

ケモカイン受容体 CXCR3 と脈絡膜新生血管の 関連に関する実験的検討

藤村 茂人

目次

● 要旨	4
序文	6
1: 加齢黄斑変性 (AMD ; age-related macular degeneration) と脈絡膜新生血管 (CNV : choroidal neovascularization) に関わるケモカイン／ケモカイン受容体に関するこれまでの知見	7
2: 本論文の研究目的.....	13
研究方法	14
実験動物.....	15
レーザー光凝固による CNV の作成.....	16
DNA マイクロアレイ	16
Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR, CXCR3 とリガンド・ケモカインの発現確認)	17
組織免疫染色.....	19
レーザー誘発性 CNV の定量	20
抗 CXCR3/抗 CXCL10 中和抗体のマウス硝子体注射.....	22
Recombinant CXCL10 のマウス硝子体注射	23
マクロファージ遊走試験.....	23
Real-Time RT-PCR (野生型マウス vs CXCR3 欠損マウス)	24
統計学的手法.....	26
結果	27
DNA マイクロアレイ	28
表 1	29
RT-PCR での CXCR3 発現.....	31
図 1	32
組織免疫染色.....	33
図 2	34
CNV の比較 : 野生型マウス vs CXCR3 欠損マウス.....	36
CNV の比較 : 抗 CXCR3 中和抗体／抗 CXCL10 中和抗体投与実験	36
図 3	37
図 4	38
CNV の比較 : Recombinant CXCL10 投与実験.....	40
図 5	41
CNV 部位へのマクロファージ遊走試験.....	43
図 6	44

<i>Real-Time RT-PCR</i> による各種サイトカイン <i>messenger-RNA</i> 発現の比較.....	45
図 7	46
考察・結論.....	48
考察.....	49
結論.....	57
謝辞	58
引用文献	59

● 要旨

論文題目 ケモカイン受容体 CXCR3 と脈絡膜新生血管の関連に関する実験的検討

所属 東京大学大学院医学系研究科 眼科学

指導教員 天野史郎 教授

申請者 藤村茂人

要旨

Purpose. Several recent studies suggest that some chemokines / chemokine receptors are involved in choroidal neovascularization (CNV). CXCR3 was the focus of our present study because microarray analysis for murine laser-induced CNV model showed the increased expression of CXCR3. The purpose of this study was to evaluate the effect of CXCR3 on CNV.

Methods. Microarray analysis was performed for the mouse eyes with laser-induced CNV. CXCR3 expressions on the endothelium of CNV were evaluated by immunohistochemistry. The expressions of CXCR3 and its ligands were quantified in the laser-treated eyes by real-time RT-PCR. CNV was compared between CXCR3-deficient mice and wild-type mice, between mice treated with anti-CXCR3 / anti-CXCL10 neutralizing antibody and mice treated with control IgG. Ocular expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), pigment epithelium-derived

factor (PEDF), C-C chemokine ligand-2 (CCL2), and complement component-3 (C3) were evaluated by real-time PCR.

Results. Microarray analysis and real-time RT-PCR revealed the elevation of CXCR3 and CXCL10 in laser-treated mouse eyes compared with control eyes. Immunohistochemistry showed CXCR3 expression on the endothelial cells of CNV. Laser-induced CNV of CXCR3-deficient mice was significantly larger with greater leakage in fluorescein angiography compared with wild-type mice ($p < 0.01$). Intravitreal injection of anti-CXCR3 / anti-CXCL10 neutralizing antibody exacerbated CNV. The CCL2 expression in the laser-treated eyes of the CXCR3-deficient mice was higher than in those of wild-type mice ($p < 0.05$), whereas VEGF, PEDF and C3 showed no differences.

Conclusions. Our present results suggested that CXCR3 expressed on CNV might have an angiostatic effect on it.

序文

1： 加齢黄斑変性（AMD；age-related macular degeneration）と脈絡膜新生血管（CNV；choroidal neovascularization）に関わるケモカイン／ケモカイン受容体に関するこれまでの知見

世界の先進国において加齢黄斑変性（age-related macular degeneration；AMD）は主要な中途失明原因となっており^{1, 2}、特に本邦においては脈絡膜新生血管（choroidal neovascularization；CNV）による滲出型AMD（exudative AMD）がその大半を占めている³。CNVは滲出型AMDの原因病巣であり、これに対して抗血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor；VEGF）治療を中心とした有効な治療法が近年定着してきた。しかしながらこれが全症例に有効というわけではなく、VEGF以外の治療標的を発見することも依然求められている。CNVの発生は、血管新生促進に関わる因子と血管新生抑制に関わる因子のバランスが崩れ血管新生促進因子が抑制因子の機能を上回った際に、脈絡膜毛細血管板から発生して網膜下に進展していく形で起こると考えられている。また、ドルーゼンと呼ばれる網膜色素上皮下の沈着物や網膜色素上皮機能低下はCNV発生に関与するとされているが^{4, 5}、これは光障害や酸化ストレスやリポフスチンにより網膜色素上皮（retinal pigment epithelium；RPE）が傷害を受け、続いてブルッフ膜に各種炎症性サイトカインが放出されることによって起こると考

えられている⁶。そしてこれらのサイトカインのいくつかは、脈絡膜での炎症細胞に働き、眼局所での免疫複合体や補体活性化を含む慢性炎症に関わるとされている^{7, 8}。すなわち、脈絡膜や RPE での慢性炎症は、ドルーゼン形成に関与すると言える。

ケモカインは、主に白血球などの炎症細胞の遊走やその活性化に関わる低分子量のサイトカインの総称である。典型的なケモカインの分子構造には、よく保存された4つのシステイン残基が存在し、そのうち N 末端側2個の形成するモチーフにより、CXC, CC, C, CX3C (X は他のアミノ酸残基) の4つのサブファミリーに分類され、その中でも CC ケモカインと CXC ケモカインは全ケモカインの大半を占める⁹。これまで CNV との関連を報告されたケモカイン・ケモカイン受容体はいくつかあり、それは CCL2/CCR2¹⁰、CX3CL1/CX3CR1¹¹、CCR3¹²、CXCR4¹³ などである。CXC ケモカイン・ファミリーは4つのシステイン残基を持ち、そのうち N 末端側の2つのシステイン残基の間にその他のアミノ酸が1つ存在する¹⁴。そしてその更に N 末端側に Glu-Leu-Arg と並ぶモチーフ (ELR motif) を有するものと有しないものに分類され、ELR motif を有する (ELR positive) CXC ケモカインは一般的に血管新生促進に働き、ELR motif を有しない (ELR negative) CXC ケモカインは血管新生抑制に働く傾向にあると報告されている¹⁵。通常炎症細胞

遊走に関わるケモカインの一部がこのように血管新生抑制効果を持つということは一見逆説的である。しかし例えば創傷治癒過程における初期に促進された血管新生は、創傷治癒過程後期に急速に停止し、一連の反応が終了するが、このように緻密に制御されたシステムには“血管新生促進因子の発現停止”のみでは不十分であり、“血管新生抑制因子の発現”が不可欠であると思われる。そして実際にこのような血管新生抑制因子である ELR negative CXC chemokine の報告は少なからず存在する^{14, 16}。

ヒト RPE 培養細胞を使用した過去の実験報告によれば、血管新生促進作用を持ついくつかの CC ケモカインと同時に、ELR negative の CXC ケモカインである interferon- γ inducible protein 10-kDa (IP-10; CXCL10)、monokine induced by interferon- γ (MIG; CXCL9)、interferon-inducible T cell α chemoattractant (I-TAC; CXCL11)といった分子もヒト RPE 細胞は発現することが分かっている¹⁷。しかし、これらのケモカインの網膜・脈絡膜血管新生における役割は不明である。

前述のように、CNV の発生に VEGF が大きく関わっていることから、滲出型 AMD の画期的な治療として現在の抗 VEGF 療法が開発されたことは疑問の余地がない事実であるが、これに続いて新たな治療標的を見出すべく、近年特にケモカイ

ン・ケモカイン受容体に着目した研究報告が相次いでいる。以下、これまで脈絡膜血管新生に関連が報告されてきたケモカイン・ケモカイン受容体について簡潔に説明をしたい。

ケモカイン CCL2 は主に CCR2 と結合して、マクロファージの遊走に関わる分子である。これらの分子を欠損したマウスは月齢 16 月を超えるとヒトの早期加齢黄斑変性に似た眼底状態、すなわちブルッフ膜の肥厚や RPE へのリポフスチンの沈着、眼底ドルーゼンの発生、そして網膜視細胞の減少を示すようになり、月齢 24 月を超えると CNV が発生する個体もある。CCL2/CCR2 は、単球やマクロファージを特異的に遊走させる因子で、これらの分子が欠損するとマクロファージの脈絡膜への遊走が障害され、網膜下やブルッフ膜の補体や免疫複合体が除去されにくくなり、結果的に蓄積することで、マウスのこのような病態を引き起こすと考えられている¹⁰。またヒトでは、AMD 患者の眼内で CCL2 発現が上昇していることも報告されている¹⁸。

CX3CL1/CX3CR1 は唯一の CX3C 型ケモカインとその受容体であり、CCL2 とともに単球系の遊走に関わる分子だが¹⁹、AMD 患者の DNA で、CX3CR1 のコード部分に一塩基多型(single nucleotide polymorphism; SNP)が多いことが報告され²⁰、CCL2 と CX3CR1 の二重欠損マウスでは CCL2 単独欠損マウスよりも強い AMD 様眼底病変が発症することが報告されている¹¹。この二重欠損マウスにおいては

Endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29) という視細胞の小胞体表面に存在する蛋白質が減少しており、このことが AMD 様病態発症に関与していると考えられている。

CCR3 は好酸球やマスト細胞に選択的に発現し、そのリガンドである CCL11, CCL24, CCL26 と反応することで、好酸球の遊走・活性化に関わる分子であるが²¹、近年これが CNV 内皮に発現し、CNV 拡大に関与することが報告された¹²。この CCR3 とそのリガンドによる CNV 促進効果は、好酸球やマスト細胞を欠損させたマウスでも認められたことから、この効果がこれらの炎症細胞とは独立に起きていることが示され、かつ抗 CCR3 中和抗体の眼内投与がレーザー誘発性マウスの CNV 部位へのマクロファージ遊走に影響を与えなかったことから、CCR3 による CNV 促進効果は CNV 内皮に発現する CCR3 による直接の効果であることが示された。

CXCR4 は多くの白血球/炎症細胞が発現し、リガンドである CXCL12 と反応して CNV 拡大の働きを持つことがマウスのレーザー誘発性 CNV モデルの実験から明らかになっている¹³。CXCL12 は前述した ELR motif の有無による分類では ELR negative の CXC ケモカインであるが、これは動物の腫瘍モデル等において例外的に血管新生促進作用を持つことが報告されている²²。ただしこの CXCL12 を対象にしたレーザー誘発性マウスモデルの実験¹³では、抗 CXCL12 中和抗体の硝子

