていない。そこで、我々は野生型マウスのレーザー誘発 CNV モデルを用い、フローサイトメトリー解析にてレーザー光凝固後網脈絡膜における CD4<sup>+</sup>T 細胞、B220<sup>+</sup> B 細胞、顆粒球および単球・マクロファージの 3 つのサブタイプ (Ly6C<sup>hi</sup>、Ly6C<sup>int</sup>、Ly6C<sup>lo</sup>) の経時変化を検討した。さらに、網脈絡膜において増加の見られた各炎症細胞の欠失したノックアウトマウスまたは薬剤にて炎症細胞が除去されたマウスを用い、CNV サイズを評価し、各炎症細胞の CNV 形成への関与の有無を検討した。

## 2-2 方法

### 実験動物

7～8 週齢♂のマウスを用いた。C57BL/6J マウスは紀和動物実験研究所より購入した。CCR2 ノックアウトマウス (*CCR2*<sup>-/-</sup>) は Jackson laboratory より購入した。C4 ノックアウトマウス (*CD4*<sup>-/-</sup>) および Rag2 ノックアウトマウス (*Rag2*<sup>-/-</sup>) は Taconic Biosciences より購入した。すべての動物は ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research に従い取り扱った。本研究計画は、東京大学動物実験委員会の承認を得て行った。

### マクロファージ枯渇マウスモデル作製

レーザー光凝固の 24 時間前にクロドロネートリポソーム 100  $\mu$ l/10g (FormuMax Scientific Inc, CA) を腹腔内投与し、その後レーザー光凝固後 4 日目に 50  $\mu$ l/10g を追加投与し、マクロファージ枯渇マウスモデルを作製した。

### レーザー誘発 CNV モデル作製

マウスにケタミン 75mg/kg とキシラジン 5mg/kg を筋肉内投与し、全身麻酔した後に 0.5%トロピカミドで散瞳させた。セルロース水溶液を点眼し、カバーグラスを角膜に当て、細隙灯顕微鏡 (TOPCON SL7F) で観察しながらダイオードレ

レーザー (NIDEK DC-3000) で視神経乳頭から同じ距離をおいて、両眼に 4 発ずつ (伸展標本の場合) または 12 発ずつ (フローサイトメトリー解析の場合) レーザー光凝固を行い、CNV を誘発させた。以下のレーザー条件を光凝固の条件として用いた。パワー : 200mW ; スポットサイズ : 170  $\mu$ m ; 照射時間 : 20msec。

ブルッフ膜が破壊されたか否かは照射部位に泡が形成されることによって確認した [36]。レーザー光凝固は出血を防ぐために網膜血管を避けるように行った。CNV サイズの比較実験およびフローサイトメトリー解析においてマウスは各群 6~8 匹を用いた。

#### 脈絡膜伸展標本作製

レーザー光凝固後 7 日目にマウスを全身麻酔し、開胸し FITC-conjugated concanavalin A (20  $\mu$ m/mL in PBS; Vector Laboratories, Burlingame, CA) を心尖部より注入した。還流染色後眼球摘出し、4% paraformaldehyde (PFA) で固定後、前眼部、水晶体および網膜を取り除き、残った後眼部の網膜色素上皮・脈絡膜・強膜から成る組織の前縁から赤道部へ向かって 4~6 本の切開を加え、RPE/脈絡膜伸展標本作製した。蛍光顕微鏡 (Keyence Corporation, Tokyo, Japan) で撮影し、Image J software で CNV 面積を測定した。脈絡膜の網膜側の



面に輪状の低蛍光に囲まれた過蛍光の血管塊として集積する部分を CNV 範囲として同定した。CNV 面積の計測はマウスのバックグラウンドを知らない験者が行った。

#### フローサイトメトリー解析

レーザー未照射の野生型マウス、レーザー光凝固 1 日、3 日および 7 日目後の野生型マウスを安楽死させ、眼球摘出した（各群 6 匹、計 12 眼）。前眼部と硝子体を除去した後にコラゲナーゼ (1 mg/mL; Wako, Japan) およびディスパーゼ (1 mg/mL; Invitrogen) 入り PBS 溶液において網膜および RPE/脈絡膜細胞を分離した。37°C で 10 分間インキュベートし、40  $\mu$ m のナイロンメッシュを通させ、700  $\times$  g、4°C で 5 分間遠心した。上清を捨て、細胞を PBS で懸濁し、フローサイトメトリー解析のために単一細胞を既報通りに調製した [37]。フローサイトメトリー解析は FACS Aria III (BD Biosciences) を用いて行い、データ解析はソフトウェア FlowJo (Tree Star) で行った。各細胞の採取した総細胞数に対する割合を算出した。Anti-CD3-PE-Cy7、anti-CD4-PE、anti-CD8-APC、anti-B220-FITC、anti-F4/80-APC、anti-Ly6C-FITC、anti-Ly6G-APC/Cy7 (BioLegend)、anti-CD11b-Pacific Blue antibody (eBioscience) を解析に用いた。T 細胞は

CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>、B 細胞は B220<sup>+</sup>、顆粒球は CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup>Ly6G<sup>+</sup>、単球・マクロ

ファージは CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi/int/lo</sup> として定義した。

#### 統計解析

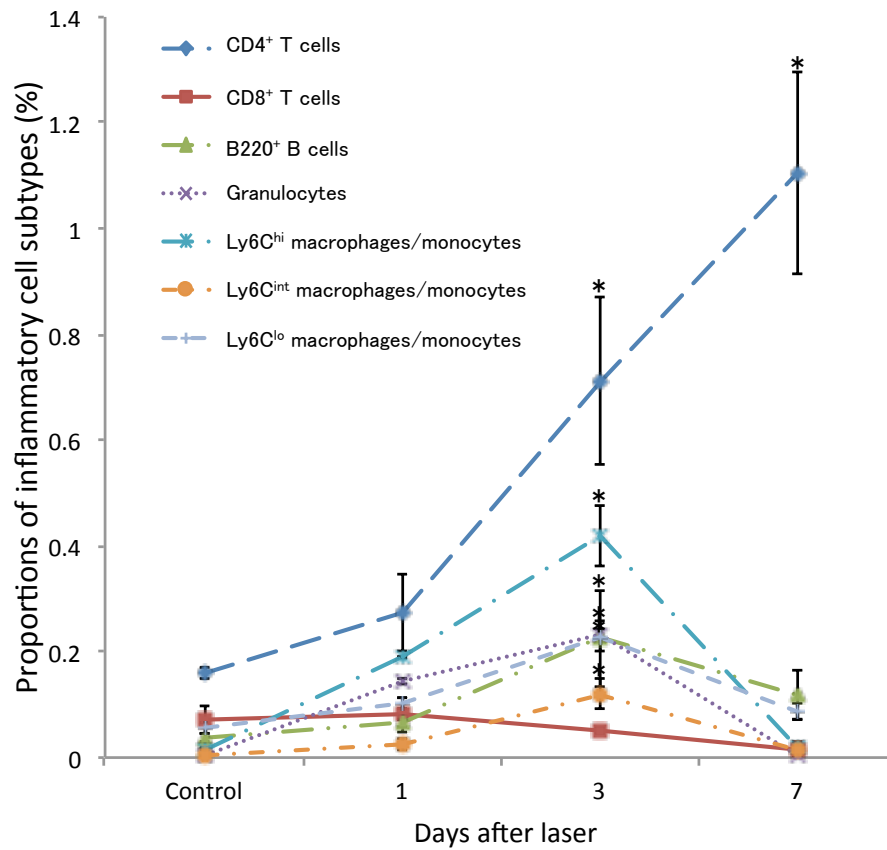
統計解析は JMP Pro 11 (SAS)を用いて Wilcoxon rank-sum test または Dunn's multiple comparison test を行った。P 値<0.05 の場合に有意差ありと判定した。

## 2-3 結果

### レーザー光凝固後眼内における各炎症細胞の経時変化

まず、C57BL/6J マウスにレーザー誘発 CNV を作製した後、フローサイトメトリー解析にて眼内における炎症細胞の経時変化を検討した。CD4<sup>+</sup>T 細胞はレーザー光凝固後 1 日目より増加し、この増加は 7 日まで持続した。一方、B 細胞、顆粒球および単球・マクロファージの 3 つのサブタイプ (Ly6C<sup>hi</sup>、Ly6C<sup>int</sup>、Ly6C<sup>lo</sup>) においてレーザー後 1 日目より増加が認められ、この増加は 3 日目にピークに達し 7 日目で減少した。CD8<sup>+</sup>T 細胞では明らかな変化を認めなかった (図 6)。

図 6 野生型マウスにおける眼内炎症細胞の経時変化

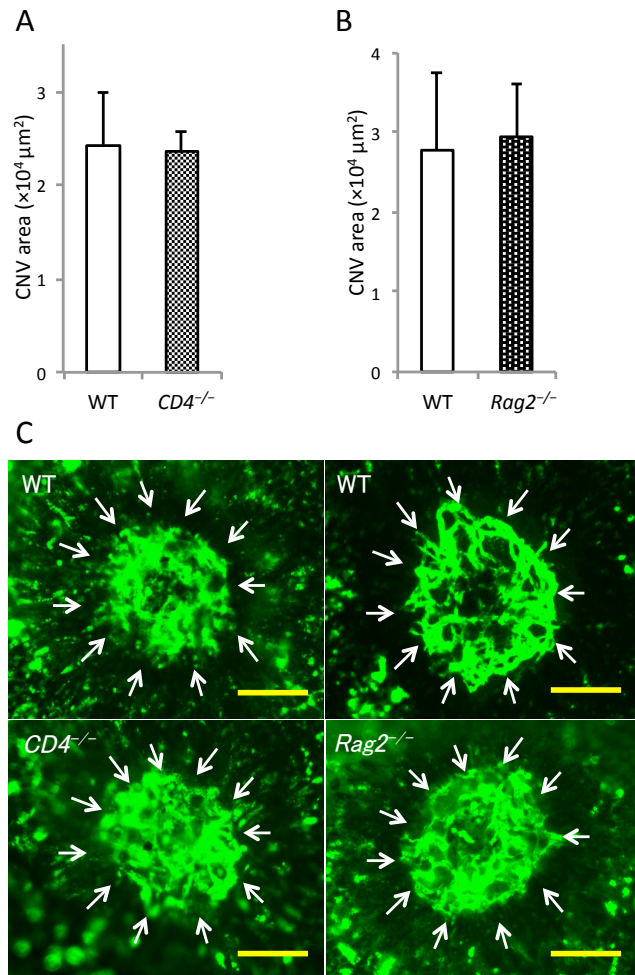


野生型マウスにレーザー誘発 CNV を作製後、フローサイトメトリー解析を用いて眼内各炎症細胞の経時変化を検討した。\* $P < 0.05$  versus control of the same subtype。

## 各炎症細胞の CNV 形成への関与

$CD4^{-/-}$ マウスおよび  $Rag2^{-/-}$ マウスを用いてリンパ球の CNV 形成への関与の有無を検討した。レーザー光凝固 7 日目にコントロール群と比べ、 $CD4^{-/-}$ マウスまたは  $Rag2^{-/-}$ マウスにおいては CNV 面積に変化が認められなかった(図 7)。さらに、抗 CD3 抗体で染色されたヒト眼球 CNV 標本切片(日本大学医学部眼科学 中静裕之先生より提供)においても T 細胞を認めなかった(図 8)。一方、 $CCR2^{-/-}$ マウスまたはクロドロネート投与により作成されたマクロファージ枯渇マウスを用い、マクロファージの CNV 形成への関与の有無を評価したところ、レーザー光凝固後 7 日目に CNV が有意に縮小することがわかった(図 9)。これらの結果より、T 細胞および B 細胞はレーザー誘発 CNV 形成への関与が少なく、単球・マクロファージが CNV 形成に関与することが明らかになった。

