

# 博士論文

論文題目 角膜血管・リンパ管新生に関与する  
新規調節因子の探索

氏 名 豊野 哲也

## 目次

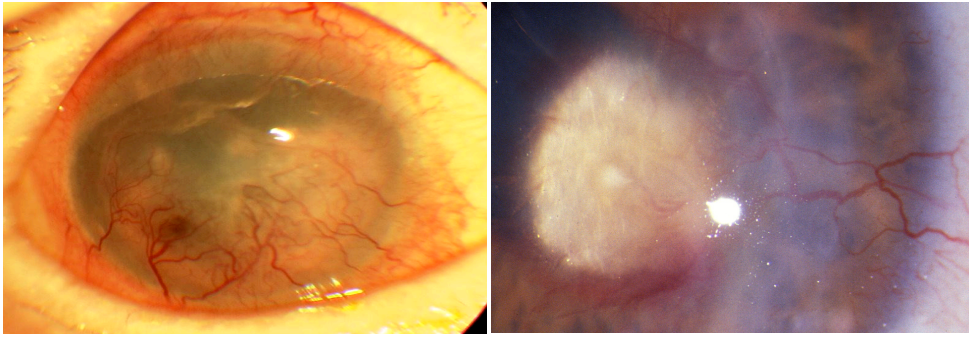
序章 .....	1
第1章 角膜血管・リンパ管新生におけるアンジオポエチン様 因子2の役割 .....	5
背景 .....	6
方法および結果	
1-1 野生型マウス炎症性角膜血管・リンパ管新生 モデルにおける Angptl2 の発現解析 .....	8
1-2 炎症性角膜血管新生における Angptl2 の役割 .....	15
1-3 Angptl2 siRNA による血管・リンパ管制御作用 の解析 .....	25
考察 .....	30
第2章 新規角膜血管新生抑制因子の探索 .....	36
背景 .....	37
方法および結果	
2-1 in vitro 角膜血管新生モデルの構築.....	39
2-2 HKC と HDF における遺伝子発現の比較.....	47

2-3	HKCにおける Angpt17 の発現確認.....	50
2-4	in vitro 角膜血管新生モデルを用いた Angpt17 血管新生制御作用の検討.....	54
2-5	in vivo における Angpt17 の血管・リンパ管新生制御作用の検討.....	59
	考察 .....	64
	まとめ .....	69
	参考文献 .....	72
	謝辞 .....	79

# 序章

角膜は眼球最表層に位置する組織であり、良好な視力や視機能を維持するためには透明であることが必須である。角膜の透明性には、「無血管組織であること」が大きく貢献しているが、様々な刺激や侵襲により惹起される炎症反応に伴い、病的な血管が二次的に角膜内へ侵入してしまうことがある（図序-1）。

図 序-1.



左：感染性角膜炎に伴う角膜血管新生

右：新生血管からの脂質漏出による角膜混濁

角膜は上皮層、実質層、内皮層の3つの層からなる。実質層は全角膜厚の約85%を占め、I型コラーゲン、細胞間基質、線維芽細胞であるケラトサイトなどで構成されており、角膜炎症に伴う新生血管は角膜実質内に侵入する。

血管新生が生じた角膜では、新生血管からの脂質やタンパク質成分の漏出、沈着、血管新生過程での角膜コラーゲン線維の癒痕化などが生じ、角膜実質混濁をきたして透明性が失われることで視機能が低下する。このように角膜血管新生は視機能を脅かす重篤な病態であるにもかかわらず、現在まで角膜血管新

生に対して一般的に臨床で用いられている治療法は存在せず、透明性が失われた後の角膜移植術に依存しているのが現状である。しかし、血管侵入を伴う混濁角膜に対する角膜移植では、術後の拒絶反応発症率が高く、その予後は不良であることが知られている<sup>1-3</sup>。

さらに、新生血管が侵入した角膜では、同時にリンパ管の侵入がみられ<sup>4,7</sup>、炎症局所で抗原を認識した抗原提示細胞の所属リンパ節やリンパ組織への移動を容易にさせる。したがって、血管新生に加えてリンパ管新生を抑制する治療法が移植片の拒絶反応にとっての理想的な予防策となり得る<sup>3,8-16</sup>。これまでにステロイド薬<sup>11,15,17-19</sup>や抗 VEGF 薬<sup>11,15,20-22</sup>を用いた角膜血管・リンパ管新生抑制療法は試みられてきたが、ステロイドには免疫抑制に伴う易感染性や眼圧上昇に伴う二次的な緑内障（ステロイド緑内障）<sup>11,15,23</sup>、抗 VEGF 療法では角膜の三叉神経再生不良に伴う神経麻痺性角膜症（難治性の角膜上皮障害）<sup>11,16</sup>などの重篤な副作用のリスクを伴うことが報告されている。したがって、新たな視点での角膜血管・リンパ管新生に対する治療法の開発が期待されている。

そこで本学位論文では、まずさまざまな炎症性疾患で発現上昇が見られる Angiopoietin like protein 2 (Angptl2)の角膜炎症における発現とその機能を調べ、

角膜血管新生やリンパ管新生の治療ターゲットになり得るか検討した(第1章)。

次に角膜に従来高発現する分子群のスクリーニングから、角膜に発現する新た

な抗血管新生分子の同定を試み、これらの解析結果から、視機能に重篤な影響

を及ぼす、角膜血管新生やリンパ管新生の病態理解や新規治療法の開発を模索

した(第2章)。

# 第 1 章 角膜血管・リンパ管新生における アンジオポエチン様因子 2 の役割



## 背景

近年、アンジオポエチン様因子(Angiotensin like protein; Angptl)ファミリーが生体内の慢性炎症性疾患や代謝性疾患など様々な病態に関与していることが報告されている<sup>3,9,11-13,15</sup>。Angptl ファミリーはアンジオポエチンの構造上の特徴であるアミノ末端の coiled-coil ドメインとカルボキシ末端の fibrinogen-like ドメインを有するタンパク質であるが、アンジオポエチンの特異的受容体である Tie1、および Tie2 と結合しない分子であり、アンジオポエチンファミリーとは異なる機能を有する分子群であることが報告された<sup>1,3,24-27</sup>。

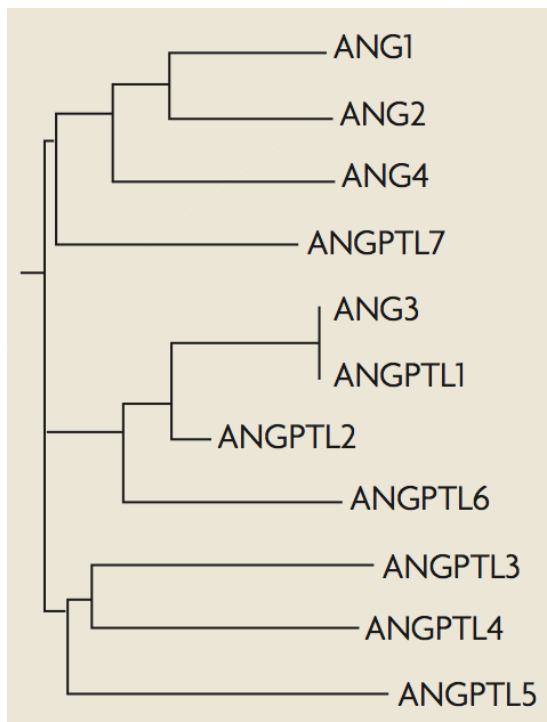


図 1-1.

Phylogenetic Clustering<sup>27</sup>

現在までに 8 分子が報告されているが<sup>4,10,28,29</sup>、なかでも Angptl2 は局所性炎症を基盤とした様々な疾患の病態の発症・進展への関与が報告されてきた<sup>3,5-7,9-11,13-15</sup>。さらに、Angptl2 は integrin に作用することで、血管内皮細胞における炎症反応やマクロファージの活性化が引き起こされると考えられている<sup>11,15,18,19,25</sup>。皮膚特異的に Angptl2 が高発現するトランスジェニックマウスでは、耳、鼻、眼周囲、尻尾の発赤や腫脹、血管壁への多数の白血球接着や血管透過性亢進がみられ、皮膚局所での炎症が誘導されることが報告されている<sup>11,12,15,30,31</sup>。しかし角膜炎症における Angptl2 の発現や機能については我々が知る限り報告がない。

そこで本章では、炎症性角膜血管・リンパ管新生における Angptl2 の役割を明らかにすることを目的とし、マウス炎症性角膜血管・リンパ管新生モデルを用いて検討を行った。

## 1-1. 野生型マウス炎症性角膜血管・リンパ管新生モデルにおける Angptl2 の発現解析

目的：

野生型マウス炎症性角膜血管・リンパ管新生モデルにおける Angptl2 発現量の経時的変化および発現部位を明らかにすること

方法：

### 動物

C57BL/6 (8 週齢オス)、BALB/c (8 週齢オス) を埼玉実験動物供給所より購入し用いた。全ての動物は東京大学動物実験実施規則ならびに ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research に従い取り扱った。

### 麻酔方法

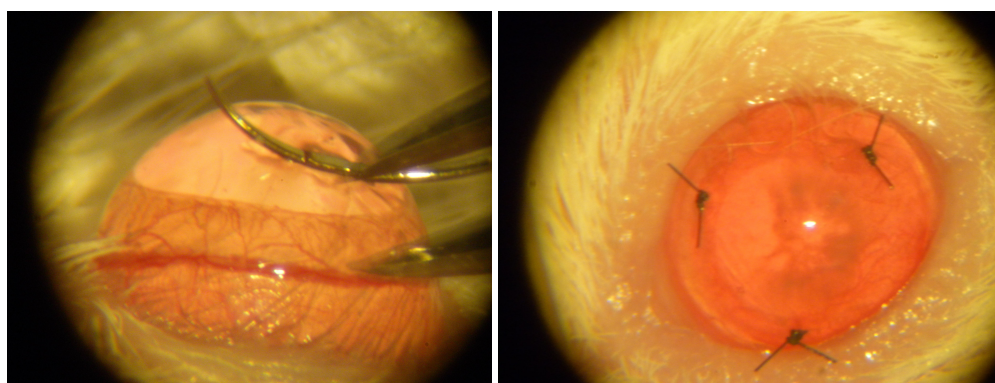
ケタミン 35mg/kg、キシラジン 5mg/kg の投与量になるよう生理食塩水で希釈し、27G 針を用いて大腿部筋肉内に投与した。

## 炎症性角膜血管・リンパ管新生の誘導方法

全身麻酔導入の後、角膜輪部血管より 1mm の部位をキャリパーで計測した。

丸針付き 10-0 Nylon 糸を用い、前房内に穿孔しないよう留意しながら、角膜実質内を通糸し縫合した。これを 1 眼当り 3 カ所行った (図 1-1-1)。

図 1-1-1.



左：輪部血管から 1mm の部位に丸針付き 10-0Nylon を用いて角膜実質内に通糸  
右：可及的等間隔に 3 針縫合を置いた

## Real Time RT-PCR

角膜実質への通糸・縫合後、各観察期間の後に眼球を摘出し、角膜片を採取した。角膜片を RNA 抽出用フェノール試薬 (ISOGEN、ニッポンジーン) に浸漬し、組織破砕機 (BeadSmash、ワケンビーテック) を用いてホモジナイズした後、ISOGEN の RNA 抽出マニュアルに従い total RNA を抽出した。PrimeScript®

RT Master Mix (タカラバイオ) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を調整した。

SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ) を用いた、インターカレータ法による定量 PCR を TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> (タカラバイオ) (設定値 : 40 サイクル、95°C 5 秒、60°C 30 秒) で行った。ターゲット遺伝子の発現量は Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現量に補正した。使用したプライマーは以下の通りである。

mice Angptl2: forward, 5'- GGAGGTTGGACTGTCATCCAGAG-3',

reverse, 5'- GCCTTGGTTCGTCAGCCAGTA-3';

mice GAPDH: forward, 5'-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3',

reverse, 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'.

## 免疫染色

角膜における Angptl2 の発現部位を同定するために、摘出眼球から作成した角膜切片を用いて、Angptl2、CD31 (血管内皮マーカー)、LYVE-1 (リンパ管内皮マーカー)、F4/80 (マクロファージマーカー) に対する免疫染色を行った。摘出したマウスの眼球をティッシュ・テック O.C.T. コンパウンド (サクラファイ

ンテックジャパン) に封埋し、液体窒素で凍結した標本をクライオスタット (Thermo Scientific) を用いて8-10 $\mu$ m厚に薄切した。3%ウシ血清アルブミン添加 PBSでブロッキングした後、ウサギ抗マウスAngptl2抗体 (1:100、熊本大学分子遺伝学教室尾池研究室より分与)<sup>10,11,15</sup>とラット抗マウスCD31抗体 (1:100、abcam)、ラット抗LYVE-1抗体 (1:100、abcam)、ラット抗F4/80抗体 (1:100、abcam) のそれぞれの組み合わせで1次染色 (4°C、オーバーナイトインキュベーション) を行った。洗浄の後、Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (1:1000, IN Vitrogen)およびAlexa Fluor® 594 donkey anti-rat IgG (H+L) (1:1000, IN Vitrogen) を用いて2次染色を行った。標本の観察には蛍光顕微鏡BZ9000 (キーエンス) を使用した。

#### 統計解析

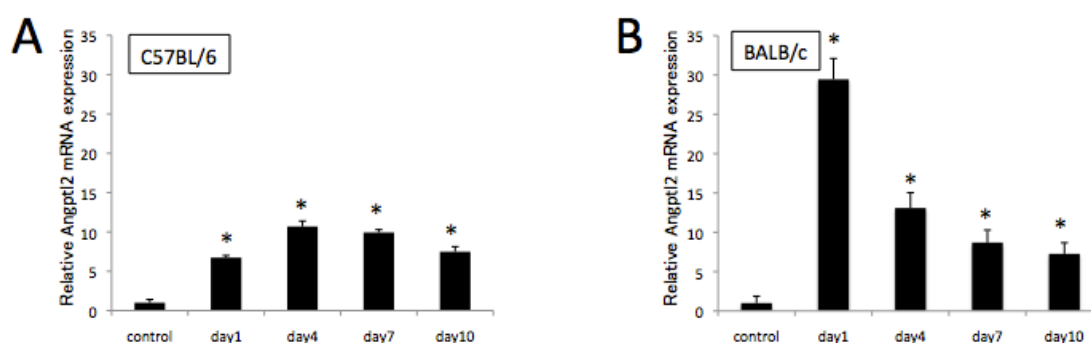
Steel 法を用いてコントロール群と各処置群との比較を行い、 $P < 0.05$  を統計学的に有意とみなした。

結果：

### 炎症性角膜血管・リンパ管新生モデルにおける経時的 Angptl2 発現量

野生型マウスを用いた炎症性角膜血管・リンパ管新生モデルにおける、角膜通糸後 1、4、7、10 日目の経時的 Angptl2 発現量を定量 PCR で検討した。結果を（図 1-1-2）に示した。C57BL/6、BALB/c 共に無処置眼であるコントロールを（図 1-1-2）に示した。C57BL/6、BALB/c 共に無処置眼であるコントロールに比べて、何れの時点においても Angptl2 mRNA の発現量が亢進していた（ $P < 0.05$ ）。C57BL/6 では 4 日目にピークを迎え、7 日目以降減少した。BALB/c では 1 日目に著明なピークがあり、4 日目以降徐々に減少していた。

図 1-1-2.



