

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月28日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592231

研究課題名（和文） 加齢黄斑変性の病態解明—光ストレスによる脂質酸化と自然免疫の関与

研究課題名（英文） Pathogenesis of age-related macular degeneration - involvement of lipid peroxidation by photic stress and innate immunity

研究代表者

瓶井 資弘（KAMEI MOTOHIRO）

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40281125

研究成果の概要（和文）：本研究は、難治性眼疾患である加齢黄斑変性の病態解明を進め、根治療法を開発することを目的としている。青色光を低照度で長期間照射することにより、ヒト加齢黄斑変性に近い動物モデル作成に成功した。低照度光照射により網膜における酸化脂質が上昇し、慢性炎症が惹起されることがわかった。加齢黄斑変性発生に自然免疫が関与しているかを検討した結果、少量の菌体成分を投与することで、脈絡膜新生血管が抑制されること、その作用メカニズムに IL-10 の発現上昇が重要な役割を担っていることを見出した。

研究成果の概要（英文）：The long term aim of this research is to reveal the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD) and develop a radical treatment. We successfully developed a new animal model of AMD which is similar to human AMD, by irradiating a low-intensity blue light for a long term (~6 months). We demonstrated an involvement of lipid peroxidation by this photic stress and a chronic inflammation. We also investigated an involvement of innate immunity to the development of AMD, and found that a pretreatment with low dose lipopolysaccharide, the major component of the bacteria wall suppressed the development of choroidal neovascularization, and revealed that IL-10 plays an important role in the mechanism of this immune modification.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：加齢黄斑変性、酸化ストレス、脂質酸化、自然免疫、光照射

## 1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は先進国における60歳以上の失明原因の第一位であり、本邦でも人口の高齢化、生活習

慣の欧米化に伴い、急速に発症頻度が増加している疾患である。統計では、現在本邦における視覚障害原因の第4位を占め、この15年間で最も顕著に増

加した疾患 (4.9%→9.3%、1.97 倍) として挙げられている (厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業、網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究 平成 19 年度 総括・分担研究報告書、P99-103、平成 20 年 3 月)。近年まで加齢黄斑変性に対する有効な治療法は無かったが、最近、光線力学的療法や抗 VEGF 薬の開発により、ある程度悪化を防止することが可能となった。しかし、これらの治療でも十分な視力改善は期待できず、その他外科的治療法によっても一旦低下した視力を取り戻すことのできる率は低いため、新しい治療法が開発が望まれている。変性した網膜に対し、網膜移植および網膜幹細胞移植による視力回復の研究も試みられているが、実用化には未だ遠い状況である。そこで本研究は、対処療法ではなく、加齢黄斑変性の発症・進展メカニズム解明に基づいた根治療法の開発、ひいては 1 次予防法を確立することを長期目標としている。本申請は、平成 17 年度から科学研究費補助金を得て続けてきた研究である「加齢黄斑変性の病因解明と治療法開発」(H17-18) および「加齢黄斑変性の病態解明—視細胞における脂質酸化とマクロファージの役割」(H19-20) の研究成果を更に発展させて、病因解明を推し進めるためのものである。

加齢黄斑変性を広義の炎症性疾患としてとらえる考え方は、研究の発展とともに世界的に受け入れられてきている。代表的なものとしては、補体因子 H や Toll-like receptor 4 などの一塩基多型が加齢黄斑変性の発症と有意に相関するというものが挙げられる (Klein, et al. Science 2005, Edwards, et al. Science 2005, Hageman, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2005, Haines, et al. Science 2005, Zarepari, et al. Am J Hum Genet 2005, Zarepari, et al. Hum. Mol. Genet. 2005)。われわれは、同じく加齢と慢性炎症が関与していると考えられる粥状動脈硬化との関連性に注目する切り口で、加齢黄斑変性の病態解明を進めてきた。これまでに、網膜内の酸化リン脂質量が年齢とともに増加しており、加齢黄斑変性眼では年齢をマッチさせた正常眼に比べ有意な増加が見られること (Suzuki et al, Molecular Vision,

