

## 〔課程-2〕

### 審査の結果の要旨

氏名 湯田健太郎

本研究は脈絡膜新生血管発生課程において重要な役割を演じていると考えられる補体因子に関連する因子の病態関与を明らかにするため、下記の研究を行い、結果を得ている。

1. マウスの眼底にレーザー照射を行うことで脈絡膜新生血管を誘発し、網膜色素上皮、脈絡膜、脈絡膜新生血管から RNA を採取し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。脈絡膜新生血管発生に重要な因子とされる補体 H 因子に関連する因子の発現に注目して解析を行ったところ、脈絡膜新生血管を誘発したマウスの網膜色素上皮細胞、脈絡膜、脈絡膜新生血管ではアドレノメジュリンの発現上昇が認められ、**real time RT-PCR** でも同様な結果が得られた。
2. **In-situ RT-PCR** を用いてアドレノメジュリン発現部位の解析を行ったところ、正常網膜において神経節細胞層、内顆粒層、外顆粒層、網膜色素上皮細胞層での発現が認められた。脈絡膜新生血管を誘発した網膜では、脈絡膜新生血管周囲の間質細胞、網膜色素上皮細胞層において強い発現が認められた。
3. アドレノメジュリン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、網膜色素上皮細胞、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。
4. アドレノメジュリンヘテロ欠損マウス及び野生型マウスにレーザー誘発性脈絡膜新生血管を作成したところ、野生型マウスと比べアドレノメジュリンヘテロ欠損マウスでは脈絡膜新生血管が有意に大きかった。さらに野生型マウスの眼内にアドレノメジュリンを投与した群では、**PBS** を投与した群と比較して脈絡膜新生血管の縮小が認められた。これよりアドレノメジュリンの脈絡膜新生血管抑制作用が明らかになった。
5. 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、アドレノメジュリンヘテロ欠損マウスでは野生型マウスと比較して脈絡膜新生血管周囲のマクロファージを多く認めた。
6. メンブレン上にマウスマクロファージ細胞培養株 **RAW264.7** を置き、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、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 直前のアドレノメ

ジュリン添加では走化能に変化は認められなかったが、アドレノメジュリンを添加して培養した D407 の培養上清では、アドレノメジュリン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、アドレノメジュリンは網膜色素上皮細胞由来のマクロファージ遊走因子を調節すると考えられた。

7. D407 にアドレノメジュリンを添加し、24 時間後に real time RT-PCR 及び ELISA を用いてマクロファージ遊走因子である CCL2 の発現解析を行ったところ、アドレノメジュリンを付加したものは、付加していないものと比較して CCL2 の発現抑制が認められた。
8. アドレノメジュリンヘテロ欠損マウスの網膜色素上皮細胞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ところ、アドレノメジュリン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。
8. CCL2 ホモ欠損マウスの眼内にアドレノメジュリンを投与し、脈絡膜新生血管を評価したところ、CCL2 ホモ欠損マウスではアドレノメジュリンの脈絡膜新生血管抑制作用は認められなかった。

以上より、アドレノメジュリンの脈絡膜新生血管抑制効果は、網膜色素上皮細胞における CCL2 の発現抑制とそれに伴う脈絡膜新生血管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。本研究はアドレノメジュリンの新たな分子メカニズムの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。