A : C57BL/6 を用いた実験結果は、Angptl2 mRNA の発現量はコントロール群に比べて、術後 1 日目から 10 日目までの全ての時点で有意な上昇がみられた（\* $P < 0.05$ 、各  $n=4$ ）。

B : BALB/c を用いた実験でも、Angptl2 mRNA の発現量はコントロール群に比べて、術後 1 日目から 10 日目までの全ての時点で有意な上昇がみられ（\* $P < 0.05$ 、各  $n=4$ ）、術後 1 日目の発現量に著明なピークがみられた。

## 血管・リンパ管新生角膜における Angptl2 の局在

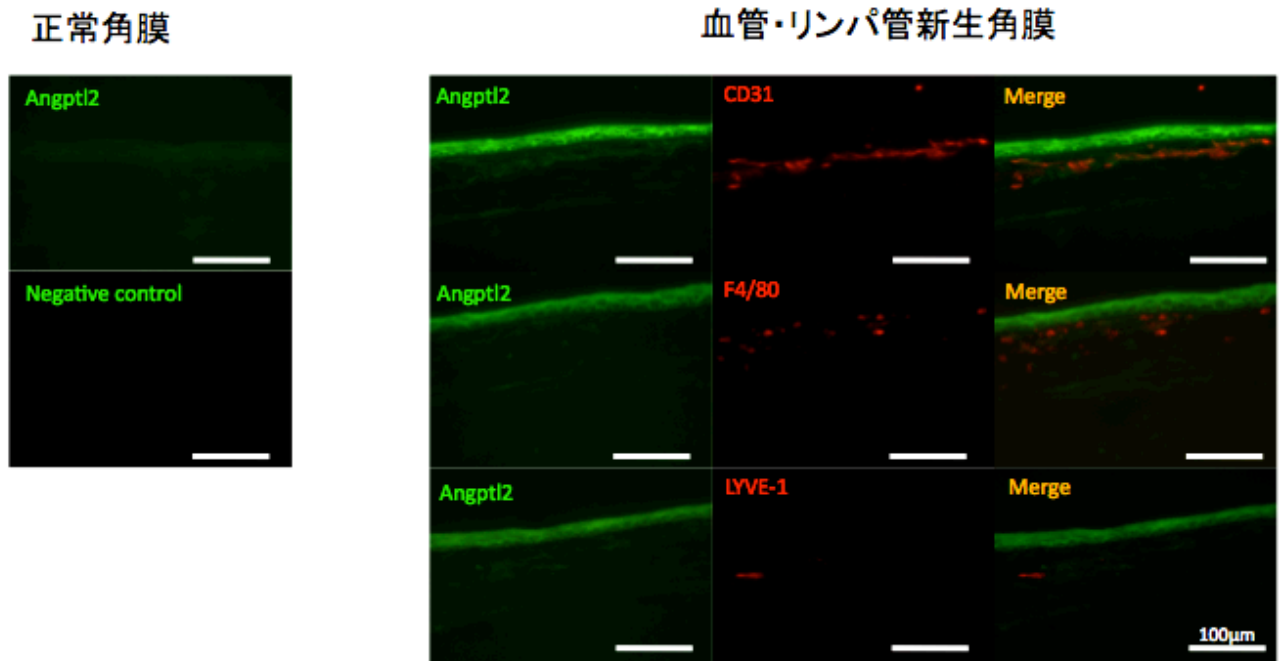
Angptl2 と CD31（血管内皮マーカー）、LYVE-1（リンパ管内皮マーカー）、F4/80（マクロファージマーカー）のそれぞれを蛍光二重染色し、角膜における Angptl2 タンパクの局在を検討した。

免疫染色の結果、正常コントロールの角膜に比べて術後 7 日目の角膜では、角膜上皮および実質への Angptl2 の発現が著明に亢進していた（図 1-1-3）。抗 Angptl2 抗体陽性細胞は、抗 CD31 抗体陽性細胞および抗 F4/80 抗体陽性細胞と部分的に一致したが、抗 LYVE-1 抗体陽性細胞とは一致しなかった（図 1-1-3）。

これらの結果から、血管・リンパ管新生角膜で発現が亢進した Angptl2 は角膜実質を構成するケラトサイトに主に発現したことが示唆された。



図 1-1-3.



C57BL/6 の正常角膜では、角膜上皮にのみ Angptl2 の弱い発現がみられた。術後 7 日目の血管・リンパ管新生が誘導された角膜では、角膜上皮および実質（主にケラトサイト）への Angptl2 の発現亢進が確認された。Angptl2 陽性の角膜実質細胞は、CD31 および F4/80 にも部分的に陽性であった。

## 1-2 炎症性角膜血管新生における Angptl2 の役割

目的：

Angptl2 過剰発現マウスおよび Angptl2 ノックアウトマウスを用いた炎症性角膜血管・リンパ管新生モデルの解析により、角膜血管・リンパ管新生に対する Angptl2 の機能を明らかにすること

方法：

動物

C57BL/6 をバックグラウンドとする Angptl2 ホモノックアウト (Angptl2<sup>-/-</sup>) マウスと BALB/c をバックグラウンドとし、サイトケラチン 14 (K14) のプロモーター下に Angptl2 を強発現させたトランスジェニック (K14-Angptl2) マウスを用いた<sup>8,10,11,32,33</sup>。コントロールには同胎の野生型マウスを用いた。何れも 20-24 週齢のオスを用いた。麻酔はケタミン 35mg/kg、キシラジン 5mg/kg の投与量になるよう生理食塩水で希釈し、27G 針を用いて大腿部筋肉内に投与した。

全ての動物は東京大学動物実験実施規則ならびに ARVO Statement for the Use of

Animals in Ophthalmic and Vision Research に従い取り扱った。

### 炎症性角膜血管・リンパ管新生の誘導

全身麻酔導入の後、角膜輪部血管より 1mm の部位をキャリパーで計測し、通糸予定部位とした。丸針付き 10-0 Nylon 糸を用い、前房内に穿孔しないよう留意しながら、角膜実質内を通糸し縫合した。これを 1 眼当り 1 カ所（新生領域定量用）ないし 3 カ所（RNA 抽出用）行った。

### Real Time RT-PCR

角膜実質への通糸・縫合後、5 日(K14-Angpt12)ないし 7 日(Angpt12<sup>-/-</sup>)後に眼球を摘出し、角膜片を採取した。角膜片を RNA 抽出用フェノール試薬 (ISOGEN、ニッポンジーン) に浸漬し、組織破砕機 (BeadSmash、ワケンビーテック) を用いてホモジナイズした後、ISOGEN の RNA 抽出マニュアルに従い total RNA を抽出した。PrimeScript<sup>®</sup> RT Master Mix (タカラバイオ) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を調整した。SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ) を用いた、インターカレータ法による定量 PCR を TaKaRa PCR

Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> (タカラバイオ) (設定値 : 40 サイクル、95°C 5 秒、60°C 30 秒) で行った。ターゲット遺伝子の発現量は 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。

mice F4/80: forward, 5'-ATGACTGCCACAGTACGATGTGGG-3',

reverse, 5'-TGCTGGACAGGAAGCCTCGTT-3';

mice Interleukin 1 $\beta$ : forward, 5'-TCCAGGATGAGGACATGAGCAC-3',

reverse, 5'-GAACGTCACACACCAGCAGGTTA-3';

mice GAPDH: forward, 5'-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3',

reverse, 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'.

#### 新生血管およびリンパ管の定量方法

炎症性血管・リンパ管新生モデルの作成は、上記の実験 2-1 の方法と同様に行った。術後 7 日目に眼球を摘出し、強角膜片を作成。放射状切開を加えて展開標本とした。新生血管、新生リンパ管の検出は血管内皮細胞マーカーである CD31 およびリンパ管内皮マーカーである LYVE-1 を免疫染色した<sup>11,12</sup>。展開した強角膜片を-20°Cのアセトンで固定し、3%BSA 入り PBS でブロッキング (48

時間、4°C)、ウサギ抗マウス LYVE-1 抗体（リンパ管内皮マーカー、Abcam）とラット抗マウス CD31 抗体（血管内皮マーカー、BD Biosciences）を用いて 1 次染色（48 時間、4°C）を行い、2 次染色（3 時間、室温）には Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG と Alexa Fluor 594 donkey anti-rat IgG（IN Vitrogen）を用いた。染色された領域を画像解析ソフト ImageJ(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)で 2 値化し、1 視野当りの新生血管およびリンパ管領域の面積割合を定量した。

#### 統計解析

Mann Whitney U test を解析に用い、 $P < 0.05$  を統計学的に有意とみなした。

結果：

K14-Angptl2 マウスでは角膜血管・リンパ管新生は亢進し、マクロファージ浸

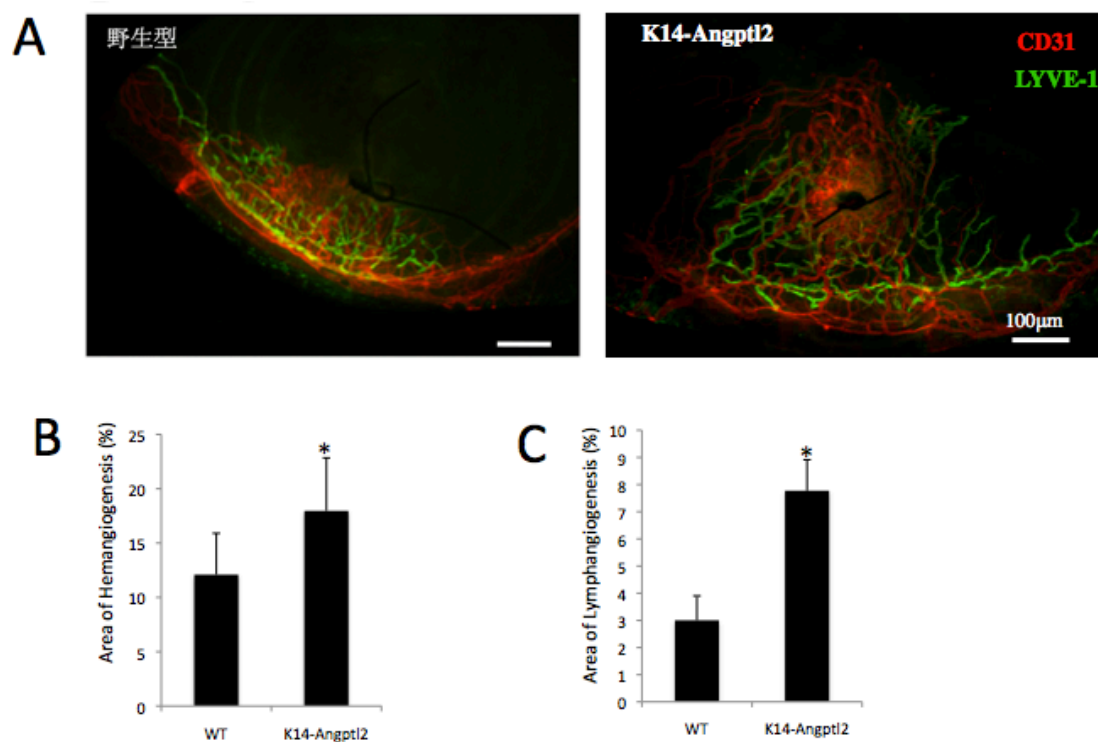
潤の増加を伴う

炎症性角膜・リンパ管新生モデルにおける早期の角膜血管新生・リンパ管新生を評価するために、術後 5 日目に眼球を摘出し、作成した角膜展開標本を血管内皮細胞マーカー（CD31）およびリンパ管内皮細胞マーカー（LYVE-1）で

免疫染色し、新生血管、新生リンパ管を同定した。

K14-Angptl2 マウスは野生型マウスと比較して血管新生領域、リンパ管新生領域共に有意に亢進した ( $P < 0.05$ ) (図 1-2-1)。

図 1-2-1.