図 7 野生型マウス (WT) およびリンパ球欠損マウスにおける CNV 面積の比較

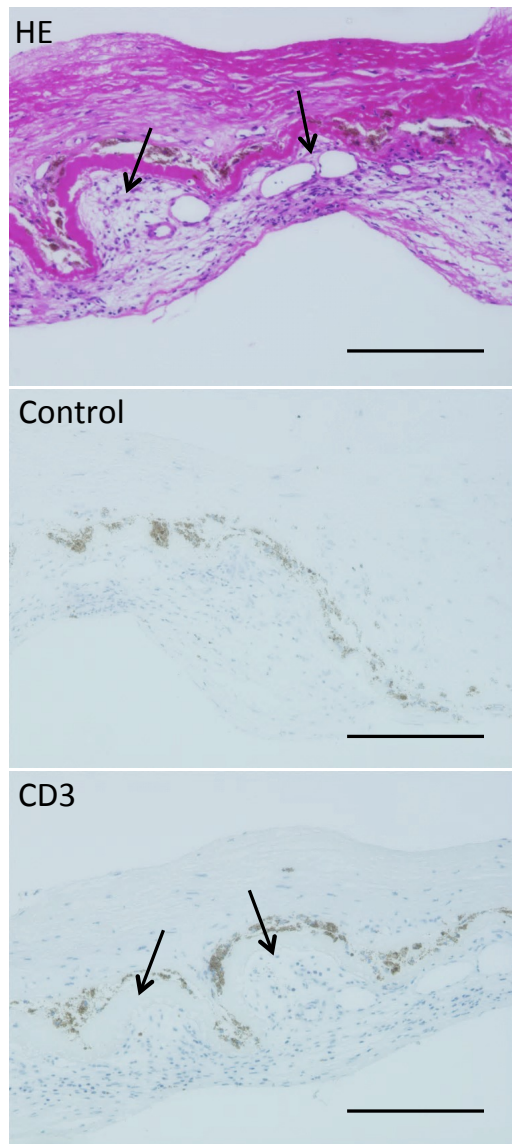


(A) レーザー光凝固後 7 日目において WT および  $CD4^{-/-}$  マウスまたは (B)  $Rag2^{-/-}$  マウスにおける

CNV 面積比較実験の結果である。(C) RPE/脈絡膜伸展標本の写真である。CNV は矢印で示してい

る。マウスを各群 8 匹ずつ使用している。Scale bars, 100  $\mu\text{m}$ 。

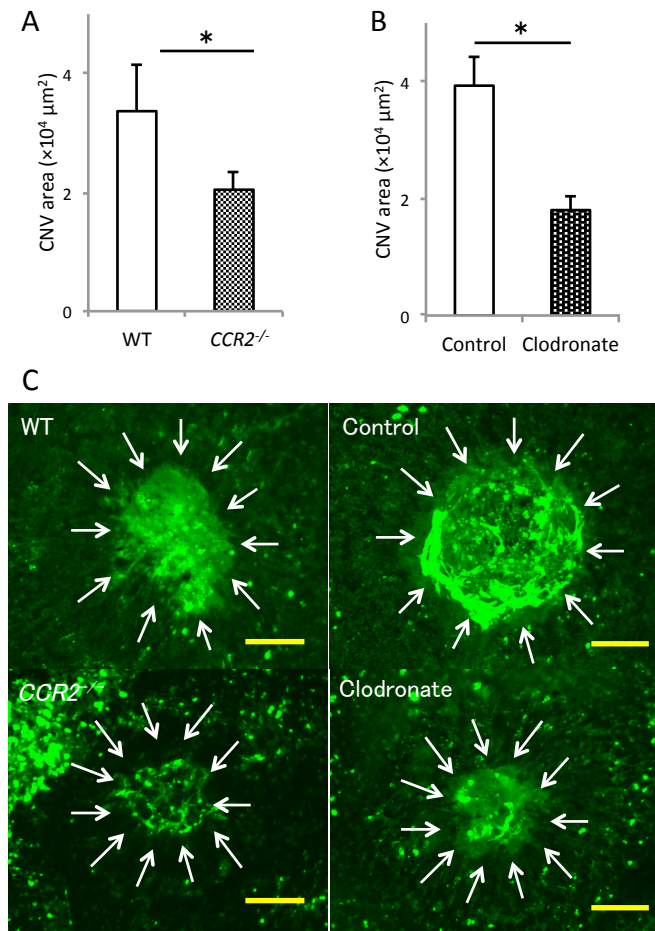
図 8 ヒト眼球組織切片免疫染色



ヒト眼球 CNV 組織切片の HE 染色および CD3 染色の写真である。矢印：CNV。褐色の細胞は網膜色素上皮細胞である。Scale bars, 200  $\mu\text{m}$ 。

図 9 WT および *CCR2*<sup>-/-</sup>マウスまたはマクロファージ枯渇マウスにおける CNV 面

積の比較



(A) レーザー光凝固後 7 日目において WT および *CCR2*<sup>-/-</sup>マウスにおける CNV 面積比較実験の結果

である。(B) コントロールおよびクロドロネート投与により作成されたマクロファージ枯渇マウ

スにおける CNV 面積比較実験の結果である。(C) RPE/脈絡膜伸展標本の写真である。CNV は矢印

で示している。マウスを各群 8 匹ずつ使用している。\* $P < 0.05$ 。Scale bars, 100  $\mu\text{m}$ 。



## 2-4 考察

リンパ球や単球、マクロファージ等の炎症細胞は CNV の形成過程で重要な役割を果たしていることが知られているが、組織損傷部位においてこれらの細胞の血管新生への作用については未だに議論が多く解明されていないことが多い。今回の検討では我々は  $CD4^{-/-}$  マウスおよび  $Rag2^{-/-}$  マウス（成熟 T 細胞と B 細胞を欠如しているマウス）を用いて T 細胞または B 細胞はレーザー誘発 CNV への関与が少ない事を明らかにした。今回の研究結果はこれまでの報告と合致している [12]。しかし、 $CD4^{+}$  T 細胞と  $\gamma \delta$  T 細胞のような T 細胞は眼で病的血管新生を促進するとの報告をしたグループもある。Nussenblatt らは AMD 患者の  $CD4^{+}$  T 細胞と単球を共培養すると補体経路（C5a 等）の活性化を介して IL-17 および IL-22 産生が促進され、さらに、これらのサイトカインの濃度が AMD 患者の血清でも上昇することを報告している [38]。Cruz-Guillory らはマウスを用いて AMD と関連のある脂質過酸化産物である CEP を眼内へ投与することによって IL-17 産生ヘルパー T 細胞が分化誘導され、これらの細胞が *in vitro* で M1 マクロファージの分化誘導を促進し、最終的に血管新生を促進するとの報告をしている [11]。さらに、近年、動物モデルにおいて  $\gamma \delta$  T 細胞および自然リンパ球様細胞より産

生された IL-17 が血管新生を増悪させることが報告されている[39]。これらの検討により T 細胞から産生された IL-17 が血管新生の過程で一定の役割をはたす可能性があり、さらにこの過程で単球・マクロファージが関連していることが示唆された。これらの研究結果から、リンパ球単独ではレーザー誘発 CNV に対する影響が少ないことが推察されるが、その関与の程度は CNV による誘発物質に依存していると考えられる。

これまでの研究では CCR 欠損またはマクロファージが除去されることにより CNV が抑制されることが報告されている[8, 40, 41]。今回の検討も同様な結果が得られている。一方、M1 サブタイプが血管新生抑制作用を持ち、眼内の異常血管の生成を妨げると我々の結果と相反する報告もある。Apte らは GM-CSF または IFN- $\gamma$  を用いて培養したマクロファージが M1 マクロファージに分化し、これをマウスの硝子体内に投与することにより ( $1 \times 10^5$  個細胞/眼) CNV が抑制されたとの報告をしている[9, 42]。しかし、この検討のように大量のマクロファージを眼内に投与し人工的にマクロファージが多量に存在する環境を作るより免疫細胞の移入モデルを用いて検討した方が生理的な状態に近いいためマクロファージの作用の研究にはもっとふさわしいと思われる。このため、以降の研究にお

いては我々はマクロファージ移入モデルを用いて検討を行うこととした。さらに、マクロファージのサブタイプの分類について議論が多く、これまでの多くの研究の様にマクロファージを2つのサブタイプ（M1 と M2）に分類することはあまりにも単純すぎるかもしれないと考えられる。マクロファージの各々のサブタイプの役割の解明は今後の研究の重要事項であると考えられるため、さらに詳細な解析を行うこととした。

### 第3章 補体 C3 の脈絡膜新生血管およびマクロファージの 眼内浸潤への関与

### 3-1 背景

補体 C3 の加水分解産物である C3a や C5a 等が血管新生促進作用を有することがこれまでに明らかになっている。第 2 章の検討によりレーザー誘発 CNV のマウスモデルで単球・マクロファージが CNV 形成に関与することが明らかになった。そこで、我々は C3 ノックアウトマウス ( $C3^{-/-}$ ) にレーザー誘発 CNV を作製し、CNV の形成過程で C3 のマクロファージのリクルートへの関与の有無を検討した。まず、RPE/脈絡膜伸展標本作製し、CNV 面積を測定し、C3 の CNV に対する影響を組織学的に検討した。次に  $C3^{-/-}$  マウスにおいてレーザー光凝固後眼内および末梢血におけるマクロファージの 3 つのサブタイプ ( $Ly6C^{hi}$ 、 $Ly6C^{int}$ 、 $Ly6C^{lo}$ ) の経時変化をフローサイトメトリー解析で検討した。さらに網脈絡膜からマクロファージの  $Ly6C^{hi}$  および  $Ly6C^{lo}$  細胞を採取し、レーザー光凝固前後における *Vegfa164* および *Vegfr1* の発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて比較した。

## 3-2 方法

### 実験動物

C57BL/6J マウスを野生型マウスとして用い紀和動物実験研究所より購入した。

C3 ノックアウトマウス ( $C3^{-/-}$ ) は内藤篤彦先生（大阪大学医学部循環器内科）より譲渡いただいた。全ての実験において7～8週齢♂のマウスを用いた。すべての動物は ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research に従い取り扱った。本研究計画は、東京大学動物実験委員会の承認を得て行った。

### レーザー誘発 CNV モデル作製

第2章の方法参照。CNV サイズの比較実験において各群6匹のマウスを用いた。

フローサイトメトリー解析においては各群6匹のマウスを用い、また、RNA 抽出には各群10匹のマウスを用い、独立した3回の実験を実施した。

### 脈絡膜伸展標本作製

第2章の方法参照。

### フローサイトメトリー解析

レーザー未照射のマウス、レーザー光凝固 1 日、3 日および 7 日後のマウスを全身麻酔し、開胸し心臓より採血した。その後眼球摘出（各群 6 匹、計 12 眼）し、前眼部と硝子体を除去した後にコラゲナーゼ (1 mg/mL; Wako, Japan) およびディスパーゼ (1 mg/mL; Invitrogen) 入り PBS 溶液において網膜および RPE/脈絡膜細胞を分離した。単一細胞は第 2 章の方法を用いて調製した。フローサイトメトリー解析は FACS Aria III (BD Biosciences) を用いて行い、データ解析はソフトウェア FlowJo (Tree Star) で行った。マクロファージの各サブタイプの採取した総細胞数に対する割合を算出した。anti-F4/80-APC、anti-Ly6C-FITC、anti-Ly6G-APC/Cy7、anti-CD11b-Pacific Blue antibody が用いられ、単球・マクロファージは  $CD11b^+F4/80^+Ly6C^{hi/int/lo}$  として定義した。Ly6C<sup>hi</sup> および Ly6C<sup>lo</sup> 細胞は FACS Aria III を用いてレーザー未照射およびレーザー光凝固 3 日後のマウス（各群 10 匹、計 20 眼）の網膜および RPE/脈絡膜より採取した。

#### リアルタイム RT-PCR

RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用い抽出した。cDNA は SuperScript® VILO™ Master Mix (Invitrogen) を用い調製した。リアルタイム RT-PCR は SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takara) を用い総量 20  $\mu$  l で Thermal Cycler Dice® Real Time System

II (Takara)を用い行った。レーザー照射前およびレーザー光凝固 3 日後において WT および *C3<sup>-/-</sup>* マウス眼内 Ly6C<sup>hi</sup> および Ly6C<sup>lo</sup> 細胞における *Vegfa164* と *Vegfr1* の発現量を検討し、それぞれの遺伝子発現量は *Gapdh* の発現量を元に補正した。使用したプライマーは以下の通りである。Mouse-*Vegfa164*: forward, 5'-GCCAGCACATAGGAGAGATGAGC-3'; reverse, 5'-CAAGGCTCACAGTGATTTTCTGG-3'。Mouse-*Vegfr1*: forward, 5'-GAGGAGGATGAGGGTGTCTATAGGT-3'; reverse, 5'-GTGATCAGCTCCAGGTTTGA CTT-3'。Mouse-*Gapdh*: forward, 5'-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3'; reverse, 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'。

#### 統計解析

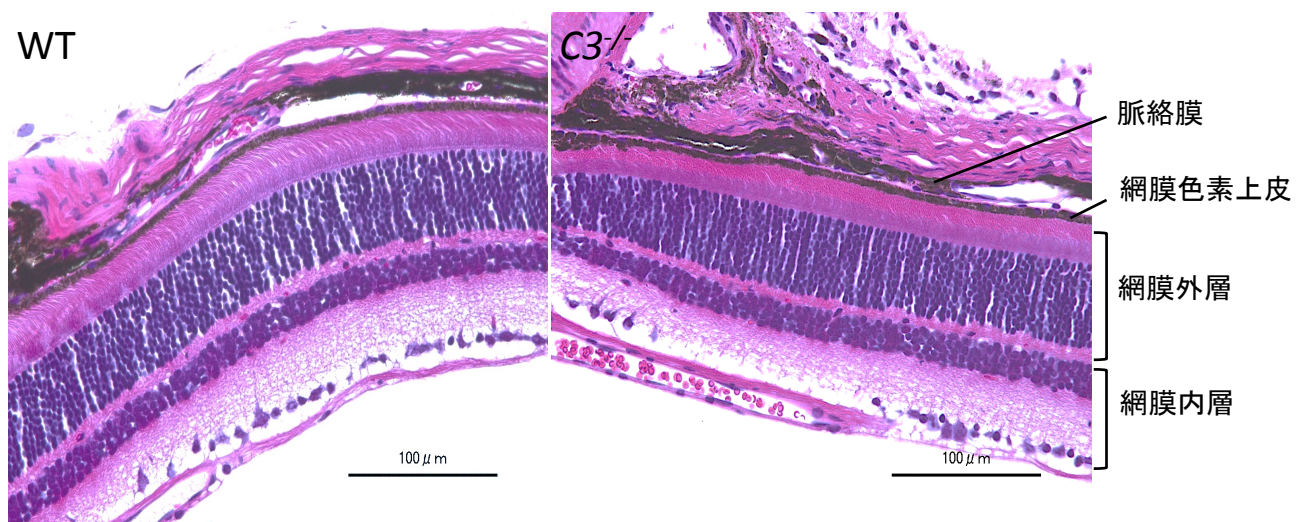
統計解析は JMP Pro 11 (SAS)を用い Wilcoxon rank-sum test を行った。P 値 < 0.05 の場合に有意差ありと判定した。



### 3-2 結果

レーザー誘発性 CNV モデルの実験に先立って、24 週齢の野生型マウス (WT) と  $C3^{-/-}$  マウスの網膜・脈絡膜構造を組織学的に調べたが、 $C3^{-/-}$  マウスは野生型マウスと同じ網脈絡膜構造を持ち、また、ドルーゼン、網膜変性および炎症細胞浸潤を認めなかった (図 10)。