2007)、滲出型加齢黄斑変性に見られる脈絡膜新生血管に集積しているマクロファージが酸化リン脂質を認識するスカベンジャーレセプターを発現していること (Kamei et al, Invest Ophthalmol Vis Sci 2007) を報告した。

一方、同じように光ストレスを受けても加齢黄斑変性を発症する人とならない人に分かれるが、我々はそのメカニズムを明らかにすることが、治療および予防に重要であると考えている。その観点から、慢性炎症性疾患の発症機序としても近年注目されている自然免疫応答受容体 Toll-like receptor (TLR) に着目した。動脈硬化では病巣に TLR 1, 2, 4 が発現しており、酸化 LDL により発現上昇するという報告 (Circulation, 2001)、TLR 4 多型 (Asp299Gly) がグラム陰性の病原菌に対する炎症応答を減少させ、粥状硬化のリスク低下と関連するという報告 (N Engl J Med, 2002) などがある。加齢黄斑変性に関しては、TLR 3 の一塩基多型 (412Phe) が萎縮型加齢黄斑変性の進行を抑制すること、また TLR 3 リガンドへの暴露が培養網膜色素上皮細胞のアポトーシスを減少させることが報告されている (N Engl J Med, 2008)。これらのことから、TLR が加齢黄斑変性の発症機序に関与している可能性が高いと考えられる。

## 2. 研究の目的

加齢黄斑変性の発症メカニズムに、リン脂質酸化が重要な役割を演じており、マクロファージの集積・活性化が疾患進展に寄与していることが確認されたので、次にそれらの現象を引き起こすメカニズムを検討するのが本研究期間における目的である。黄斑部は眼に入った光が焦点を結ぶ網膜の中心部位で、他の網膜部位に比べ常に集光しているのが特徴である点に注目し、リン脂質酸化の誘因として光ストレスの関与を検討する。我々が加齢に伴い網膜で酸化リン脂質が蓄積すること、光ストレスによりリン脂質の酸化が誘導されることを明らかにしたが、その酸化リン脂質が TLR のリガンドとして働くことが明らかとなり、本研究ではその免疫応答を検討し、加齢黄斑変性発症の分子メカニズムを明らかにすることを試みる。加齢黄斑変性の発症には、補体などの免疫系の異常や肺炎クラミジアなどの全身感染症の関与も報告されているので、我々は、微生物感染によって引き起こされる全身の免疫系の変化が、AMD 発症に関与しないかどうか