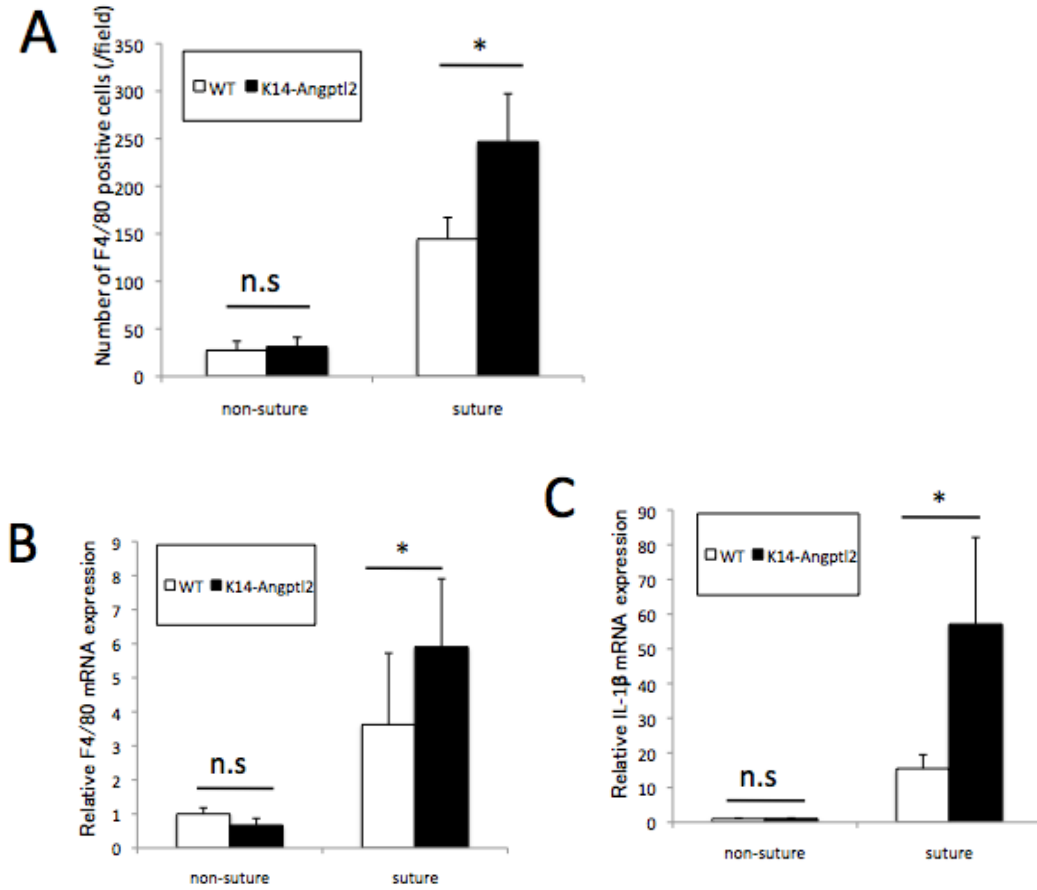


A: 術後 5 日目に摘出し、CD31 (血管内皮マーカー) および LYVE-1 (リンパ管内皮マーカー) を免疫染色した。

B, C: 血管新生領域、リンパ管新生領域ともに K14-Angptl2 マウス群で有意に拡大した (\* $P < 0.05$ 、各  $n=6$ )

そこで、本モデルにおける炎症性角膜血管・リンパ管新生の亢進とマクロファージ浸潤や炎症性サイトカインの関与を検討した。角膜凍結切片をマクロファージマーカーF4/80で免疫染色し、角膜輪部から通糸縫合部までのF4/80陽性細胞数をカウントしたところ、K14-Angptl2マウス群で有意に高い結果であった(図1-2-2.A)。また、血管・リンパ管新生角膜のF4/80およびインターロイキン1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )のmRNA発現量を定量PCRで測定し、結果を比較した。無処置眼より採取した角膜を用いた比較では、両群に有意な差は見られなかったが、術後5日目の角膜を用いた比較では、F4/80、IL-1 $\beta$ ともにK14-Angptl2マウス群で有意に高い結果であった(P<0.05)(図1-2-2.B,C)。

図 1-2-2.



A : 術後 5 日目の角膜における比較では、角膜内に浸潤した F4/80 陽性マクロファージの細胞数が K14-Angptl2 マウス群で有意に多かった ( $P < 0.05$ 、各  $n=8$ ) B, C : F4/80 および IL-1 $\beta$  の mRNA 発現量の比較でも、術後 5 日目の角膜を用いた比較では、F4/80、IL-1 $\beta$  ともに K14-Angptl2 マウス群で有意に高い結果であった ( $P < 0.05$ 、各  $n=4$ )

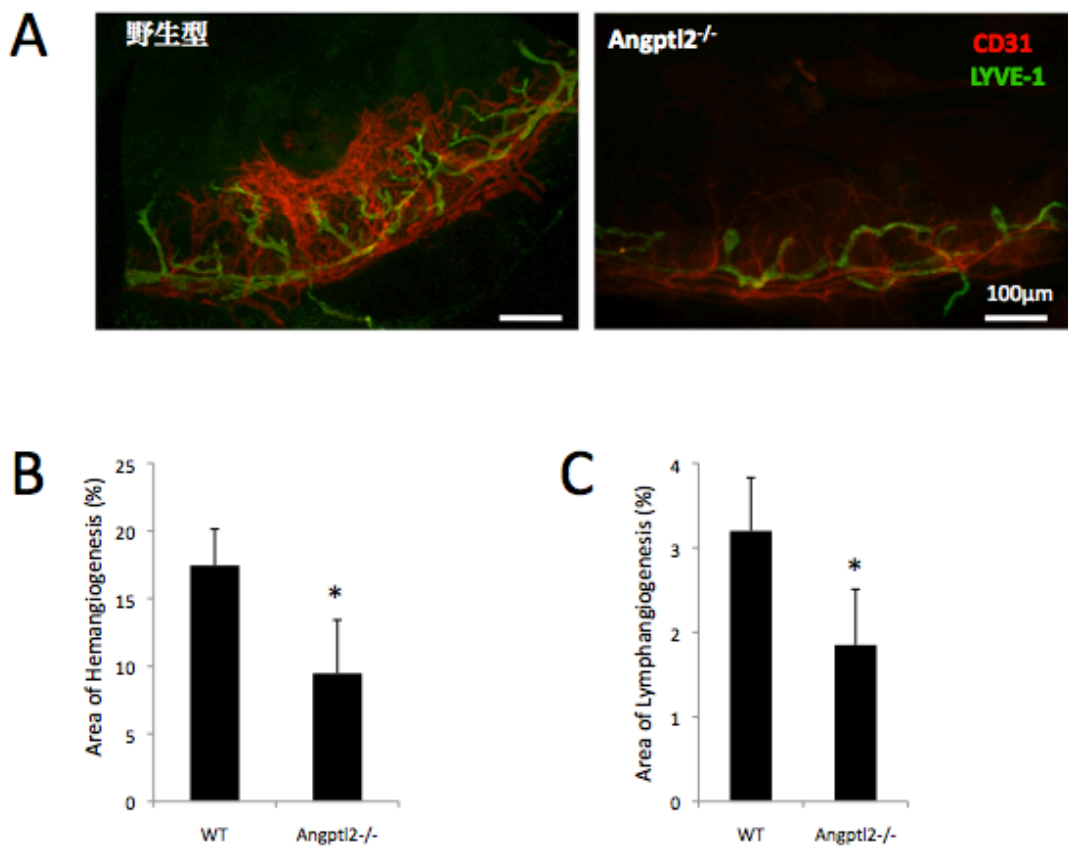
これらの結果から、Angptl2 の強発現を介したマクロファージ浸潤の増加や IL-1 $\beta$  に代表される炎症性サイトカインの発現上昇により角膜血管新生、リンパ管新生が亢進したことが示唆された。



Angptl2<sup>-/-</sup>マウスでは炎症性角膜血管・リンパ管新生が減弱する

一方、Angptl2<sup>-/-</sup>マウスは野生型マウスと比較して血管新生領域、リンパ管新生領域共に有意に縮小した (P < 0.05) (図 1-2-3)。

図 1-2-3.

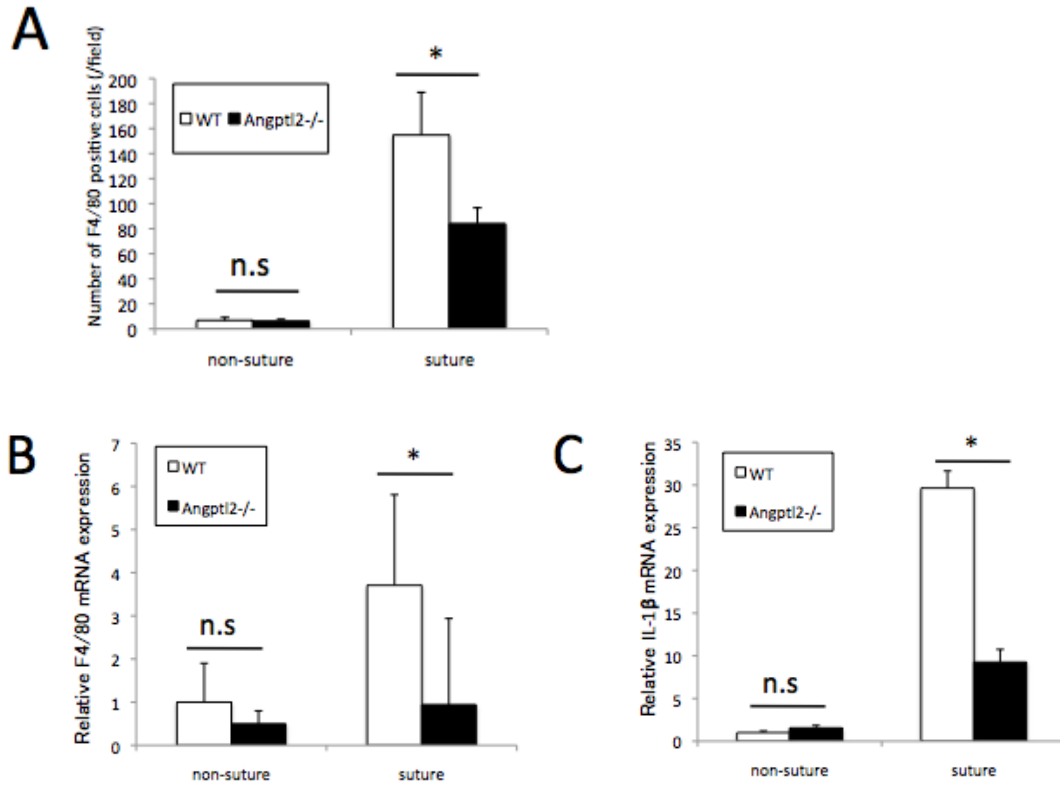


A : 術後 7 日目に摘出し、CD31 (血管内皮マーカー) および LYVE-1 (リンパ管内皮マーカー) を免疫染色した。

B, C : 血管新生領域、リンパ管新生領域ともに Angptl2<sup>-/-</sup>マウス群で有意に縮小した (\*P < 0.05、各 n=6)

そこで、トランスジェニックマウスの解析と同様、本モデルにおける炎症性角膜血管・リンパ管新生の亢進とマクロファージ浸潤や炎症性サイトカインの関与を検討した。角膜凍結切片をマクロファージマーカーF4/80で免疫染色し、角膜輪部から通糸縫合部までのF4/80陽性細胞数をカウントしたところ、 $Angptl2^{-/-}$ マウス群で有意に低い結果であった ( $P < 0.05$ )。また、血管・リンパ管新生角膜のF4/80およびIL-1 $\beta$ のmRNA発現量を比較すると、術後7日目の角膜を用いた比較において、F4/80、IL-1 $\beta$ ともに $Angptl2^{-/-}$ マウス群で有意に低い結果であった ( $P < 0.05$ ) (図 1-2-4)。

図 1-2-4.



A: 術後 7 日目の比較では、角膜内に浸潤した F4/80 陽性マクロファージの細胞数が Angptl2<sup>-/-</sup>マウス群で有意に少なかった ( $P < 0.05$ 、各  $n=8$ )

B, C: F4/80 および IL-1 $\beta$  の mRNA 発現量を比較すると、術後 7 日目の角膜を用いた比較において、F4/80、IL-1 $\beta$  ともに Angptl2<sup>-/-</sup>マウス群で有意に低い結果であった ( $P < 0.05$ 、各  $n=4$ )

これら一連の結果から、角膜炎症を誘導しても、Angptl2 が発現していない状況下ではマクロファージ浸潤や IL-1 $\beta$  の発現が減弱し、角膜血管新生、リンパ管新生が抑制されたと考えられ、Angptl2 が血管・リンパ管新生を促進させる因子である可能性が示唆された。

### 1-3 Angptl2 siRNA による血管・リンパ管制御作用の解析

目的：

将来の臨床応用への可能性を見据え、核酸製剤投与による Angptl2 抑制が炎症性角膜血管・リンパ管新生に及ぼす影響を検討すること。

方法：

#### 動物

C57BL6（8 週齢オス）を埼玉実験動物供給所より購入し用いた。全ての動物は東京大学動物実験実施規則ならびに ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research に従い取り扱った。

#### 麻酔方法

ケタミン 35mg/kg、キシラジン 5mg/kg の投与量になるよう生理食塩水で希釈し、27G 針を用いて大腿部筋肉内に投与した。

### 炎症性角膜血管・リンパ管新生の誘導方法

実験 1-1、1-2 と同様に行った。全身麻酔導入の後、角膜輪部血管よりキャリパーで計測した 1mm の部位に、丸針付き 10-0 Nylon 糸を用いて、前房内に穿孔しないよう留意しながら、角膜実質内を通糸し縫合した。これを 1 眼当り 1 カ所行った。

### siRNA 導入法および新生血管・リンパ管誘導法

1.0 $\mu$ g (0.1mg/ml の溶液を 10 $\mu$ l) の Angptl2 siRNA (esiRNA, Sigma) または control siRNA (esiRNA, Sigma) を結膜下注射した。角膜新生血管・リンパ管の誘導は、siRNA 結膜下注射後 24 時間の時点で、上記実験 1-1、1-2 と同様に角膜輪部血管から 1mm の位置に 10-0Nylon 糸で角膜実質に通糸縫合を行った。通糸縫合後 5 日目に眼球を摘出し、解析を行った。

### Real Time RT-PCR

Angptl2 mRNA 量のノックダウンを確認する目的で、導入処置後 48 時間、96 時間に眼球摘出を行った。採取した角膜片を RNA 抽出用フェノール試薬

(ISOGEN、ニッポンジーン) に浸漬し、組織破砕機 (BeadSmash、ワケンビータック) を用いてホモジナイズした。以降、ISOGEN の RNA 抽出マニュアルに従い total RNA を抽出した。PrimeScript<sup>®</sup> RT Master Mix (タカラバイオ) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を調整した。SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ) を用いた、インターカレータ法による定量 PCR を TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> (タカラバイオ) (設定値: 40 サイクル、95°C 5 秒、60°C 30 秒) で行った。ターゲット遺伝子の発現量は 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。

mice Angptl2: forward, 5'- GGAGGTTGGACTGTCATCCAGAG-3',

reverse, 5'- GCCTTGGTTCGTCAGCCAGTA-3';

mice GAPDH: forward, 5'-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3',

reverse, 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'.