図 10 マウス眼球組織標本 HE 染色

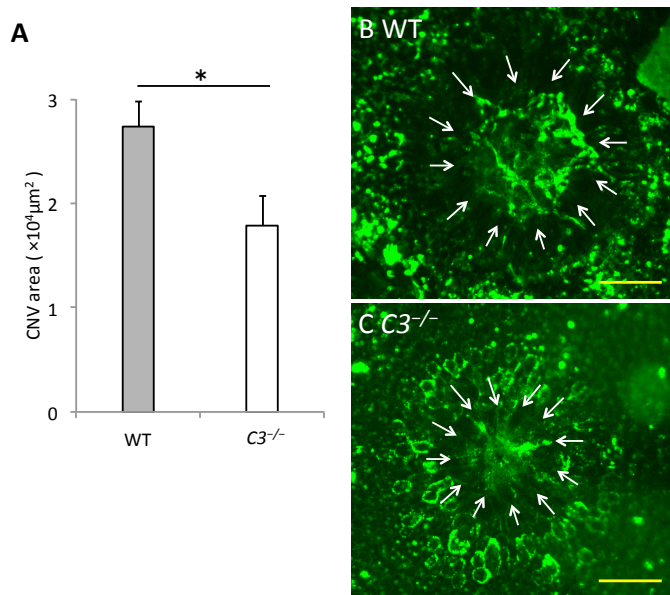


24 週齢の野生型マウス (WT) と  $C3^{-/-}$  マウス眼球組織標本を HE 染色で染色し、両者の網膜・脈絡膜構造を調べた。

### C3 の CNV 面積に対する影響

7～8 週齢♂の野生型マウスおよび  $C3^{-/-}$  マウスにレーザー誘発 CNV を作成し、7 日後に CNV 面積を測定した結果、野生型マウスと比較して  $C3^{-/-}$  マウスで CNV が約 35%縮小することが明らかになった (図 11)。

図 11 野生型マウス (WT) および  $C3^{-/-}$  マウスにおける CNV 面積の比較



(A) レーザー光凝固後 7 日目において野生型マウス (WT) および  $C3^{-/-}$  マウスにおける CNV 面積比較実験の結果である。(B) WT と (C)  $C3^{-/-}$  マウスの RPE/脈絡膜伸展標本の写真である。CNV は矢印で示している。マウスは各群 6 匹を使用している。\* $P < 0.05$ 。Scale bars, 100 μm。

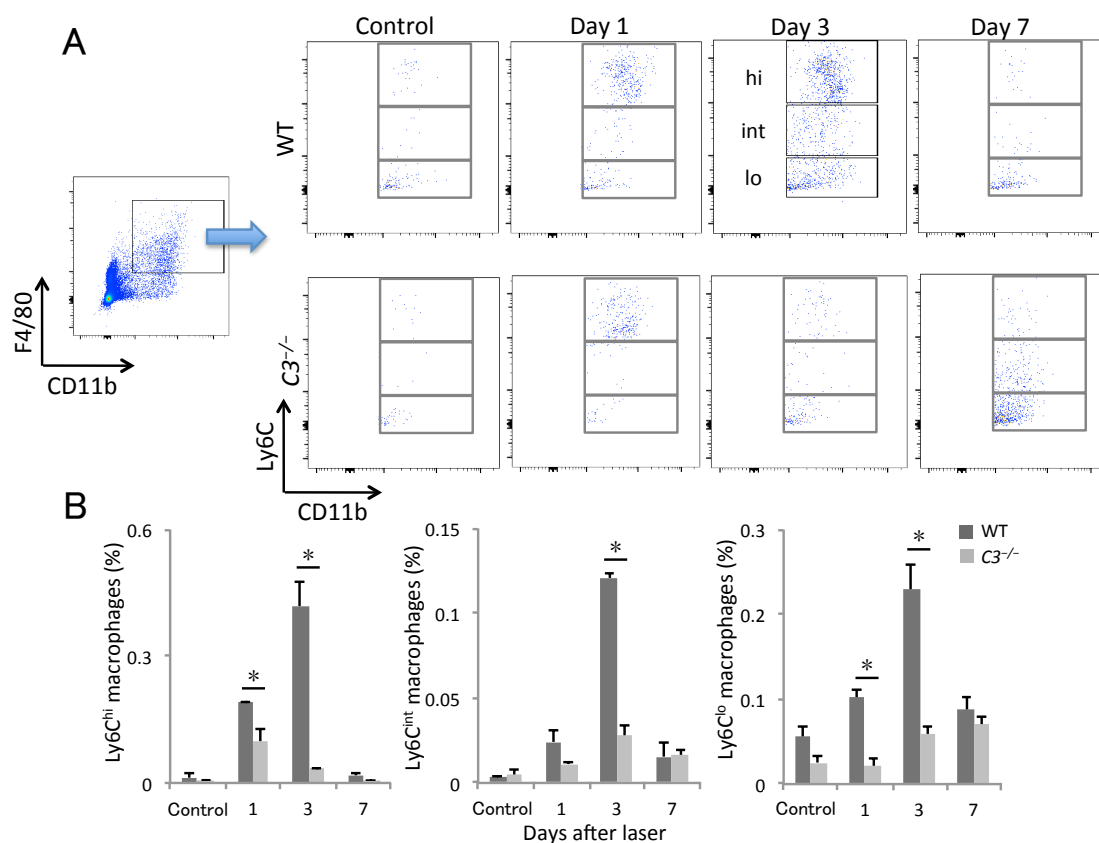
### C3 の眼内および末梢血中炎症細胞浸潤への影響

次に、レーザー光凝固後後眼部（網膜、RPE/脈絡膜）における単球・マクロファージのサブタイプの経時変化をフローサイトメトリー解析にて検討したところ、野生型マウスで眼内における  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$ 、 $\text{Ly6C}^{\text{int}}$  および  $\text{Ly6C}^{\text{lo}}$  細胞の割合がレーザー光凝固後 1 日目より増加し、3 日目でピークに達することがわかった。一方、野生型マウスと比較し  $\text{C3}^{-/-}$  マウスでは眼内  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$  および  $\text{Ly6C}^{\text{lo}}$  単球・マクロファージの増加はレーザー光凝固後 1 日目より抑制され ( $52.0 \pm 14.9\%$ ,  $20.5 \pm 11.5\%$  of wild-type values)、また、眼内  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$ 、 $\text{Ly6C}^{\text{int}}$  および  $\text{Ly6C}^{\text{lo}}$  サブタイプはいずれもレーザー光凝固後 3 日目において有意に低い割合を示すことが明らかになった ( $8.0 \pm 1.3\%$ ,  $23.1 \pm 4.1\%$  and  $25.5 \pm 0.7\%$  of wild-type values) (図 12)。

さらに、野生型マウスおよび  $\text{C3}^{-/-}$  マウスの末梢血におけるマクロファージサブタイプの経時変化を検討した結果、レーザー照射前においては両群間に有意差を認めなかったが、野生型マウスと比較して  $\text{C3}^{-/-}$  マウスの末梢血  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$  細胞の割合はレーザー光凝固後 1 日目、3 日目および 7 日目において有意に高かつ

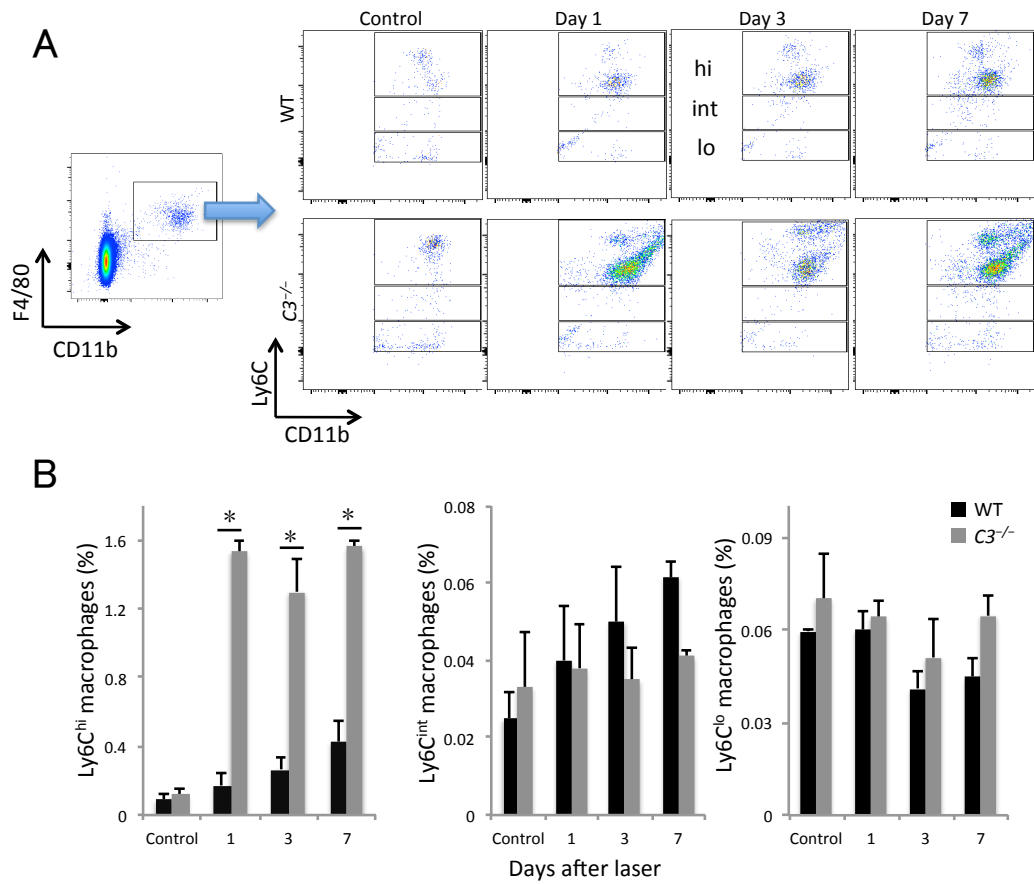
た。一方、末梢血 Ly6C<sup>int</sup> および Ly6C<sup>lo</sup> 細胞はレーザー光凝固前後において両群間に有意差が認められなかった (図 13)。

図 12 レーザー光凝固前後における眼内マクロファージの経時変化



(A) フローサイトメトリーを用いて野生型マウス (WT) および  $C3^{-/-}$ マウスの眼内マクロファージの経時変化を検討し、レーザー未照射、レーザー光凝固後 1 日、3 日および 7 日目の代表的なプロットを示している。上段: WT、下段:  $C3^{-/-}$ マウス。Hi、int および lo はそれぞれ Ly6C<sup>hi</sup>、Ly6C<sup>int</sup> および Ly6C<sup>lo</sup> サブタイプを示している。(B) 眼内 Ly6C<sup>hi</sup>、Ly6C<sup>int</sup> および Ly6C<sup>lo</sup> マクロファージの採取した総細胞数に対する割合である。\* $P < 0.05$  versus control of the same subtype.

図 13 レーザー光凝固前後における末梢血単球の経時変化



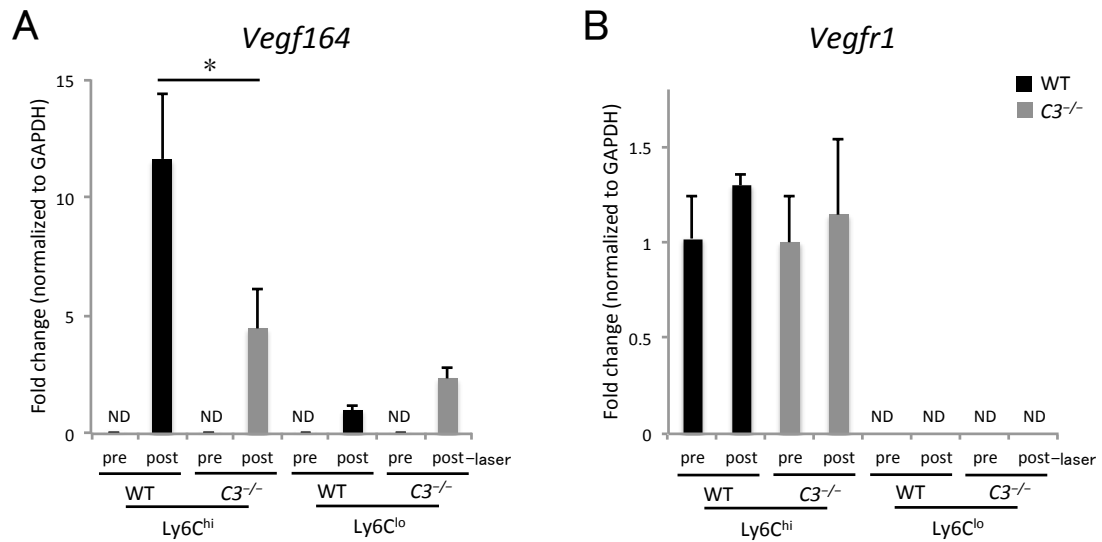
(A) フローサイトメトリーを用いて野生型マウス (WT) および  $C3^{-/-}$  マウスの末梢血単球の経時変化を検討し、レーザー未照射、レーザー光凝固後 1 日、3 日および 7 日目の代表的なプロットを示している。上段: WT、下段:  $C3^{-/-}$  マウス。Hi、int および lo はそれぞれ  $Ly6C^{hi}$ 、 $Ly6C^{int}$  および  $Ly6C^{lo}$  サブタイプを示している。(B)  $Ly6C^{hi}$ 、 $Ly6C^{int}$  および  $Ly6C^{lo}$  単球の末梢血白血球に対する割合である。\* $P < 0.05$  versus control of the same subtype。