体内投与では変化が見られず、唯一網膜下投与でのみ新生血管抑制効果が得られており、CXCR4/CXCL12 の影響はこれまで報告された他の分子と比較して弱いものではないかと思われる。しかしながらこのようにケモカイン・ケモカイン受容体は、CNV 形成に関わる因子として近年注目されてきているのは事実である。

そこで私は、まず DNA マイクロアレイとマウスを使ったレーザー誘発性 CNV モデルを用いて、AMD に関する新たな治療・研究標的となりうるケモカイン・ケモカインレセプターを検索した。次いで、その結果着目したケモカインレセプター CXCR3 とそのリガンドの発現を確認した。

更に、CNV 発生における CXCR3 やそのリガンドの役割を明らかにするべく行った実験研究内容についても記述する。

2：本論文の研究目的

- 1．未だ CNV との関連が報告されていないケモカイン・ケモカイン受容体の中で、新たに CNV との関連があるものを見出すこと。
- 2．実験で見出されたケモカイン受容体 CXCR3 とそのリガンドについて、CNV 発生における役割を検討すること。

研究方法

実験動物

本研究の動物実験に関しては、「東京大学動物実験実施規則」並びに「東京大学動物実験実施マニュアル」に従い取り扱った。野生型 C57BL/6J マウスは埼玉実験動物供給所より購入した。10～18 週齢のものを、マイクロアレイ、組織免疫染色、RT-PCR 実験に使用した。

CXCR3 欠損マウスは東京大学医学系研究科分子予防医学教室（松島綱治教授）より提供を受けた。これは既報^{23, 24}のように Balb-c マウスで作られた CXCR3 欠損マウスを C57BL/6J マウスと 8 世代交配したものである。CXCR3 に関する遺伝子型は tail snip による genotyping を行ったのであるが、その為の primer は、Forward: GCCGATGTTCTGCTGGTGTT, Reverse: GAGCAGACAGAGACCCCATACAA, NeoR2: GACCGCTTCCTCGTGCTTTACGG である。実際の CXCR3 欠損マウスと野生型マウスの比較実験にあたっては、本実験で扱ったレーザー誘発性 CNV モデルが、マウスの家系の違い等の要因で差が出やすいモデルであるため、なるべく同腹の個体同士を比較するように工夫した。すなわち、CXCR3 が X 染色体にコードされるため、まず分子予防医学教室から提供を受けたメスの CXCR3(-/-)マウスと埼玉実験動物供給所より購入したオス野生型 C57BL/6J マウス(Y/+)を mating し、得られたオス(Y/-)とメス(+/-)を mating して野生型オス(Y/+)と CXCR3 欠損オス(Y/-)を得た。そしてこの野生型オス(Y/+)と CXCR3 欠損オス(Y/-)を 10 週齢まで

飼育し、実験に使用した。

レーザー光凝固による CNV の作成

レーザー照射 CNV モデルは、アカゲザルを使用した実験報告²⁵以降、CNV の動物実験モデルとして広く一般的に用いられている方法であるが、今回はマウスに対して行った。10～12 週齢の C57BL/6J マウスにケタミン (Ketalar; Sankyo, Tokyo, Japan) とキシラジン (Celactal; Bayer, Tokyo, Japan) の (7:3) 混合液を腹腔内投与 (各約 1.8mg, 約 0.35mg) して全身麻酔を施し、同時に瞳孔を 0.5% tropicamide (Mydrine M; Santen Pharmaceutical, Osaka, Japan) で散瞳させた。レーザー照射条件等については既報²⁶⁻³⁰に多少の変更を加えて行った。カバーガラスを接触型レンズとして用い、細隙灯 (SL-7F; Topcon, Tokyo, Japan) を通じてダイオードレーザー (DC-3000; NIDEK, Osaka, Japan) を照射した。光凝固の条件は、スポットサイズ: 75 μ m、照射時間: 20msec、照射パワー: 200mW であった。ブルッフ膜が破壊されたか否かは、照射部位の中心に気泡が形成されることによって確認した。照射はそれぞれ出血を防止するために網膜血管を避けて行った。

DNA マイクロアレイ

18 週齢オスの C57BL/6J マウスの片眼に 10 発レーザー光凝固を行い、対側眼を

コントロールとして使用した。レーザー5日後にマウスを頸椎脱臼させて屠殺し、両眼球を採取し、既報²⁸と同様に RPE/Choroid を眼球より分離した。次いでその RPE/Choroid より messenger RNA (mRNA) を市販のキット (RNeasy Mini kit; Qiagen Inc., Valencia, CA) を使用して抽出し、東京大学先端科学技術研究センターで gene chip array (GeneChip Mouse Genome 430 2.0 array; Affymetrix Inc., Santa Clara, CA) にハイブリダイズして、マイクロアレイを行った。手順については Affymetrix の Technical manual に従った。データは 4 匹 8 眼 (レーザー照射 4 眼、コントロール 4 眼) について比較を行った。ケモカイン、ケモカイン受容体、chemokine-like factor を含む 60 種類の transcript を解析対象とした。

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR, CXCR3 とリガンド・ケモカインの発現確認)

10 週齢オスの C57BL/6J マウスの片眼に 10 発レーザー光凝固を行い、対側眼をコントロールとして使用した (n = 8~10 per group)。既報³¹ (and Takahashi H, unpublished data, 2010) で各種サイトカインの mRNA の発現がほぼピークを迎えるとされるレーザー3日後にマウスを屠殺、両眼球を採取し、既報²⁸と同様に RPE/Choroid を眼球より分離した。次いでその RPE/Choroid より messenger RNA

(mRNA)を市販のキット(SV total RNA isolation kit; Promega, Madison, WI)を使用して抽出し、cDNAはSuperscript^{III} for RT-PCR (Invitrogen)を用いて調整した。通常のPCRはCXCR3についてMJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)を使用して行い、得られたDNA産物をアガロース・ゲル中で電気泳動し、エチジウム・ブロマイドで染色後、ゲル撮影装置(AE-6932GX; ATTO Corporation, Tokyo)で可視化・撮影した。その際positive controlとしてマウス頸部リンパ節を使用した。また、その際のPCR設定条件は以下のとおりである。Denature: 95°C 15min, 95°C 30 sec 55cycles, 60°C 1minute。

Real-time PCRはCXCR3とその3つの主要リガンドであるCXCL10, CXCL9, CXCL11についてPlatinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen)を用い、総量20 μ lでRoche LightCyclerを用い行った(プログラム: 15minutes at 95°C denature, followed by 55 cycles at 95°C for 30 seconds and 60°C for 1 minute)。それぞれの遺伝子の発現量は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。

mouse-GAPDH, left, 5'-aactttggcattgtggaagg-3', right, 5'-cacattgggggtaggaacac-3';

mouse-CXCR3, left, 5'-gctgtagccgatgttctgctggtg-3', right, 5'-tgcactatgctcagatatctgtc-3';

mouse-CXCL10, left, 5'-cccacgtgttgagatcattg-3', right, 5'-cactgggtaaaggggagtg-3';

mouse-CXCL9, left, 5'-aaaatttcacacgcccttg-3', right, 5'-tctccagcttggtgaggtct-3';

mouse-CXCL11, left, 5'-agtaacggctgcgacaaagt-3', right, 5'-gcatgttccaagacagcaga-3';

組織免疫染色

ヒト AMD 眼の CNV と、マウスレーザー誘発性 CNV に対して、組織免疫染色を行った。

ヒト CNV 組織は、2002 年に東京大学医学部附属病院にて AMD に対する治療として硝子体茎離断 CNV 抜去手術を受けた患者より術前に書面による同意を得て手術中に採取された。なお、この採取されたヒト CNV 組織の研究目的使用については東京大学医学部倫理委員会の承認を得ており、取り扱いはヘルシンキ宣言に準拠している。この組織はカルノア液（クロロホルム：エタノール：酢酸 = 9 : 6 : 1）で固定、パラフィン包埋後 5 μ m の切片に薄切された後、rabbit polyclonal antibodies against CXCR3 (1:200, Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, CA) で over night で反応させたのち、標準的な immunoperoxidase procedure を施し、最終的に diaminobenzamine (DAB; Vector Laboratories, Burlingame, CA) で褐色に発色させた。ネガティブ・コントロールは、別の検体のスライドに一次抗体を skip する形で行った。

マウス CNV は、12 週齢オスの両眼に各 10 発ずつレーザー照射を施し、照射 7 日

後に屠殺・眼球採取し、OCT compound (Sakura, Kobe, Japan)に包埋して液体窒素で凍結の後、-80℃保存した後 10 μ m の凍結切片とし、アセトン固定して再び-80℃保存した。マウスの切片は rabbit polyclonal antibodies against CXCR3 (1:200, Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, CA) と rat monoclonal antibodies against CD31 (1:100, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) の二重染色とし、CXCR3 抗体で CXCR3 陽性細胞を、CD31 抗体で血管内皮を染色する目的で行った。各々の一次抗体は室温で 2 時間反応させ、二次抗体は CXCR3 については goat anti-rabbit antibodies conjugated to Alexa 488 (1:300, Invitrogen, Carlsbad, CA) で、CD31 については donkey anti-rat antibodies conjugated to Alexa 594 (Invitrogen) で各々室温 60 分反応させた。その上で 4',6-Diamino-2-Phenyl-Indole (1:3000, DAPI; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) で 5 分間反応させて核染色を行い、1:1 glycerol-PBS でマウントした。ネガティブ・コントロールは各々 CXCR3 抗体、CD31 抗体と同希釈濃度の rabbit and rat isotype-matched IgG を使用して行った。画像の観察・記録は蛍光顕微鏡 (model XI, Olympus, Tokyo, Japan) で行った。

レーザー誘発性 CNV の定量

レーザー照射は、前述と同様の条件で、両眼に 3 発／眼ずつ行った (CXCR3 欠損

マウス vs 野生型マウスの比較では n = 10 per group、CXCR3 中和抗体/ CXCL10 中和抗体/ control IgG 硝子体投与実験では n = 8~10 per group)。レーザー光凝固 7 日後に形成された CNV からの蛍光漏出を定量する目的でフルオレセイン蛍光眼底造影を既報²⁶⁻²⁹と同様に行い、続いてマウス眼球の脈絡膜伸展（フラットマウント）標本による CNV サイズの定量を既報^{27, 32}と同様に行った。手順としては、まずレーザー光凝固 7 日目のマウスに全身麻酔を施し、腹腔内にフルオレセインナトリウム (10%; 0.1ml/kg; Fluorescein; Alcon, Fort Worth, TX) を注射した。腹腔内注入 4~6 分後に両眼の眼底造影写真をデジタル眼底カメラ (model TRC501X; Topcon, Tokyo, Japan) を使用して撮影した。撮影された画像はカメラに付属のソフトウェア (Imagenet; Topcon) で処理・保存され、Image-J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を使用して定量・解析を受けた。次いで 5 時間経過後、マウスに再度全身麻酔を施し、胸部を切開して心臓を露出させ、心尖部より 50mg/ml のフルオレセイン標識デキストラン (FITC-Dextran; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) を貫流した。そしてマウスを屠殺し、眼球を採取し、4% paraformaldehyde (PFA) で固定後、前眼部・水晶体・網膜を眼球内から除去し、残った後眼部の強膜・脈絡膜・網膜色素上皮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、強膜面を下にしてスライドガラス上に広げる形でフラットマウント標本作製した。フラッ