#### 新生血管およびリンパ管の定量方法

炎症性血管・リンパ管新生モデルの作成は、上記の実験 1-1 の方法と同様に行った。術後 5 日目に眼球を摘出し、強角膜片を作成。放射状切開を加えて展

開標本とした。新生血管、新生リンパ管の検出は血管内皮細胞マーカーである CD31 およびリンパ管内皮マーカーである LYVE-1 を免疫染色した。染色された領域を画像解析ソフト ImageJ(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)で 2 値化し、1 視野当りの新生血管およびリンパ管領域の面積割合を定量した。

### 統計解析

Steel-Dwass 法および Mann Whitney U test を解析に用い、 $P < 0.05$  を統計学的に有意とみなした。

### 結果

#### Angptl2 siRNA は角膜血管新生およびリンパ管新生を抑制させる

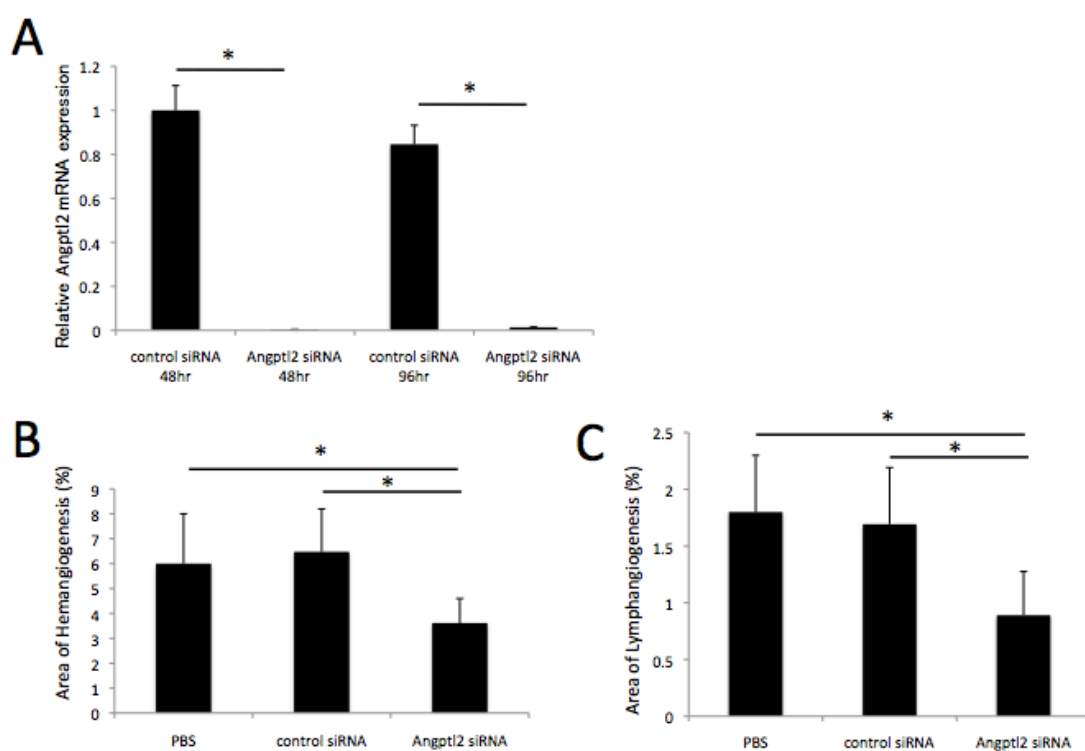
Angptl2 siRNA を結膜下に事前投与した野生型マウス(C57BL/6)の炎症性血管・リンパ管新生モデルにおいて、角膜血管新生およびリンパ管新生反応への影響を検討した。

Angptl2 siRNA の結膜下投与により、角膜に発現する Angptl2 mRNA は、control

siRNA 投与群と比較して有意に低下した ( $P < 0.001$ 、各  $n = 4$ ) (図 1-3-1. A)。

術後 5 日目の角膜血管新生領域、リンパ管新生領域はともに、PBS 投与群および control siRNA 投与群と比べて Angptl2 siRNA 投与群で有意に抑制された ( $P < 0.05$ 、各  $n = 4$ ) (図 1-3-1. B, C)。

図 1-3-1.



A : 結膜下投与による siRNA 導入後 48 時間後および 96 時間後の Angptl2 mRNA の発現は、有意なノックダウンが維持されていた ( $P < 0.001$ 、各  $n=4$ )。B, C : PBS 投与群、control siRNA 投与群と比べて、Angptl2 siRNA 投与群において、血管新生領域、リンパ管新生領域ともに有意に抑制された ( $P < 0.05$ 、各  $n=4$ )。



## 考察

本研究では、まず縫合糸による炎症によって、Angptl2 遺伝子レベルおよびタンパクレベルでの発現が、正常角膜に比べて亢進することを示した (図 1-1-2, 1-1-3)。そして角膜血管新生およびリンパ管新生の領域は、野生型マウスに比べて、K14-Angptl2 マウスで有意に拡大し (図 1-2-1)、Angptl2<sup>-/-</sup>マウスで有意に縮小した (図 1-2-3)。これらの結果から、角膜実質の通糸縫合により惹起される角膜炎症では、Angptl2 発現が上昇し、Angptl2 が炎症性角膜血管新生、リンパ管新生の形成に重要な役割を担うことが示唆された。また、Angptl2 siRNA の結膜下注射により角膜血管・リンパ管新生が著明に減少した (図 1-3-1)。これらの結果を統合すると、Angptl2 は角膜炎症や角膜移植後拒絶反応を抑制する治療ターゲットになり得ると考えられる。

角膜血管新生は局所の炎症や様々な血管新生因子と密接に関係している<sup>24-26,34,35</sup>。角膜の炎症において、活性化した角膜上皮細胞に加えて、単球・マクロファージ系の細胞が炎症や血管新生を促進することが知られており、単球・マクロファージ等の白血球浸潤は炎症性角膜血管新生における重要な役割を果たしている<sup>10,11,28,29</sup>。

一方、角膜内に新生血管が侵入した角膜では、同時にリンパ管の侵入もみられることが知られている<sup>5-7,10,14,36</sup>。角膜に形成された新生リンパ管の病理的意義はよくわかっていないが、マウス角膜移植モデルにおける同種移植片の免疫抑制メカニズムに関連した報告がある。Yamagamiらはマウス角膜移植後眼において、角膜局所に浸潤した抗原提示細胞が、新生リンパ管を經由してリンパ節に戻ることを報告している<sup>25,37</sup>。さらに、リンパ管新生を抑制することにより、角膜移植片の拒絶反応が減少することが報告されている<sup>12,30,31,38,39</sup>。また、炎症性角膜リンパ管新生は炎症局所に浸潤したマクロファージがリンパ管内皮細胞に分化することにより生じることが報告されており<sup>10,11,40</sup>、角膜炎症におけるマクロファージの制御は血管新生のみならずリンパ管新生も抑制することになる。動物モデルにおいて、クロドロン酸リポソームの結膜下投与により角膜のマクロファージがほぼ完全に除去され、角膜血管新生およびリンパ管新生が抑制されるという報告も<sup>8,10,32,33,41</sup>、マクロファージの関与が重要である根拠を裏付けるものである。

本研究では、マクロファージマーカーである F4/80 および代表的な血管新生促進因子である IL-1 $\beta$  の発現が、野生型に比べて K14-Angptl2 マウスで有意に

上昇していた（図 1-2-2）。Angptl2 の機能的受容体と考えられている  $\alpha 5\beta 1$  インテグリン<sup>11,42</sup>の活性化を通して、単球・マクロファージ系細胞の輪部血管から角膜実質内への血管外浸潤が調節されていることが報告されている<sup>34,35,43,44</sup>。さらに Angptl2 は血管内皮細胞における炎症カスケードの活性化と  $\alpha 5\beta 1$  インテグリンを介した血管内皮細胞の遊走を引き起こし、単球・マクロファージ系細胞の遊走を亢進させることが報告されている<sup>11,44</sup>。また、 $\alpha 5\beta 1$  インテグリンは NF- $\kappa$ B シグナリングの活性化を介して、IL-1 $\beta$  を含む種々の炎症性サイトカイン、血管新生促進因子発現を亢進させることが知られている<sup>36,45</sup>。これらを併せて考えると、本研究では炎症角膜における Angptl2/ $\alpha 5\beta 1$  インテグリンの機能的役割が示唆されたと考えられる。炎症性角膜血管・リンパ管新生モデルにおける NF- $\kappa$ B の評価を行うことにより、その関与の有無を明らかとすることは今後の検討課題である。

今回の結果の裏付けとなる、インテグリンが角膜血管新生に与える影響に関する報告として、Muether らは、 $\alpha 5\beta 1$  インテグリンは角膜血管新生を亢進させ、その拮抗薬で角膜血管新生が抑制されることを報告している<sup>37,46</sup>。本研究でも、Angptl2<sup>-/-</sup>マウスにおいて、F4/80 および IL-1 $\beta$  の発現が著明に減少し、新生血管・

リンパ管の抑制が生じることが明らかとなった(図 1-2-4)。一方 Dierlich らは、角膜リンパ管には  $\alpha 5$  インテグリンが発現しており、角膜リンパ管新生は  $\alpha 5$  インテグリンを通して惹起されることを報告している<sup>38,39,47,48</sup>。単球・マクロファージ系細胞は血管・リンパ管新生に関与するので、 $Angptl2^{-/-}$ マウスの角膜に F4/80 陽性細胞が少なかったことは、 $Angptl2$  によって炎症性角膜血管新生およびリンパ管新生が引き起こされるメカニズムの少なくとも一部分は説明できる。

$\alpha 5\beta 1$  インテグリンをターゲットにした治療薬として腎臓癌や卵巣癌に用いられる中和抗体である volociximab (Ophthotech Corp.) が脈絡膜新生血管による病態である加齢黄斑変性症の治療薬としても注目されている。しかし、多くの細胞において  $\alpha 5\beta 1$  インテグリンは多様なシグナル経路を活性化するので、すべての経路を不活性化させることによる副作用の懸念があるため、血管新生に関係した経路のみをターゲットにすることが理想である。今回、 $Angptl2$  の活性化が  $\alpha 5\beta 1$  インテグリンを介して病的血管・リンパ管新生を誘導することが示唆されたことから、 $Angptl2$  の抑制療法は  $\alpha 5\beta 1$  インテグリン自体をターゲットにした際の副作用を回避しながら、抗血管・リンパ管新生効果を得られる可能性があり、加齢黄斑変性症や増殖糖尿病網膜症など様々な疾患の治療への応

用が期待される。しかし、*Angptl2*<sup>-/-</sup>マウスでも約 50%程度の炎症性角膜血管・リンパ管新生の抑制効果であったことから、半減程度が効果の限界である可能性も示唆された。

*Angptl2* 発現上昇の誘因はこれまで明らかでなかったが、最近の研究で *Angptl2* の発現は虚血や日光曝露を含む幾つかの誘因によって亢進することが示唆されている<sup>11,40,43,44</sup>。眼科臨床で日常的に処方されるコンタクトレンズの使用によって生じる角膜への変化は、ほとんどが虚血によるものであり、長期間の使用には角膜血管新生がみられる<sup>41,45</sup>。さらに、慢性的な紫外線曝露は翼状片の原因になる。翼状片とは眼表面の結膜組織が血管新生を伴いながら角膜上に進展してくる加齢性の病気であり、日常臨床で観察機会の多い疾患である。動物モデルにおいても紫外線照射により炎症性角膜血管新生が生じることが報告されている<sup>26,42,49-52</sup>。このような眼表面疾患の病態における *Angptl2* の役割を明らかにすることは今後の課題である。

炎症角膜における *Angptl2* の発現部位は、免疫染色（図 1-1-3）の結果から角膜上皮、角膜実質、浸潤マクロファージ、新生血管内皮細胞であった。これらのうち *Angptl2* の直接の標的細胞を明らかとすることは今後の課題であるが、

特に血管内皮細胞に直接作用しているか否かは重要であり第2章で用いた *in vitro* における角膜血管新生モデル等を用いて *Angptl2* の作用をさらに検証していく必要がある。

本研究では *Angptl2* は角膜炎症により発現が亢進し、炎症性角膜血管新生およびリンパ管新生を引き起こす重要な因子であること、*Angptl2* の発現抑制により血管新生、リンパ管新生ともに著明に減少することを明らかにした。

*Angptl2* は視力障害を予防するための治療ターゲットになり得ると考えられた。

## 第 2 章 新規角膜血管新生抑制因子の探索

背景：

ケラトサイトは角膜実質の主要な構成成分であり、アクチンフィラメントを含む細胞骨格 (*extensive intracellular cytoskelton*) を持った線維芽細胞様の細胞である。角膜に何らかの刺激が加わると、ケラトサイトは活性化され、細胞外マトリックス、コラーゲン消化酵素、実質細胞を修復するサイトカイン等を産生する筋線維芽細胞へと形質転換する<sup>43,44,52</sup>。これらの因子による作用が協調することで視力を失う原因となる角膜血管新生が引き起こされる。一方で、正常角膜におけるケラトサイトはほとんど *turn over* しない、*quiescent* な細胞であり、角膜の透明性維持に寄与している<sup>44</sup>。しかしながら、角膜の無血管性維持と新生血管形成に關与するケラトサイトの役割は未だ十分に解明されていない。

血管新生は、新生血管を形成する血管内皮細胞と周囲の微小環境に存在する細胞との細胞間相互作用を主体とする、複雑な生物学的過程である。近年、*in vitro* における生体内の血管新生の微小環境を模したモデルとして、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (*human umbilical vein endothelial cell; HUVEC*) とヒト皮膚線維芽細胞 (*human dermal fibroblast; HDF*) の共培養系が確立され、血管新生を制御する因子の探索に用いられている<sup>45</sup>。この実験系では、線維芽細胞から分泌される