### C3 の眼内マクロファージにおける *Vegf164* と *Vegfr1* の発現への影響

最後に、野生型マウスおよび *C3*<sup>-/-</sup>マウスの後眼部から採取した Ly6C<sup>hi</sup> と Ly6C<sup>lo</sup> 細胞についてレーザー光凝固前後における *Vegf164* と *Vegfr1* の発現を検討した。レーザー照射前の両群のマウスで眼内 Ly6C<sup>hi</sup> と Ly6C<sup>lo</sup> 細胞のいずれにおいても *Vegf164* は検出限界以下であった。レーザー光凝固後 3 日目に *C3*<sup>-/-</sup>マウスで *Vegf164* 発現上昇を認めたが、野生型マウスと比較し、この上昇が少ないことが明らかになった。一方、両群のマウスでレーザー光凝固前後において眼内 Ly6C<sup>hi</sup> 細胞の *Vegfr1* の発現量に有意な差を認めなかった。また、レーザー光凝固前後において両群のマウスの Ly6C<sup>lo</sup> 細胞で *Vegfr1* は検出限界以下であった (図 14)。

図 14 眼内 Ly6C<sup>hi</sup> および Ly6C<sup>lo</sup> マクロファージにおける *Vegf164* および *Vegfr1*

発現量の比較



(A) 両群のマウスの眼内 Ly6C<sup>hi</sup> と Ly6C<sup>lo</sup> 細胞における *Vegf164* 発現量の比較である。(B) 両群の

マウスの眼内 Ly6C<sup>hi</sup> と Ly6C<sup>lo</sup> 細胞における *Vegfr1* 発現量の比較である。



### 3-4 考察

RPE においてドルーゼンに存在する補体 C3 の活性化が慢性炎症を惹起し、AMD における血管新生に重要な役割をはたしていることは以前より報告されている [5, 26, 27]。近年、レーザー誘発 CNV モデルで C3 および C3a 受容体がレーザー光凝固後脈絡膜への白血球浸潤にも強く関わっていることがわかってきた [30, 43]。一方、あるグループは  $C3^{-/-}$  マウスで CNV が増大すると報告している [44]。そこで、今回の研究では我々は C3 の AMD モデルにおける血管新生への関与を調べるために C3 欠損による CNV 面積および単球・マクロファージサブタイプに及ぼす影響を検討した。

今回の研究の結果、CNV 病巣サイズが  $C3^{-/-}$  マウスで著明に減少することが確認された。この結果はこれまでの C3 が血管新生促進作用を有するという研究結果と合致している [43]。また、これまでいくつかの検討でマクロファージの眼内浸潤がレーザー光凝固後 3 日目にピークに達することが報告されており [12, 30, 45]、今回の結果、野生型マウスのマクロファージをサブタイプ毎に解析しても眼内へのリクルートはレーザー光凝固後 3 日目に最大ピークを示すことが明らかになった。一方、 $C3^{-/-}$  マウスでは眼内 Ly6C<sup>hi</sup> マクロファージがレーザ

一光凝固後 1 日目に最も多いのに対して、Ly6C<sup>int</sup> マクロファージは 3 日目にピークに達しており、また、Ly6C<sup>lo</sup> マクロファージの割合の増加はレーザー光凝固後 7 日目まで持続していることがわかった。*C3*<sup>-/-</sup>マウスの末梢血においてマクロファージの割合が多いにもかかわらず、マクロファージの眼内への動員は、C3 欠損により著しく抑制されることが明らかになった。組織への遊走および免疫細胞のリクルートが抑制されるのはアナフィラトキシン C3a と C5a の欠乏による可能性が考えられる。我々は眼内に浸潤している炎症細胞の数が増加した際に、フィードバックループによる制御が働き、末梢血での炎症細胞の数を減少させると考えるのは合理的であると考えているが、今回の研究結果では *C3*<sup>-/-</sup>マウスで C3 欠損およびこれによるアナフィラトキシン産生が抑制されることにより、このフィードバック機能が効かなくなる可能性が示唆された。

補体 C3 は RPE/脈絡膜でも産生され、CNV マウスモデルで発現が上昇することが知られている [43, 46]。アナフィラトキシン C3a と C5a は、マクロファージの組織浸潤を制御し、RPE 細胞から VEGF 産生および分泌をコントロールすると知られている。RPE 細胞が VEGF-VEGFR1 シグナルにも関与するため、RPE/脈絡膜へのマクロファージ・単球のリクルートおよび VEGF 発現増加が抑制されるのは RPE

における C3a と C5a 欠如による可能性が考えられる。さらに、*C3*<sup>-/-</sup>マウスの眼内における VEGF の発現が減弱することによりレーザー誘発 CNV が縮小することが示唆された。しかし、C3 の RPE 細胞における VEGF 発現に及ぼす影響や、局所的に産生される C3 もしくは全身の C3 が関わっているかを明らかにするためには更なる検討が必要であり、今後の課題であると考えられる。

## 第4章 交感神経の脈絡膜新生血管およびマクロファージ の眼内浸潤への関与

## 4-1 背景

近年、マクロファージのサブタイプ分類について、様々なマーカーの組み合わせを用いた研究が盛んに行われており、マウスの末梢血においては前述のマーカーにさらに別のマーカーの組み合わせを用いて classical monocytes ( $CD11b^+CD115^+Ly6C^{hi}CD43^{lo}$ 、炎症性単球)、nonclassical monocytes ( $CD11b^+CD115^+Ly6C^{lo}CD43^{hi}$ 、在住単球)および中間型の intermediate monocytes ( $CD11b^+CD115^+Ly6C^{int}CD43^{hi}$ ) に分類することにより、より再現性の高い解析が可能であると考えられるようになってきた[47, 48]。一方、マウスの眼内マクロファージに関しては、細胞表面マーカーLy6C と CD64 を用いて同定するとマクロファージが明確な3つの集団 ( $Ly6C^{hi}$ 、 $Ly6C^{lo}$ 、 $Ly6C^{int}CD64^+$ ) に分離されることが報告された[48]。このため、まず我々は今回の実験系においてこれらの細胞表面マーカーの有用性を確認し、さらにレーザー誘発 CNV のマウスモデルにおける末梢血および眼内の単球・マクロファージの変動を調べた。

前章で述べたようにマクロファージの浸潤が抑制できれば CNV が抑制できると考えられる。このため、本章ではさらに治療介入可能な新たな標的として交感神経に着目した。動脈硬化マウスモデルで交感神経系刺激により骨髄から放

出された単球前駆細胞が脾臓に定着し、ここで単球・マクロファージを供給する前駆細胞へ変換され、さらに脾臓から血液を介して単球・マクロファージは動脈硬化巣へ動員され、プラーク拡大や心筋梗塞の再発に関与することが報告されている[49]。一方、ラットで頸部交感神経節を切断することにより、脈絡膜血流増加、血管サイズ増大が見られると報告されている[34]が、交感神経の CNV 形成への関与に関してはほとんど検討されていない。

マウスにおいて  $\beta$  アドレナリン受容体は以前より研究されている交感神経受容体であり、サブタイプは  $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$  の 3 種類が存在する。これまでに  $\beta 1$  と  $\beta 2$  受容体は心機能を調節していることが知られている。 $\beta 1$  受容体は主に心臓に存在し、カテコールアミン類による陽性変力および陽性変時作用にかかわっており[50]、また心肥大や心筋のアポトーシスにも関与している[51, 52]。一方、 $\beta 2$  受容体は主に気管支や血管平滑筋に発現しており、気管支平滑筋の拡張、血管平滑筋の拡張に作用する[53, 54]。 $\beta 2$  は心臓にも存在するが、 $\beta 1$  とは逆に抗アポトーシス等心保護に働く[55]。 $\beta 3$  は一般的に脂肪分解に関与しているといわれており、 $\beta 3$  のノックアウトマウスで体脂肪が増えることが報告されている[56]。しかしながら、近年、造血幹前駆細胞の骨髄からの遊離や単球・マ

クロファージを供給する前駆細胞の脾臓からの遊離には  $\beta 3$  受容体シグナルが関与していることが証明された[49, 57]。そこで、我々は  $\beta 3$  受容体選択的遮断薬投与により交感神経機能を抑制したマウスまたは脾臓交感神経除神経や脾臓摘出を行ったマウスを用いて、レーザー誘発 CNV を作製し交感神経の CNV への影響の有無を検討した。さらに、フローサイトメトリー解析にて脾臓交感神経除神経後、脾臓摘出後の眼内および末梢血における単球・マクロファージの変化を検討した。最後に、Ly6C<sup>hi</sup> 細胞を脾臓交感神経除神経マウスに移入した後に CNV を作製し、Ly6C<sup>hi</sup> 単球・マクロファージの CNV 形成への関与を検討した。

## 4-2 方法

### 実験動物

C57BL/6J マウスを野生型マウスとして用い日本クレアより購入した。Ly5.1 マウスは三協ラボサービスより購入した。7~8 週齢♂のマウスを用いた。すべての動物は ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research に従い取り扱った。本研究計画は、東京大学動物実験委員会の承認を得て行った。

### レーザー誘発 CNV モデル作製

第 2 章の方法参照。CNV サイズの比較実験において各群 6 匹のマウスを用いた。フローサイトメトリー解析においては各群 6 匹のマウスを用い、独立した 3 回の実験を実施した。

### 脈絡膜伸展標本作製

第 2 章の方法参照。

### フローサイトメトリー解析

レーザー未照射のマウス、レーザー光凝固 1 日、3 日および 7 日後のマウスを全身麻酔し、開胸し心臓より採血した。その後眼球摘出し (各群 6 匹、計 12 眼)、



前眼部と硝子体を除去した後にコラゲナーゼ (1 mg/mL; Wako, Japan) およびディ  
スパーゼ (1 mg/mL; Invitrogen) 入り PBS 溶液において網膜および RPE/脈絡膜細  
胞を分離した。単一細胞は第 2 章の方法を用いて調製した。フローサイトメト  
リー解析は FACS Aria III (BD Biosciences) を用いて行い、データ解析はソフトウ  
ェア FlowJo (Tree Star) で行った。マクロファージの各サブタイプの採取した  
総細胞数に対する割合を算出した。Anti-CD45.2-FITC、anti-CD115-PE、  
anti-Ly6G-APC/Cy7、anti-F4/80-APC、anti-Ly6C-Pacific Blue、anti-CD64-PE、  
anti-CD45.1-APC (BioLegend)、anti-CD11b-PE/Cy7、anti-CD43-APC antibody (BD  
Pharmingen) が用いられた。

#### 骨髄交感神経 $\beta 3$ 受容体遮断薬投与

骨髄交感神経  $\beta 3$  受容体の選択的遮断薬である SR59230A を PBS に溶解し、レ  
ーザー光凝固の 4 日前より 5mg/kg を 1 日 2 回、1 回の投与量が 100  $\mu$ L になる  
ように C57BL/6J マウスに腹腔内投与した。同量の PBS のみを投与したマウスを  
コントロールとして用いた。

### 脾臓神経除神経

野生型マウスを全身麻酔し、左側腹部を開腹し、脾門部を露出させた。交感神経を血管から丁寧に剥離し切除した。開腹のみを行ったマウスをコントロールとして用いた。

### 脾臓摘出

野生型マウスを全身麻酔し、左側腹部を開腹し、脾臓を露出させた。脾臓周囲の血管を結紮し、脾臓摘出を行った。開腹のみを行ったマウスをコントロールとして用いた。

### 養子細胞移入

野生型マウスの脾臓より  $CD11b^{+}CD115^{+}Ly6C^{hi}$  細胞をフローサイトメーター FACS Aria III で採取し、滅菌 PBS にて懸濁し ( $6 \times 10^5$  個細胞/mL)、 $200 \mu L$  (約  $1.2 \times 10^5$  個細胞) を脾臓神経除神経マウスの尾静脈より注入した。同日にレーザー光凝固を両眼に 4 カ所ずつ行い CNV を作成後、7 日後に CNV 面積を比較した。

次に、Ly5.1 マウスの脾臓より採取した  $CD11b^{+}CD115^{+}Ly6C^{hi}$  細胞の懸濁液を  $200 \mu L$  ずつ Ly5.2 マウスより作成したコントロール、脾臓除神経マウスおよび脾臓摘出マウスに移入し (約  $3 \times 10^4$  個細胞/マウス)、レーザー光凝固を両眼に 12 カ

所ずつ行い、3 日後に眼内へ動員される Ly5.1 マウス由来の Ly6C<sup>hi</sup> 細胞の割合をフローサイトメトリー解析にて検討した。

#### 統計解析

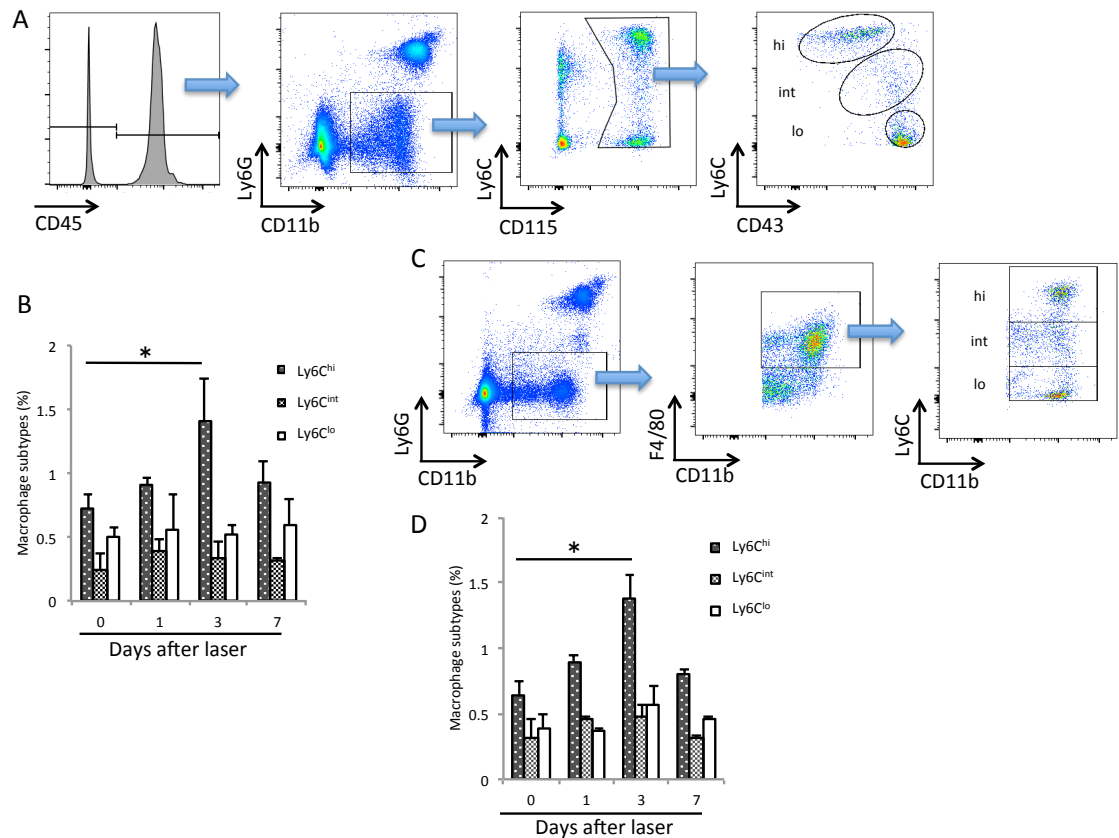
統計解析は JMP Pro 11 (SAS)を用いて Wilcoxon rank-sum test または Dunn's multiple comparison test を行った。P 値<0.05 の場合に有意差ありと判定した。

