

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592552

研究課題名(和文)ケモカイン受容体を標的とした新たな加齢黄斑変性の治療戦略

研究課題名(英文)A chemokine receptor as a novel treatment target of age-related macular degeneration

研究代表者

柳 靖雄 (Yanagi, Yasuo)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90376442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では加齢黄斑変性に対する炎症性のサイトカインであるIP-10の役割を調査した。その結果、IP-10は脈絡膜新生血管モデルでは炎症性のマクロファージや網膜色素上皮細胞から産生されその受容体であるCXCR3を介して脈絡膜新生血管を抑制する事が示された。本研究で治療に難渋する加齢黄斑変性の新たな治療標的を同定し、新規の治療の可能性の道が開かれた。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the effects of inflammatory cytokine, IP-10, on choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. The results demonstrated that IP-10 is produced in the inflammatory macrophage and retinal pigment epithelial cells and inhibits choroidal neovascularization through its receptor, CXCR3. This study identified a new treatment target for age-related macular degeneration, a devastating condition leading to legal blindness.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学

キーワード：加齢黄斑変性 ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

世界の先進国において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CNVによる滲出型AMD(exudative AMD)がその大半を占めている。基礎的な加齢黄斑変性における炎症性サイトカインの重要性が分かり始めてきた。一方で、モデル動物と疾患における差異が明らかとなっており、モデル動物において様々なサイトカインが加齢黄斑変性と関連のある可能性が示唆されており、臨床上也患者検体を用いた研究によっていくつかのサイトカインが病態に関わる事が明らかとなってきた。現在加齢黄斑変性の治療はVEGFを標的とした抗VEGF療法が第一選択となっているが治療に難渋する症例も多く、治癒する症例がほとんどないために継続的に治療を行う必要がある。一方で、サイトカインなどを標的とした治療は他の疾患においても創薬がすすんでいる分野である。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。このため、もし、炎症性のサイトカインが加齢黄斑変性の治療の標的となるのであれば臨床上也有益な治療の開発につながるのではないかと考え、研究を行う事とした。

2. 研究の目的

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。本研究では研究開始当初は治療標的として着目されていない因子で加齢黄斑変性の病態に関わりうる因子を同定し、新たな治療標的を見いだす事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) モデル動物を用いて加齢黄斑変性の病態を作成し、モデル動物において発現の変動がみられるサイトカインについて網羅的に検討を行った。その結果、変動がみられた因子で、かつ、これまでに知られていない因子について脈絡膜新生血管に対する影響を検討した。

(2) in vivo では脈絡膜新生血管モデルを作成し、マウスにおいて表記の方法で同定したサイトカインに対する中和抗体を用いて脈絡膜新生血管に対する影響を検討した。

(3) 上記の受容体のノックアウトを用いて脈絡膜新生血管モデルを作成し、その解析を行った。

(4) さらに、その分子メカニズムを明らかにするためにこれまでに加齢黄斑変性において知られている因子について発現変動を解析した。

本研究の動物実験に関しては、The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)の動物実験に関する指針(ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research)に従い取り扱った。野生型C57BL/6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。

4. 研究成果

(1) モデル動物を用いてサイトカインを網羅的に解析し本研究の結果、これまでは加齢黄斑変性に対する関与が疑われていたものの、その機能が知られていなかったIP-10が加齢黄斑変性と密接に関連している事が判明した。