細胞外基質が、新生血管のような管腔状の構造物を形成させる微小環境要因となっているものと考えられている<sup>46</sup>。

そこで、本来は無血管である角膜の血管新生における微小環境を再現した *in vitro* 共培養系として、HUVEC とヒト角膜ケラトサイト (human keratocyte; HKC) の共培養系を確立し、薬剤スクリーニングや内因性の新規血管新生制御因子の探索ツールとして利用することを試みた。さらに、HDF と HKC に発現する遺伝子群を比較することにより、恒常的に角膜の無血管性を維持するために重要な因子の探索を試みた。

## 2-1. in vitro 角膜血管新生モデルの構築

目的：

角膜血管新生における微小環境を再現した in vitro モデルを確立すること

方法：

### 細胞培養

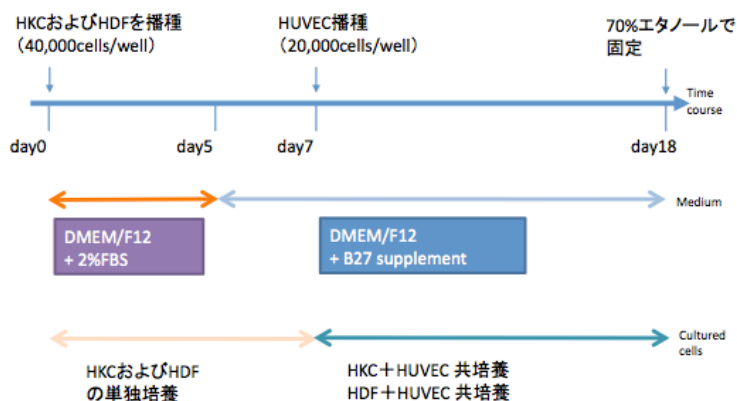
HDF と HUVEC は Lonza (Allendale) より購入した。HDF を培養皿に播種し、2%FBS 添加 DMEM/F12 培養液で培養した。細胞がコンフルエントになるまで 2 日おきに培養液を交換した。HKC はアメリカアイバンク (SightLife) から輸入した実験用角膜より既報に準じた方法で採取した<sup>47,48</sup>。角膜実質層の採取は、角膜上皮層をカミソリ刃で擦過除去し、デスメ膜と内皮は鑷子を用いてシート上に剥離した。中心部の角膜を 8.0mm の生検トレパン (カイインダストリーズ) で打ち抜き、0.02% collagenase (Sigma-Aldrich) を添加した基礎培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/ F12 medium (1:1) に B27 supplement (Invitrogen) を添加) でオーバーナイトインキュベーション (37°C) した。24 時間後、消化

された組織塊をピペティングして細胞にばらし、8000×G で 5 分間遠心分離した。回収された HKC は培養液で再懸濁し、培養皿に播種した。本研究では 2 継代目の細胞を使用した。

### 共培養系

HKC および HDF を 24 ウェルプレートに播種 (40,000cells/well) し、2% FBS を含む DMEM/F12 で 5 日間培養した。その後、B27 supplement 添加 DMEM/F12 に交換し、無血清条件下で 2 日間培養した。7 日目に、コンフルエントになった HKC および HDF に HUVEC を播種 (20,000cells/well) した。共培養開始後は B27 supplement 添加 DMEM/F12 を用いた無血清培養を 11 日間 (18 日目まで) 続けた (図 2-1-1)。

図 2-1-1.



また、血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factors ; VEGF) による影響を観察するため、10ng/well の human recombinant VEGF-A165 (R&D system) を 7 (共培養開始時点)、9、11、13、15 日目に添加した群の比較も行った。

一部の well の培養細胞は、7 日目に核染色 (DAPI) および WST-1 assay に使用した。

#### WST-1 assay

HKC および HDF の細胞増殖能力や細胞生存能力を発色測定により定量するために、生細胞中のミトコンドリア脱水素酵素によるテトラゾリウム塩 (WST-1) のホルマザン色素への変換を利用した WST-1 assay system (Takara Bio) を用いた。これは、ホルマザン色素と培養液中の代謝活性のある細胞の数とは直線的な相関を示すことを利用した解析法である。

HKC および HDF を培養開始後 7 日目に、WST-1 reagent 添加 DMEM/F12 培養液と培地交換し、37°C、1 時間のインキュベーションを行った。色素の吸光度はプレートリーダー (Victor 3V Multilable Counter model 1420: Perkin Elmer) を使用し、450nm で測定した。

## 免疫染色

形成された HUVEC の cord like structure は染色キット（クラボウバイオメディカル）を用い、血管内皮細胞のマーカーである CD31 をキットのマニュアルに従い染色した。以下に染色行程の概要を記す。

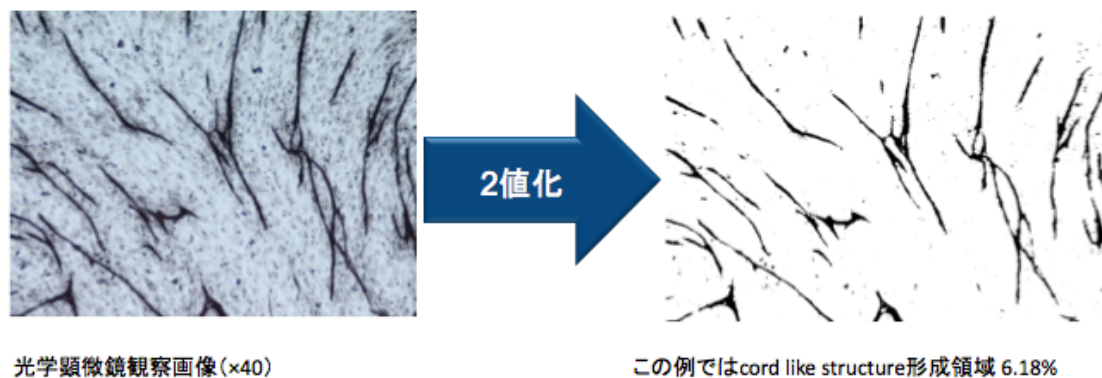
培養 18 日目（共培養開始後 11 日目）の細胞を氷冷した 70%エタノールを用いて固定した（室温、30 分間）後、ブロッキング液（1%BSA 入り PBS）にて洗浄し、ブロッキング液で希釈した抗ヒト CD31 モノクローナル抗体で 1 次染色した（37°C、60 分）。洗浄後、Goat anti-mouse IgG, Alkaline phosphatase Conjugate を用いて 2 次染色（37°C、60 分）を行った。アルカリフォスファターゼの発色には 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium（BCIP/NBT）を用い、約 5 分間反応させた。

## 脈管形成領域の定量方法

免疫染色された CD31 陽性の cord like structure を光学顕微鏡で観察し、各 well 当たり 3 視野（倍率; ×40）をデジタル画像として記録。ImageJ ソフトウェアを用いてデータを 2 値化し、1 視野当りの染色された部分の面積を定量した（図

2-1-2)。

図 2-1-2.



### 統計解析

Mann Whitney U test を解析に用い、 $P < 0.05$  を統計学的に有意とみなした。

結果：

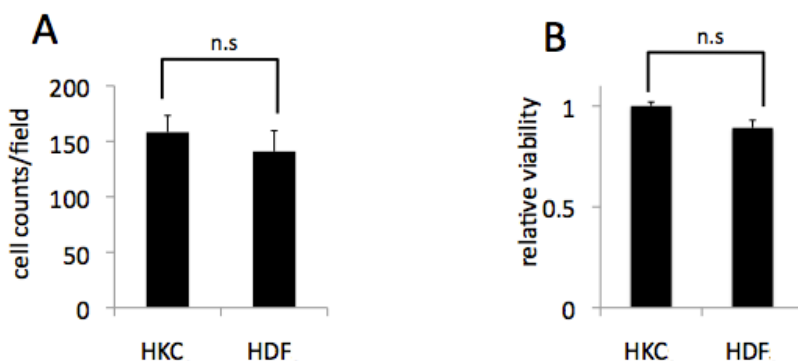
### 細胞数カウントおよび WST-1 assay

HUVEC との共培養を開始する直前、すなわち HKC および HDF の培養開始後 7 日目に、培養細胞数カウントと WST-1 assay を行った。

HKC および HDF の細胞数カウント結果の比較では両群間に有意な差はみられなかった (図 2-1-3. A)。

また、細胞増殖能力および細胞生存能力を WST-1 assay により検討したところ、HKC と HDF の間に有意な差はみられなかった (図 2-1-3. B)。

図 2-1-3.



7日間培養した HKC と HDF の一部を使用し、細胞数カウントと WST-1 assay を行った。

A: コンフルエントの HKC および HDF の細胞数カウントでは有意な差はみられなかった (n=6)。

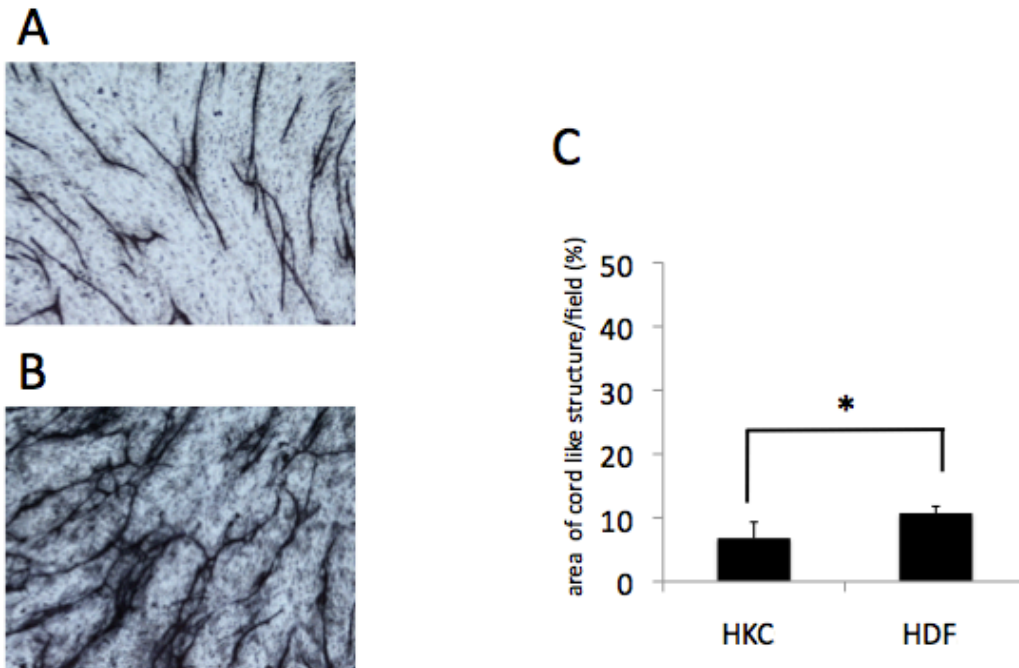
B: WST-1 assay によるこれらの細胞の生存率に有意な差はみられなかった (n=8)

#### cord like structure 形成領域の定量

HKC および HDF と HUVEC の共培養により形成された cord like structure の領域を定量した。

無血清培地を用いて共培養を行った結果を図 2-1-4 に示した。HKC+HUVEC 6.81 ± 1.07%、HDF+HUVEC 10.37 ± 2.52 %であり、両群間に有意な差がみられた (P < 0.0001、図 2-1-4.)

図 2-1-4.

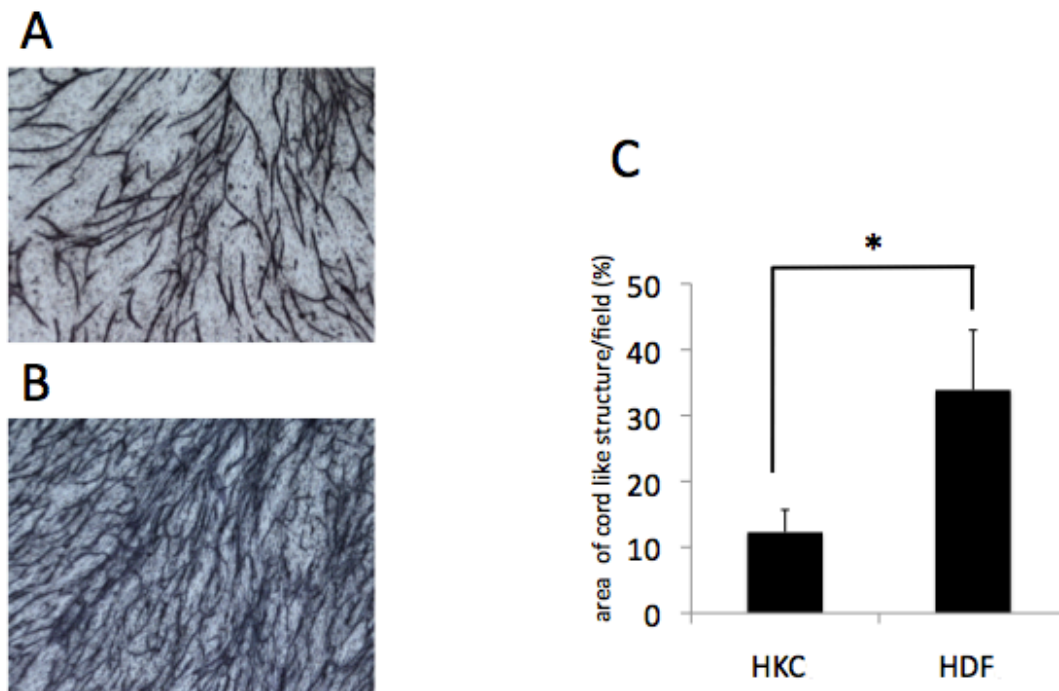


無血清培地を用いた共培養における cord like structure 形成領域は、HKC + HUVEC (A)  $6.81 \pm 1.07\%$ 、HDF + HUVEC (B)  $10.37 \pm 2.52\%$  であり、両群間に有意な差がみられた ( $n=12$ ,  $*p < 0.0001$ ) (C)。

また、無血清培地に VEGF (10ng/well) を加えた培養液を用いた実験では、HKC + HUVEC  $12.28 \pm 3.41\%$ 、HDF + HUVEC  $33.87 \pm 9.10\%$  であり、両群間に有意な差がみられた ( $P < 0.0001$ 、図 2-1-5.)。したがって、VEGF を添加した状況下においても、HKC + HUVEC 群の方が HDF + HUVEC 群より cord like structure 形成が有意に抑えられた結果となった。



図 2-1-5.