### 4-3 結果

#### 野生型マウスにおける新たなゲートの設定と従来の設定による単球・マクロファージの分類の比較

交感神経の CNV 形成への関与の検討に先立って、野生型マウスのレーザー誘発 CNV モデルについて新たなゲートの設定でフローサイトメトリー解析を行い、従来の抗体の組み合わせと比較し末梢血単球および眼内マクロファージの割合がどのように変化したかを検討した。血液では、従来のゲートの設定と比較して新たなゲートの設定の方が単球のサブタイプがより明瞭に 3 つの集団に分かれることがわかった (図 15)。また、末梢血中の単球のサブタイプの割合について、新たなゲートの設定により算出されたものと従来のゲートの設定によるものと比較を行った。その結果、いずれのゲートの設定においても末梢血中の classical monocytes (Ly6C<sup>hi</sup>) 細胞の割合はコントロールと比較してレーザー光凝固後 3 日目に有意な増加が認められ、ピークに達した。一方、いずれのゲート設定においても末梢血中の intermediate monocytes (Ly6C<sup>int</sup>) および nonclassical monocytes (Ly6C<sup>lo</sup>) 細胞ではレーザー光凝固前後において変化が認められなかった。

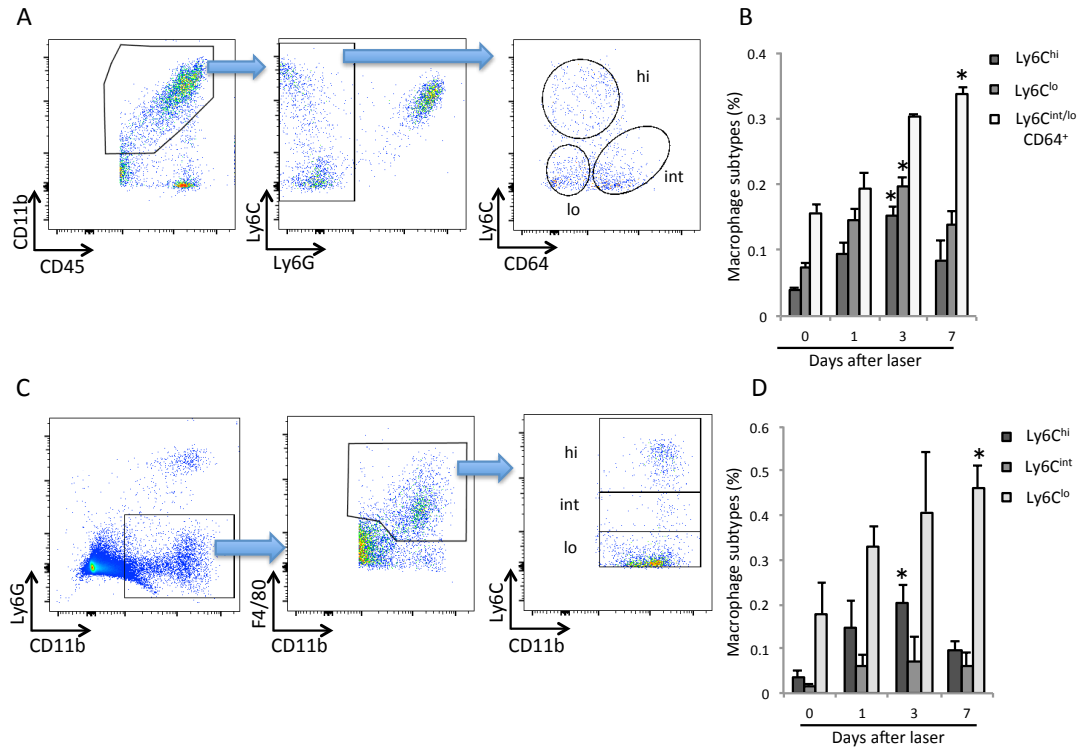
図 15 末梢血単球サブタイプ分類におけるゲート設定の比較



(A) 新たなゲートの設定によるフローサイトメトリー解析の代表的なプロットである。末梢血中の単球は  $CD45^+CD11b^+Ly6G^-CD115^+$  として定義され、各サブタイプは Ly6C と CD43 により分類されている。(B) 新たなゲートの設定により算出された単球サブタイプの割合である。(C) 従来のゲートの設定によるフローサイトメトリー解析の代表的なプロットである。末梢血中の単球は  $CD11b^+Ly6G^-F4/80^+$  として定義され、各サブタイプは Ly6C と CD11b により分類されている。(D) 従来のゲートの設定により算出された単球のサブタイプの割合である。\* $P < 0.05$  versus control of the same subtype。

また、眼内のマクロファージについては CD64 を含む新たなゲートの設定の場合、比較的明瞭に 3 群に分類された。新たな抗体の組み合わせによるゲート設定を行った場合にはレーザー光凝固後に  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$  および  $\text{Ly6C}^{\text{lo}}$  マクロファージの割合に増加が認められ、いずれもレーザー光凝固後 3 日目にピークに達した(図 16)。一方、眼内の  $\text{Ly6C}^{\text{int/lo}}\text{CD64}^+$  細胞においてはレーザー照射後 7 日に有意な増加が認められた。これに対して従来のゲートの設定の場合、新たなゲートの設定と同様にレーザー光凝固後に眼内の  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$  細胞の割合はコントロールと比較して有意に増加し、レーザー光凝固後 3 日目にピークに達した。一方、 $\text{Ly6C}^{\text{lo}}$  サブタイプはレーザー光凝固後 7 日に有意な増加が認められた。また、眼内の  $\text{Ly6C}^{\text{int}}$  細胞ではレーザー照射前後において変化が認められなかった。この結果により、 $\text{Ly6C}^{\text{int/lo}}\text{CD64}^+$  細胞は  $\text{Ly6C}^{\text{int}}$  とは明確に異なる挙動を示し、むしろ  $\text{Ly6C}^{\text{lo}}$  に分類された細胞集団と部分的に挙動を共にすることが示唆された。そこで本検討ではこれらの新しいマーカーの組み合わせを用いて検討を行った。

図 16 眼内マクロファージサブタイプ分類におけるゲート設定の比較



(A) 新たなゲートの設定によるフローサイトメトリー解析の代表的なプロットである。眼内マクロファージは  $CD45^+CD11b^+Ly6G^-$  として定義され、各サブタイプは Ly6C と CD64 により分類されている。(B) 新たなゲートの設定により算出された眼内マクロファージサブタイプの割合である。(C) 従来のゲートの設定によるフローサイトメトリー解析の代表的なプロットである。眼内マクロファージは  $CD11b^+Ly6G^+F4/80^+$  として定義され、各サブタイプは Ly6C と CD11b により分類されている。(D) 従来のゲートの設定により算出された眼内マクロファージのサブタイプの割合である。\* $P < 0.05$  versus control of the same subtype.

## 脾臓交感神経除去または骨髄交感神経遮断の CNV 面積への影響

4 章 1 節で述べたように骨髄と脾臓は単球・マクロファージのリザーバーであるという報告をもとに、骨髄交感神経受容体  $\beta 3$  ブロッカー投与または脾臓神経除神経を行ったマウスを用いて交感神経の血管新生への作用を調べたところ、コントロール群と比較して  $\beta 3$  ブロッカー投与または脾臓神経除神経マウスで CNV がそれぞれ約 65% または 40% に有意に縮小することが明らかになった。また、同様に脾臓摘出したマウスにおいても CNV が約 53% に有意に縮小することがわかった (図 17)。

さらに、脾臓交感神経除神経マウスのレーザー前後における眼内のマクロファージサブタイプの割合を検討した結果、コントロール群と比較してレーザー照射前およびレーザー光凝固後 3 日目において脾臓神経除神経マウスの眼内  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$  細胞が有意に少なかった。また、脾臓神経除神経マウスの眼内  $\text{Ly6C}^{\text{int}}$  および  $\text{Ly6C}^{\text{lo}}$  細胞はレーザー照射前においてコントロールと比較して有意に低い割合を示したが、レーザー光凝固後 3 日目においてコントロールと変わらなかった。一方、レーザー光凝固前後において末梢血中の  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$ 、 $\text{Ly6C}^{\text{int}}$  と  $\text{Ly6C}^{\text{lo}}$

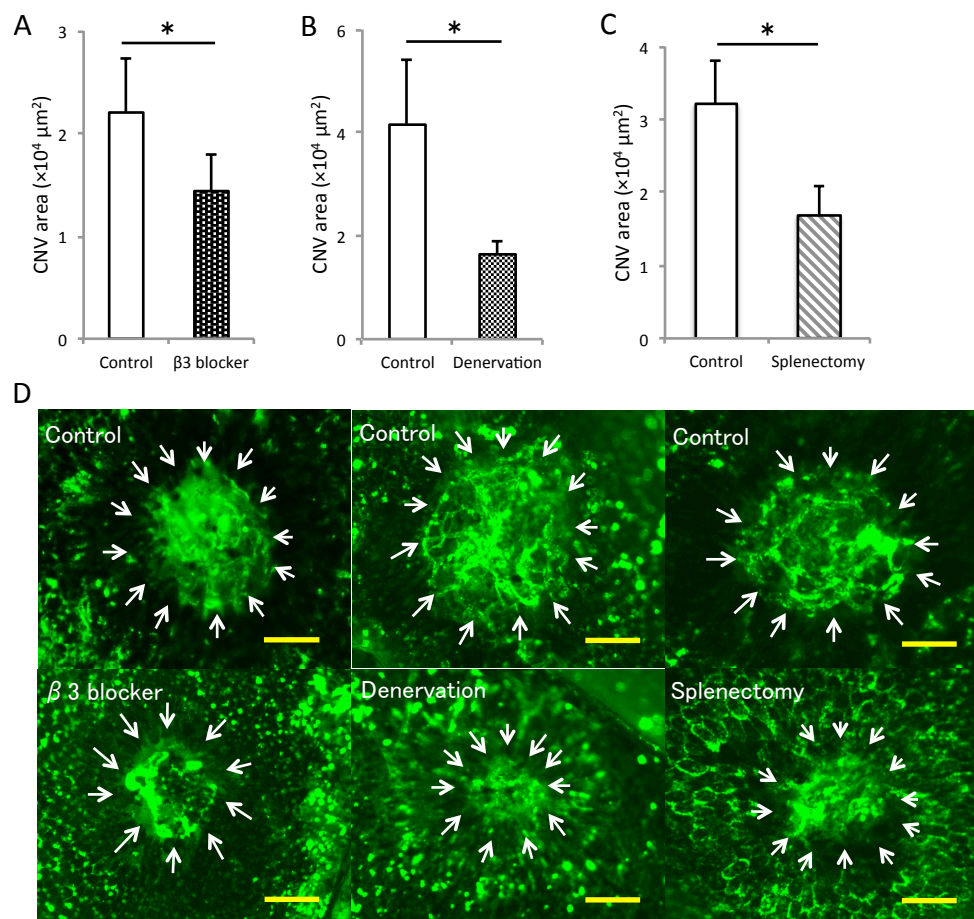


単球のいずれにおいても脾臓神経除神経マウスとコントロール群の間に有意差を認めなかった(図 18)。

また、脾臓摘出マウスの眼内および末梢血中の単球・マクロファージの経時変化を検討したところ、脾臓交感神経除神経マウスと同様に眼内  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$  細胞の割合はコントロール群と比較してレーザー照射前およびレーザー光凝固後 3 日目において有意に減少していた。眼内  $\text{Ly6C}^{\text{int/lo}}\text{CD64}^+$ 細胞の割合はレーザー照射前およびレーザー光凝固後 3、7 日目のすべての測定時期において有意に低い割合を示した。一方、 $\text{Ly6C}^{\text{lo}}$ 細胞においては両群間に有意差を認めなかった。また、脾臓摘出マウス末梢血中の  $\text{Ly6C}^{\text{int}}$ 細胞はレーザー照射前およびレーザー光凝固後 3、7 日目のすべての測定時期においてコントロール群より有意に低い割合を示しており、 $\text{Ly6C}^{\text{lo}}$ 細胞の割合は脾臓摘出マウスではレーザー光凝固後 7 日目に有意に減少した。しかしながら、末梢血中の  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$ 細胞では両群間に有意差が認められなかった(図 19)。

