

論 文 要 旨

NSAIDs inhibit neovascularization of choroid through
HO-1-dependent pathwayNSAIDs は HO-1 依存的経路を介して
脈絡膜血管新生を抑制する

吉永 就正

【序論および目的】

脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization : CNV) は眼科疾患の中でも重大な視力低下をもたらす原因の一つである。近年まで CNV には有効な治療法がなく視力予後は極めて悪かったが、抗 vascular endothelial growth factor (VEGF) 薬により治療効果は大きく改善してきている。しかしその治療法には問題もあり、VEGF は網膜発生や神経保護に重要な因子であるため、その完全な阻害により網膜に変性を起こす危険性が指摘されている。一方で、近年 non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) が動物モデルの CNV を抑制したという報告、またアスピリンを内服している患者で CNV の発生率が少ないという大規模後ろ向き研究結果が報告された。これらは NSAIDs の cyclooxygenase (COX) 阻害を介しての作用であると考えられているが、その詳細なメカニズムは分かっていない。

Heme oxygenase-1 (HO-1) は転写因子 NF-E2 related factor 2 (Nrf2) の活性化によって発現する抗酸化タンパク質であり、その基質である heme だけではなく酸化ストレスや炎症性サイトカインなどでも誘導される。HO-1 は heme を分解して一酸化炭素、遊離鉄、ビリベルジンを産生し、これらの産生物は抗酸化作用、抗アポトーシス作用をもつ。HO-1 は胃粘膜細胞などで NSAIDs によって誘導されることが確認されており、眼組織においても NSAIDs 投与により誘導される可能性がある。今回我々は NSAIDs による抗酸化タンパク質の誘導とその作用、CNV との関連について検討した。

【材料および方法】

ヒト網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 を用いて NSAIDs であるインドメタシン、ブロムフェナク刺激による Nrf2 の活性化と HO-1 の発現、その作用を検討した。培養した ARPE-19 細胞株を NSAIDs で刺激し、免疫染色、ウエスタンブロットを用いて Nrf2、HO-1 の局在と発現を検討した。また、培養した ARPE-19 細胞株にブロムフェナクの前処置を行った後、過酸化水素による酸化ストレス刺激を加え、propidium iodide 染色を行いアポトーシス細胞の割合を、MTT アッセイを行い細胞死の程度を比較した。動物実験委員会の承認を得て、ラットレーザー誘発 CNV モデルを作成しブロムフェナク点眼の効果、その際の HO-1 の関与を検討した。ブロムフェナク点眼を行ったラットとコントロールのラットで CNV サイズを比較、また CNV 部での Nrf2 と HO-1 の発現を免疫染色、ウエスタンブロットで確認した。HO-1 の関連により焦点を当てるため、HO-1 の阻害剤である stannic mesoporphyrin (SnMP) の腹腔内注射を一部のラットに追加して行い、CNV サイズ、CNV 部への ED1 陽性マクロファージの浸潤、眼内容液中の VEGF 値の変化についても検討を行った。

【結果】

ARPE-19 細胞株を NSAIDs で刺激すると、時間依存的、濃度依存的に Nrf2 が活性化されて核内に移行しており、同時に HO-1 の発現増強がみられた。また、プロムフェナクで前処置を行うことで酸化ストレスによるアポトーシス細胞の割合 ($p < 0.01$ Mann-Whitney U 検定)、細胞死 ($p < 0.001$ Mann-Whitney U 検定) が共に抑制されており、その抗酸化作用、細胞保護作用が確認された。ラット CNV モデルではプロムフェナクの点眼を行ったラットで CNV サイズが抑制されており ($p < 0.001$ Mann-Whitney U 検定)、プロムフェナクによる脈絡膜血管新生抑制が確認された。この際 CNV 部では Nrf2 が核内に蓄積、HO-1 の発現が増強していた。SnMP を用いて HO-1 を阻害するとプロムフェナクで抑制された CNV サイズが、抑制される前のレベルにまで拡大しており ($p < 0.001$ Mann-Whitney U 検定)、プロムフェナクの血管新生抑制作用の一部に HO-1 が関連していると考えられた。また、プロムフェナク点眼により CNV への浸潤マクロファージが減少 ($p < 0.01$ Mann-Whitney U 検定)、眼内溶液中の VEGF 値が低下 ($p < 0.01$ Mann-Whitney U 検定) していたが HO-1 を阻害すると、これらの作用もみられなくなり、HO-1 との強い関連が示唆された。

