

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 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791670

研究課題名（和文） 加齢黄斑変性症及び緑内障におけるスカベンジャー受容体を介する治療法の基盤研究

研究課題名（英文） Role of scavenger receptors in age related macular degeneration and glaucoma.

研究代表者

猪俣 泰也 (INOMATA YASUYA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：50452884

研究成果の概要（和文）：我々はマウスでの脈絡膜新生血管(CNV)モデルを用いて抗酸化物質チオレドキシンやスタチンでの CNV 形成抑制効果や酸化型 LDL 受容体の一つである LOX-1 の病態形成への関与を報告してきた。今回、細胞内でチオールを増加させる N-Acetyl-cystein(NAC)を用い CNV の抑制効果を検討した結果、CNV 形成における NF- κ B の核内移行や好中球/マクロファージ浸潤に関与するサイトカイン (CXCL-1, MCP-1) や VEGF、VEGFR-1 の発現上昇を NAC 投与により抑制することを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

Our previous studies have suggested that the anti-oxidant, such as thioredoxin, and pitavastatin, could inhibit the development of choroidal neovascularization (CNV). We reported that N-Acetyl-cystein (NAC), which has a tissue protective action against oxidative stress, inhibited indicators of oxidative stress and the activation of NF- κ B induced by laser injury, and consequently suppressed macrophage and neutrophil infiltration and the development of CNV.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：加齢黄斑変性症・酸化ストレス・Nアセチルシステイン・スカベンジャー受容体

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性症 (Age-related Macular

Degeneration: AMD) は先進国において後天性の視力低下や失明の主原因で、とくに欧米では成人失明（特に 50 歳以上）原因の第 1 位の疾患である。近年我が国においても AMD

患者数は増加傾向にある。AMD は Bird らの国際分類により萎縮型（非滲出型）と滲出型に大別される。萎縮型 AMD は網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium: RPE)、脈絡膜、網膜の萎縮が特徴であり、その進行は比較的緩徐とされている。一方の滲出型の AMD

の本態は脈絡膜新生血管 (Choroidal Neovascularization: CNV) である。CNV はブルッフ膜を破壊して、RPE 下あるいは網膜下に発育、侵入する。さらにその周囲は RPE の増殖を伴いながら膠原線維を主体とした増殖組織が形成される。CNV の病因は、RPE・ブルッフ膜・脈絡膜の加齢変化を基盤として、細胞外マトリックスの異常、慢性炎症や酸化ストレスに伴うさまざまな分子の相互作用にくわえ、遺伝的因子、環境因子が関与していると考えられているが、完全にはわかっていない。現在の AMD の治療は活動性の高い脈絡膜新生血管をターゲットとした治療が主流で光線力学的療法 (Photo dynamic therapy: PDT)、抗血管新生増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) 抗体の硝子体注入などである。いずれの治療法も一定の成績はあげているが未だ十分な結果は得られていない。我々は従来の光線力学療法単独と比較し、光線力学療法に抗 VEGF 抗体硝子体注入を併せる事により効果的な視機能改善を得られる事を明らかにした。(文献②) しかし、依然として視機能改善効果に限界が満足の得られる視力、視機能を維持するという観点から CNV の発生および進行を未然に防ぐことが望ましい。現在のところエビデンスとして確立されているのはサプリメント (ビタミン C、ビタミン E、β-カロテン、亜鉛) の服用などがあるが、AMD 患者が増加傾向となっている今、CNV の発生および進行を抑える効果のある新たな方法が望まれている。近年、CNV 形成/進展に酸化ストレスが関与する事が明らかにされた。これまでに我々は、細胞の酸化ストレスに対する重要な抗酸化酵素である Thioredoxin や、抗酸化作用を有する高脂血症治療薬 Pitavastatin による CNV 形成抑制効果を報告した。また、酸化低比重リポタン

パク質 (oxidized low-density lipoprotein: LDL) のスカベンジャーレセプターである LOX-1 の CNV 形成の検討により、CNV 形成に酸化ストレスが関与する事を報告してきた。生体内においてグルタチオンシステムは重要な抗酸化システムの一つであり、フリーラジカル除去物質である N-アセチル-システイン (N-Acetyl- cysteine: NAC) は体内で還元型グルタチオンへと代謝され、細胞内の還元型グルタチオン濃度を上げる作用を持つ。NAC は元来、閉塞性呼吸器疾患の治療薬、アセトアミノフェン中毒の解毒剤として利用されていたが、近年 human immunodeficiency virus (HIV)-1 感染による急性/慢性炎症や、パーキンソン病等の神経変性疾患に対しても有用である事が報告されている。眼科領域においては光による視細胞障害に対して保護的に働く事が明らかにされた。体内で還元型グルタチオン濃度を上げる事は、酸化ストレスから組織を保護する効果が期待できる。そのため経口投与可能な NAC による AMD 抑制効果が期待されている。本研究で用いた NAC は経口投与では速やかに吸収され、投与後 2-3 時間後に最高血中濃度となり、主に腎臓、肝臓、肺に分布する。

