

## 論文の内容の要旨

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

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の滲出性変化を特徴とする進行性の疾患で、欧米では以前より中途失明原因の第一位となっている。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の頻度は年々増加している。近年の研究によりAMDの病態の背景は網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium: RPE)、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。網膜色素上皮異常、ドルーゼン等の前駆病変が進行すると、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。形成された脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization: CNV) は未熟な血管からなるため滲出性の変化や出血をきたし、急激に視機能が障害される。従ってCNVに対する治療法について長年研究が行われており、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。しかし、抗VEGF療法は対処療法であり、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。

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ようになってきた。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。マクロファージが血管新生促進作用を有することが報告されている一方、マクロファージが血管新生抑制作用を有するとの相反する報告もある。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った。例えば、リンパ球がCNV形成に促進的に働くことが報告されている一方、リンパ球のCNV形成に対する影響が少ないことも報告されている。このように、リンパ球の血管新生への関与も統一した見解に至っていない。

また、近年のゲノム解析によりAMD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ようになってきた。補体C3の加水分解産物であるC3aやC5a等がRPEにおけるVEGFの発現を上昇させ、血管新生促進作用を有することが明らかになっている。一方、C3ノックアウトマウスでCNVが増大するとの相反する報告もある。

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。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。また、従来報告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。

これらの研究結果をもとに、今回我々は炎症細胞、補体C3または交感神経のCNV形成過程に及ぼす影響を検討するために、以下の研究を行った。

## 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<sup>-/-</sup>)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<sup>-/-</sup>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<sup>hi</sup>、Ly6C<sup>int</sup>、Ly6C<sup>lo</sup>)の経時変化を検討したところ、WTと比較してC3<sup>-/-</sup>マウス末梢血Ly6C<sup>hi</sup>単球の割合が増加する一方で、眼内Ly6C<sup>hi</sup>、Ly6C<sup>int</sup>およびLy6C<sup>lo</sup>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<sup>hi</sup>およびLy6C<sup>lo</sup>細胞についてVEGF発現量を検討した結果、VEGFは

主にLy6C<sup>hi</sup>細胞由来であり、WTと比較してC3<sup>-/-</sup>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β3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β3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単球・マクロファージサブタイプの割合の経時変化を検討した結果、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Ly6C<sup>hi</sup>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Ly6C<sup>hi</sup>、Ly6C<sup>int</sup>とLy6C<sup>lo</sup>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Ly6C<sup>hi</sup>細胞の割合に有意な減少を認め、眼内Ly6C<sup>int/lo</sup>CD64<sup>+</sup>細胞が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で少ないことが明らかになった。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。野生型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、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。

これらの研究結果をまとめると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形成に強く関与することが明らかになった。また、補体C3が血管新生促進作用を有することが明らかになり、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を示唆された。さらに、交感神経がCNVに対して促進的に作用する可能性が示唆されたことより、β遮断薬の全身投与などの交感神経抑制薬がAMDのための新たな治療法または補助療法になりうる可能性が示された。