

審査の結果の要旨

氏名：藤村 茂人

本研究は、滲出型加齢黄斑変性(wet AMD)の原因である脈絡膜新生血管(CNV)とケモカイン受容体 CXCR3、そのリガンドの一つである CXCL10 の関連を明らかにするため、wet AMD の動物モデルであるレーザー誘発性 CNV モデルを用いて、それらの分子が CNV 発生に与える効果を検証したものであり、下記の結果を得ている。

1. レーザー照射 (CNV 誘発) 眼の網膜色素上皮/ 脈絡膜 (RPE/Choroid) への DNA マイクロアレイでは、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 に着目した。

2. Real-time RT-PCR において、レーザー照射眼の RPE/Choroid では対照眼に比較して 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。

3. 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。

4. 野生型(WT)マウスと CXCR3 欠損(CXCR3KO)マウス眼球にレーザー照射し、7 日後の CNV を比較したところ、蛍光眼底造影(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、脈絡膜フラットマウント標本では、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。

5. WT マウス眼球にレーザー照射し、抗 CXCR3 中和抗体、抗 CXCL10 中和抗体、または control IgG を硝子体投与し CNV を比較したところ、FA において、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蛍光漏出増大を認めた。脈絡膜フラットマウント標本でも、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。

6. WT マウス眼球にレーザー照射し、Recombinant CXCL10、または PBS を硝子体投与し、CNV を比較したところ、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。

7. CXCR3KO マウスで CNV が拡大する機序を解明するため、CNV 部位へのマクロファージ遊走試験を行った。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。

8. CXCR3KO マウスで CNV が拡大する機序を更に調べるため、Real-Time RT-PCR による各種サイトカイン messenger-RNA (mRNA) 発現の比較を行った。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。

以上の結果より、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か、あるいは投与回数や投与量が不十分であった可能性が考えられる。

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。

以上、本論文は CXCR3 と CXCL10 のシグナルが CNV 抑制効果を持つ可能性を示したといえる。現在の wet AMD 治療の主軸である VEGF 抑制以外の治療法開発や疾患の発症メカニズム解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。