2. 研究の目的

今回、NAC の AMD への効果を調べる事を目的とし、実験的に脈絡膜新生血管を誘発した実験動物に NAC を腹腔内投与し、CNV の抑制効果とその作用機序の解明を目的とした。

3. 研究の方法

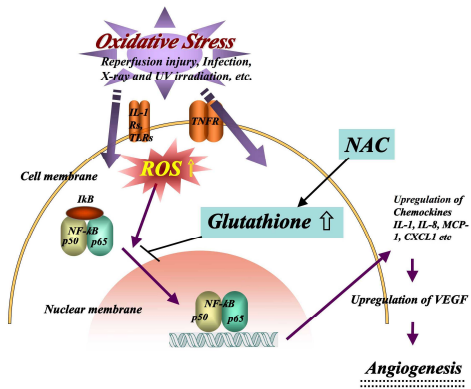
6-8 週令雄の C57BL/6 マウスを用い過去の報告に準じてレーザー誘発実験的 CNV を組織免疫染色法及び CNV サイズ計測の際は 4 発/1 眼ずつ、その他の実験では 15 発/1 眼ずつレーザーを施行した。NAC をリン酸塩緩衝液に溶解し、NAC 群のラットにはレーザーによる脈

絡膜新生血管作製を行なった後に、NAC 溶液 (250mg/ kg/ day) を 0.5ml 腹腔内投与した。コントロール群はレーザーによる脈絡膜新生血管作製を行なった後に、PBS のみを 0.5ml 腹腔内投与した。レーザー無施行のマウスとレーザー照射 1、3、6、12 時間後の眼球を摘出し、酸化ストレスを確認する為に、酸化ストレスバイオマーカーである 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) や転写因子 nucleus factor- κ (NF-kappa) B の核内移行を Western blotting で、VEGF、VEGF receptor (VEGFR)-1、VEGFR-2、monocyte chemotactic protein (MCP)-1、chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)-1 を ELISA にて検討した。免疫染色法にてレーザー照射による好中球/マクロファージを評価した。また CNV サイズ測定し NAC による効果を検討した。

4. 研究成果

4-HNE はレーザー後徐々に増加し、3 時間をピークに減少していたが NAC 投与群では有意に抑制された。細胞レドックス感受性転写因子である NF- κ B もレーザー照射 6 時間後には認められ、NAC 投与により抑制されることを確認した。またレーザー照射 2 日後に上昇しており NAC 投与群では有意に低かった。マクロファージ特異的抗原 F4/80 の免疫染色により、光凝固斑周囲に浸潤するマクロファージを測定しするとコントロール群と比較して NAC 群では明らかに浸潤が抑制されていた。レーザー照射により CXCL-1 発現量は上昇し NAC 投与群では有意に抑制されていた。周囲に集簇する多核白血球量を評価する為に、Ly-6G の免疫染色を行なったが、レーザー照射 3 日後のコントロール群と比較して NAC 投与群では明らかに浸潤が抑制されていた。VEGF、VEGFR-1 発現量コントロール群と比較して NAC 群では有意に抑制されていたが VEGFR-2 発現量に有意差はなかった。

レーザー照射 7 日後に、形成された CNV は fluorescein-labeled tomato lectin で明瞭に描出され、コントロール群と比較して NAC 投与群ではそのサイズが有意に縮小していた。以上より本研究において NAC が CNV 伸展に対して抗血管新生作用を有する事を示した。本報告は実験的脈絡膜新生血管により 4-HNE が上昇する事を示した最初の報告である。NF- κ B は多くの炎症関連遺伝子の転写を仲介するレドックス感受性転写因子で、今回の結果は、NAC が TRX-1 と同様にシステイン残基を介して NF- κ B の機能を調節し、NF- κ B を介した遺伝子発現の阻害に働いている可能性を示唆している。またマクロファージ浸潤を抑制する事により実験的脈絡膜新生血管を抑制する事が示されており、更にマクロファージから VEGF を分泌する事で新生血管の伸展を促進させる。MCP-1 は実験的脈絡膜新生血管形成の重要な分子であり、この事は臨床での得られた CNV サンプルからも示されている。今回の我々の研究もこれらを支持する結果となった。今回の研究では、NAC が CXCL-1 を抑制する事で好中球の浸潤を抑制すると考えられた。補体経路の活性化を抑制した為ではなかった (データ未発表)。炎症反応の過程で MCP-1 と CXCL-1 の発現は NF- κ B によって制御されるとされており、NAC は NF- κ B を抑制する事で MCP-1 や CXCL-1 の発現を抑制していると考えられた。s



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2件)

①Hara R, Inomata Y, Kawaji T, Sagara N, Inatani M, Fukushima M, Tanihara H. Suppression of Choroidal Neovascularization by N-Acetyl-Cysteine in Mice. *Current Eye Research*. 査読有, 35(11), 2010, 1012-102.

②Hara R, Kawaji T, Inomata Y, Tahara J, Sagara N, Fukushima M, Tanihara H. Photodynamic therapy alone versus combined with intravitreal bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration without polypoidal choroidal vasculopathy in Japanese patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 査読有, 248(7), 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪俣 泰也 (INOMATA YASUYA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：50452884

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：