図 17  $\beta 3$  ブロッカー投与マウス、脾臓神経除神経マウスおよび脾臓摘出マウス

スにおける CNV 面積の変化



レーザー光凝固後 7 日目においてコントロールおよび (A) 骨髄交感神経受容体  $\beta 3$  ブロッカー

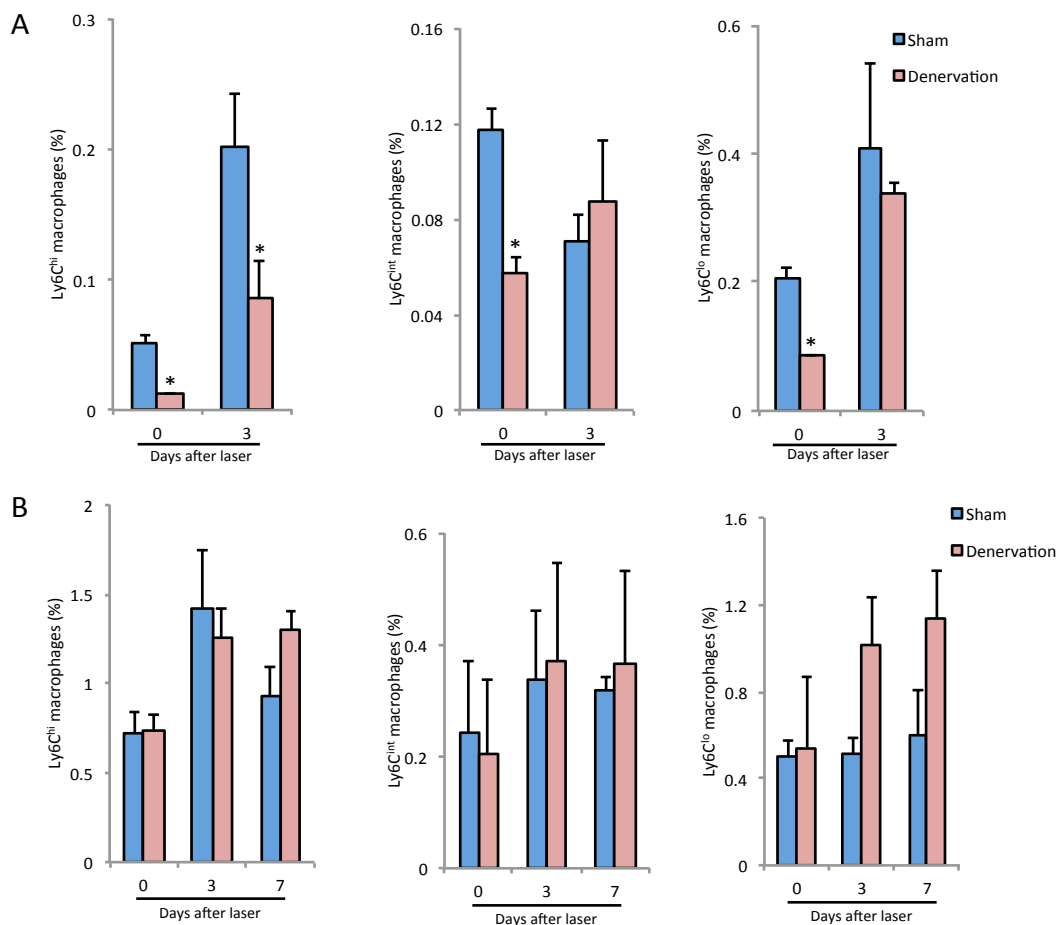
投与マウス、(B) 脾臓神経除神経マウスまたは (C) 脾臓摘出を行ったマウスにおける CNV 面積

比較実験の結果である。(D) RPE/脈絡膜伸展標本の写真である。CNV は矢印で示している。マウ

スを各群 6 匹ずつ使用している。\* $P < 0.05$ 。Scale bars, 100  $\mu\text{m}$ 。

図 18 脾臓交感神経除神経マウスにおける眼内および末梢血中の単球・マクロ

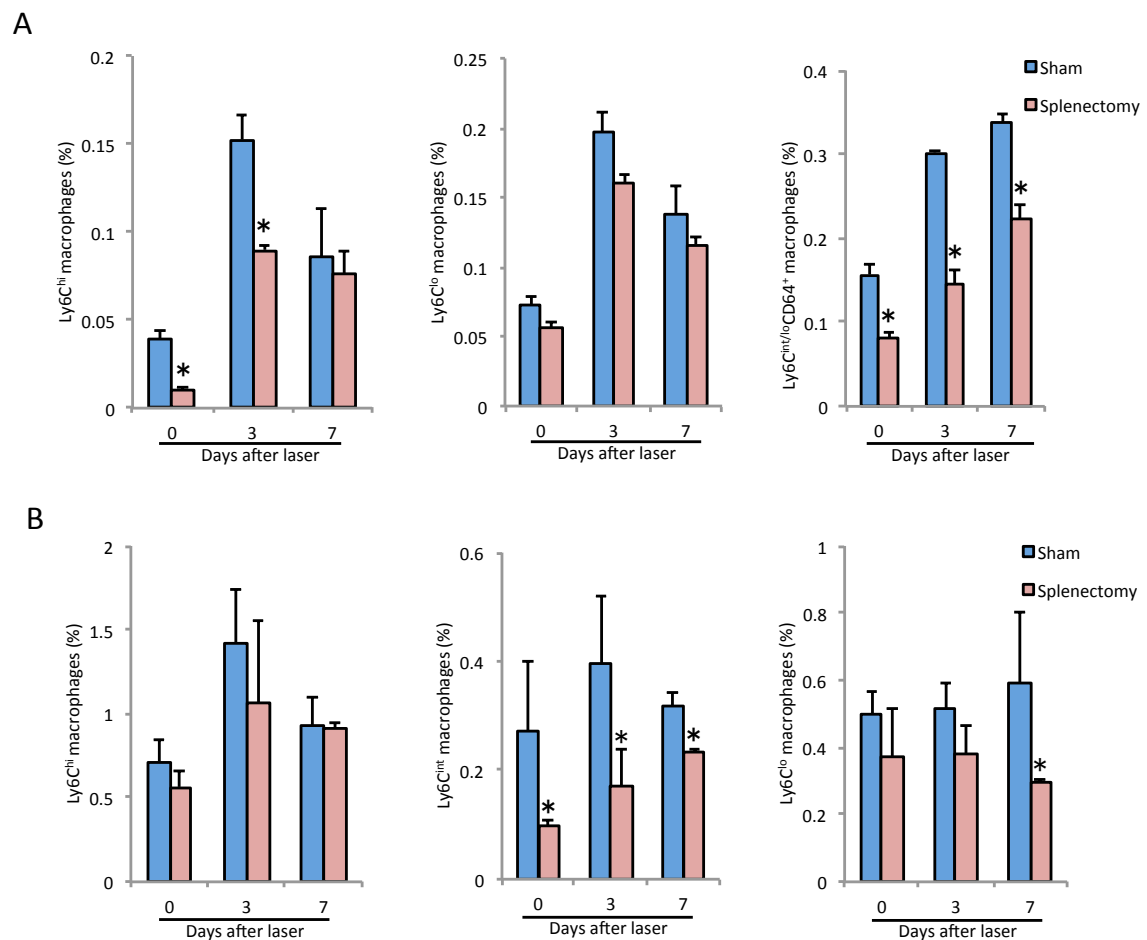
# ファージの経時変化



(A) レーザー照射前およびレーザー光凝固後 3 日目における眼内マクロファージサブタイプの割合の経時変化の結果である。(B) レーザー照射前、レーザー光凝固後 3 日および 7 日目における末梢血単球サブタイプの割合の経時変化の結果である。\* $P < 0.05$  versus the same subtype of control。

図 19 脾臓摘出マウスにおける眼内および末梢血中の単球・マクロファージの

経時変化



(A) レーザー照射前、レーザー光凝固後 3 日および 7 日目における眼内マクロファージサブタイ

プの割合の経時変化の結果である。(B) レーザー照射前、レーザー光凝固後 3 日および 7 日目に

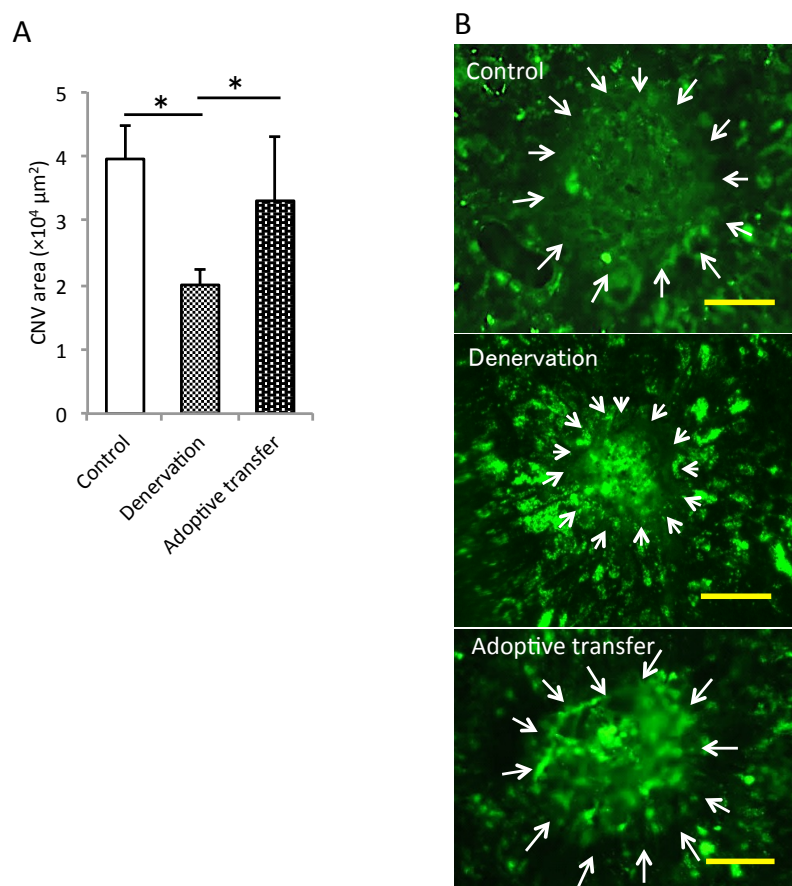
における末梢血単球サブタイプの割合の経時変化の結果である。\* $P < 0.05$  versus the same

subtype of control。

## Ly6C<sup>hi</sup> 単球・マクロファージの CNV 形成に対する影響

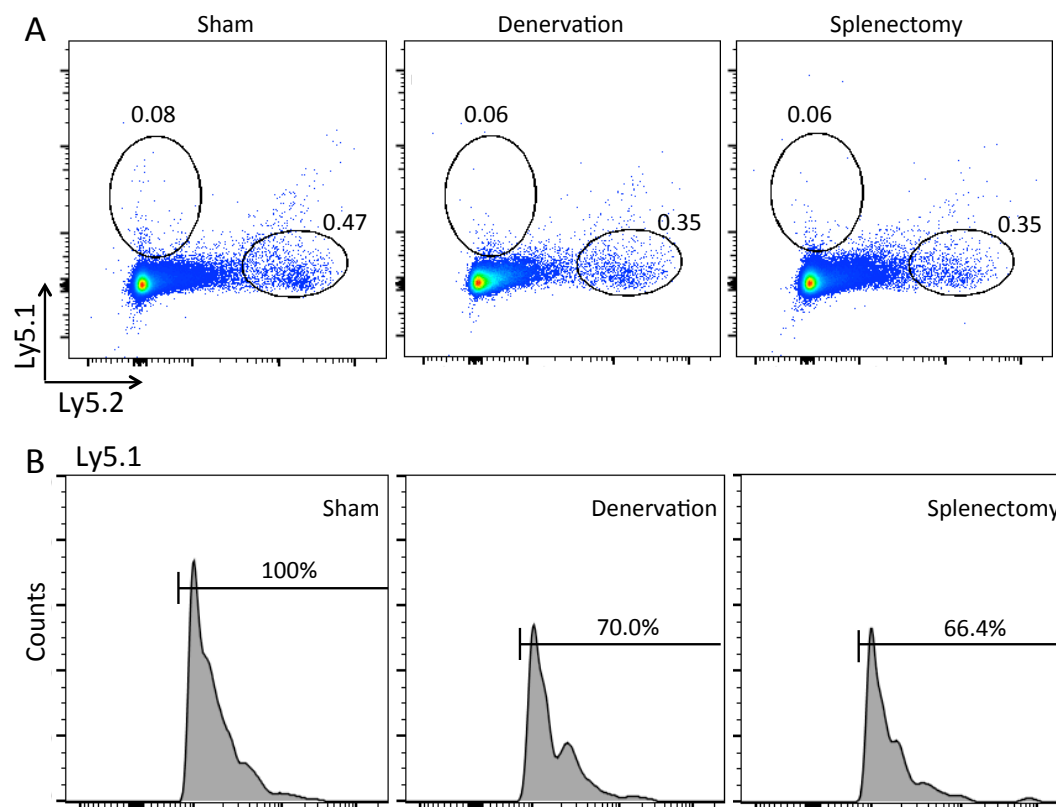
この章のはじめに行った検討により Ly6C<sup>hi</sup> 単球・マクロファージが CNV 形成に関与することが示唆されたため、野生型マウスの脾臓から採取した CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> 細胞を脾臓神経除神経マウスに移入し CNV を作製し 7 日後に CNV の大きさを評価した。コントロール群と比較して脾臓神経除神経マウスで CNV 面積が約 51.0%に減少したが、Ly6C<sup>hi</sup> 細胞を移入したことにより、CNV 面積が脾臓神経除神経マウスの約 1.7 倍に増大した (図 20)。次に、Ly5.1 マウスの脾臓から採取した Ly6C<sup>hi</sup> 細胞を Ly5.2 マウスより作成したコントロール、脾臓除神経マウスおよび脾臓摘出マウスに移入し、眼内へ動員される Ly5.1 マウス由来の Ly6C<sup>hi</sup> 細胞の割合を検討した結果、脾臓除神経マウスおよび脾臓摘出マウスでは脾臓由来の Ly6C<sup>hi</sup> 細胞の眼内への動員がむしろ抑制されることが明らかになった (図 21)。