無血清培地に 10 ng/well の VEGF を添加した共培養における cord like structure 形成領域は、HKC + HUVEC (A)  $12.28 \pm 3.41$  %、HDF + HUVEC (B)  $33.87 \pm 9.10$  %であり、両群間に有意な差がみられた ( $n=12$ ,  $*p < 0.0001$ ) (C)。

## 2-2 HKC と HDF における遺伝子発現の比較

目的：

HKC および HDF における遺伝子発現プロファイルの差異について解析し、  
角膜の無血管性維持に寄与する血管新生制御因子候補を検討すること。

方法：

### 培養細胞および培養法

実験 2-1 と同様に HKC および HDF を播種し、5 日間の低血清培養  
(DMEM/F12+2%FBS) 後、2 日間無血清培養 (DMEM/F12+B27 supplement) を  
行い、細胞を回収した。

### total RNA 抽出

培養細胞を PBS(-)で洗浄した後、RNA 抽出用フェノール試薬 (ISOGEN、ニ  
ッポンジーン) 1ml で細胞を溶解し回収した。ISOGEN の RNA 抽出マニュアル  
に従い total RNA を抽出し、超微量分光光度計 (NanoDrop 2000、Thermo scientific)  
で RNA の濃度および純度を測定した後、DNA マイクロアレイ (Agilent Array 発

現解析、タカラバイオ)を行った。

結果：

HDF に対して HKC に Fold change 7 以上高発現している遺伝子が 21 種類(表 2-2-1) あった。これらの分子の中で、Fold change が 12.34 (約 5000 倍) と非常に高かった Angiopoietin like protein 7 (Angptl7) に着目し、今後の解析を進めることにした。

表2-2-1.

Official Full Name	Gene Symbol	Fold change	Location	Unigene ID
aldo-keto reductase family 1, member B10	AKR1B10	13.38	hs 7q33	Hs.116724
gastrin-releasing peptide	GRP	12.78	hs 18q21.32	Hs.153444
angiotensin-like 7	ANGPTL7	12.34	hs 1p36.22	Hs.146559
aldo-keto reductase family 1, member B15	AKR1B15	12.22	hs 7q33	Hs.116724
prolactin-induced protein	PIP	10.06	hs 7q34	Hs.99949
cancer/testis antigen 1A (CTAG1A)	CTAG1A	9.77	hs Xq28	Hs.534310
carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 6	CHST6	9.46	hs 16q23.1	Hs.655622
transmembrane 4 L six family member 1 (TM4SF1)	TM4SF1	9.40	hs 3q25.1	Hs.351316
secretogranin II	SCG2	9.36	hs 2q36.1	Hs.516726
cytokine-like 1	CYTL1	9.34	hs 4p16.2	Hs.13872
ATPase, aminophospholipid transporter (APLT), class I, type 8A, member 1	ATP8A1	9.08	hs 4p13	Hs.435052
solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4	SLC4A4	9.01	hs 4q13.3	Hs.5462
transmembrane protein 155 (TMEM155)	TMEM155	8.53	hs 4q27	Hs.27524
Glutathione S-transferase theta 1	GSTT1	8.30	hs 22q11.23	Hs.268573
sushi domain containing 2	SUSD2	8.01	hs 22q11.23	Hs.131819
aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	ALDH3A1	7.78	hs 17p11.2	Hs.531682
nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	NR0B1	7.78	hs Xp21.2	Hs.268490
transcription factor AP-2 beta (activating enhancer binding protein 2 beta)	TFAP2B	7.67	hs 6p12.3	Hs.33102
hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1	HSD11B1	7.51	hs 1q32.2	Hs.195040
sclerostin	SOST	7.07	hs 17q21.31	Hs.349204

HDFに対してHKCにFold change 7以上高発現している遺伝子が21種類あった。

## 2-3 HKC における Angptl7 の発現確認

目的：

HKC における Angptl7 の発現を遺伝子レベル（定量 PCR）、タンパクレベル（ウエスタンブロット）で確認すること

方法：

### Real Time RT-PCR

実験 2-2 で抽出した totalRNA の一部を用い、PrimeScript<sup>®</sup> RT Master Mix（タカラバイオ）を用いて逆転写反応を行い、cDNA を調整した。SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus)（タカラバイオ）を用いた、インターカレータ法による定量 PCR を TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice<sup>®</sup>（タカラバイオ）（設定値：40 サイクル、95°C 5 秒、60°C 30 秒）で行った。ターゲット遺伝子の発現量は Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (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。

human Angptl7: forward, 5'- CGGCTGCGTGTAGAGATGGA -3',

reverse, 5'- CCTTGGTGCTGAAGGCTGTGT -3';

human GAPDH: forward, 5'- TTGATTTTGGAGGGATCTCG -3',

reverse, 5'- GAGTCAACGGATTTGGTCGT -3'.

### ウエスタンブロット

ウエスタンブロット解析を HKC および HDF に発現する Angptl7 タンパクを評価するために行った。

実験 2-2 と同様に培養した HKC および HDF に SDS サンプルバッファーを加えて回収し、定量したタンパク質サンプルを 50 $\mu$ g ずつ、12% acrylamide gel (Bio-Rad) にアプライして電気泳動を行った (200V、25 分)。電気泳動後のゲルから poly- vinylidene difluoride membrane (Bio-Rad) にタンパクを転写した (100V、60 分)。ブロッキングは 5% スキムミルク溶液中で室温、60 分間震盪により行い、100 倍希釈したウサギ抗 Angptl7 抗体 (abcam)、200 倍希釈したウサギ抗 GAPDH 抗体 (abcam) (内在性コントロール) で 1 次染色した (4°C、オーバーナイト)。洗浄後、4000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤ

ギ抗ウサギ抗体溶液 (santa cruz) にメンブレンを移し、60 分震盪した。発色には BCIP/NBT (Bio-Rad) を用いた。

バンド検出には CCD カメラシステム ImageQuant LAS 4000mini (富士フィルム) を用いた。

結果：

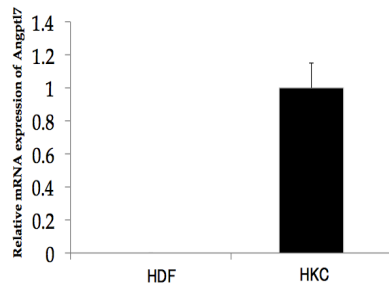
#### HKC および HDF における Angptl7 発現

定量 PCR の結果、Angptl7 は HKC には発現が確認され、HDF には発現がみられなかった (図 2-3-1. A)。

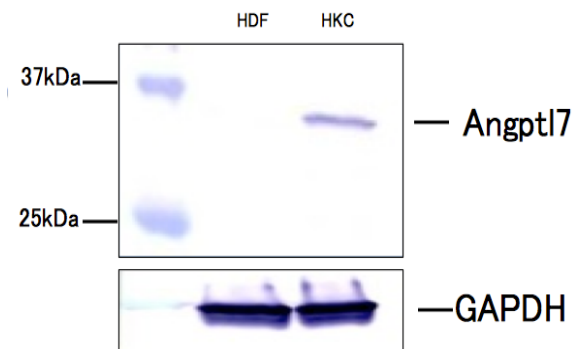
ウエスタンブロットにおいても HKC からのみ Angptl7 のタンパクが検出された (図 2-3-1. B)。

図2-3-1.

A



B



A : 定量PCRではHKCでのみ発現が確認された (n=3)。

B : ウェスタンブロットの結果、HKC での発現が確認された。



## 2-4 in vitro 角膜血管新生モデルを用いた Angptl7 血管新生制御作用の検討

目的：

Angptl7 の角膜血管新生に及ぼす影響を検討するため、Angptl7 siRNA および human recombinant Angptl7 (rhAngptl7) を用いた際の、HKC+HUVEC 共培養系に与える影響を検討すること。

方法：

### HKC の培養方法および siRNA 導入法

実験 2-1 と同様に HKC を 24well プレートに播種 (40,000cells/well) し、3 日間の低血清培養 (DMEM/F12+2%FBS) 後、Lipofectamin RNAiMAX (Invitrogen) と混合した Angptl7 siRNA を 50nM の濃度になるよう HKC の培養液に添加した。48 時間後に培地を B27supplement 添加 DMEM/F12 に交換し、導入後 48 時間、96 時間に RNA を抽出するために細胞を回収した。

## Real Time RT-PCR

siRNA 導入後 48 時間、96 時間の HKC における Angptl7 遺伝子発現量の変化を確認するため、定量 PCR を行った。実験 2-2 に準じた方法で ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて細胞を回収し、RNA を抽出した。定量 PCR は実験 2-3 と同様に行った。

## HKC+HUVEC 共培養系を用いた実験

導入用試薬のみ添加 (normal 群)、ランダム配列の siRNA 導入 (control siRNA 群)、Angptl7 siRNA 導入 (Angptl7 siRNA 群) した後、96 時間経過後の HKC に HUVEC (20,000cells/well) を播種し共培養を 6 日間おこなった。Angptl7 siRNA を導入した well の半数には HUVEC 播種時、共培養 2 日目、4 日目に 500ng/ml の rhAngptl7 を添加した (A7 siRNA + Angptl7 群)。

## 免疫染色および cord like structure 形成領域の定量方法

共培養により形成された HUVEC の cord like structure は染色キット (クラボウバイオメディカル) を用い、血管内皮細胞のマーカーである CD31 をキット

のマニュアルに従い、実験 2-1 と同様に染色した。

免疫染色された CD31 陽性の脈管様構造物を光学顕微鏡で観察し、各 well 当たり 3 視野（倍率; ×40）をデジタル画像として記録。ImageJ ソフトウェアを用いてデータを 2 値化し、1 視野当りの染色された部分の面積を定量した（図 2-1-2 参照）。

#### 統計解析

Steel-Dwass 検定を解析に用い、 $P < 0.05$  を統計学的に有意とみなした。

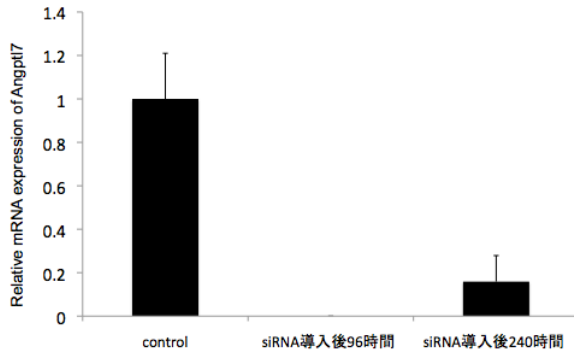
結果：

#### siRNA 導入による Angptl7 遺伝子のノックダウン効率確認

HKC への Angptl7 siRNA を導入後、定量 PCR でノックダウン効率を確認した。

導入後 96 時間後のサンプルでは Angptl7 mRNA 発現レベルは 99%以上ノックダウンされ、240 時間後のサンプルにおいても約 80%ノックダウンの状態が維持された（図 2-4-1）。

図2-4-1.



Angptl7 siRNA導入後の定量PCRによる遺伝子レベルでのノックダウン効率確認。

導入後 96 時間では完全ノックダウン、240 時間では約 80%ノックダウンであった (各 n=3)。

#### Angptl7 siRNA および rhAngptl7 を用いた共培養系での脈管形成

それぞれの条件における cord like structure 形成領域は、正常 HKC 群

$0.13 \pm 0.15\%$ 、control siRNA 導入群  $0.31 \pm 0.09\%$ 、Angptl7 siRNA 導入群  $1.41 \pm 0.54\%$ 、

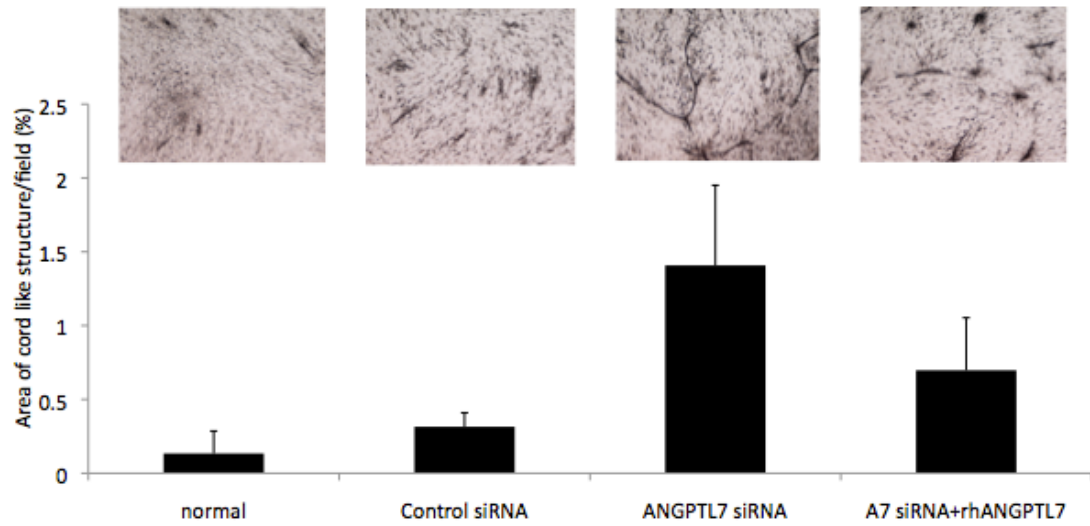
Angptl7 siRNA 導入+rhAngptl7 添加群  $0.69 \pm 0.3\%$ であった。Angptl7 siRNA 導入

群では、control siRNA 導入群と比べて有意に cord like structure 形成領域の拡大

がみられた ( $P < 0.001$ )。さらに Angptl7 siRNA 導入+rhAngptl7 添加群では cord

like structure 形成領域は縮小した ( $P < 0.01$ ) (図 2-4-2)。

図2-4-2



Angptl7 siRNA 導入群では、control siRNA 導入群と比べて有意に cord like structure 形成領域の拡大がみられた ( $P < 0.001$ )。さらに Angptl7 siRNA 導入 +rhAngptl7 添加群では cord like structure 形成領域は縮小した ( $P < 0.01$ ) (各  $n=12$ )。