【結論及び考察】

過去にも NSAIDs による CNV の抑制はいくつか報告がある。いずれもその抗炎症作用から VEGF の down regulation を介していると考えられているが、詳細な機序は明らかになっていない。一方で COX2 のノックアウトマウスでは VEGF が低下しており CNV が抑制されること、浸潤マクロファージの減少でも CNV が抑制されることが報告されている。今回、NSAIDs が網脈絡膜においても、抗酸化タンパク質である HO-1 を誘導することを確認し、その抗酸化ストレス作用、細胞保護作用を確認した。動物モデルの実験では、NSAIDs 点眼により CNV が抑制されること、それに関すると考えられるマクロファージ浸潤の減少や VEGF の低下などの作用が見られたが、HO-1 を阻害することで NSAIDs によるこれらの効果は見られなくなった。これらのことから NSAIDs による CNV の抑制と HO-1 との強い関連が示唆された。安全かつ簡便に点眼で使用できることから、NSAIDs はヒトの加齢黄斑変性に伴う CNV の治療の選択肢としても有用であると考えられる。また、CNV には血管新生が関連した中枢神経系疾患の病態が色濃く反映されており、今後更に検討することで、より多い疾患の治療選択肢として NSAIDs の適応を拡大できる可能性がある。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 146号		学位申請者	吉永 就正
審査委員	主査	金蔵 拓郎	学位	博士 (医学)
	副査	上村 裕一	副査	柴鶴 義人
	副査	久保田 龍二	副査	中尾 久美子

NSAIDs inhibit neovascularization of choroid through HO-1-dependent pathway

(NSAIDs は HO-1 依存的経路を介して脈絡膜血管新生を抑制する)

脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization: CNV) は日本で 50 歳以上の人口の約 0.7% が罹患しているとされ、中途失明原因の第 4 位でもある重要な眼科疾患である。近年まで有効な治療法がなく視力予後は極めて悪かったが、抗 vascular endothelial growth factor (VEGF) 薬によりその治療効果は大きく改善してきている。しかし抗 VEGF 薬による治療には問題もあり、効果を維持するには年平均約 10 回の硝子体注射が必要とされ大きな患者負担、眼内炎など重大な合併症の危険を伴う。VEGF は網膜発生や神経保護に重要な因子であるため、その完全な阻害により網膜に変性を起こす危険性も指摘されている。このため抗 VEGF 薬の投与回数を減らすことが世界規模での目標となっており、他の薬物との併用療法が模索されている。中でも非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs: NSAIDs) は眼科炎症性疾患に対し広く用いられており、副作用も少ない薬物である。近年、抗 VEGF 薬の硝子体注射を行う CNV 患者に NSAIDs 点眼を追加すると注射の必要回数が 1/3 に減少したと報告されており、過去には NSAIDs が動物モデルの CNV を抑制したという結果や、アスピリンを内服している患者で CNV の発生率が少ないという大規模後ろ向き研究結果も報告されている。これらは NSAIDs の cyclooxygenase 阻害を介しての作用であると考えられているが、その詳細なメカニズムは分かっていない。Heme oxygenase-1 (HO-1) は転写因子 NF-E2 related factor 2 (Nrf2) の活性化によって発現する抗酸化タンパク質であり、その基質である heme だけではなく酸化ストレスや炎症性サイトカインなどでも誘導される。HO-1 は heme を分解して一酸化炭素、遊離鉄、ビリベルジンを産生し、これらの産生物は抗酸化作用、抗アポトーシス作用をもつ。HO-1 は胃粘膜細胞などで NSAIDs によって誘導されることが確認されており、眼組織においても NSAIDs 投与により誘導される可能性がある。そこで学位申請者らはヒト網膜色素上皮細胞株 ARPE-19、ラットレーザー誘発 CNV モデルを用いて NSAIDs 投与による Nrf2 の活性化と抗酸化タンパク質 HO-1 の誘導とその作用、CNV との関連について検討した。また、ラットモデルでは CNV 抑制との関連があるとされる CNV への浸潤マクロファージ数、眼内溶液中の VEGF についても検討を行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) NSAIDs の投与により、ARPE-19、ラット CNV モデル双方で、Nrf2 が活性化され、HO-1 の発現が増強していた。
- 2) NSAIDs の前処置で H₂O₂ の酸化ストレスによるアポトーシス細胞の割合 (p<0.01 Mann-Whitney U 検定)、細胞死 (p<0.001 Mann-Whitney U 検定) が共に抑制された。
- 3) NSAIDs の点眼を行ったラットで CNV サイズが抑制されていた (p<0.001 Mann-Whitney U 検定)。
- 4) HO-1 阻害剤の追加により CNV サイズが NSAIDs による抑制前のレベルにまで拡大していた (p<0.001 Mann-Whitney U 検定)。
- 5) NSAIDs 点眼により CNV への浸潤マクロファージが減少 (p<0.01 Mann-Whitney U 検定)、眼内溶液中の VEGF 値が低下 (p<0.01 Mann-Whitney U 検定) していたが HO-1 を阻害すると、これらの作用もみられなくなった。