トマウント標本の CNV 画像は、フラットマウント作成後 24 時間以内に蛍光顕微鏡 (BX51; Olympus, Tokyo, Japan) で撮影し、デジタル画像として保存された。

この CNV 画像の解析は Image-J software を用いて行われ、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。

なお、蛍光眼底写真での蛍光漏出とフラットマウント標本での CNV 面積の評価はマウスの background を知らない験者が行った。

抗 CXCR3/抗 CXCL10 中和抗体のマウス硝子体注射

オス 10 週齢の野生型 C57BL/6 マウスの両眼へ上述のようにレーザー照射した後、それをランダムに 3 つのグループへ分けた (n=8~10 mice per group)。まず 1 つ目のグループはレーザー照射後即座に中和抗体と isotype を合わせた control IgG (Southern Biotech Inc, Birmingham, AL): $1\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ を両眼の毛様体扁平部より硝子体内注射し、2 つ目のグループは抗 CXCR3 中和抗体 (Abcam plc, Cambridge, UK): $1\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ 、3 つ目のグループは抗 CXCL10 中和抗体 (Abcam plc): $1\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ を両眼へ硝子体内注射した。注射手技としては、手術用顕微鏡下で角膜輪部より 0.5mm の強膜から $5\mu\text{l}$ マイクロシリンジ (Ito corporation, Shizuoka, Japan) の先についた 33 gauge 2 段針 (Ito corporation) を刺入し、

試薬を投与した。その後の CNV の評価については、上述のとおりである。

Recombinant CXCL10 のマウス硝子体注射

オス 10 週齢の野生型 C57BL/6J マウスの両眼へ上述のようにレーザー照射した後、それをランダムに 2 つのグループへ分けた (n=8~10 mice per group)。まず 1 つ目のグループはレーザー照射直後に phosphate buffered saline (PBS): 2 μ l を両眼の毛様体扁平部より硝子体内注射し、2 つ目のグループはレーザー照射直後に recombinant mouse CXCL10 (R&D Systems, Minneapolis, MN): 0.2 μ g / 2 μ l を両眼へ硝子体内注射した。注射手技とその後の CNV の評価については、上述のとおりである。

また、CXCL10 が CNV 発生の中期に CNV 発現へ影響する可能性もあるため、別実験として、眼内投与日のみ変更した実験も行った。すなわち、レーザー照射 3 日後に第 1 群 PBS : 2 μ l、第 2 群 recombinant mouse CXCL10: 0.2 μ g / 2 μ l を上記と同様に眼内投与し、上記と同様の比較実験を行った。

マクロファージ遊走試験

マクロファージは CNV の形成において重要な役割を担うことが報告されている³³。CXCR3 欠損がレーザー照射部位へのマクロファージ遊走に与える影響を

調べるため、マクロファージ遊走試験を既報³⁴に少し変更を加えた方法で行った。まず 10 週齢オスの野生型／CXCR3 欠損マウス（各 n = 8）に上記と同様に 3 発ずつレーザー照射し、3 日目にマウスを屠殺、眼球摘出し、4% paraformaldehyde (PFA)で固定し、脈絡膜フラットマウントを上記と同様に作成。5% goat-serum で blocking 後に rat anti-mouse F4/80 antibody conjugated to Alexa 488 (1:100; Life Technologies, Carlsbad, CA)で染色し、蛍光顕微鏡 (BX 51; Olympus)で観察・撮影を行った。各レーザー照射部位の内部やその周囲に存在する F4/80 陽性細胞（マクロファージ）の数を計測し、1 眼につき 3 か所のレーザー照射部位における細胞数を平均して、その眼のデータとした。これと並行して、野生型／CXCR3 欠損マウスの CNV 作成眼球フラットマウント各 1 眼ずつに対して濃度と isotype を一致させた rat IgG conjugated to Alexa 488 を使用した negative control 標本も作製した。

Real-Time RT-PCR (野生型マウス vs CXCR3 欠損マウス)

野生型マウスと CXCR3 欠損マウスでの CNV 関連因子発現の違いを調べるため、RPE/Choroid での各種因子発現を mRNA レベルで調べた。まず 10 週齢オスの野生型、CXCR3 欠損マウスの片眼に 10 発レーザー光凝固を行い、対側眼をコントロールとして使用した (n = 10 per group)。各種サイトカインの messenger RNA

(mRNA)発現がピークを迎えると既報³¹にて報告されているレーザー照射3日後に両眼球を採取し、RPE/Choroidを眼球より分離した。次いでそのRPE/Choroidより messenger RNA (mRNA)を市販のキット(SV total RNA isolation kit; Promega, Madison, WI)を使用して抽出し、cDNAはSuperscript^{III} for RT-PCR (Invitrogen)を用いて調整した。

Real-time PCRは既報にてCNVと関連があることが報告されているサイトカインやそれに近い因子、すなわち、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)³⁵、pigment epithelium-derived factor (PEDF)³⁶、CCL2¹⁰、Complement component 3 (C3)³⁷についてPlatinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen)を用い、総量20 μ lでRoche LightCyclerを用いた(プログラム: 15minutes at 95°C denature, followed by 55 cycles at 95°C for 30 seconds and 60°C for 1 minute)。それぞれの遺伝子の発現量は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。

mouse-VEGF, left, 5'-gtacctccaccatgccaaagt-3', right, 5'-gcattcacatctgctgtgct-3';

mouse-PEDF, left, 5'-cacccgacttcagcaagattact-3', right, 5'-tcgaaagcagccctgtgtt-3';

mouse-CCL2, left, 5'-tctggacccattccttcttg-3', right, 5'-caggtccctgtcatgttct-3';

mouse-C3, left, 5'-ccgcaggctgtggggaacag-3', right, 5'-gctgtcagccaggtgctggg-3';.

統計学的手法

マイクロアレイの結果のデータ解析にはマイクロアレイに付属した内在プログラム(Affymetrics® Microarray Suite Version 5.0)を使用して解析し、発現の有無、発現亢進の有無を判定した。

real-time PCR 結果やマクロファージ遊走試験の統計学的解析には SPSS software (SPSS Inc., Chicago)を用い、Mann-Whitney U-test を行った。P 値 < 0.05 の場合に有意差ありと判定した。

蛍光眼底造影における CNV からの leak の評価や CNV の面積の評価に関しては、1 眼につき 3 ヶ所のレーザー照射部位があるため、nested ANOVA test を使用して群間の蛍光漏出の強さや CNV 面積を比較した。その際、CNV サイズが拡大すると必然的に分散も拡大するので、それらの値を既報³⁸と同様に自然対数化して解析を行った。P 値 < 0.05 の場合に有意差ありと判定した。

結果

DNA マイクロアレイ

解析対象とした 60 種類のケモカイン、ケモカイン受容体、chemokine-like factor のうち 23 種類の分子がレーザー照射眼の RPE/choroid で対照眼に比して発現上昇していた（表 1）。この中で CCL2, CXCL4, CCR1, CCR2, CXCL5, CCL11, CXCL10 (IP-10), CXCR3, CXCL12, CXCR4, CXCL1 が血管新生促進あるいは抑制に関わっているという過去の報告が有るものである^{14, 39}。そしてこの 11 種類の分子のうち、CCL2/CCR2, CXCL12/CXCR4, CCL11 は既に CNV との関連が報告されているため¹⁰⁻¹³、これを除外し、残りの 6 種類のうちケモカインとその受容体が共に発現上昇を示す CXCR3, CXCL10 に着目した。この CXCL10 と CXCR3 というケモカイン/ケモカイン受容体は血管新生抑制作用を持つという報告が幾つかあることも⁴⁰⁻⁴³、この分子に着目した理由である。

表 1

レーザー照射眼で非照射眼に比較して
発現上昇が認められた遺伝子

Unigene	Probe ID	Gene name	非 照 射 眼	レ ー ザ ー 照 射 眼	Fold change
Mm_137	1417266_at	C-C chemokine ligand 6	77.2	425.5	5.51
Mm_867	1419282_at	C-C chemokine ligand 12	26.2	118.8	4.53
Mm_290320	1420380_at	C-C chemokine ligand 2	27.3	107	3.92
Mm_332490	1448995_at	C-X-C chemokine ligand 4	83.3	323.6	3.88
Mm_14302	1424727_at	C-C chemokine receptor 5	17.2	60.7	3.53
Mm_41988	1419413_at	C-C chemokine ligand 17	21.9	73.8	3.37
Mm_274927	1419609_at	C-C chemokine receptor 1	20.3	65.7	3.24
Mm_341574	1421228_at	C-C chemokine ligand 7	13.3	41.3	3.11
Mm_6272	1421186_at	C-C chemokine receptor 2	13.7	40.2	2.93
Mm_42029	1419684_at	C-C chemokine ligand 8	70	194.1	2.77
Mm_4660	1419728_at	C-X-C chemokine ligand 5	16.3	38.7	2.37
Mm_4686	1417789_at	C-C chemokine ligand 11	27.2	57.2	2.10
Mm_877	1418930_at	C-X-C chemokine ligand 10 (IP-10)	29.5	60.2	2.04
Mm_12876	1449925_at	C-X-C chemokine receptor 3 (CXCR3)	16.1	30.4	1.89
Mm_277129	1418718_at	C-X-C chemokine ligand 16	105.9	189.9	1.79
Mm_29658	1448316_at	Chemokine-like factor super family 3	93.1	160.5	1.72
Mm_143745	1455577_at	C-C chemokine ligand 28	26	40.3	1.55
Mm_303231	1417574_at	C-X-C chemokine ligand 12	147.5	225.3	1.53
Mm_1401	1448710_at	C-X-C chemokine receptor 4	25.9	35.2	1.36
Mm_35600	1460253_at	Chemokine-like factor super family 7	37.5	48.4	1.29
Mm_7275	1418777_at	C-C chemokine ligand 25	30.1	38.3	1.27
Mm_10116	1448859_at	C-X-C chemokine ligand 13	41.9	52.4	1.25
Mm_21013	1441855_x_at	C-X-C chemokine ligand 1	35.4	42.6	1.20