図 20 脾臓由来 Ly6C<sup>hi</sup> 細胞移入による CNV 面積の変化



(A) レーザー光凝固後 7 日目において、野生型マウスの脾臓より採取した CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> 細胞の移入による脾臓交感神経除神経マウスにおける CNV 面積比較試験の結果である。(B) RPE/脈絡膜伸展標本の写真である。CNV は矢印で示している。マウスを各群 6 匹ずつ使用している。\* $P < 0.05$ 。Scale bars, 100 μm。

図 21 Ly5.1 マウス脾臓由来 Ly6C<sup>hi</sup> 細胞移入による眼内へ動員される Ly5.1 細胞の割合の比較



(A) 眼内 Ly5.1<sup>+</sup>細胞および Ly5.2<sup>+</sup>細胞の総網脈絡膜細胞に対する割合である。(B) コントロール群に対して、脾臓交感神経除神経および脾臓摘出マウスの眼内 Ly5.1<sup>+</sup>細胞の割合を示している。

#### 4-4 考察

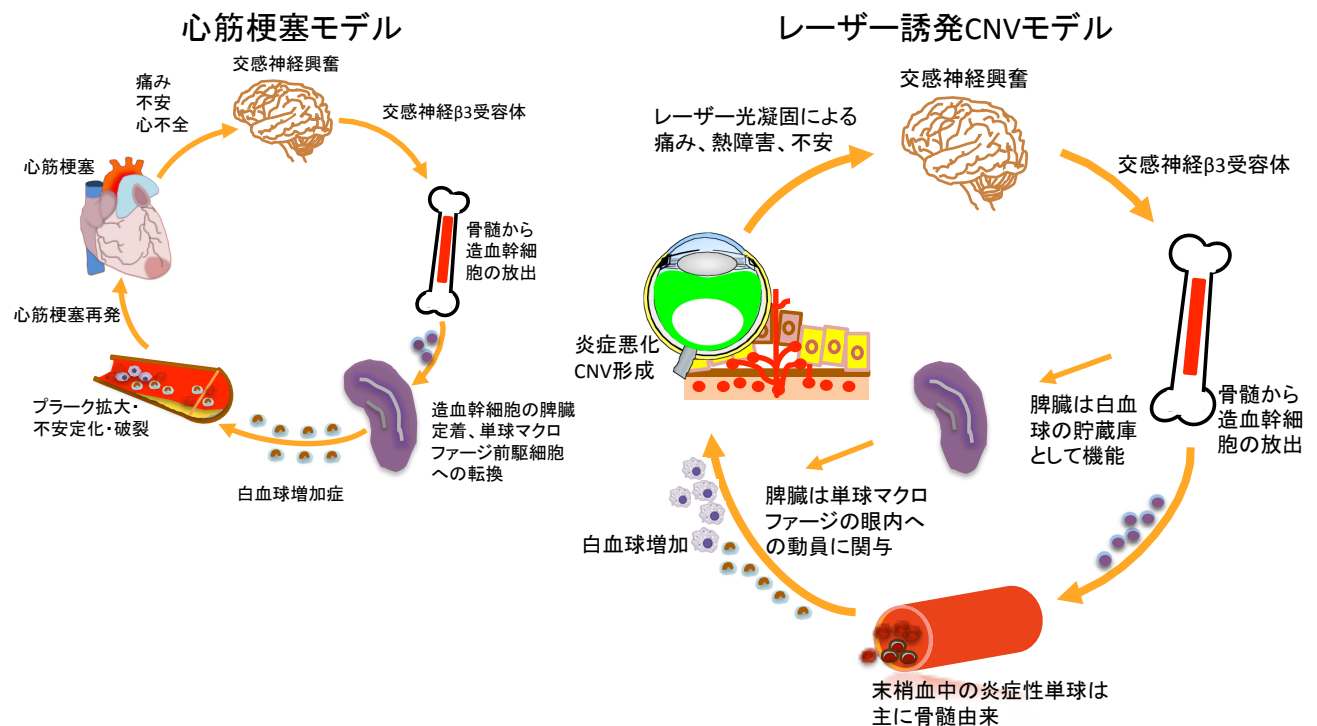
交感神経と血管新生の関連についてはマウスの卵巣癌モデルでもストレスによる交感神経亢進が血管新生を促進することが報告されている[58]。今回の我々の検討では、 $\beta 3$  ブロッカー投与または脾臓除神経による交感神経遮断により、マクロファージの末梢組織への動員が著しく抑制され、実験的 CNV が縮小することが明らかになった。一方、ラットで頸部交感神経切除による交感神経活動の抑制が炎症性サイトカインを介して脈絡膜血管のリモデリングを促進し、術後 6 週間で脈絡膜細静脈の数および細動脈の血管径が増大するとの報告もある[34, 59]。動物 CNV モデルおよび AMD 患者のいずれにおいても炎症反応が CNV 形成に強く関わっているが、今回の我々の研究結果では交感神経刺激も CNV 形成の初期段階で重要な因子である可能性が示唆された。

心筋梗塞のマウスモデルで虚血等により交感神経系が活性化され、骨髄から造血幹前駆細胞の放出が惹起され、これらの前駆細胞の一部が脾臓へ定着し、そして、その後単球やマクロファージへ変換され、末梢血を介して組織へ動員され、プラーク拡大や心筋梗塞再発が促されることが報告されている[49] (図 22)。眼内においても類似した病態が発生している可能性があると考え本検討を



行った。

図 22 心筋梗塞モデルおよびレーザー誘発 CNV モデルの比較



AMD は多因子疾患であり、代謝、遺伝子や環境等複数の要因が重なってはじめて発症すると知られており [60]、AMD の早期病態における酸化ストレスや虚血等により、交感神経系刺激や炎症の悪化に伴い骨髄や脾臓から動員された単球・マクロファージが眼内へリクルートされ、血管新生を増悪させると推察した。しかしながら本検討の結果、我々の用いた脾臓除神経マウスにおいてはコントロール群と比較してレーザー前後における末梢血中の単球・マクロファージサブタイプのいずれも割合が変わらなかった。一方、脾臓摘出マウスでは末梢血

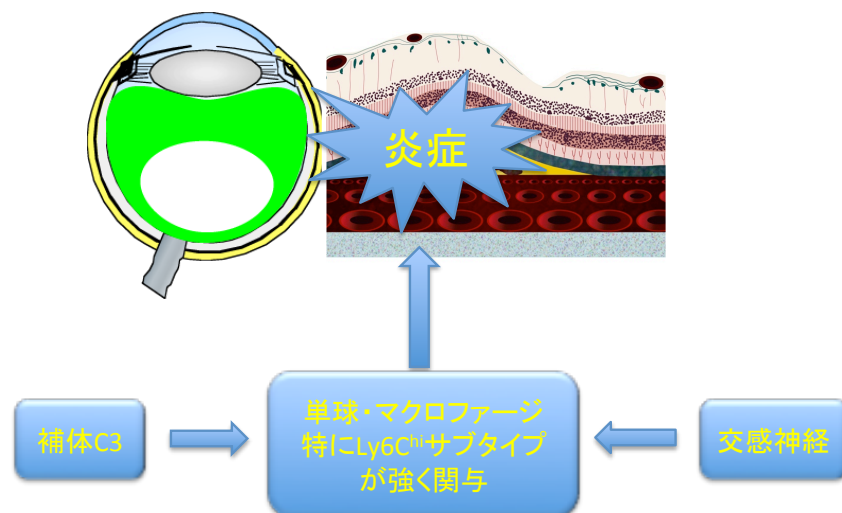
Ly6C<sup>int</sup> 細胞の割合はレーザー前後のすべての測定時期において減少しており、また Ly6C<sup>lo</sup> 細胞はレーザー光凝固後 7 日目にコントロール群より低い割合を示したものの、Ly6C<sup>hi</sup> 細胞では両群間に有意差が認められなかった。これらの実験結果より、CNV モデルにおいては末梢血中において増加した単球は主に骨髄由来であり [61]、脾臓除神経または脾臓摘出を行っても骨髄から単球が末梢血中へ動員されていることが推察された (図 22)。また、脾臓摘出マウスで Ly6C<sup>int/lo</sup>CD64<sup>+</sup> 細胞の眼内浸潤の減少を認めており、これは末梢血中の Ly6C<sup>int</sup> および Ly6C<sup>lo</sup> 細胞の減少によるものと考えられた。しかしながら脾臓除神経または脾臓摘出により共に眼内への Ly6C<sup>hi</sup> 細胞の浸潤の減少を認め、CNV の縮小を認めた。さらに、脾臓除神経モデルへ脾臓由来の Ly6C<sup>hi</sup> 細胞を移入することにより、CNV が大きくなり、脾臓由来の Ly6C<sup>hi</sup> マクロファージが直接末梢血へリクルートされなくても CNV 形成に関与すると考えられた (図 22)。これらの結果は以前報告された心筋梗塞モデル [49] とは異なる。ドナー脾臓由来の Ly6C<sup>hi</sup> 細胞の眼内浸潤が脾臓除神経または脾臓摘出マウスで減少している結果により、骨髄由来および脾臓由来の Ly6C<sup>hi</sup> 単球のいずれも眼内への動員に脾臓が関与している可能性があると考えられる。

交感神経または脾臓の CNV やマクロファージの眼内浸潤への作用機序を解明するは今後重要な課題であり、さらなる検討が必要であると考えられる。

## 第 5 章 総合討論

滲出型 AMD は、CNV による滲出性変化を特徴とする進行性の疾患で、CNV に対する治療法について研究が長年行われている。網膜光凝固、光線力学的療法や抗 VEGF 療法等が開発され、現在は抗 VEGF 療法が滲出型 AMD 治療の主流となっているが、対処療法であり、根治に至ることはない。また、無効例、再発例、晩期の RPE 萎縮が指摘されているため、代替治療法の探索が重要な課題になってきている。そのため、新しい治療法を開発するためには更なる病態の把握に基づいた新規治療標的の解明が必要と考えられる。そこで我々は炎症細胞の眼内浸潤、補体経路、交感神経の 3 つのポイントに注目した (図 23)。

図 23 単球・マクロファージ、補体 C3 および交感神経の CNV への関与



まず、レーザー誘発 CNV モデルを用いて、眼内へ浸潤した T 細胞または B 細胞はレーザー誘発 CNV への関与が少ない一方、単球・マクロファージが CNV 形

成に関与することを明らかにした。しかし、病態によっては T 細胞から産生された IL-17 が血管新生の過程で一定の役割を演じる可能性があり、さらにこの過程で単球・マクロファージが関連している可能性があると考えられる。一方、マウスのマクロファージは Ly6C<sup>hi</sup>、Ly6C<sup>int</sup>、Ly6C<sup>lo</sup> の 3 つのサブタイプに分かれており、血液中や組織で Ly6C<sup>hi</sup> マクロファージが Ly6C<sup>int</sup> マクロファージを経て Ly6C<sup>lo</sup> サブタイプへと分化すると知られているが、実際にマクロファージの形態や性質はより複雑であると思われる。このため、マクロファージの各サブタイプの作用を明確にすることは難しい課題であり、未だに議論が多い。今回我々の研究の結果、Ly6C<sup>hi</sup> マクロファージが CNV 形成に強く関与していることが明らかとなった。マクロファージの血管新生への作用機序は浸潤組織や細胞の年齢により異なる可能性があるので、網脈絡膜における Ly6C<sup>hi</sup> 細胞の病態への関与メカニズムの解明は今後の研究の重要事項であると考えられる。

補体 C3 の加水分解産物である C3a や C5a およびその受容体の CNV への関与については研究が盛んに行われている。今回我々の検討では C3 の CNV 形成に対する直接の影響を検討し、C3 が欠損することにより CNV が縮小し、マクロファージの眼内浸潤および炎症に伴う VEGF 発現増加が抑制されることが明らかになっ

た。この結果により補体経路活性化の抑制は AMD の新たな治療戦略となりうる  
ことが示唆された。近年、多くの新規治療法の臨床試験が行われており、POT-4  
(Potentia Pharmaceuticals, Louisville, KY) はその中の代表的な新薬の一  
つである。POT-4 はヒト補体 C3 と結合し、その活性化を抑制できるペプチドで  
あり、萎縮型 AMD に対する第 1 相臨床試験がすでに終了している[62]。我々の  
研究結果は眼内補体 C3 分子標的治療薬が滲出型 AMD の治療に有効でありうる裏  
付けとなった。

第 4 章においては自律神経の CNV 形成過程での作用についてあまり検討され  
ていないため、今回の検討で我々は  $\beta 3$  受容体遮断薬投与や脾臓交感神経除去、  
または脾臓摘出を行ったマウスで CNV が減少することを明らかにした。また、  
脾臓除神経または脾臓摘出マウスにおいてレーザー光凝固後 Ly6C<sup>hi</sup> 単球・マク  
ロファージの眼内へ動員が抑制されることにより、脾臓がマクロファージの眼  
内浸潤に関与する可能性が示唆された。

実際に、脾臓摘出は現実的な治療ではないが、 $\beta$  ブロッカー投与により眼局  
所炎症を抑える治療は応用可能かもしれない。最近の臨床研究では、 $\beta$  遮断薬  
全身投与は滲出型 AMD の発症の予防にはほとんど効果がないと報告されている