NSAIDs が網脈絡膜においても、抗酸化タンパク質 HO-1 を誘導することが確認され、その抗酸化ストレス作用、細胞保護作用も確認された。動物モデルの実験では、NSAIDs 点眼により CNV が抑制され、それに関すると考えられるマクロファージ浸潤の減少や VEGF の低下などの作用が見られたが、HO-1 を阻害することで NSAIDs によるこれらの効果は見られなくなった。これらのことから NSAIDs による CNV の抑制と HO-1 との強い関連が示唆された。安全かつ簡便に点眼で使用できることから、NSAIDs はヒトの加齢黄斑変性に伴う CNV の治療の選択肢として有用であると考えられる。

本研究は近年問題となっている CNV の治療について、NSAIDs 点眼による抗酸化タンパク質 HO-1 誘導の観点から有用性を検討した研究である。網脈絡膜での NSAIDs による HO-1 の誘導を検討した初めての研究であり、HO-1 の阻害剤を用いてその関連を詳細に検討した内容となっている。今後の検討を進めることで、より良い治療法の確立に寄与する可能性のある有意義な研究と言える。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 1 4 6 号		学位申請者	吉永 就正
審査委員	主査	金蔵 拓郎	学位	博士 (医学)
	副査	上村 裕一	副査	柴鶴 義人
	副査	久保田 龍二	副査	中尾 久美子
<p>主査および副査の5名は、平成23年9月26日、学位申請者 吉永 就正 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) ARPE-19の細胞培養に用いたDMEM/F-12の特徴は何か。 (回答) 広範囲の哺乳類細胞用に開発された培養液で、ARPE-19の培養に最も広く用いられているものである。</p> <p>質問2) 細胞を刺激する際に血清飢餓を行っているが、その方法と意味は何か。 (回答) 通常ウシ胎仔血清を混入した培地で細胞を培養しているが、この培地を血清が混ざっていない培地と交換することで行った。これにより一旦細胞の増殖が停止し、それぞれの細胞の刺激に対する反応の差が少なくなると考えられる。</p> <p>質問3) Materials and methods の cell viability assay の項で plates に 500 ml の培地を加えたとしてある 500 μl の間違いでは。 (回答) 500 μl の誤表記である。訂正する。</p> <p>質問4) 本文中に HO-1 等の phase 2 protein という記載があるが、この意味は何か。 (回答) 転写因子の活性化を一旦介して誘導される protein という意味で用いた表現である。</p> <p>質問5) Figure 4 で FITC を用いて脈絡膜新生血管 (CNV) の大きさを調べているが、CNV を観察する方法は。 (回答) マウスの心臓に FITC を注入し全身に灌流後、眼球を摘出し網膜脈絡膜を分離、これを網膜側が上になるよう設置した。その後網膜を丁寧に除去し脈絡膜のみを残し蛍光顕微鏡で FITC に染色される CNV を観察した。</p> <p>質問6) ブルッフ膜が重要であるようだが、これはどのようなものか。 (回答) ブルッフ膜は、網膜色素上皮の基底膜、内側膠原線維層、弾性繊維層、外側膠原線維層、脈絡膜毛細血管の基底膜で形成されており、脈絡膜側から感覚網膜への水分移行を阻止するバリアとして機能する膜の名称である。