Unigene	Gene name	Fold change
Mm_137	C-C chemokine ligand 6	5.51
Mm_867	C-C chemokine ligand 12	4.53
Mm_290320	C-C chemokine ligand 2	3.92
Mm_332490	C-X-C chemokine ligand 4	3.88
Mm_14302	C-C chemokine receptor 5	3.53
Mm_41988	C-C chemokine ligand 17	3.37
Mm_274927	C-C chemokine receptor 1	3.24
Mm_341574	C-C chemokine ligand 7	3.11
Mm_6272	C-C chemokine receptor 2	2.93
Mm_42029	C-C chemokine ligand 8	2.77
Mm_4660	C-X-C chemokine ligand 5	2.37
Mm_4686	C-C chemokine ligand 11	2.10
Mm_877	C-X-C chemokine ligand (IP-10)	10 2.04
Mm_12876	C-X-C chemokine receptor (CXCR3)	3 1.89
Mm_277129	C-X-C chemokine ligand 16	1.79
Mm_29658	Chemokine-like factor super family 3	1.72
Mm_143745	C-C chemokine ligand 28	1.55
Mm_303231	C-X-C chemokine ligand 12	1.53
Mm_1401	C-X-C chemokine receptor 4	1.36
Mm_35600	Chemokine-like factor super family 7	1.29

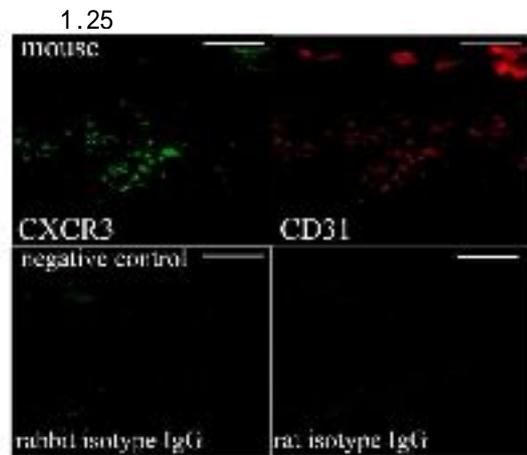
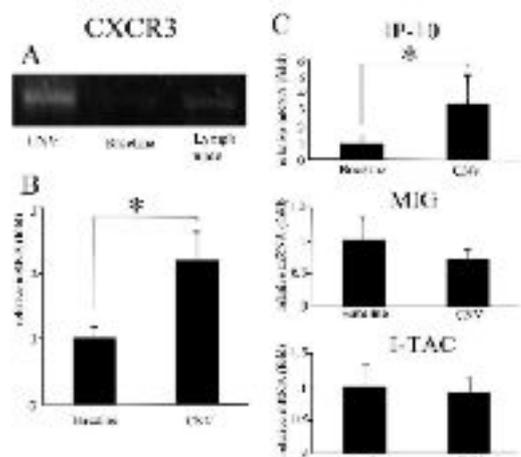
Mm_10116	C-X-C chemokine ligand 13
Mm_21013	C-X-C chemokine ligand 1
Mm_7275	C-C chemokine ligand 25

すなわち、マイクロアレーを用いた検討により IP-10 の発現上昇が認められ、その受容体である CXCR3 の発現も上昇していた。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/CCR2、CX3CL1/CX3CR1、CCR3、CXCR4 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。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。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-inducible protein 10-kDa (IP-10)、monokine induced by interferon- γ (MIG)、interferon-inducible T cell chemoattractant (I-TAC) 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。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った。

さらに、RT-PCR を用いた解析でもその発現は上昇しており、CXCR3 の他のリガンドについては発現の変動はみられなかった。

人の手術標本を用いた解析では IP-10 はマクロファージに発現が認められ、同様に、マウス脈絡膜新生血管モデルにおいてもマクロファージに発現を認めた。

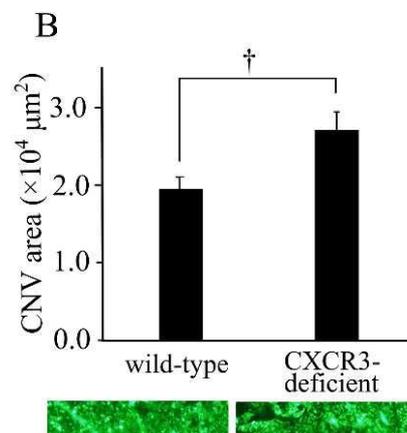
マウス CNV における CXCR3 と CD31 の二重免疫染色より、CNV 内皮に CXCR3 の発現を認めた。