[63]が、その研究において、高血圧等の交絡因子が存在している可能性がある。

一方で、他の研究者達は CNV を伴う AMD 難治例に対して  $\beta$  ブロッカー全身投与によりベバシズマブ硝子体内投与の投与回数が減少したことより、 $\beta$  ブロッカー全身投与は抗 VEGF 抗体硝子体内注射の頻度を減らす可能性が示唆されたとの報告をしている[64]。 $\beta$  ブロッカー全身投与の CNV 抑制への臨床的有効性についてはまだ強いエビデンスが少なく、現時点の標準治療である抗 VEGF 療法に変わる主要な治療になるとは考え難いが、AMD 治療のための補助療法になりうる可能性があると考えられる。また、マクロファージは AMD 患者において視力低下をきたす線維化瘢痕の形成で重要な役割を演じていることが報告されており[65, 66]、交感神経遮断によるマクロファージのリクルートの減少により網膜下線維性瘢痕の縮小が期待できるかもしれない。すでに  $\beta$  遮断薬は臨床応用されて長い歴史のある薬剤であるが、様々な全身作用も有するため、高齢者に対して使用する場合には注意が必要である。

AMD は慢性炎症を基盤とした疾患であり、遺伝学的要因および環境要因が発症に複合的に関与する多因子疾患である。発症の危険因子として加齢[67]、疾患感受性遺伝子[68, 69]、喫煙[70]や光線曝露[71]等が挙げられる。本研究では動



物モデルで AMD の病態に寄与している可能性のある因子について検討を行ったが、補体や交感神経刺激はあくまで複数の危険因子の一部であり、実際 AMD 患者の慢性的経過における関与については更なる検討が必要であると考えられる。

## まとめ

今回の研究において炎症細胞、特に単球・マクロファージの CNV への関与、また補体 C3 や交感神経の CNV 形成に与える影響への理解が深まった。リンパ球の CNV への関与が少ない一方、単球・マクロファージ、特に Ly6C<sup>hi</sup> サブタイプが CNV 形成に強く関わっていることが明らかになった。また、補体 C3 欠損によりマクロファージの眼内浸潤や眼内の VEGF 発現増加が抑制され、CNV が縮小することが明らかになり、補体 C3 を標的とした治療が新たな AMD 治療ターゲットとなりうることが示唆された。さらに、今回の検討では、 $\beta 3$  受容体遮断薬投与や脾臓交感神経除神経により、マクロファージの眼内への動員が抑制され、CNV の形成が抑えられることがわかった。交感神経が CNV に対して促進的に作用することが示唆されたことより、 $\beta$  遮断薬の全身投与が AMD のための新たな治療法または補助療法になりうると考えられた。今後ヒトへの応用を進めるためには、AMD における交感神経の役割を臨床的に解明することで病態理解を進め、検討を重ねる必要があると考えられる。

1. de Jong PT (2006) Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 355: 1474-1485.
2. Pascolini D, Mariotti SP, Pokharel GP, Pararajasegaram R, Etya'ale D, et al. (2004) 2002 global update of available data on visual impairment: a compilation of population-based prevalence studies. *Ophthalmic Epidemiol* 11: 67-115.
3. 厚生労働省特定疾患 網膜脈絡膜・視神経萎縮症調査研究班 2011 年報告書
4. Eldred GE (1995) Lipofuscin fluorophore inhibits lysosomal protein degradation and may cause early stages of macular degeneration. *Gerontology* 41 Suppl 2: 15-28.
5. Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, Johnson LV, Anderson DH, et al. (2001) An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 20: 705-732.
6. Grossniklaus HE, Ling JX, Wallace TM, Dithmar S, Lawson DH, et al. (2002) Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Mol Vis* 8: 119-126.
7. Zhou J, Pham L, Zhang N, He S, Gamulescu MA, et al. (2005) Neutrophils promote experimental choroidal neovascularization. *Mol Vis* 11: 414-424.
8. Sakurai E, Anand A, Ambati BK, van Rooijen N, Ambati J (2003) Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 3578-3585.
9. Apte RS, Richter J, Herndon J, Ferguson TA (2006) Macrophages inhibit neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration. *PLoS Med* 3: e310.
10. Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, et al. (2003) An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med* 9: 1390-1397.
11. Cruz-Guilloty F, Saeed AM, Duffort S, Cano M, Ebrahimi KB, et al. (2014) T cells and macrophages responding to oxidative damage

- cooperate in pathogenesis of a mouse model of age-related macular degeneration. *PLoS One* 9: e88201.
12. Tsutsumi-Miyahara C, Sonoda KH, Egashira K, Ishibashi M, Qiao H, et al. (2004) The relative contributions of each subset of ocular infiltrated cells in experimental choroidal neovascularisation. *Br J Ophthalmol* 88: 1217-1222.
  13. Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5: 953-964.
  14. Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8: 958-969.
  15. Libby P, Nahrendorf M, Swirski FK (2013) Monocyte heterogeneity in cardiovascular disease. *Semin Immunopathol* 35: 553-562.
  16. Mantovani A, Garlanda C, Locati M (2009) Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1419-1423.
  17. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, et al. (2007) The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 204: 3037-3047.
  18. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, et al. (2007) Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 204: 1057-1069.
  19. Saederup N, Cardona AE, Croft K, Mizutani M, Cottle AC, et al. (2010) Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice. *PLoS One* 5: e13693.
  20. Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, et al. (2004) Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 172: 4410-4417.
  21. Hristov M, Weber C (2011) Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 106: 757-762.
  22. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, et al. (2007)

- Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317: 666-670.
23. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, et al. (2012) A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336: 86-90.
  24. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, et al. (2013) Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38: 79-91.
  25. Davies LC, Rosas M, Jenkins SJ, Liao CT, Scurr MJ, et al. (2013) Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. *Nat Commun* 4: 1886.
  26. Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV (2002) A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol* 134: 411-431.
  27. Johnson LV, Leitner WP, Staples MK, Anderson DH (2001) Complement activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration. *Exp Eye Res* 73: 887-896.
  28. Walport MJ (2001) Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344: 1058-1066.
  29. Markiewski MM, Lambris JD (2007) The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol* 171: 715-727.
  30. Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, Sarma JV, Barnum SR, et al. (2006) Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2328-2333.
  31. Arteaga Figueroa L, Barbosa Navarro L, Patino Vera M, Petricevich VL (2015) Preliminary Studies of the Immunomodulator Effect of the *Bougainvillea xbuttiana* Extract in a Mouse Model. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015: 479412.
  32. van Furth R, Cohn ZA (1968) The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 128: 415-435.
  33. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo

- V, et al. (2009) Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325: 612-616.
34. Steinle JJ, Pierce JD, Clancy RL, G Smith P (2002) Increased ocular blood vessel numbers and sizes following chronic sympathectomy in rat. *Exp Eye Res* 74: 761-768.
  35. Telander DG (2011) Inflammation and age-related macular degeneration (AMD). *Semin Ophthalmol* 26: 192-197.
  36. Takahashi H, Tamaki Y, Ishii N, Oikawa N, Mizuguchi E, et al. (2008) Identification of a novel vascular endothelial growth factor receptor 2 inhibitor and its effect for choroidal neovascularization in vivo. *Curr Eye Res* 33: 1002-1010.
  37. Fujiu K, Manabe I, Nagai R (2011) Renal collecting duct epithelial cells regulate inflammation in tubulointerstitial damage in mice. *J Clin Invest* 121: 3425-3441.
  38. Liu B, Wei L, Meyerle C, Tuo J, Sen HN, et al. (2011) Complement component C5a promotes expression of IL-22 and IL-17 from human T cells and its implication in age-related macular degeneration. *J Transl Med* 9: 1-12.
  39. Hasegawa E, Sonoda KH, Shichita T, Morita R, Sekiya T, et al. (2013) IL-23-independent induction of IL-17 from  $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells promotes experimental intraocular neovascularization. *J Immunol* 190: 1778-1787.
  40. Espinosa-Heidmann DG, Suner IJ, Hernandez EP, Monroy D, Csaky KG, et al. (2003) Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 3586-3592.
  41. Tsutsumi C, Sonoda KH, Egashira K, Qiao H, Hisatomi T, et al. (2003) The critical role of ocular-infiltrating macrophages in the development of choroidal neovascularization. *J Leukoc Biol* 74: 25-32.
  42. Kelly J, Ali Khan A, Yin J, Ferguson TA, Apte RS (2007) Senescence regulates macrophage activation and angiogenic fate at sites of tissue injury in mice. *J Clin Invest* 117: 3421-3426.
  43. Bora PS, Sohn JH, Cruz JM, Jha P, Nishihori H, et al. (2005) Role of

- complement and complement membrane attack complex in laser-induced choroidal neovascularization. *J Immunol* 174: 491-497.
44. Poor SH, Qiu Y, Fassbender ES, Shen S, Woolfenden A, et al. (2014) Reliability of the mouse model of choroidal neovascularization induced by laser photocoagulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55: 6525-6534.
  45. Jawad S, Liu B, Li Z, Katamay R, Campos M, et al. (2013) The role of macrophage class a scavenger receptors in a laser-induced murine choroidal neovascularization model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 5959-5970.
  46. Yuda K, Takahashi H, Inoue T, Ueta T, Iriyama A, et al. (2012) Adrenomedullin inhibits choroidal neovascularization via CCL2 in the retinal pigment epithelium. *Am J Pathol* 181: 1464-1472.
  47. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, et al. (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116: e74-80.
  48. Toomey CB, Kelly U, Saban DR, Bowes Rickman C (2015) Regulation of age-related macular degeneration-like pathology by complement factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E3040-3049.
  49. Dutta P, Courties G, Wei Y, Leuschner F, Gorbato R, et al. (2012) Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature* 487: 325-329.
  50. Rohrer DK, Desai KH, Jasper JR, Stevens ME, Regula DP, Jr., et al. (1996) Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7375-7380.
  51. Morisco C, Zebrowski DC, Vatner DE, Vatner SF, Sadoshima J (2001) Beta-adrenergic cardiac hypertrophy is mediated primarily by the beta(1)-subtype in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 33: 561-573.
  52. Zhu WZ, Wang SQ, Chakir K, Yang D, Zhang T, et al. (2003) Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II. *J Clin Invest* 111: 617-625.
  53. Johnson M (1998) The beta-adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med*

- 158: S146-153.
54. Chruscinski AJ, Rohrer DK, Schauble E, Desai KH, Bernstein D, et al. (1999) Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. *J Biol Chem* 274: 16694-16700.
55. Chesley A, Lundberg MS, Asai T, Xiao RP, Ohtani S, et al. (2000) The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. *Circ Res* 87: 1172-1179.
56. Susulic VS, Frederick RC, Lawitts J, Tozzo E, Kahn BB, et al. (1995) Targeted disruption of the beta 3-adrenergic receptor gene. *J Biol Chem* 270: 29483-29492.
57. Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, et al. (2006) Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* 124: 407-421.
58. Thaker PH, Han LY, Kamat AA, Arevalo JM, Takahashi R, et al. (2006) Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat Med* 12: 939-944.
59. Steinle JJ, Lashbrook BL (2006) Cervical sympathectomy regulates expression of key angiogenic factors in the rat choroid. *Exp Eye Res* 83: 16-23.
60. Nowak JZ (2006) Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacol Rep* 58: 353-363.
61. Wiktor-Jedrzejczak W, Gordon S (1996) Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse. *Physiol Rev* 76: 927-947.
62. Leung E, Landa G (2013) Update on current and future novel therapies for dry age-related macular degeneration. *Expert Rev Clin Pharmacol* 6: 565-579.
63. Davis A, Cohen SM, Pautler SE, Billiris-Findlay K, Eichenbaum DA (2012) Beta blocker use and age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol* 90: e162-163.
64. Montero JA, Ruiz-Moreno JM, Sanchis-Merino E, Perez-Martin S (2013) Systemic beta-blockers may reduce the need for repeated intravitreal



- injections in patients with wet age-related macular degeneration treated by bevacizumab. *Retina* 33: 508-512.
65. Jo YJ, Sonoda KH, Oshima Y, Takeda A, Kohno R, et al. (2011) Establishment of a new animal model of focal subretinal fibrosis that resembles disciform lesion in advanced age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52: 6089-6095.
  66. Lech M, Anders HJ (2013) Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochim Biophys Acta* 1832: 989-997.
  67. Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, Klaver CC, et al. (2001) Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. *Ophthalmology* 108: 697-704.
  68. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, et al. (2005) Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308: 385-389.
  69. Yang Z, Camp NJ, Sun H, Tong Z, Gibbs D, et al. (2006) A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science* 314: 992-993.
  70. Seddon JM, Willett WC, Speizer FE, Hankinson SE (1996) A prospective study of cigarette smoking and age-related macular degeneration in women. *JAMA* 276: 1141-1146.
  71. Mitchell P, Smith W, Wang JJ (1998) Iris color, skin sun sensitivity, and age-related maculopathy. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 105: 1359-1363.

## 謝辞

研究の機会を与えて下さり、4年間にわたり終始御懇意なる御指導、御鞭撻を賜った東京大学大学院医学系研究科 外科学専攻感覚運動機能医学講座 眼科学分野 天野史郎前教授および相原一教授に心より感謝申し上げます。

研究は主に東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚運動機能医学講座眼科学教室にて行われました。本研究において東京大学大学院医学系研究科 外科学専攻感覚運動機能医学講座 眼科学分野 柳靖雄前講師（現 Associate Professor, Duke NUS medical School）には終始御懇意なる御指導、有益な助言、御鞭撻を賜り厚く感謝申し上げます。

また、共同研究を快く引き受けてくださった東京大学大学院医学系研究科内科学専攻器官病態内科学講座 循環器内科学 藤生克仁助教、真鍋一郎講師、自治医科大学 永井良三学長に深謝申し上げます。

最後に、本研究に際して数々のご助言、ご協力いただきました東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚運動機能医学講座眼科学教室西田淳子研究員、山岸麗子研究員に厚く御礼申し上げます。