

審査の結果の要旨

氏名 譚 雪

本研究は滲出型加齢黄斑変性の主病態となる脈絡膜新生血管 (CNV) の形成過程において重要な役割を演じていると考えられる因子の関与を明らかにするため、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、レーザー誘発CNVモデルを用いて、CNV面積比較検討や、眼内および末梢血中の炎症細胞の割合の比較検討を試みたものであり、下記の結果を得ている。

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⁺T細胞、B220⁺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^{hi}、Ly6C^{int}、Ly6C^{lo}) が増加することが示された。一方、CD8⁺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ン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は認められなかった。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示された。

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示された。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示された。

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示された。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^{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Ly6C^{hi}、Ly6C^{int}とLy6C^{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Ly6C^{hi}細胞の割合に有意な減少を認め、眼内Ly6C^{int/lo}CD64⁺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示された。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^{int}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^{lo}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^{hi}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^{hi}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^{hi}細胞を移入することにより、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^{hi}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^{hi}細胞の眼内への動員が抑制されることが示された。

以上、本論文は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を明らかにした。また、補体C3が血管新生促進作用を有することを明らかにし、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可能性を示した。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を示した。本研究は滲出型加齢黄斑変性における脈絡膜新生血管の発生機序の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。