を検討する。

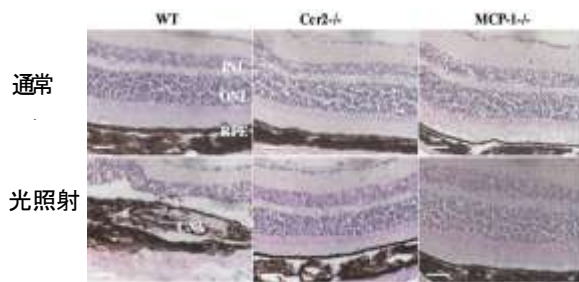
### 3. 研究の方法

- (1) 光ストレス動物モデルの作成：低照度光ストレスを長期間負荷することで、網膜下に脈絡膜新生血管が誘導されるかを検討する。480nm青色発光ダイオード（LED）光が飼育ケージ全体に照射するように飼育システムを組み立てる。有色マウス（C57/BL6）またSODノックアウトマウスを用いて、光照射により酸化ストレスを与える。照射強度は、これまでの短期照射より弱い照度（～500 Lux）に設定する。
- (2) 酸化リン脂質の動態を調べるため、一定時間（3, 6, 9, 12, 15, 18 ヶ月）の光照射後、網膜～脈絡膜での酸化リン脂質の分布と量を免疫組織化学と competitive ELISA 法を用いて経時的に評価する。
- (3) 長期低照度光照射により慢性炎症が誘導されているかどうかを調べるため、RT-PCR、ELISA、免疫組織化学を用いて、MCP-1 の発現定量・分布とマクロファージの集積を経時的に評価する。
- (4) 脈絡膜新生血管が誘導されているかどうかを調べるため、定期的（9 か月以降3 ヶ月毎）に蛍光眼底造影を施行する。組織学的に、またマクロファージと血管内皮細胞に対する抗体を用いて、免疫組織化学を用いて検討する。また、フラットマウント標本作製し、脈絡膜新生血管の体積を評価する。
- (5) 慢性炎症の関与の検討：酸化リン脂質網膜下投与による脈絡膜新生血管発症モデルにおいて、MCP-1 あるいはそのレセプターである ccr-2 のノックアウトマウスへの投与では、脈絡膜新生血管は生じなかったことより、酸化リン脂質が MCP-1 の発現を介してマクロファージの集積、脈絡膜新生血管を誘導している可能性が示唆されたので、低照度長期照射モデルでもこれらの分子の関与の有無を検討する。これらのノックアウトマウスでは、網膜色素上皮と脈絡膜毛細血管板の間に存在するブルッフ膜の肥厚が指摘されているので、低照度長期光照射で更に肥厚が見られるか、電子顕微鏡で評価する。
- (6) 脈絡膜新生血管発症と全身感染症の検

討：C57BL/6 マウスを用い、レーザー照射による CNV モデルを作成し、レーザー照射の1～4 日前に低用量（20ug/0.2ml）のグラム陰性菌の菌体外毒素であるリポポリサッカライド（LPS）を腹腔内投与した。レーザー照射の10 日後に眼球摘出し、脈絡膜フラットマウントにて CNV サイズを測定した。また、LPS 投与後の血中 IL-10 濃度を ELISA にて、LPS 投与 2 日後の腹腔マクロファージ・眼内の IL-10 発現を定量的 RT-PCR にて測定した。さらに、LPS を事前投与したマウスにおいて、レーザー光凝固と同時に IL-10 中和抗体の硝子体内投与を行い、CNV サイズの変化をみた。また、LPS 事前投与マウスから腹腔マクロファージ移入を行なった無処置マウスに対してレーザー照射し、CNV サイズを評価した。

### 4. 研究成果

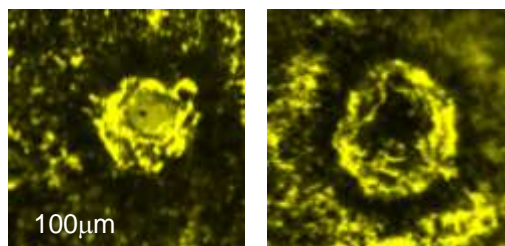
- (1) 加齢黄斑変性の実際の病態に類似した動物モデルを確立するため、低照度長期間光照射により網膜下脈絡膜新生血管（CNV）が誘導されるかを検討した結果、有色マウスで CNV の発生を蛍光眼底造影、および、組織学的、免疫組織化学的に確認した。電子顕微鏡による評価では低照度長期光照射で網膜下腔およびブルッフ膜下へのマクロファージの集積とブルッフ膜の肥厚が生じることが判明した。
- (2) 低照度青色光の照射条件を変化させて、マウス網膜における変化を比較検討した。その結果、長期の連続照射では高度の網膜障害をきたすが、周期的な低照度長期光照射では網膜障害は余り見られず、網膜内および網膜下腔へのマイクログリアの集積を誘発し、慢性炎症を惹起することが判明した。
- (3) 同様の光酸化ストレスを与えた MCP-1<sup>-/-</sup>および ccr-2<sup>-/-</sup> マウスでは CNV の発生が見られなかったことより、その発症機序に酸化ストレスにより惹起される慢性炎症が関与していることが確認できた。



MCP-1 を加齢黄斑変性の発症誘因候補の1つとして絞ることができたので、薬物による CNV 発症抑制効果の検討を行った。MCP-1 受容体阻害薬を加齢黄斑変性動物モデルに投与し、脈絡膜新生血管 (CNV) の抑制効果があるかを検討したところ、対照群に比べ 44%抑制することに成功した。抑制の分子メカニズムを現在解明中である。

