

論文の内容の要旨

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

氏名：藤村 茂人

【序文】

世界の先進国においては脈絡膜新生血管 (CNV) による滲出型加齢黄斑変性 (AMD) が中途失明原因の主要な疾患である。この発症には、脈絡膜や網膜色素上皮 (RPE) での慢性炎症が部分的に関与すると考えられている。

CXC ケモカインは N 末端側に 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) ものは一般的に血管新生促進に働き、ELR motif を有しない (ELR negative) ものは血管新生抑制に働く傾向にあると報告されている。また、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) をヒト RPE 細胞は発現することが分かっているが、これらの CNV 発生における役割は不明である。

【目的】

第一に、AMD 治療の新たな標的となりうるケモカイン・ケモカイン受容体分子を発見すること。第二に、その結果着目した CXCR3 とそのリガンド・ケモカインの CNV 発生に与える影響を調べること。

【対象・方法】

- 野生型 C57BL/6 (WT) マウスあるいは CXCR3 欠損 (CXCR3KO) マウス 10~18 週齢オスを使用した。CNV 作成にあたっては、マウスに全身麻酔を施し、瞳孔を散瞳させ、カバーグラスを接触型レンズとして用い、細隙灯を通じてダイオードレーザーを眼底に照射した。
- DNA マイクロアレイにおいては、WT マウスの片眼に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日後に両眼球を採取、網膜色素上皮/脈絡膜 (RPE/Choroid) を眼球より分離し、messenger RNA (mRNA) を抽出し、gene chip array にハイブリダイズして、マイクロアレイを行った。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) においては、WT マウス、あるいは CXCR3KO マウスの片眼に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)。レーザー3日後に RPE/Choroid の messenger RNA (mRNA) を抽出、cDNA を調整した。CXCR3 とその3つの主要リガンドである CXCL10, CXCL9, CXCL11 について、また WT マウスと CXCR3KO マウスの比較実験では、血管内皮増殖因子 (VEGF)、pigment epithelium-derived factor (PEDF)、CCL2、Complement component 3 (C3) について行った。それぞれの遺伝子の発現量は GAPDH の発現量を元に補正した。
- 組織免疫染色においては、ヒト AMD 眼の CNV と、マウスレーザー誘発性 CNV に対して行った。ヒト CNV 組織は、パラフィン切片を抗 CXCR3 抗体で反応させたのち、標準的な immunoperoxidase procedure を施し、diaminobenzamine (DAB) で発色させた。マウス CNV は、レーザー照射 7 日後に眼球採取し、凍結切片をアセトン固定した。一次抗体は抗 CXCR3 抗体と抗 CD31 抗体の二重染色とした。
- レーザー誘発性 CNV の定量においては、レーザー照射を 3 発/眼ずつ行い、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 (FA) を行い、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 サイズの定量を行った。
- 抗 CXCR3/抗 CXCL10 中和抗体のマウス硝子体注射においては、WT マウスの両眼へレーザー照射後、ランダムに 3 つのグループへ分けた (各 n=8~10)。グループ①はレーザー照射後即座に control IgG、グループ②は抗 CXCR3 中和抗体、グループ③は抗 CXCL10 中和抗体を硝子体内注射した。その後上述のとおり CNV を定量した。
- Recombinant CXCL10 のマウス硝子体注射においては、WT マウスの両眼へ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 (各 n=8~10)。グループ①はレーザー

一照射直後に PBS を硝子体内注射し、グループ②はレーザー照射直後に recombinant mouse CXCL10 を硝子体内注射した。その後上述のとおり CNV を定量した。また、薬剤の眼内投与日をレーザー照射 3 日目に変更した実験も別に行った。

- マクロファージ遊走試験においては、WT/CXCR3KO マウス (各 n = 8) 両眼にレーザー照射し、3 日目に脈絡膜フラットマウント標本を作成。Alexa 488 標識抗 F4/80 抗体で染色し、各レーザー照射部位に存在する F4/80 陽性細胞 (マクロファージ) の数を計測した。
- 統計学的手法は、マイクロアレイの結果のデータ解析には装置に付属する内在プログラムを使用し、統計処理を行った。その他の結果の統計学的解析には SPSS software を用いた。FA における CNV からの蛍光漏出の評価や 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。マクロファージ遊走試験や real-time PCR 結果の統計学的解析には 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。

【結果】

DNA マイクロアレイ

解析対象とした 60 種類の分子のうち 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。この中で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分子を選別し、更に、既に CNV との関連が報告されている分子を除外した結果、最終的に CXCR3, CXCL10 に着目し、研究を進めることにした。

RT-PCR

レーザー照射眼の RPE/choroid では対照眼より 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 の中では、CXCL10 のみ発現上昇を認めた。

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。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。

CNV の比較 : WT マウス vs CXCR3KO マウス

FA では、WT マウスに比較して CXCR3KO マウスで有意に強い蛍光漏出を認め ($p < 0.01$)、フラットマウントでは、WT マウスに比較して CXCR3KO マウスで有意に大きい CNV を認めた ($p < 0.01$)。

CNVの比較：抗 CXCR3 中和抗体／抗 CXCL10 中和抗体投与 vs control IgG

FA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 ($p < 0.05$ and $p < 0.01$)。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 ($p < 0.01$)。

CNVの比較：Recombinant CXCL10 投与 vs PBS 投与

薬剤をレーザー照射直後に投与した場合、3日後に投与した場合いずれにおいても、FAによる蛍光漏出に有意差を認めず、フラットマウントでのCNV面積も有意差を認めなかった。

CNV 部位へのマクロファージ遊走試験

レーザー照射部位へのF4/80陽性細胞(マクロファージ)集積は、CXCR3KOマウスにおいてWTマウスに比して有意に亢進していた ($p < 0.01$)。

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

レーザー照射3日後におけるVEGF、PEDF、C3のmRNA発現と、VEGF/PEDF発現量比の上昇倍率は、WTマウスとCXCR3KOマウス間で差がなかったが、CCL2のmRNA発現は、CXCR3KOマウスでWTマウスに比して有意に高い発現を認めた ($p < 0.05$)。

【考察・結論】

本研究において、CNV発生に対しCXCR3やCXCL10が抑制効果を持つ可能性が示唆された。Recombinant CXCL10の眼内投与ではCNV抑制効果が得られなかったが、これ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可能性が理由の一つとして考えられる。

また、WT/CXCR3KOマウスのreal time RT-PCR結果より、CXCR3やCXCL10によるCNVへの作用経路がVEGF、PEDFやC3の経路とは独立に存在していると推察される。

一方、CXCR3KO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から、CXCR3のシグナルとCCL2の発現に何らかの関連がある可能性が示唆された。