## 2-5 in vivo における Angpt17 の血管・リンパ管新生制御作用の検討

目的：

マウス炎症性角膜血管・リンパ管新生モデルを用いて、生体内での角膜新生血管、新生リンパ管形成における Angpt17 の役割を検討すること

方法：

### 動物

C57BL/6（8週齢オス）を埼玉実験動物供給所より購入し用いた。全ての動物は東京大学動物実験実施規則ならびに ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research に従い取り扱った。

### 麻酔方法

ケタミン 35mg/kg、キシラジン 5mg/kg の投与量になるよう生理食塩水で希釈し、27G 針を用いて大腿部筋肉内に投与した。

## siRNA 導入法および新生血管・リンパ管誘導法

1.0 $\mu$ g (0.1mg/ml の溶液を 10 $\mu$ l) の Angptl7 siRNA (esiRNA, Sigma) または control siRNA (esiRNA, Sigma) を結膜下注射した。角膜新生血管・リンパ管の誘導は、siRNA 結膜下注射後 24 時間の時点で、角膜輪部血管から 1mm の位置に 10-0Nylon 糸で角膜実質に通糸縫合を行った。通糸縫合後 7 日目に摘出した眼球を用いて解析した。

## Real Time RT-PCR

Angptl7 mRNA 量のノックダウン効率を確認する目的で、導入処置後 48 時間に眼球摘出を行った。採取した角膜片を RNA 抽出用フェノール試薬 (ISOGEN、ニッポンジーン) に浸漬し、組織破砕機 (BeadSmash、ワケンビーテック) を用いてホモジナイズした。以降、ISOGEN の RNA 抽出マニュアルに従い total RNA を抽出した。PrimeScript<sup>®</sup> RT Master Mix (タカラバイオ) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を調整した。SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ) を用いた、インターカレータ法による定量 PCR を TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> (タカラバイオ) (設定値 : 40 サイクル、95°C 5 秒、60°C

30 秒 ) で行った。ターゲット遺伝子の発現量は 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。

mice Angptl7: forward, 5'- AATGAACATATCCACCGGCTCAC -3',

reverse, 5'- AGTTCATTGCCCAACGCAAAG -3';

mice GAPDH: forward, 5'-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3',

reverse, 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'.

#### 新生血管およびリンパ管の定量

術後 7 日目に眼球を摘出し、強角膜片を作成。放射状切開を加えて展開標本とした。新生血管、新生リンパ管の検出は血管内皮細胞マーカーである CD31 およびリンパ管内皮マーカーである LYVE-1 を免疫染色した。染色された領域を画像解析ソフト ImageJ(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)で 2 値化し、1 視野当りの新生血管およびリンパ管領域の面積割合を定量した。

#### 統計解析

Mann Whitney U test を解析に用い、 $P < 0.05$  を統計学的に有意とみなした。



結果：

#### siRNA 導入による Angptl7 ノックダウン効率

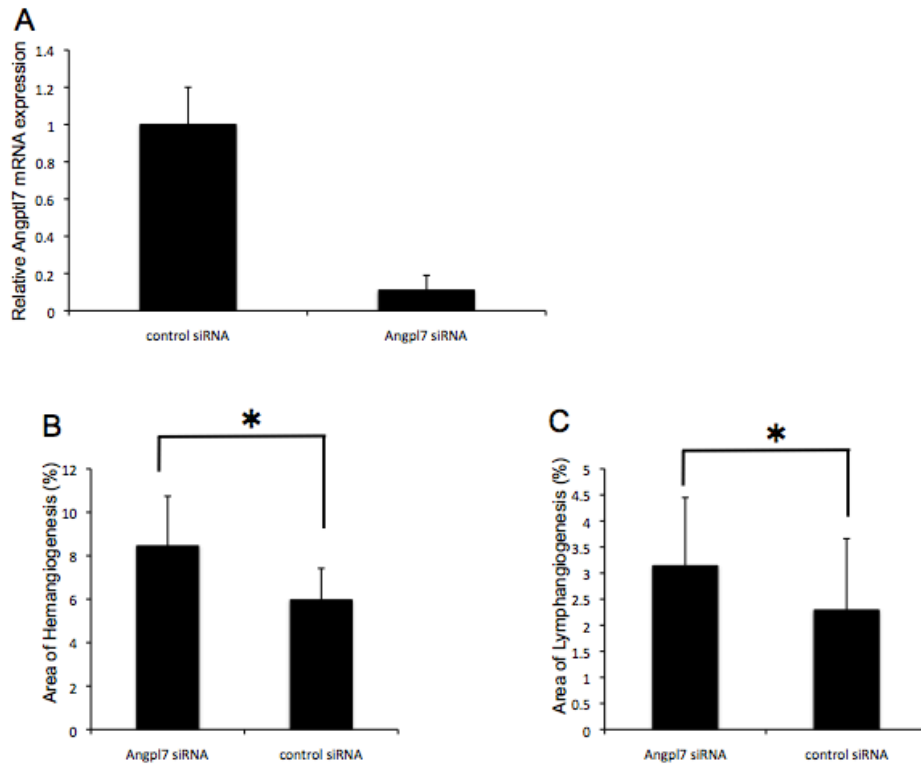
Angptl7 siRNA の結膜下投与により、角膜に発現する Angptl7 mRNA 量は、control siRNA 投与群と比較して約 90%低下した (n = 4) (図 2-5-1. A)。

#### Angptl7 siRNA 導入角膜における角膜新生血管および新生リンパ管の定量

Angptl7 siRNA を結膜下に事前投与した野生型マウス(C57BL/6)の炎症性血管・リンパ管新生モデルにおいて、角膜血管新生およびリンパ管新生への影響を検討した。

術後 7 日目の角膜血管新生領域は Angptl7 siRNA 群  $8.45 \pm 2.29\%$ 、control siRNA 群  $5.96 \pm 1.46\%$ 、リンパ管新生領域は Angptl7 siRNA 群  $3.14 \pm 1.31\%$ 、control siRNA 群  $2.29 \pm 1.37\%$  であり、ともに control siRNA 投与群と比べて Angptl7 siRNA 投与群で有意に亢進した ( $P < 0.05$ 、各 n = 13) (図 2-5-1. B, C)。

図2-5-1.



A: 結膜下投与による Angptl7 siRNA 導入 48 時間後の Angptl7 mRNA 発現量は、control siRNA 群と比較して約 90%低下していた (n=4)。

B: control siRNA 投与群と比べて、Angptl7 siRNA 投与群において、血管新生領域は有意に亢進した (\*P < 0.01、n=13)。

C: リンパ管新生領域も Angptl7 siRNA 投与群で有意に亢進した (\*P < 0.05、n=13)。

考察：

本研究では HKC+HUVEC、HDF+HUVEC の共培養を無血清培養で行い、HKC+HUVEC の群で有意に cord like structure 形成が少ない結果であった。さらに、この傾向は VEGF の存在下でも変わらなかった。これらの結果から、HKC が HUVEC に抗血管新生作用を及ぼす環境を提供している事が示唆された。そこで、HKC と HDF に発現する遺伝子の差異からケラトサイトに高発現する血管新生制御因子の同定を試み、DNA マイクロアレイ解析の結果から角膜にのみ高発現していた Angptl7 に着目し、in vitro および in vivo の実験から、血管新生およびリンパ管新生の抑制作用を有することが示唆された。

今回確立した共培養系の特徴は、無血清培養条件下で HUVEC の cord like structure 形成を観察できることである。HUVEC の単独培養の場合、今回使用した無血清培地（B27 supplement 添加 DMEM/F12）では、細胞を維持する事は不可能である。今回の実験系では、HKC および HDF の 5 日間の低血清培養

（2%FBS）で増殖させた際に、筋線維芽細胞への形質転換<sup>43,44</sup>が起こったと考えられ、無血清培地での培養に切り替えたのちも細胞外マトリックス、コラーゲン消化酵素、実質細胞を修復するサイトカイン等ケラトサイトは活性化され、

細胞外マトリックス、コラーゲン消化酵素、実質細胞を修復するサイトカイン等が産生されているために、HUVEC の cord like structure 形成を生じさせる環境を提供できたと考えられる。

皮膚線維芽細胞と HUVEC の共培養には通常ウシ血清が用いられている<sup>45</sup>。

ウシ血清は様々な成長因子やホルモンを含んでおり、製造ロットの違いによる影響がしばしば問題となる。また、血清には cord like structure 形成制御に関与する未知の物質も多数含まれていると考えられ、特定のターゲット因子の効果を純粋に観察する事はできない。従って、無血清共培養系は血管新生制御因子の薬剤スクリーニングを行う際に最適な実験系であると考えられる。

無血管組織である正常角膜には、角膜の細胞中に複数の抗血管新生因子が発現していると考えられている。今回の結果から、HKC は HDF に比べて血管新生に対する ①促進因子の発現が少ない、②抑制因子の発現が多い のどちらか、もしくは両方により血管新生が起こりにくい環境を提供していることが明らかになった。角膜実質のケラトサイトに発現する血管新生制御因子は、未だ十分に解明されていないものの幾つかの報告はある<sup>26,49-52</sup>。例えば、血管新生抑制因子として良く知られている thrombospondin はケラトサイトに発現しているが、

培養ケラトサイトに1型単純ヘルペスを感染させる事により発現が減少することが報告されている<sup>52</sup>。また、Azarらは、*in vitro*の実験において、ケラトサイトが産生するMT1-MMP (membrane-type1 matrix metalloproteinase) に抗血管新生作用があることを報告している<sup>2,49</sup>。我々の結果も合わせて考えると、ケラトサイトは角膜血管新生を抑制する役割を担っていることが示唆される。したがって、今回確立したケラトサイトを用いた実験系を使うことで、角膜血管新生の制御に特異的な因子が検出される事が期待される。

Angptl7はcornea-derived transcript 6として角膜実質から同定された遺伝子であり<sup>5-7,53</sup>、後にアンジオポエチン類似の特徴的な構造からAngptl familyに分類された。アンジオポエチンの受容体であるTie1やTie2には結合せず、その特異的受容体は同定されていないオーファンリガンドである。全身臓器の中で角膜以外ではほとんど発現を認めず、角膜特異的に存在することが報告されている<sup>8,10,12,14,16,53</sup>。Peekらは、Angptl7は無血管である角膜実質に高発現している一方で、ゼノグラフトマウスモデルにおいて血管豊富な増殖中の腫瘍組織にも発現しており、多量の細胞外マトリックスの沈着を通じた抗腫瘍効果はみられるものの、抗腫瘍血管新生効果は明らかではないことを報告している<sup>17,54</sup>。ま

た、Bouis らは、Angptl7 の血管新生制御作用を確認する目的で、ヒトおよびマウスのメラノーマの cell line を用いて、Angptl7 を強制発現させたところ、VEGF の発現に変化はなく、抗血管新生作用のある Endostatin の発現がヒト細胞では有意に上昇し、マウスでは有意に減少するという結果を報告している<sup>20-22,55</sup>。すなわち、現時点で他施設からの報告では、Angptl7 の抗血管新生作用は controversial である。しかし、今回行った我々の解析では、Angptl7 は角膜においては抗血管新生作用を示しており、本分子の作用発現には角膜という環境が必要であり、角膜に特異的受容体が発現している可能性も考えられる。

Rozsa らは、ヒト培養線維柱帯細胞に TGF- $\beta$  やデキサメサゾンを作用させることにより、Angptl7 の発現が上昇し I 型コラーゲン等の細胞外基質の産生が亢進することを報告している<sup>23,56</sup>。現在、臨床では角膜移植術後などにステロイド剤の点眼を用いて炎症や拒絶反応を抑制する治療が広く行われている<sup>16,17</sup>が、ステロイド剤点眼により Angptl7 の発現が亢進している可能性があり、今回の結果と併せて考えると、角膜移植術後の血管新生やリンパ管新生を抑制する一助となっていることが考えられる。

今回の検討では Angptl7 が直接血管内皮細胞に作用するのか、間接的に関与

するのは明らかになっていないが、ケラトサイトの培養上澄を血管内皮細胞の評価系に用いることで、内皮細胞へ直接液性因子として作用するか否かを明らかにできる可能性が考えられ、今後の検討課題である。

今回、Angptl7 の血管・リンパ管新生に及ぼす影響について、*in vitro* 共培養血管新生モデルおよびマウス炎症性角膜血管・リンパ管新生モデルを用いた、新生脈管の定量解析により検討した。血管・リンパ管新生の複雑な分子メカニズムにおいて、Angptl7 がどのように関与しているのかを解明することが今後の課題であり、この分子メカニズムが明らかになることで、未だ見つかっていない特異的受容体同定の手がかりになる可能性も考えられる。

本研究により、角膜に特異的に発現する Angptl7 が血管・リンパ管新生を抑制することが示唆された。したがって、Angptl7 が角膜の特徴である透明性を維持するための、無血管・無リンパ管維持機構を担う重要な因子である可能性があると考えられた。

## まとめ



本研究では角膜の透明性を脅かし、視機能低下を引き起こす重篤な病的イベントである、角膜血管・リンパ管新生に関する因子の検討を行った。

第1章では、局所性炎症を基盤とした様々な疾患の病態の発症・進展への関与が報告されている<sup>3,9,11,13,15</sup> Angptl2 の角膜血管・リンパ管新生に対する影響について検討した。Angptl2 は、局所での炎症性サイトカインの発現亢進やマクロファージの浸潤増加を介し、角膜血管新生、リンパ管新生ともに亢進させる作用のある因子であることが示唆された。