遺伝子発現量比（レーザー照射眼／非照射眼）が大きいものから順に記載した。

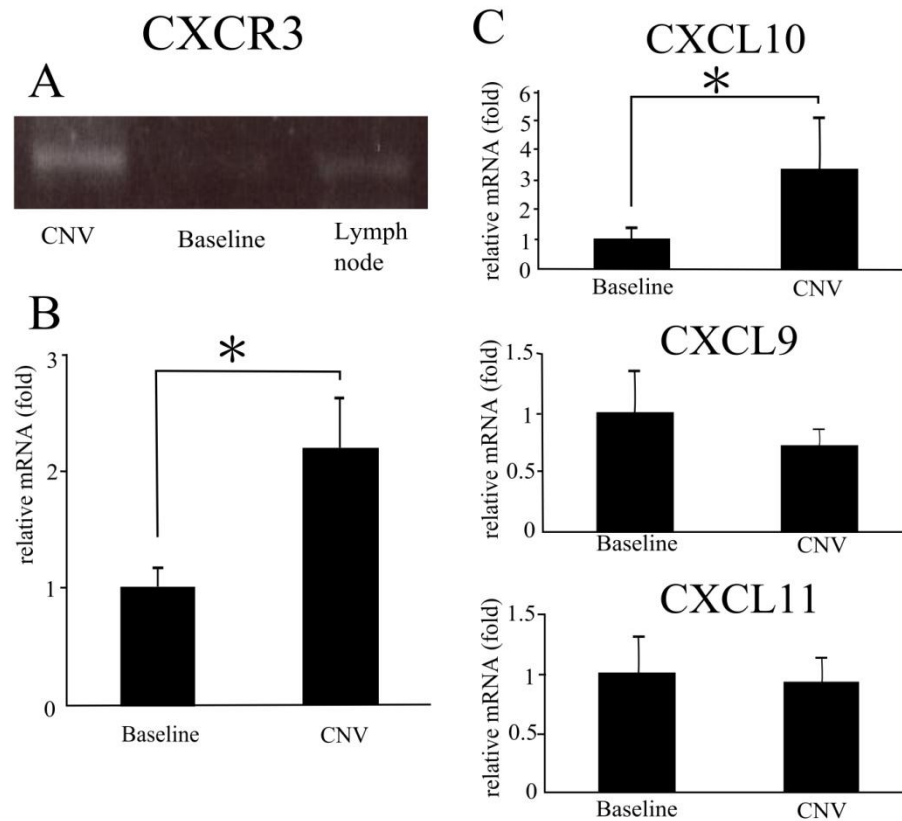
測定されたが表に記載されていない 37 種類の遺伝子のうち、7 種類はマイクロ

アレイの解析プログラムによる判定で発現亢進が認められず。30 種類は検出されなかった。

RT-PCR での CXCR3 発現

マウス レーザー照射眼 (CNV) の RPE/choroid では対照眼 (Baseline) のそれより CXCR3 の発現が亢進していた。また、CXCR3 の主要リガンドである CXCL10, CXCL9, CXCL11 についても同様に実験を行ったが、これは DNA マイクロアレイの結果と同様に、CXCL10 のみ発現上昇を認めた (n = 8~10 per group) (図 1)。

図 1



A: RT-PCR 産物アガロースゲル電気泳動の結果。CXCR3 の発現が CNV 眼にて亢進している。

B: real-time PCR の結果。CNV 眼で Baseline に比較して CXCR3 の発現が亢進している。*; $P < 0.05$ Mann-Whitney U-test。

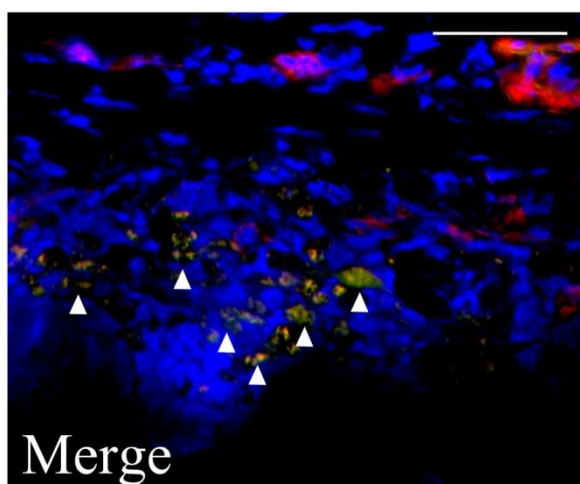
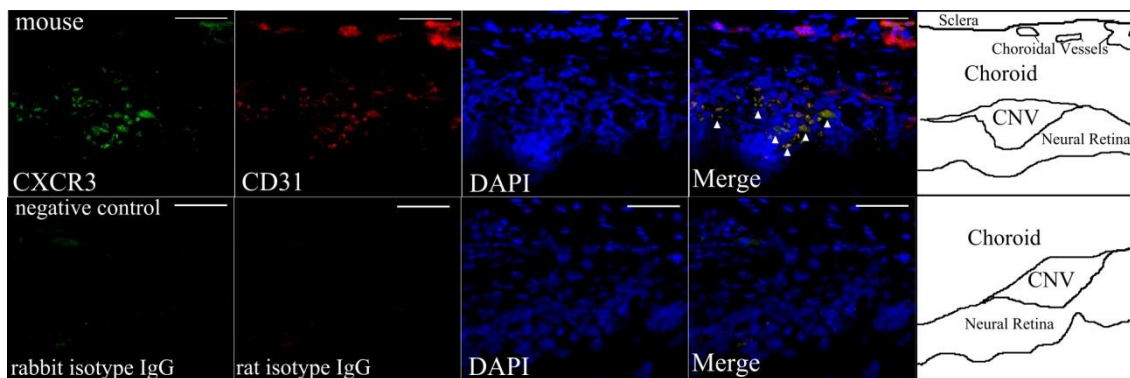
C: CXCL10, CXCL9, CXCL11 に関する real-time PCR の結果。3 つのリガンドの中では CXCL10 のみ CNV 眼での発現が亢進している。*; $P < 0.05$ Mann-Whitney U-test。

組織免疫染色

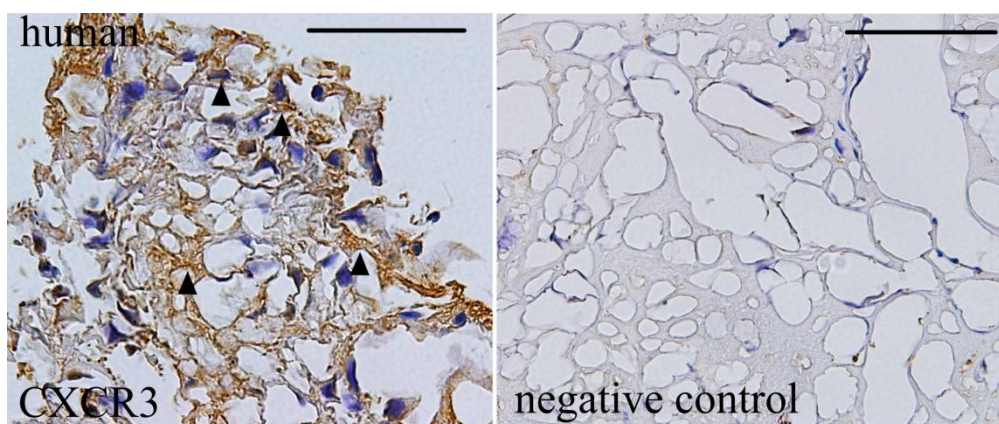
マウス CNV における CXCR3 と CD31 の二重免疫染色より、CNV 内皮に CXCR3 の発現を認めた（図 2 A）。また、ヒト CNV の CXCR3 に関する一重免疫染色においても、CNV 内皮と思われる部分に CXCR3 の発現を認めた（図 2 B）。

図 2

A



B



A : マウス CNV における CXCR3 の発現。血管内皮を CD31 で二重染色しており、

画面中央の CNV 内皮と画面上方の正常脈絡膜血管 (choroidal vessels) 内皮が CD31 を発現しているが、CXCR3 の発現は CNV 内皮にのみ選択的に起きていることが分かる (上段の上列、下段は Merge 画像の拡大図)。一方、rat & rabbit isotype IgG を使用した negative control では染色は認められない (上段の下列)。Scale bar = 50 μ m。

B: ヒト CNV 標本における CXCR3 の発現。

CNV の内皮と思われる部分 (矢頭) に DAB の発色を認める。Scale bar = 50 μ m。

CNV の比較：野生型マウス vs CXCR3 欠損マウス

レーザー誘発性 CNV モデルの実験に先立って、成熟野生型マウスと CXCR3 欠損マウスの網膜・脈絡膜構造を組織学的に調べたが、CXCR3 欠損マウスの網膜構造・網膜血管、脈絡膜血管の構造に異常は認めなかった（図 3）。

レーザー照射 7 日目の蛍光眼底造影では、野生型マウスに比較して CXCR3 欠損マウスで有意に強い蛍光漏出を認め (0.39 ± 0.08 AU vs 0.88 ± 0.17 AU, $p < 0.01$)

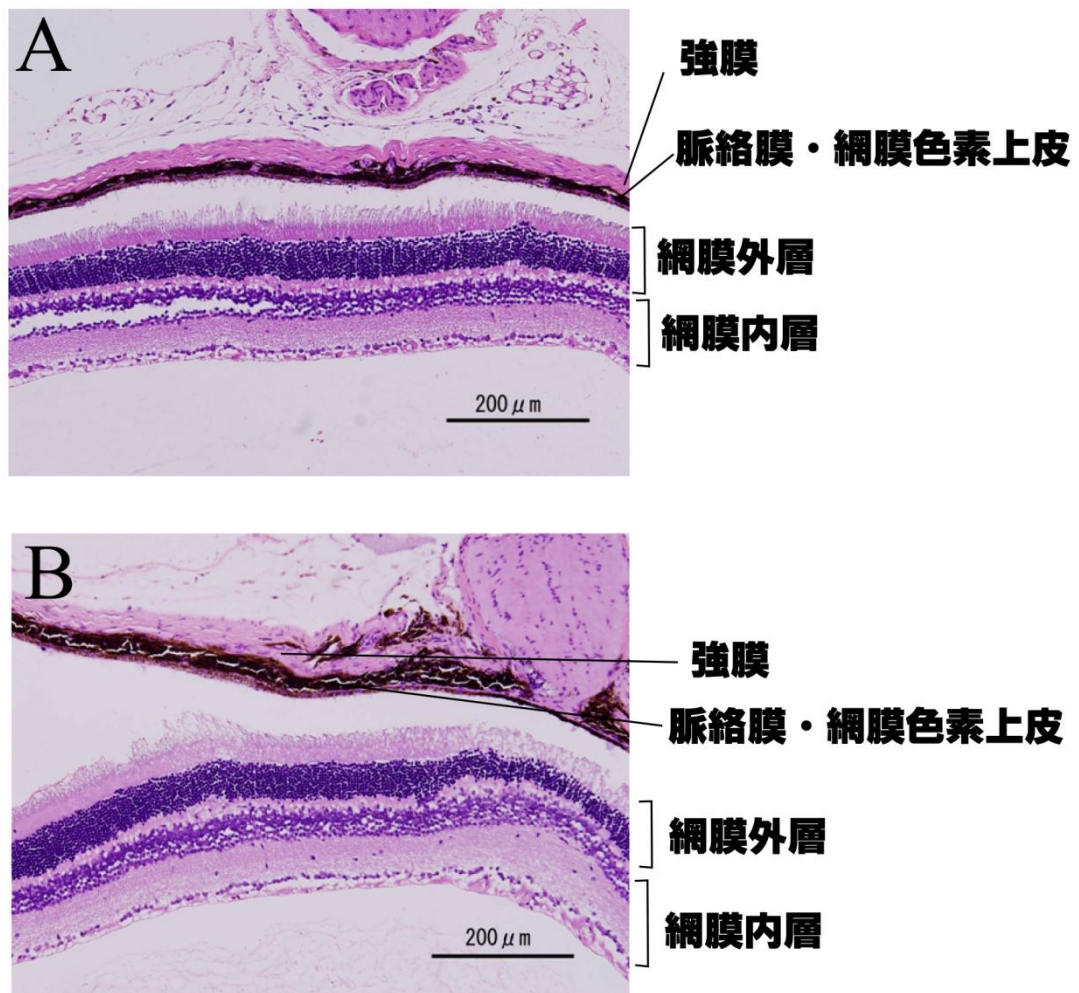
（図 4 A）、フラットマウントでは、野生型マウスに比較して CXCR3 欠損マウスで有意に大きい CNV を認めた ($19313 \pm 1739 \mu\text{m}^2$ vs $26962 \pm 2310 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$)（図 4 B）。