- (4) 加齢黄斑変性の発症における自然免疫が関与の検討に関し、免疫系分子のノックアウトマウスを用いた実験は、生育不良のため断念した。
- (5) レーザー照射の2日前に LPS 事前投与を行ったマウスの CNV サイズは、 $14781 \mu\text{m}^2$  であり、コントロール ( $21350 \mu\text{m}^2$ ) と比較して有意に減少した。不顕性感染などを介した自然免疫不活化が発症に抑制的に関与している可能性を見出した。
- (6) その分子メカニズムとして、IL-10 が関与していることを突き止めた。LPS 投与後の血中 IL-10 濃度、腹腔マクロファージ・眼内の IL-10 発現は有意に上昇した。また、IL-10 中和抗体の投与により LPS による CNV 縮小効果は抑制された。さらに、LPS 投与マウスからの腹腔マクロファージ移入により、無処置マウスにおいても CNV は抑制された。

#### LPS 投与時期による CNV 形成の違い



- 2 day

対照

#### 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 22 件)

1. Suzuki M, Tsujikawa M, Itabe H, Du ZJ, Xie P, Matsumura N, Fu X, Zhang R, Sonoda K, Egashira K, Hazen S, Kamei M, Chronic photo-oxidative stress and subsequent MCP-1 activation as causative factors for age-related macular degeneration, J Cell Sci、査読有、in press (2012)

2. Sakimoto S, Kidoya H, Naito H, Kamei M, Sakaguchi H, Fukamizu A, Nishida K, Takakura N. A role for endothelial cells in promoting maturation of astrocytes through the apelin/APJ system, Development、査読有、139、(2012)、1327-1335.

3. Ueda T, Gomi F, Suzuki M, Sakaguchi H, Sawa M, Kamei M, Nishida K. Usefulness of indocyanine green angiography to depict the distant retinal vascular anomalies associated with branch retinal vein occlusion causing serous macular detachment. Retina、査読有、32(2):308-13, 2012

4. Du ZJ, Yamamoto T, Ueda T, Suzuki M, Tano Y, Kamei M: Activated Protein C Rescues the Retina from Ischemia-induced Cell Death. Invest Ophthalmol Vis Sci.、査読有、52(2):987-93, 2011.

5. Yamamoto T, Kamei M, Sayanagi K, Matsumura N, Nishida K, Sakaguchi H, Tsujikawa M, Tano Y. Simultaneous intravitreal injection of triamcinolone acetonide and tissue plasminogen activator for central retinal vein occlusion: A Pilot Study. Br J Ophthalmol、査読有、95:69-73, 2011.

6. Nishida K, Kamei M, Du ZJ, Xie P, Yamamoto T, Suzuki M, Sakaguchi H, Nishida K. Safety threshold of intravitreal activated protein-C. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol、査読有、249(6):833-8, 2011.

7. Fujikado T, Kamei M, Sakaguchi H, Kanda H, Morimoto T, Ikuno Y, Nishida K, Kishima

H, Maruo T, Konoma K, Ozawa M, Nishida K. Testing of semi-chronically implanted retinal prosthesis by suprachoroidal-transretinal stimulation in patients with retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci、査読有、 52(7):4726-33, 2011.

8. Morimoto T, Kamei M, Nishida K, Sakaguchi H, Kanda H, Ikuno Y, Kishima H, Maruo T, Konoma K, Ozawa M, Nishida K, Fujikado T. Chronic implantation of newly developed suprachoroidal-transretinal stimulation prosthesis in dogs. Invest Ophthalmol Vis Sci、査読有、 52(9):6785-92, 2011.

9. Nishida K, Sakaguchi H, Xie P, Terasawa Y, Ozawa M, Kamei M, Nishida K. Biocompatibility and durability of Teflon-coated platinum-iridium wires implanted in the vitreous cavity. J Artif Organs、査読有、 14(4):357-63, 2011.