(2) 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 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 IP-10 (R&D Systems, Minneapolis, MN):0.2 μ g/2 μ l を両眼へ硝子体内注射した。

その結果脈絡膜新生血管モデルでは IP-10 に対する中和抗体を硝子体内に投与してから脈絡膜新生血管を作成するとその大きさが大きくなる事が判明した。

さらに、その受容体 CXCR3 に対する中和抗体の投与によっても脈絡膜新生血管は大きさが大きくなる事が判明した。



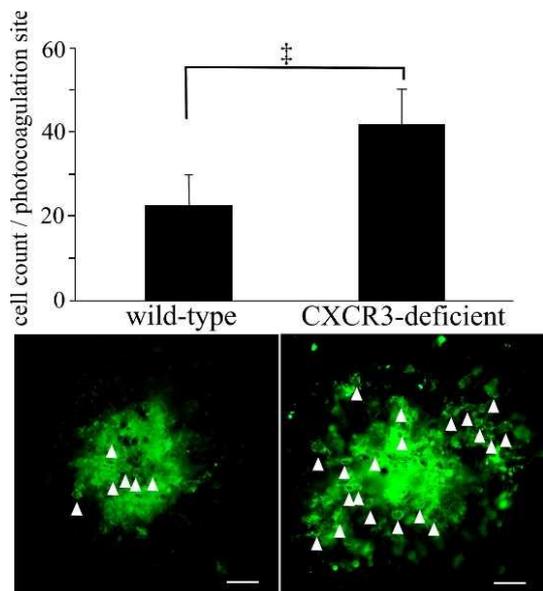
(3) CXCR3 欠損マウスと野生型マウスの比較

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/6 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/+, WT)と CXCR3 欠損オス(Y/-, CXCR3KO)を 10 週齢まで飼育し、実験に使用した。

レーザー誘発性 CNV モデルの実験に先立って、成熟 WT マウスと CXCR3KO マウスの網膜・脈絡膜構造を組織学的に調べたが、CXCR3KO 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。

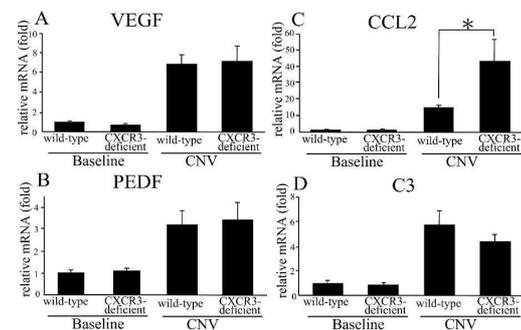
CXCR3 ノックアウトマウスを用いると脈絡膜新生血管の大きさは野生型マウスを用いて脈絡膜新生血管を作成した場合と比較して大きくなる事が判明した。

また、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、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 (42 ± 8 vs 22 ± 7 counts / photocoagulation site, $p < 0.01$, Mann-Whitney U test)。



(4) CXCR3 ノックアウトマウスと野生型マウスを用いて脈絡膜新生血管に関連する因子の発現の変動を確認するとレーザー照射 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)。



すなわち、CXCR3 が減少する事によってマクロファージが増加し、その結果として脈絡膜新生血管が大きくなっている事が推察された。

IP-10 は加齢黄斑変性で発現が上昇しているサイトカインであり、その受容体を介して加齢黄斑変性の原因である脈絡膜新生血管を抑制している事が判明した。本研究成果から加齢黄斑変性に対しての新たな治療標的が同定されたと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Fujimura S, Takahashi H, Yuda K, Ueta T, Iriyama A, Inoue T, Kaburaki T, Tamaki Y, Matsushima K, Yanagi Y. Angiostatic effect of CXCR3 expressed on choroidal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci. 53: 1999-2006, 2012

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳 靖雄 (YANAGI, Yasuo)

東京大学医学系研究科外科学専攻眼科学

教室・講師

研究者番号：90376442

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：