CNV の比較：抗 CXCR3 中和抗体／抗 CXCL10 中和抗体投与実験

抗 CXCR3 中和抗体／抗 CXCL10 中和抗体硝子体投与と control IgG 硝子体投与の比較実験では、まず蛍光眼底造影において、control IgG 投与眼に比較して抗 CXCR3 中和抗体投与、抗 CXCL10 中和抗体投与眼いずれも、蛍光漏出増大を認めた (0.34 ± 0.08 AU vs 0.59 ± 0.12 AU and 1.34 ± 0.27 AU, $p < 0.05$ and $p < 0.01$)

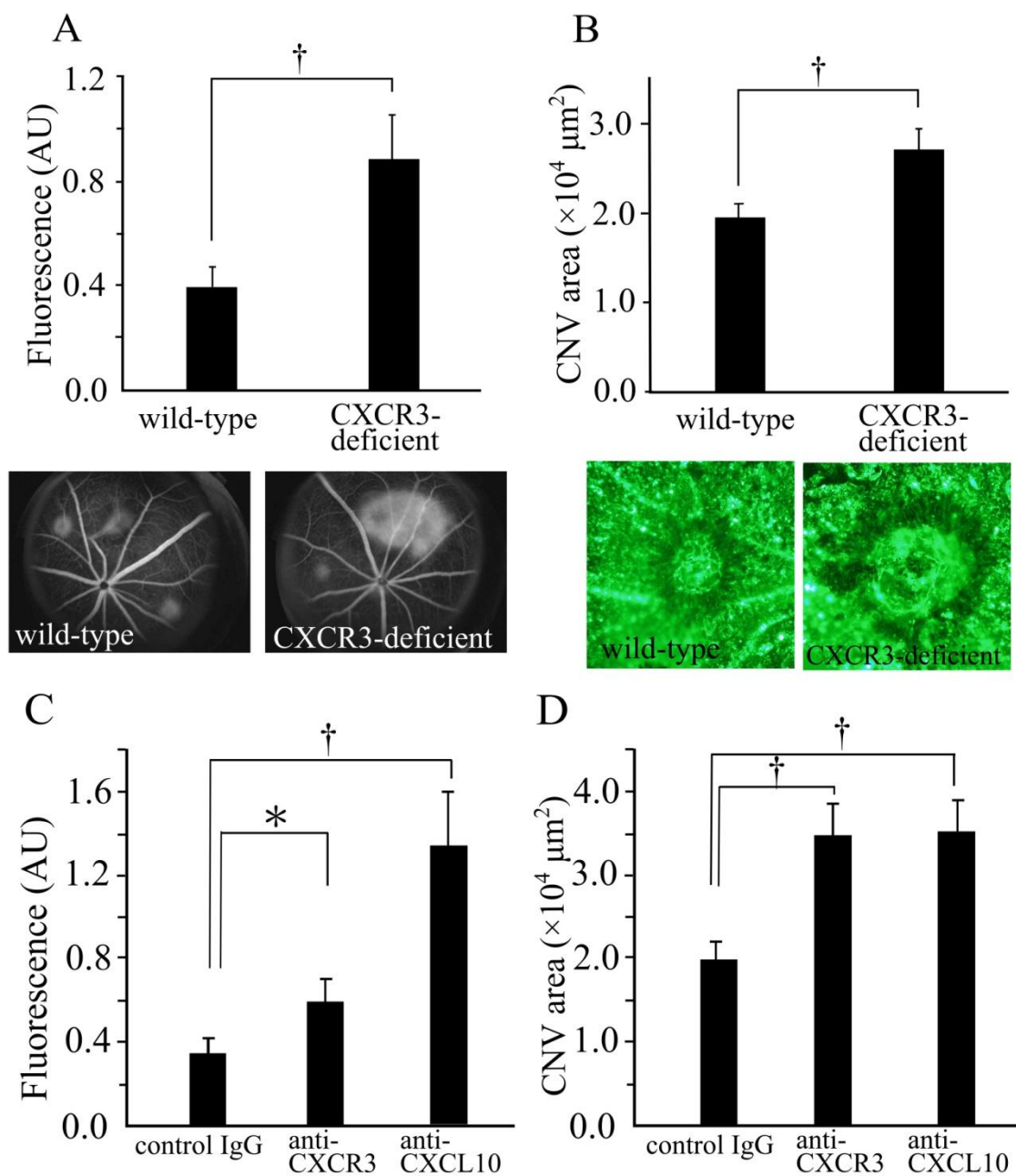
（図 4 C）。フラットマウントでも、control IgG 投与眼に比較して抗 CXCR3 中和抗体投与眼、抗 CXCL10 中和抗体投与眼いずれも、CNV 拡大を認めた ($19901 \pm 2403 \mu\text{m}^2$ vs $34798 \pm 3735 \mu\text{m}^2$ and $35179 \pm 3776 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$)（図 4 D）。

図 3



オス 10 週齢の野生型マウス (A) と CXCR3 欠損マウス (B) の眼球後極部組織標本 (ヘマトキシリン・エオジン染色)。両者において網膜・脈絡膜構造の違いを認めない。

図 4



A：蛍光眼底造影による野生型マウスと CXCR3 欠損マウスの CNV 比較。CXCR3 欠損マウスで蛍光漏出の亢進を認める。

B：脈絡膜フラットマウント標本による野生型マウスと CXCR3 欠損マウスの CNV 面積の比較。CXCR3 欠損マウスで CNV 面積の拡大を認める。

C : 蛍光眼底造影による抗 CXCR3/ 抗 CXCL10 中和抗体投与眼と control IgG 投与眼の CNV 蛍光漏出の比較。両中和抗体投与眼にて蛍光漏出の亢進を認める。

D : 脈絡膜フラットマウント標本による抗 CXCR3/ 抗 CXCL10 中和抗体投与眼と control IgG 投与眼の CNV 面積の比較。両中和抗体投与眼にて CNV 面積の拡大を認める。

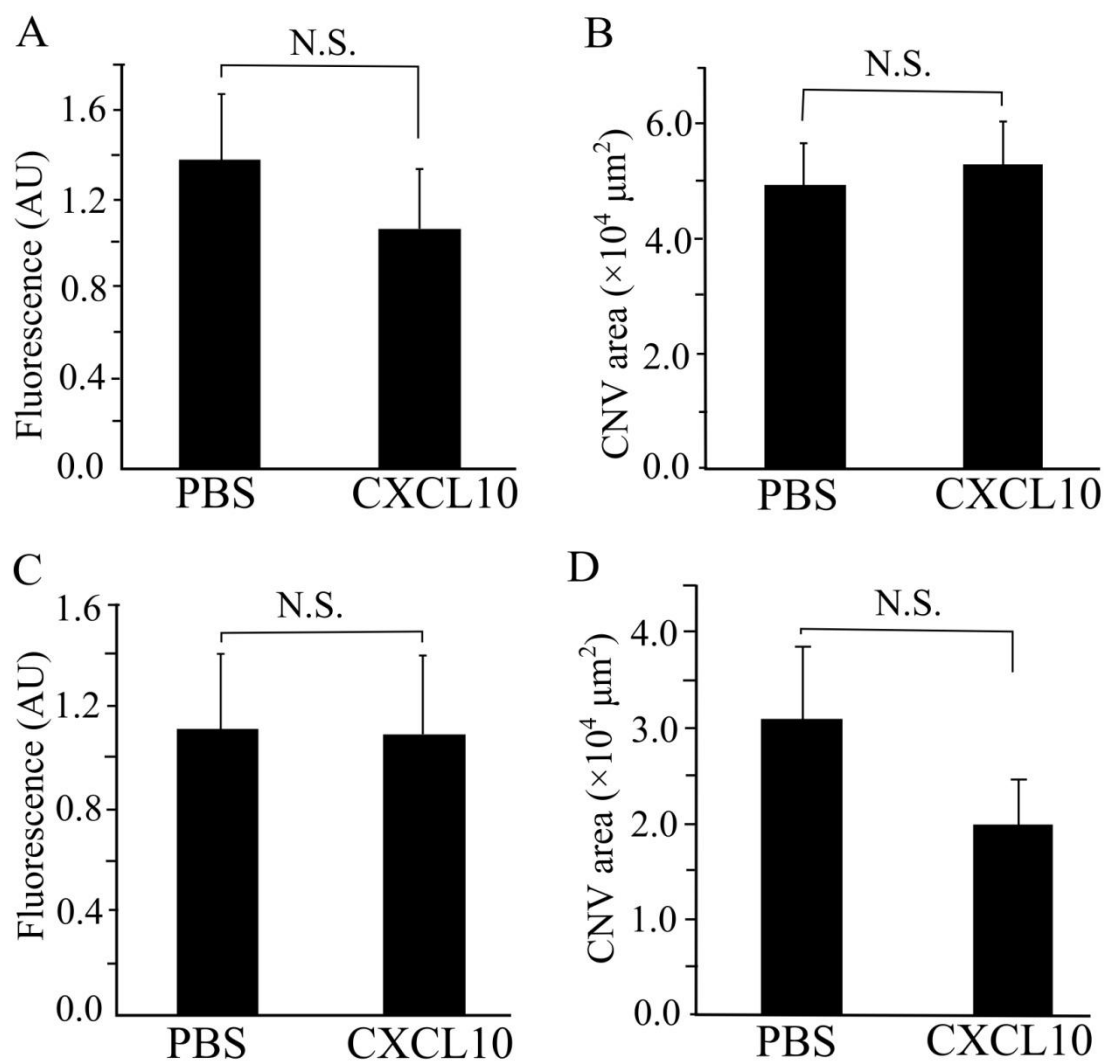
† : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$

CNV の比較 : Recombinant CXCL10 投与実験

PBS (vehicle)硝子体投与と Mouse Recombinant CXCL10 硝子体投与の比較実験で、レーザー照射直後に投与した場合では、蛍光眼底造影による蛍光漏出に有意差を認めず (1.37 ± 0.29 AU vs 1.07 ± 0.27 AU, $p = 0.35$) (図 5 A)。フラットマウントでの CNV 面積も有意差を認めなかった ($49295 \pm 7141 \mu\text{m}^2$ vs $52793 \pm 7648 \mu\text{m}^2$, $p = 0.69$) (図 5 B)。