第2章では、従来から用いてきた、マウス炎症性角膜血管・リンパ管新生モデルに加え、今回新たに角膜実質の微小環境を反映した、角膜ケラトサイトとHUVEC とを共培養する *in vitro* 角膜血管新生モデルを構築した。*in vitro* 角膜血管新生モデルの研究過程において、角膜ケラトサイト (HKC) +HUVEC 群では皮膚線維芽細胞 (HDF) +HUVEC 群と比較して有意に HUVEC の脈管形成作用が小さかったことから、HKC と HDF に発現する遺伝子の差異を DNA マイクロアレイで検討した。HKC にのみ高発現していた遺伝子のうち、血管新生抑制因子として Angptl7 に着目し、*in vitro* および *in vivo* モデルで血管新生およびリンパ管新生に及ぼす影響を検討した。Angptl7 は角膜血管新生、リンパ管

新生ともに抑制する効果を有することが示唆された。

今回検討した角膜血管・リンパ管新生制御因子である Angptl2 および Angptl7 は、偶然にも共に Angiopoietin に類似した特徴的な構造を有する Angptl ファミリーに分類されているが、独立した異なるタンパク質である (図 1-1)。Angptl ファミリーの幾つかは血管新生に関与することが報告されてきたが、本研究により初めて従来無血管組織である角膜の血管新生およびリンパ管新生の制御への関与が検討され、Angptl2 は促進作用、Angptl7 は抑制作用を有することが示唆された。よって Angptl2 を制御する治療法や Angptl7 を活性化する治療法の開発によって、今後角膜の透明性を維持する新たな治療への道が拓けると考えられる。そのためには、これらの因子が作用する分子メカニズムをさらに調べる必要があり、今後の課題と考えられる。

参考文献：

1. Kim I, Moon SO, Koh KN, et al. Molecular cloning, expression, and characterization of angiopoietin-related protein. angiopoietin-related protein induces endothelial cell sprouting. *J Biol Chem*. 1999;274(37):26523–26528.
2. Bachmann B, Taylor RS, Cursiefen C. Corneal neovascularization as a risk factor for graft failure and rejection after keratoplasty: an evidence-based meta-analysis. *Ophthalmology*. 2010;117(7):1300–5.e7. doi:10.1016/j.ophtha.2010.01.039.
3. Oike Y, Yasunaga K, Suda T. Angiopoietin-related/angiopoietin-like proteins regulate angiogenesis. *Int J Hematol*. 2004;80(1):21–28.
4. Quagliarini F, Wang Y, Kozlitina J, et al. Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(48):19751–19756. doi:10.1073/pnas.1217552109.
5. Collin HB. Endothelial cell lined lymphatics in the vascularized rabbit cornea. *Invest Ophthalmol*. 1966;5(4):337–354.
6. Mimura T, Amano S, Usui T, Kaji Y, Oshika T, Ishii Y. Expression of vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in corneal lymphangiogenesis. *Experimental Eye Research*. 2001;72(1):71–78. doi:10.1006/exer.2000.0925.
7. Cursiefen C, Chen L, Dana MR, Streilein JW. Corneal lymphangiogenesis: evidence, mechanisms, and implications for corneal transplant immunology. *Cornea*. 2003;22(3):273–281.
8. Cursiefen C. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest*. 2004;113(7):1040–1050. doi:10.1172/JCI200420465.
9. Zhang CC, Kaba M, Ge G, et al. Angiopoietin-like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Nat Med*. 2006;12(2):240–245. doi:10.1038/nm1342.

10. Maruyama K, Ii M, Cursiefen C, et al. Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages. *J Clin Invest*. 2005;115(9):2363–2372. doi:10.1172/JCI23874.
11. Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, et al. Angiopoietin-like Protein 2 Promotes Chronic Adipose Tissue Inflammation and Obesity-Related Systemic Insulin Resistance. *Cell Metabolism*. 2009;10(3):178–188. doi:10.1016/j.cmet.2009.08.003.
12. Albuquerque RJC, Hayashi T, Cho WG, et al. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat Med*. 2009;15(9):1023–1030. doi:10.1038/nm.2018.
13. Mitsuhsa Tabata  
TKSFKMYIMETUHJZHTHTKKKMTIMSKSTINNTYHKMKYAHONMHITS  
AYO. Supplemental data Angiopoietin-like Protein 2 Promotes Chronic Adipose Tissue Inflammation and Obesity-Related Systemic Insulin Resistance. 2009:1–32.
14. Nakao S, Zandi S, Hata Y, et al. Blood vessel endothelial VEGFR-2 delays lymphangiogenesis: an endogenous trapping mechanism links lymph- and angiogenesis. *Blood*. 2011;117(3):1081–1090. doi:10.1182/blood-2010-02-267427.
15. Aoi J, Endo M, Kadomatsu T, et al. Angiopoietin-like protein 2 is an important facilitator of inflammatory carcinogenesis and metastasis. *Cancer Res*. 2011;71(24):7502–7512. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1758.
16. Bock F, Maruyama K, Regenfuß B, et al. Novel anti(lymph)angiogenic treatment strategies for corneal and ocular surface diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2013;34:89–124. doi:10.1016/j.preteyeres.2013.01.001.

17. Hos D, Saban DR, Bock F, et al. Suppression of inflammatory corneal lymphangiogenesis by application of topical corticosteroids. *Arch Ophthalmol*. 2011;129(4):445–452. doi:10.1001/archophthalmol.2011.42.
18. Okada T, Tsukano H, Endo M, et al. Synoviocyte-derived angiopoietin-like protein 2 contributes to synovial chronic inflammation in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol*. 2010;176(5):2309–2319. doi:10.2353/ajpath.2010.090865.
19. Kanda A, Noda K, Oike Y, Ishida S. Angiopoietin-like protein 2 mediates endotoxin-induced acute inflammation in the eye. *Laboratory Investigation*. 2012;92(11):1553–1563. doi:10.1038/labinvest.2012.111.
20. Bock F, Onderka J, Dietrich T, et al. Bevacizumab as a Potent Inhibitor of Inflammatory Corneal Angiogenesis and Lymphangiogenesis. 2007.
21. Bucher F, Parthasarathy A, Bergua A, et al. Topical Ranibizumab inhibits inflammatory corneal hem- and lymphangiogenesis. *Acta Ophthalmologica*. 2012;no–no. doi:10.1111/j.1755-3768.2012.02525.x.
22. Sener E, Yuksel N, Yildiz DK, et al. The Impact of Subconjunctivally Injected EGF and VEGF Inhibitors on Experimental Corneal Neovascularization in Rat Model. *Curr Eye Res*. 2011;36(11):1005–1013. doi:10.3109/02713683.2011.601840.
23. Cunningham MA, Edelman JL, Kaushal S. Intravitreal Steroids for Macular Edema: The Past, the Present, and the Future. *Survey of Ophthalmology*. 2008;53(2):139–149. doi:10.1016/j.survophthal.2007.12.005.
24. Amano S, Rohan R, Kuroki M, Tolentino M, Adamis AP. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularization. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1998;39(1):18–22.

25. Yamagami S, Dana MR, Tsuru T. Draining Lymph Nodes Play an Essential Role in Alloimmunity Generated in Response to High-Risk Corneal Transplantation. *Cornea*. 2002;21(4):405.
26. Ellenberg D, Azar DT, Hallak JA, et al. Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. *Prog Retin Eye Res*. 2010;29(3):208–248. doi:10.1016/j.preteyeres.2010.01.002.
27. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(3):165–177. doi:10.1038/nrm2639.
28. Usui T, Yamagami S, Kishimoto S, Seiich Y, Nakayama T, Amano S. Role of macrophage migration inhibitory factor in corneal neovascularization. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2007;48(8):3545–3550. doi:10.1167/iovs.06-0695.
29. Kataru RP, Jung K, Jang C, et al. Critical role of CD11b+ macrophages and VEGF in inflammatory lymphangiogenesis, antigen clearance, and inflammation resolution. *Blood*. 2009;113(22):5650–5659. doi:10.1182/blood-2008-09-176776.
30. Tang X-L, Sun J-F, Wang X-Y, Du L-L, Liu P. Blocking neuropilin-2 enhances corneal allograft survival by selectively inhibiting lymphangiogenesis on vascularized beds. *Mol Vis*. 2010;16:2354–2361.
31. Zhang H, Hu X, Tse J, Tilahun F, Qiu M, Chen L. Spontaneous Lymphatic Vessel Formation and Regression in the Murine Cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011;52(1):334–338. doi:10.1167/iovs.10-5404.
32. Van der Veen G, Broersma L, Dijkstra CD, Van Rooijen N, Van Rij G, Van der Gaag R. Prevention of corneal allograft rejection in rats treated with subconjunctival injections of liposomes containing dichloromethylene diphosphonate. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1994;35(9):3505–3515.

33. Van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods*. 1994;174(1-2):83–93.
34. Friedl P, Weigelin B. Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat Immunol*. 2008;9(9):960–969. doi:10.1038/ni.f.212.
35. Rose DM, Alon R, Ginsberg MH. Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunol Rev*. 2007;218:126–134. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00536.x.
36. Klein S, de Fougères AR, Blaikie P, et al. Alpha 5 beta 1 integrin activates an NF-kappa B-dependent program of gene expression important for angiogenesis and inflammation. *Mol Cell Biol*. 2002;22(16):5912–5922.
37. Muether PS, Dell S, Kociok N, et al. The role of integrin alpha5beta1 in the regulation of corneal neovascularization. *Experimental Eye Research*. 2007;85(3):356–365. doi:10.1016/j.exer.2007.06.004.
38. Dietrich T, Onderka J, Bock F, et al. Inhibition of inflammatory lymphangiogenesis by integrin alpha5 blockade. *Am J Pathol*. 2007;171(1):361–372.
39. Dietrich T, Bock F, Yuen D, et al. Cutting Edge: Lymphatic Vessels, Not Blood Vessels, Primarily Mediate Immune Rejections After Transplantation. 2010.
40. Okazaki H, Hirakawa S, Shudou M, et al. Targeted overexpression of Angptl6/angiopoietin-related growth factor in the skin promotes angiogenesis and lymphatic vessel enlargement in response to ultraviolet B. *J Dermatol*. 2012;39(4):366–374. doi:10.1111/j.1346-8138.2011.01396.x.
41. Liesegang TJ. Physiologic changes of the cornea with contact lens wear. *CLAO J*. 2002;28(1):12–27.
42. Shi H, Yu HJ, Wang HY, et al. Topical administration of peroxiredoxin-6 on the cornea suppresses inflammation and neovascularization induced by ultraviolet

- radiation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2012;53(13):8016–8028. doi:10.1167/iovs.12-10064.
43. Funderburgh JL, Mann MM, Funderburgh ML. Keratocyte phenotype mediates proteoglycan structure: a role for fibroblasts in corneal fibrosis. *J Biol Chem*. 2003;278(46):45629–45637. doi:10.1074/jbc.M303292200.
  44. Kawakita T, Espana EM, He H, et al. Preservation and expansion of the primate keratocyte phenotype by downregulating TGF-beta signaling in a low-calcium, serum-free medium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2006;47(5):1918–1927. doi:10.1167/iovs.05-1040.
  45. Bishop ET, Bell GT, Bloor S, Broom IJ, Hendry NF, Wheatley DN. An in vitro model of angiogenesis: basic features. *Angiogenesis*. 1999;3(4):335–344.
  46. Hetheridge C, Mavria G, Mellor H. Uses of the in vitro endothelial-fibroblast organotypic co-culture assay in angiogenesis research. *Biochem Soc Trans*. 2011;39(6):1597–1600. doi:10.1042/BST20110738.
  47. Sakai R, Kinouchi T, Kawamoto S, et al. Construction of human corneal endothelial cDNA library and identification of novel active genes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2002;43(6):1749–1756.
  48. Yamagami S, Yokoo S, Mimura T, Takato T, Araie M, Amano S. Distribution of precursors in human corneal stromal cells and endothelial cells. *Ophthalmology*. 2007;114(3):433–439. doi:10.1016/j.ophtha.2006.07.042.
  49. Azar DT, Casanova FH, Mimura T, Jain S, Chang J-H. Effect of MT1-MMP deficiency and overexpression in corneal keratocytes on vascular endothelial cell migration and proliferation. *Curr Eye Res*. 2008;33(11):954–962. doi:10.1080/02713680802461106.
  50. Mimura T, Han KY, Onguchi T, et al. MT1-MMP-mediated cleavage of decorin in corneal angiogenesis. *J Vasc Res*. 2009;46(6):541–550. doi:10.1159/000226222.



51. Mimura T, Chang J-H, Kim T-I, et al. MT1-MMP cleavage of the antiangiogenic proteoglycan decorin: role in corneal angiogenesis. *Cornea*. 2011;30 Suppl 1:S45–9. doi:10.1097/ICO.0b013e31822816e0.
52. Choudhary A, Hiscott P, Hart CA, Kaye SB, Batterbury M, Grierson I. Suppression of thrombospondin 1 and 2 production by herpes simplex virus 1 infection in cultured keratocytes. *Mol Vis*. 2005;11:163–168.
53. Peek R, van Gelderen BE, Bruinenberg M, Kijlstra A. Molecular cloning of a new angiopoietinlike factor from the human cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1998;39(10):1782–1788.
54. Peek R, Kammerer RA, Frank S, Otte-Höller I, Westphal JR. The angiopoietin-like factor cornea-derived transcript 6 is a putative morphogen for human cornea. *J Biol Chem*. 2002;277(1):686–693. doi:10.1074/jbc.M105746200.
55. Bouïs DRMH, Dam WA, Meijer C, Mulder NH, Hospers GAP. Effect of CDT6 on factors of angiogenic balance in tumour cell lines. *Anticancer Res*. 2007;27(4B):2325–2329.
56. Rozsa FW, Reed DM, Scott KM, et al. Gene expression profile of human trabecular meshwork cells in response to long-term dexamethasone exposure. *Mol Vis*. 2006;12:125–141.

## 謝辞

研究の機会を与えて下さり、4年間に渡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 天野史郎教授に心より感謝申し上げます。

実験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で行いました。本研究において、同眼科学 臼井智彦講師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熊本大学大学院生命科学研究部先端生命医療科学部門 成育再建・移植医学講座 分子遺伝学分野 尾池雄一教授、宮田敬士先生に深謝致します。

最後に、本研究に際して数々の御助言、御協力を頂きました、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 山上聡准教授、横尾誠一先生を始め、御指導頂きました皆様に厚く御礼申し上げます。