10. Xie P, Kamei M, Suzuki M, Matsumura N, Nishida K, Sakimoto S, Sakaguchi H, Nishida K. Suppression and regression of choroidal neovascularization in mice by a novel CCR2 antagonist, INCB3344. PLoS ONE、査読有、 2011;6(12):e28933

11. Nishida K, Kamei M, Kondo M, Sakaguchi H, Suzuki M, Fujikado T, Tano Y: Efficacy of Suprachoroidal-Transretinal Stimulation in Rabbit Model of Retinal Degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci、査読有、 51:2263-8, 2010.

12. Sakaguchi H, Kamei M, Fujikado T, Yonezawa E, Ozawa M, Cecilia-Gonzalez C, Ustariz-Gonzalez O, Quiroz-Mercado H, Tano Y. Artificial Vision by Direct Optic Nerve Electrode (AV-DONE) implantation in a blind patient with retinitis pigmentosa. J Artif Organs、査読有、 12:206-9, 2009.

13. Yamamoto T, Kamei M, Sakaguchi H, Oshima Y, Ikuno Y, Gomi F, Ohji M And Tano Y. Comparison of surgical treatments for central retinal vein occlusion; RON vs

cannulation of tPA into the retinal vein. RETINA、査読有、 29:1167-74, 2009.

[学会発表] (計 10 件)

1. 松村永和、瓶井資弘、辻川元一、謝平、鈴木三保子、坂口裕和、西田幸二 低用量リポポリサッカライドの事前投与は、脈絡膜新生血管を抑制する 第115回日本眼科学会総会 2011.5.12 東京

2. Xie P, Kamei M, Matsumura N, Sakimoto S, Nishida K, Suzuki M, Sakaguchi H, Nishida K, Effect of Different exposure Styles of Low Level Intensity Blue Light on Mice Retina, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2011.5.2, Fort Lauderdale, FL, USA

3. Kamei M, Tano Y, Artificial Vision by Direct Optic Nerve Electrode (AV-DONE)、XXIIth Meeting of the CLUB JULES GONIN, 2010.11.4 京都

4. N. Matsumura, M. Tsujikawa, P. Xie, K. Nakai, Y. Saishin, M. Suzuki, H. Sakaguchi, M. Kamei, Lipopolysaccharide Pretreatment Suppresses Choroidal Neovascularization. Annual meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2010.5.4、Fort Lauderdale, FL, USA

5. Kamei M, A new pharmacological treatment for central retinal vein occlusion, 第114回日本眼科学会総会、2010.4.6 名古屋

6. 鈴木三保子、瓶井資弘 加齢黄斑変性におけるリン脂質酸化の関与 日本眼炎症学会総会 2009.7.10 大阪

7. 瓶井資弘 網膜リン脂質の加齢変化第48回日本白内障学会総会 2009.6.27 東京

8. 鈴木三保子、瓶井資弘 酸化リン脂質の脈絡膜新生血管発症への関与 第113回日本眼科学会総会 2009.4.17 東京

9. 松村永和、瓶井資弘 低照度長期の光照射によるBruch膜・脈絡膜の変化第113回日本眼科学会総会 2009.4.17 東京

[図書] (計 3 件)

1. Nancy Kujukunju, Hirokazu Sakaguchi, Motohiro Kamei, Hugo Quiroz-Mercado, Lippincott Williams & Wilkins, Macular Surgery, Second Edition (2011), 8 (507-514)

2. Motohiro Kamei, Yasuo Tano, Karger、  
Developments in Ophthalmology、(2009) 7  
(82-88)

3. 鈴木三保子、瓶井資弘 文光堂 眼科プラ  
クティス：生体計測、(2009) 4 (212)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瓶井 資弘 (KAMEI MOTOHIRO)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：40281125

### (2) 研究分担者

五味 文 (GOMI FUMI)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：80335364

辻川 元一 (TSUJIKAWA MOTOKAZU)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：70419472

坂口 裕和 (SAKAGUCHI HIROKAZU)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：80379172