また、レーザー照射 3 日後に投与した場合でも、蛍光眼底造影による蛍光漏出に有意差を認めず (1.11 ± 0.30 AU vs 1.09 ± 0.31 AU, $p = 0.96$) (図 5 C)。フラットマウントでの CNV 面積も有意差を認めなかった ($30956 \pm 7554 \mu\text{m}^2$ vs $19855 \pm 4845 \mu\text{m}^2$, $p = 0.41$) (図 5 D)。

図 5



Mouse recombinant CXCL10 の硝子体投与マウスと PBS 硝子体投与マウスの実験的レーザー誘発性 CNV の比較。

A: 蛍光眼底造影による CNV 蛍光漏出の比較。レーザー直後に PBS/CXCL10 を投与した場合（有意差なし）。

B: 脈絡膜フラットマウントによる CNV 面積の比較。レーザー直後に PBS/CXCL10 を投与した場合（有意差なし）。

C: 蛍光眼底造影による CNV 蛍光漏出の比較。レーザー照射 3 日後に PBS/CXCL10 を投与した場合（有意差なし）。

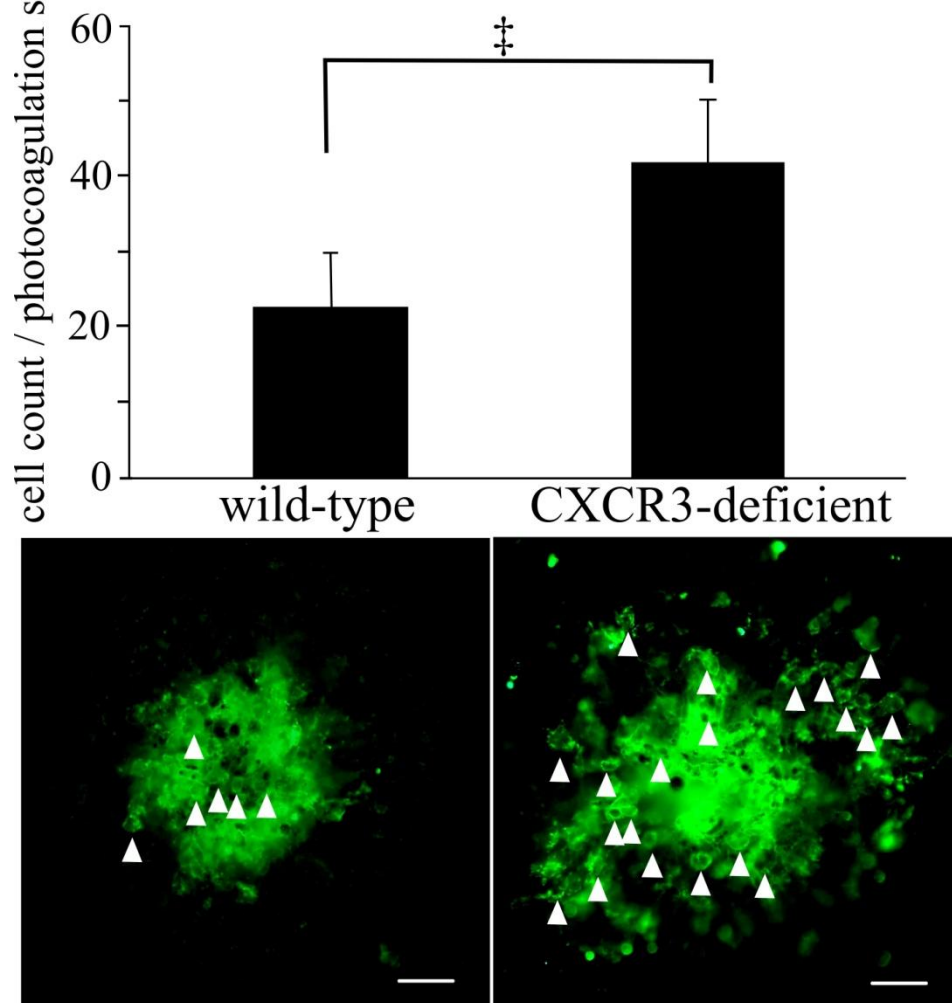
D: 脈絡膜フラットマウントによる CNV 面積の比較。レーザー 3 日後に PBS/CXCL10 を投与した場合（有意差なし）。

CNV 部位へのマクロファージ遊走試験

CXCR3 欠損で CNV が拡大する機序を解明する目的で、レーザー誘発性 CNV 部位へのマクロファージ集積を脈絡膜フラットマウントへの免疫染色にて確認した。

レーザー照射 3 日目において、レーザー照射部位とその周囲への F4/80 陽性細胞（マクロファージ）集積は、CXCR3 欠損マウスにおいて野生型マウスに比して有意に亢進していた（ 42 ± 8 vs 22 ± 7 counts / photocoagulation site, $p < 0.01$, Mann-Whitney U test）（図 6）。

図 6



CXCR3 欠損による影響：マクロファージ遊走試験

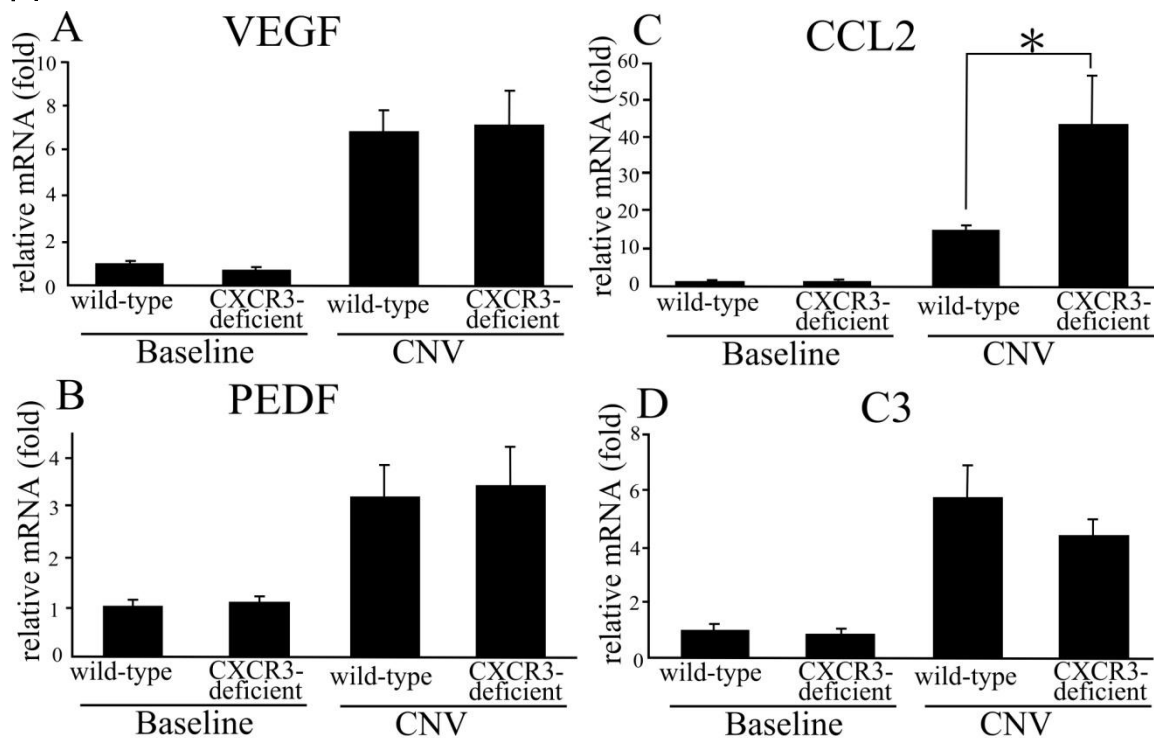
レーザー照射部位への集積マクロファージ数が、CXCR3 欠損マウスでは野生型マウスに比較して有意に亢進していた (‡ : $p < 0.01$, Mann-Whitney U test)。

Scale bar = $50 \mu\text{m}$

***Real-Time RT-PCR*による各種サイトカイン messenger-RNA 発現の比較**

VEGF, PEDF, CCL2, C3 いずれも、レーザー非照射眼(Baseline)での発現量では野生型マウスと CXCR3 欠損マウスに有意差はなかった。野生型マウスと CXCR3 欠損マウス双方において、レーザー非照射眼(Baseline)に比してレーザー照射 3 日目の照射眼の発現量は 4 種類全ての分子において有意に上昇していた ($p < 0.01$, Wilcoxon signed-rank test)。レーザー照射 3 日後における VEGF, PEDF, C3 の mRNA 発現は、野生型マウスと CXCR3 欠損マウス間で差がなかったが、CCL2 の mRNA 発現は、CXCR3 欠損マウスで野生型マウスに比して有意に高い発現を認めた ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test) (図 7)。なお、レーザー誘発性 CNV において VEGF/PEDF 発現量比上昇と CNV の増大が関連する事が過去の報告⁴⁴にて指摘されているが、本実験では野生型マウスにおける VEGF/PEDF 発現量比は Baseline に比して照射 3 日後に 2.14 倍に上昇し、CXCR3 欠損マウスにおける VEGF/PEDF 発現量比は 2.93 倍に上昇していた。それらの上昇倍率は、野生型マウスと CXCR3 欠損マウス間で有意差を認めなかった。

図 7



Real-time RT-PCR による各種 CNV 関連サイトカイン messenger RNA の

RPE/Choroid 発現：野生型マウスと CXCR3 欠損マウスの比較。

A: Vascular endothelial growth factor (VEGF), B: Pigment epithelium derived factor (PEDF), C: CCL2, D: C3 いずれも、レーザー非照射眼 (Baseline) での発現量では野生型マウスと CXCR3 欠損マウスに有意差はなかった。野生型マウスと CXCR3 欠損マウス双方において、レーザー非照射眼 (Baseline) に比してレーザー照射 3 日目の照射眼での上記 4 つの分子の発現量は有意に上昇していた (p < 0.05, Mann-Whitney U test)。

C: レーザー照射 3 日後の CXCR3 欠損マウスの CCL2 発現は、野生型マウスに比べて有意に強い上昇を認めた (* : $p < 0.05$, Mann-Whitney U test)。

考察・結論

考察

我々の知るところでは、本研究以前に CXCR3 と CNV 形成の関連を研究・報告した論文はない。マウスにおける *in vivo* 実験⁴⁰ やヒト血管内皮細胞による *in vitro* 実験^{41, 45, 46} で皮膚や腫瘍の新生血管内皮に CXCR3 発現が証明された過去の報告と同様に、本研究では、マウス レーザー誘発性 CNV と手術的に採取されたヒト CNV の血管内皮に CXCR3 の発現が認められた。また、本研究ではレーザー照射を受けたマウス眼球の RPE/Choroid において CXCL10 の mRNA 発現上昇が認められたが、これは加齢黄斑変性患者の血清中 CXCL10 が上昇しており、摘出された加齢黄斑変性罹患眼の免疫染色で、CNV に CXCL10 の発現を認めたとする過去の報告⁴⁷ と矛盾しない結果である。これらの報告と本研究結果は共に、CNV 発生に CXCR3 や CXCL10 が何らかの形で関わっていることを示唆している。

