

論文の内容の要旨

論文題目 アドレノメジュリンの網膜色素上皮細胞及び脈絡膜新生血管に及ぼす影響

氏名 湯田健太郎

加齢黄斑変性 (Age related macular degeneration; AMD) とは、網膜中心部の黄斑が加齢に伴い変性を起こす疾患である。特に滲出型 AMD は脈絡膜新生血管 (Choroidal neovascularization; CNV) を伴い、網膜・脈絡膜管のバリア機構が破壊されることによって黄斑部機能が著しく低下し、欧米では以前より中途失明の第一の原因としてあげられ、本邦においても高齢化社会の進行に伴い患者数が増大している。

近年、AMD の病態に補体因子、特に補体副経路の抑制因子として知られる補体 H 因子 (Complement factor H; CFH) が関与することが網羅的遺伝子多型解析及び組織学的解析により明らかになった。CFH の AMD への病態関与について様々な検討が進んでいる。その一つとして、Y402H 多型により補体副経路が活性化し、補体複合体がドルーゼンに蓄積して慢性炎症が引き起こされ、その結果 AMD が誘発されるとの報告がされる。これ以外にも、Y402H 多型は C-reactive protein (CRP) との結合力が低下し、相互の生理作用が低下することで細胞内の不要代謝産物が蓄積し、炎症が誘発されることにより AMD が引き起こされるとも報告されている。しかしながら、CFH は CRP 以外の因子とも複合体を形成してさまざまな作用を示すため、補体または CRP を介さずに AMD の病態に関与する可能も考えられる。

そのため今回の検討では、補体及び補体に関連因子の脈絡膜新生血管発生過程における作用を検討するために、以下の実験を行った。

1. レーザー誘発性新生血管モデルにおける網羅的遺伝子発現解析によるアドレノメジュリンの同定

マウスの眼底にレーザー誘発性 CNV を作成、網膜色素上皮および脈絡膜においてマイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析をおこなった。補体に注目して解析を行ったところ、CNV を誘発したマウスでは補体古典経路の C1q 及び C4 と補体副経路の C3 の発現上昇が認められた。また、AMD の原因遺伝子として最も関連性の強い CFH に結合するとしめされている因子、CRP, Fibromodulin, Adrenomedullin (ADM) について検討を行ったところ、ADM のみ発現上昇が認められることがわかった。ADM の網膜における発現解析のために In-situ RT-PCR を行ったところ、正常網膜において神経節細胞層、内顆粒層、外顆粒層、網膜色素上皮での発現が認められた。CNV を誘発した網膜では CNV 周囲の間質細胞、網膜色素上皮において強い発現が認められた。この結果より滲出型 AMD に対する ADM の病態関与が疑い、ADM の CNV における機能解析を行うこととした。

2. アドレノメジュリンの脈絡膜新生血管に対する作用の検討

ADM の網膜における作用を検討するために ADM ヘテロ欠損マウスの組織学的解析を行ったところ、網膜血管、網膜、網膜色素上皮、ブルッフ膜、脈絡膜血管いずれにおいても異常所見は認められなかった。ADM ヘテロ欠損マウス及び野生型マウスにレーザー誘発性 CNV を作成したところ、野生型マウスと比べ ADM ヘテロ欠損マウスでは CNV が有意に大きかった。さらに野生型マウスの眼内に ADM を投与した群では、PBS を投与した群と比較して CNV の縮小が認められた。また、抗 VEGF-A 抗体を眼内に投与して ADM を投与したものと比較したところ、ADM の CNV 抑制効果は抗 VEGF 抗体を投与したものと同程度の効果であることがわかった。これより ADM の CNV 抑制作用が明らかになった。

3. アドレノメジュリンの脈絡膜新生血管抑制メカニズムの解析

レーザー照射後に脈絡膜伸展標本を作成、マクロファージ数を計測したところ、ADM ヘテロ欠損マウスでは野生型マウスと比較して CNV 周囲のマクロファージを多く認めた。

また、メンブレン上にマウスマクロファージ細胞培養株 RAW264.7 に置き、メンブレン下に網膜色素上皮細胞培養株 D407 の培養上清を浸してメンブレン下に走化したマクロファージ数を計測することによりマクロファージの走化能を検討する *in vitro* macrophage migration assay を行った。assay 直前の ADM 添加では走化能に変化は認められなかったが、ADM を添加して培養した D407 の培養上清では、ADM を添加しなかったものと比較してマクロファージの走化能は有意に抑制された。この結果より、ADM のマクロファージ抑制メカニズムとして、網膜色素上皮においてマクロファージ誘導因子を抑制していると推定した。網膜色素上皮で発現する因子でマクロファージの走化能を活性化して新生血管を増悪する因子として CCL2 に注目し、解析を行った。*In vitro* では D407 に ADM を添加して培養を行い、24 時間後に *real time* RT-PCR 及び ELISA を用いた CCL2 の発現解析を行った。その結果 ADM を付加したものは、付加していないものと比較して VEGF-A,B の発現変動に変化はなかったが、CCL2 の発現抑制が認められた。*In vivo* では ADM ヘテロ欠損マウスの網膜色素上皮及び脈絡膜において *real time* RT-PCR 及び ELISA を用いた CCL2 の発現解析を行った。その結果 ADM ヘテロ欠損マウスは野生型マウスに比べ CCL2 の発現が大きかった。さらに CCL2 ホモ欠損マウスの眼内に ADM を投与、CNV を評価したところ ADM の CNV 抑制効果は有意に減少した。

これらの研究結果をまとめると、ADM の CNV 抑制効果は網膜色素上皮における CCL2 の発現抑制とそれに伴う CNV へのマクロファージ集積抑制によるものであることが分かった。近年 AMD の治療法として CNV の増悪因子として VEGF-A に対する中和抗体を用いた抗 VEGF 治療法が主流であり、良好な治療成績を得られている。しかしながら、VEGF の抑制による細胞障害の懸念と抗 VEGF 治療に抵抗を示す症例の存在により新たな治療法が求められている。ADM の CNV 抑制効果は抗 VEGF-A 抗体と同程度であることと、VEGF-A を抑制しないことより、アドレノメジュリンが滲出型 AMD の新たな創薬ターゲットとなりうる事が本研究により示された。

今後の課題として、ADM の眼内投与による安全性と ADM の CNV 抑制メカニズムのさらなる検討が必要であると考えられる。