CXCR3 は 7 回膜貫通型 G タンパク質共役受容体のひとつである。これまで幾つかの CXCR3 に関する実験報告^{14, 15, 40-43, 46} が、CXCR3 へのシグナルが抗血管新生作用を持つことを示唆している。ヒト CXCR3 には CXCR3-A と CXCR3-B という 2 つのスプライシング・バリエントがあり、これらはお互いに異なる機能を持つ。

CXCR3-A は主に 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) やナチュラルキラー (NK) 細胞表面に発現され、主要なリガンドである CXCL10, CXCL9, CXCL11 などのケモカインと結合し、受容体へのシグナルはこれらの遊走に働くが、CXCR3-B は創傷治癒過

程の組織や腫瘍の新生血管内皮に発現し、そのシグナルは血管新生抑制や腫瘍発育抑制に働く^{41, 42, 48}。このような2つのスプライシング・バリエントはマウスに於いては存在しないが⁴⁹、CXCR3は元々ヒトより先にマウスの血管内皮細胞に同定された分子であり⁵⁰、CXCR3やCXCL10が血管新生抑制作用を持つことが幾つかのマウス・ラットの動物実験で証明されており^{40, 51, 52}、そのうちの一つ⁴⁰はマウスの創傷モデルにおいて、CXCR3欠損マウスでは血管新生が亢進すると報告している。

本研究において、mouse recombinant CXCL10の硝子体注射ではレーザー誘発性CNVの蛍光漏出・サイズ共に影響を受けなかった。しかしながら、抗CXCL10中和抗体の硝子体注射は上述のようにCNV発生を促進した。この理由としては、先ずレーザー誘発性CNVモデルの、AMD疾患モデルとしての限界が挙げられる。AMDの臨床においてヒトCNVは数年間という時間をかけて徐々に発生してくることが多く、慢性の経過を示すことが一般的であるのに対して、レーザー誘発性CNVはレーザー照射による眼底の外傷後、眼内に強い炎症を起こし、数日でCNVが発生するという急性の経過を示す。このようなモデルでは、実際のAMDの場合よりも強く急激なサイトカイン発現が予想される。すなわち今回の実験では、マウス眼底にレーザーを照射後、眼内の内因性CXCL10発現がCNVに発現するCXCR3を飽和させる程度まで亢進した為、そこへ眼外からCXCL10を追加投与し

てもそれ以上の CNV 抑制効果を示さなかったという可能性が考えられる。それとは対照的に、抗 CXCL10 中和抗体や抗 CXCR3 中和抗体の投与では、レーザー照射後に CNV 発生を代償的に抑制するべく発現亢進した内因性 CXCL10 の働きを各中和抗体が抑制し、結果として CNV 発生を促進したと考えられる。慢性の経過を示すヒトの滲出型加齢黄斑変性の場合に、CXCL10 発現が CXCR3 を飽和させる程度まで上昇しないと仮定すれば、眼内への CXCL10 投与がヒト滲出型加齢黄斑変性の CNV を抑制する可能性は十分考えられる。また、今回の実験における CNV の評価は一律にレーザー照射 7 日目に行ったが、レーザー照射後 1 日目から毎日の time course を調べていくことで CXCL10 硝子体注射による効果を検出できた可能性はあると考えられた。

また、CXCL10 の硝子体投与量が不十分であった可能性も考えられる。今回の実験における mouse recombinant CXCL10 の投与量は、過去の in vivo での実験報告^{40, 43}における投与量と、現在 AMD 症例に治療として硝子体投与する抗 VEGF 抗体由来治療薬の硝子体中モル濃度を参考にして算出した。従ってもしレーザー誘発性 CNV モデルがヒトの AMD と同様の状態をシミュレート出来ていると仮定すれば、今回の投与量が有効投与量と言えるが、前述のようにこのモデルは実際の疾患とは異なる眼内環境にある可能性が想定されるので、本実験のようにレーザー照射直後あるいは 3 日後の単回投与のみでは効果が得られなかった可

能性が考えられる。例えば照射直後と3日目の2回、あるいは3回など複数回の硝子体内投与をしていれば、recombinant CXCL10 硝子体投与の CNV 抑制効果を確認することが出来たのかもしれない。しかしマウス硝子体注射は比較的難しい手技で、単回投与のみでも1～2割の確率で外傷性白内障や網膜剥離が起こり、CNV の蛍光漏出やサイズが測定不可となるため、実際に複数回硝子体注射を行うことは極めて困難であった。

CNV 発生時における CXCL10 の供給源としては、RPE 細胞と各種炎症細胞そして CNV の血管内皮細胞が考えられる。ヒト胎児 RPE 細胞の実験報告によれば、培養 RPE 細胞は CXCR3 の3つの主要リガンド・ケモカインである CXCL9, CXCL10, CXCL11 全てを発現することが報告されており¹⁷、この RPE 細胞が何らかのストレスを受けることでこれらケモカインの発現亢進を来す可能性がある。ただしヒト AMD の末期や、マウスであれば広く広範なレーザー照射を受けた場合などは多くの RPE 細胞が死滅してしまうので、逆にケモカイン供給源としての重要性は低くなると想定される。一方、白血球や炎症細胞に関して言えば、リンパ球、単球、マクロファージ、線維芽細胞など多くの白血球・炎症細胞、あるいは血管内皮細胞が IFN- γ の刺激により CXCL10 を発現・分泌することが知られている。これらの細胞は全てヒトの滲出型 AMD の CNV 組織に認められるもので⁵³、これらの細胞が CNV 局所やその周辺に遊走し、結果的に CXCL10 の主要な供給源

となっている可能性が高いと考えられる。本研究では CXCR3 欠損マウスのみならず野生型マウスにおいても多数のマクロファージが CNV 局所に確認された。今回の実験ではその他の炎症細胞の局所遊走は評価していないが、マクロファージやその他の炎症細胞、線維芽細胞やあるいは CNV の血管内皮そのものが CXCL10 の供給源になっている可能性があると考えられた。

CXCR3 の各リガンド・ケモカインとの結合親和性に関しては、Lasagni ら⁴¹はヒト血管内皮細胞の実験において、CXCL10 が最も強く、次いで CXCL11, CXCL9 の順であったと報告している。更にこれらのケモカインの血管新生抑制に関する実験では、私の調べる限り CXCL10 が最も多く報告されていて、かつ本実験のマイクロアレイや real time RT-PCR では CXCL10 のみ発現亢進を示し、CXCL11, CXCL9 は発現亢進を示さなかった為、本研究では CXCL11, CXCL9 に関してそれ以上の実験的検討を行わなかった。しかしヒト微小血管内皮細胞を使用した in vitro の実験報告^{45, 46}によれば、CXCL10 のみならず CXCL9, CXCL11 も同様に内皮細胞の遊走や増殖を抑制したと報告している。従って、本研究においても CXCL9, CXCL11 がレーザー誘発性 CNV と何らかの関連を示した可能性はあり、これらのケモカインの硝子体投与や CXCL10 との併用投与が CNV 抑制効果を示す可能性はある。

CXCR3を介した抗血管新生効果の分子生物学的なメカニズムはまだ不明である。

In vitro実験に関する既報⁴³によれば、VEGFの働きでm-calpainが活性化して血管新生が起きるのであるが、CXCL10はCXCR3と結合することにより、このm-calpain活性化を抑制するシグナルを出し、結果的に血管新生抑制を抑制すると報告している。本研究では、野生型マウスとCXCR3欠損マウスのレーザー照射眼においてVEGF発現レベルの差を認めなかったため、CXCR3やCXCL10によるCNVへの作用経路がVEGFの経路とは独立に存在していると推察される。同様に、PEDFやC3のmRNA発現が野生型マウスのレーザー照射眼とCXCR3欠損マウスのレーザー照射眼の間で差が無かったことから、CXCR3やCXCL10によるCNVへの作用経路がPEDFやC3とも独立して存在すると考えられる。

また、CXCR3による血管新生抑制効果が、新生血管内皮に発現するCXCR3によるもののみではない可能性も考えられる。炎症細胞表面のCXCR3とそのリガンド・ケモカインの結合シグナルは、CXCR3を発現するT細胞やNK細胞の遊走を惹起することでTh1依存性炎症反応を引き起こし、それが血管新生を抑制するという考えもある。このメカニズムは” immunoangiostasis” と呼ばれ、過去に報告されている^{54, 55}。肺非小細胞癌の動物モデルを扱った既報によれば^{56, 57}、IFN- γ 、CXCL10、CXCL9等のTh1系サイトカインによる細胞免疫反応の導入により、腫瘍関連の血管新生が抑制され、結果的に腫瘍の成長が抑制されたと報告されている。本研究に於いても、CXCR3欠損マウスや抗CXCL10中和抗体／抗CXCR3中和抗

体投与眼にこのような” immunoangiostasis” と呼ばれる血管新生抑制作用が働かなかったと考えれば、これらのマウス眼でCNV発生が促進されていた理由の一つとして考えられる。ただし、新生血管内皮に発現するCXCR3のシグナルによる直接の血管新生抑制機序とTh1細胞/NK細胞表面に発現するCXCR3のシグナルによる” immunoangiostasis” の機序をのどちらがどの程度今回のレーザー誘発性マウスCNVモデルに働いていたかということを同定するのは困難であると考えられた。

今回の研究において、CNV部位へのマクロファージ遊走とレーザー照射眼のCCL2発現がCXCR3欠損マウスにおいて野生型マウスに比較して亢進していたのであるが、このCCL2とその主な受容体であるCCR2は、CNV形成に関わる分子として近年注目されているものである^{10, 58}。CCR2はマクロファージ表面に表面に発現し、CCL2と反応することでマクロファージの遊走を亢進させる機能を持つが、レーザー誘発性CNVモデルにおいてCCR2が欠損すると、毛細血管系への白血球接着が抑制され、血管内から単球系細胞が血管周囲組織へ血管外遊走をするのを抑制する³³。これらの最近のCCL2/CCR2に関する実験報告は、CCL2が単球系細胞やマイクログリア細胞の動員・遊走に関わっている分子であることを示唆している。更に最近の臨床研究報告¹⁸によれば、滲出型加齢黄斑変性症例において眼内のCCL2濃度が上昇していることが示されている。このように、CCL2/CCR2とマクロ

ファージの関連を示した既報^{33, 59}と照らし合わせて、本研究においてCXCR3欠損マウスでマクロファージ動員・遊走と局所CCL2発現が亢進していたことが、このマウスでのより大きなCNV形成につながったと考えることができる。しかしながら、上述のとおり細胞免疫においてCCL2は主に単球系に関連するのに対し、CXCR3は主にTh1細胞に働くとされている⁶⁰。従って、CXCR3欠損マウスでCCL2発現が上昇しているのが単にこのマウスでのCNV発生促進に伴う付帯徴候なのか、あるいはCXCR3のシグナルとCCL2の発現に何らかのcrosstalkがあるのかどうかということに関しては、今後の更なる研究テーマとして提言したい。

結論

私の今回の研究において、CNV 内皮に発現する CXCR3 からの直接的シグナルあるいは CNV 内皮に限らず Th1 や NK 細胞などの炎症細胞に発現する CXCR3 からのシグナルによる” immunoangiostasis” からの間接的な作用によって CNV を抑制することが出来る可能性が示されたといえる。加齢黄斑変性の治療標的に関しては国際的にも関心の高い分野であり、本研究の成果を眼科の英文雑誌に投稿することができた(Fujimura S, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2012)。また、本研究と前後して CXCR3 のリガンド monokine induced by interferon γ (MIG; CXCL9) と interferon-inducible protein 10 (IP10; CXCL10) が、ヒト加齢黄斑変性眼で発現上昇していることも報告されている⁶¹。これらと本研究成果と考えると CXCR3 は加齢黄斑変性治療の新たな標的となりうると期待される。今後 CXCR3 とそのリガンド・ケモカインに関連する更なる研究によって、滲出型 AMD に対する新たな治療法の開発が望まれる。

謝辞

研究の機会を与えて下さり、約9年間にわたり終始御指導、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 新家眞名誉教授と、天野史郎教授に心より感謝申し上げます。

研究は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、東京大学大学院医学系研究科社会医学専攻社会予防医学講座分子予防医学 松島綱治教授 に深謝申し上げます。

最後に、日頃よりご助言、ご協力いただいております、眼科 黄斑外来の皆様 に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Klaver CC, Wolfs RC, Vingerling JR, Hofman A, de Jong PT. Age-specific prevalence and causes of blindness and visual impairment in an older population: the Rotterdam Study. *Arch Ophthalmol* 1998;116:653-658.
2. Attebo K, Mitchell P, Smith W. Visual acuity and the causes of visual loss in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 1996;103:357-364.
3. Maruko I, Iida T, Saito M, Nagayama D, Saito K. Clinical characteristics of exudative age-related macular degeneration in Japanese patients. *Am J Ophthalmol* 2007;144:15-22.
4. Crabb JW, Miyagi M, Gu X, et al. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:14682-14687.
5. Marin-Castano ME, Csaky KG, Cousins SW. Nonlethal oxidant injury to human retinal pigment epithelium cells causes cell membrane blebbing but decreased MMP-2 activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:3331-3340.
6. Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, Johnson LV, Anderson DH, Mullins RF. 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* 2001;20:705-732.
7. Mullins RF, Aptsiauri N, Hageman GS. Structure and composition of drusen associated with glomerulonephritis: implications for the role of complement activation in drusen biogenesis. *Eye (Lond)* 2001;15:390-395.
8. Mullins RF, Russell SR, Anderson DH, Hageman GS. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J* 2000;14:835-846.
9. Yoshie O, Imai T, Nomiyama H. Chemokines in immunity. *Adv Immunol* 2001;78:57-110.
10. Ambati J, Anand A, Fernandez S, et al. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med* 2003;9:1390-1397.

11. Tuo J, Bojanowski CM, Zhou M, et al. Murine ccl2/cx3cr1 deficiency results in retinal lesions mimicking human age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:3827-3836.
12. Takeda A, Baffi JZ, Kleinman ME, et al. CCR3 is a target for age-related macular degeneration diagnosis and therapy. *Nature* 2009;460:225-230.
13. Sengupta N, Afzal A, Caballero S, et al. Paracrine modulation of CXCR4 by IGF-1 and VEGF: implications for choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:2697-2704.
14. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, et al. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2000;68:1-8.
15. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 1995;270:27348-27357.
16. Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN, Belperio JA, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:593-609.
17. Shi G, Maminishkis A, Banzon T, et al. Control of chemokine gradients by the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:4620-4630.
18. Jonas JB, Tao Y, Neumaier M, Findeisen P. Monocyte chemoattractant protein 1, intercellular adhesion molecule 1, and vascular cell adhesion molecule 1 in exudative age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 128:1281-1286.
19. Combadiere C, Potteaux S, Rodero M, et al. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 2008;117:1649-1657.
20. Chan CC, Tuo J, Bojanowski CM, Csaky KG, Green WR. Detection of CX3CR1 single nucleotide polymorphism and expression on archived eyes with age-related macular degeneration. *Histol Histopathol* 2005;20:857-863.
21. Kitaura M, Nakajima T, Imai T, et al. Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3. *J Biol Chem* 1996;271:7725-7730.
22. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, et al. The chemokine receptor

CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998;393:591-594.

23. Yoneyama H, Matsuno K, Toda E, et al. Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. *J Exp Med* 2005;202:425-435.

24. Hancock WW, Lu B, Gao W, et al. Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. *J Exp Med* 2000;192:1515-1520.

25. Ryan SJ. The development of an experimental model of subretinal neovascularization in disciform macular degeneration. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1979;77:707-745.

26. Takahashi H, Obata R, Tamaki Y. A novel vascular endothelial growth factor receptor 2 inhibitor, SU11248, suppresses choroidal neovascularization in vivo. *J Ocul Pharmacol Ther* 2006;22:213-218.

27. Takahashi H, Yanagi Y, Tamaki Y, Uchida S, Muranaka K. COX-2-selective inhibitor, etodolac, suppresses choroidal neovascularization in a mice model. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:461-466.

28. Yanagi Y, Tamaki Y, Obata R, et al. Subconjunctival administration of bucillamine suppresses choroidal neovascularization in rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:3495-3499.

29. Yanagi Y, Tamaki Y, Inoue Y, Obata R, Muranaka K, Homma N. Subconjunctival doxifluridine administration suppresses rat choroidal neovascularization through activated thymidine phosphorylase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:751-754.

30. Kami J, Muranaka K, Yanagi Y, Obata R, Tamaki Y, Shibuya M. Inhibition of choroidal neovascularization by blocking vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase. *Jpn J Ophthalmol* 2008;52:91-98.

31. Rohrer B, Long Q, Coughlin B, et al. A targeted inhibitor of the alternative complement pathway reduces angiogenesis in a mouse model of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:3056-3064.

32. Edelman JL, Castro MR. Quantitative image analysis of laser-induced choroidal neovascularization in rat. *Exp Eye Res* 2000;71:523-533.

33. Tsutsumi C, Sonoda KH, Egashira K, et al. The critical role of ocular-infiltrating macrophages in the development of choroidal neovascularization. *J Leukoc Biol* 2003;74:25-32.

34. Jasielska M, Semkova I, Shi X, et al. Differential role of tumor

necrosis factor (TNF)-alpha receptors in the development of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:3874-3883.

35. Ishibashi T, Hata Y, Yoshikawa H, Nakagawa K, Sueishi K, Inomata H. Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997;235:159-167.

36. Renno RZ, Youssri AI, Michaud N, Gragoudas ES, Miller JW. Expression of pigment epithelium-derived factor in experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:1574-1580.

37. Bora PS, Sohn JH, Cruz JM, et al. Role of complement and complement membrane attack complex in laser-induced choroidal neovascularization. *J Immunol* 2005;174:491-497.

38. Takahashi H, Tamaki Y, Ishii N, et al. Identification of a novel vascular endothelial growth factor receptor 2 inhibitor and its effect for choroidal neovascularization in vivo. *Curr Eye Res* 2008;33:1002-1010.

39. Kiefer F, Siekmann AF. The role of chemokines and their receptors in angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 68:2811-2830.

40. Bodnar RJ, Yates CC, Rodgers ME, Du X, Wells A. IP-10 induces dissociation of newly formed blood vessels. *J Cell Sci* 2009;122:2064-2077.

41. Lasagni L, Francalanci M, Annunziato F, et al. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med* 2003;197:1537-1549.

42. Yang J, Richmond A. The angiostatic activity of interferon-inducible protein-10/CXCL10 in human melanoma depends on binding to CXCR3 but not to glycosaminoglycan. *Mol Ther* 2004;9:846-855.

43. Bodnar RJ, Yates CC, Wells A. IP-10 blocks vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and tube formation via inhibition of calpain. *Circ Res* 2006;98:617-625.

44. Sreekumar PG, Zhou J, Sohn J, et al. N-(4-hydroxyphenyl) retinamide augments laser-induced choroidal neovascularization in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:1210-1220.

45. Salcedo R, Resau JH, Halverson D, et al. Differential expression and responsiveness of chemokine receptors (CXCR1-3) by human microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells. *FASEB J* 2000;14:2055-2064.

46. Romagnani P, Annunziato F, Lasagni L, et al. Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J Clin Invest* 2001;107:53-63.
47. Mo FM, Proia AD, Johnson WH, Cyr D, Lashkari K. Interferon gamma-inducible protein-10 (IP-10) and eotaxin as biomarkers in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:4226-4236.
48. Feldman ED, Weinreich DM, Carroll NM, et al. Interferon gamma-inducible protein 10 selectively inhibits proliferation and induces apoptosis in endothelial cells. *Ann Surg Oncol* 2006;13:125-133.
49. Campanella GS, Colvin RA, Luster AD. CXCL10 can inhibit endothelial cell proliferation independently of CXCR3. *PLoS One* 5:e12700.
50. Soto H, Wang W, Strieter RM, et al. The CC chemokine 6Ckine binds the CXC chemokine receptor CXCR3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8205-8210.
51. Luster AD, Cardiff RD, MacLean JA, Crowe K, Granstein RD. Delayed wound healing and disorganized neovascularization in transgenic mice expressing the IP-10 chemokine. *Proc Assoc Am Physicians* 1998;110:183-196.
52. Yates CC, Whaley D, Kulasekeran P, et al. Delayed and deficient dermal maturation in mice lacking the CXCR3 ELR-negative CXC chemokine receptor. *Am J Pathol* 2007;171:484-495.
53. Nussenblatt RB, Ferris F, 3rd. Age-related macular degeneration and the immune response: implications for therapy. *Am J Ophthalmol* 2007;144:618-626.
54. Balestrieri ML, Balestrieri A, Mancini FP, Napoli C. Understanding the immunoangiostatic CXC chemokine network. *Cardiovasc Res* 2008;78:250-256.
55. Pan J, Burdick MD, Belperio JA, et al. CXCR3/CXCR3 ligand biological axis impairs RENCA tumor growth by a mechanism of immunoangiostasis. *J Immunol* 2006;176:1456-1464.
56. Sharma S, Yang SC, Hillinger S, et al. SLC/CCL21-mediated anti-tumor responses require IFNgamma, MIG/CXCL9 and IP-10/CXCL10. *Mol Cancer* 2003;2:22.
57. Hillinger S, Yang SC, Zhu L, et al. EBV-induced molecule 1 ligand chemokine (ELC/CCL19) promotes IFN-gamma-dependent antitumor responses in a lung cancer model. *J Immunol* 2003;171:6457-6465.

58. Yamada K, Sakurai E, Itaya M, Yamasaki S, Ogura Y. Inhibition of laser-induced choroidal neovascularization by atorvastatin by downregulation of monocyte chemotactic protein-1 synthesis in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:1839-1843.
59. Luhmann UF, Robbie S, Munro PM, et al. The drusenlike phenotype in aging Ccl2-knockout mice is caused by an accelerated accumulation of swollen autofluorescent subretinal macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:5934-5943.
60. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 1998;187:875-883.
61. Newman AM, Gallo NB, Hancox LS, et al. Systems-level analysis of age-related macular degeneration reveals global biomarkers and phenotype-specific functional networks. *Genome Med* 4:16.