</p> <p>質問7) 細胞の実験モデルで用いた ARPE-19 細胞の由来はどこ細胞か。 (回答) ARPE-19 はブルッフ膜の一部を形成する、網膜色素上皮細胞の細胞株であり、これを実験で用いた。</p> <p>質問8) 臨床では加齢黄斑変性 (AMD) に抗 VEGF 薬の硝子体注射を多く用いているようだが、患者数はどれぐらいいるのか。 (回答) 過去の研究では日本の 50 歳以上の 0.6-0.7% が AMD に罹患しているとされ、現在約 69 万人の患者がいるとされている。</p> <p>質問9) 硝子体注射は、通常の治療として既に行われているのか、また、NSAIDs 点眼の併用は行われているのか。 (回答) 抗 VEGF 薬の硝子体注射は、現在 AMD の標準的な治療として行われており、当科でも通常の診療で行っている。NSAIDs 点眼併用については、硝子体注射の回数を減少させることができたとする報告もあり、現在その効果が検討されている。</p> <p>質問10) NSAIDs が動物モデル CNV に効果があると 10 年以上前に報告されているが、臨床では使われていなかったのか。 (回答) ヒトの CNV の治療では同時期より抗 VEGF 薬の硝子体注射が非常に大きな治療効果をあげる事が報告された。他の薬物がこれに替わることは難しいため抗 VEGF の分野での研究が主となっていた。近年併用療法の検討が行われ始めている。</p> <p>質問11) NSAIDs を併用した治療は他の中枢神経系の疾患で報告されているか。 (回答) NSAIDs は全身性エリテマトーデスなどに有効であるが、AMD 以外の血管新生を伴う疾患への有効性が示唆された。</p> <p>質問12) NSAIDs が多数ある中でインドメタシン、ブロムフェナクを選んだ理由は何か。 (回答) 眼科点眼剤の中から選択した。ブロムフェナクは点眼後の網膜移行が良いと報告されており、動物モデルでも使用した。</p> <p>質問13) 臨床でブロムフェナクは一日2回の点眼で用いられている。今回の動物モデルで6回点眼した理由は何か。 (回答) ウサギ網膜の薬物濃度の報告では点眼4時間後まで高い濃度が維持されていた。網膜での薬物濃度を維持するため。</p> <p>質問14) ブロムフェナク点眼の網膜への移行性が高いのは何か特別な処理がされているからか。 (回答) 一般の点眼と比較して特別な処理はされていない。ブロムフェナクの成分自体の特性であると考えられる。</p> <p>質問15) 点眼ではなく、内服で投与すると効果が向上する可能性はあるか。 (回答) 内服での投与で薬効が向上する可能性は考えられるが、副作用も増加する。点眼での使用が総合的に有用と考えられる。</p>				

最終試験の結果の要旨

質問 1 6) Propidium iodide (PI) 染色を用いてアポトーシスを調べているが、ネクローシスなどは含まれていないのか。

(回答) PI 染色にはネクローシスも含まれる可能性があり、より正確には annexin V などを用いた染色が適当であった。

質問 1 7) Figure 3 でブロムフェナクが細胞死を抑制しているが、濃度を上げるとより強く抑制するのか。

(回答) 様々な条件で実験を行ったが ARPE-19 の特徴として、低濃度の H₂O₂ 等のストレスでは細胞死に至りにくい反面、一旦細胞死が始まると途端に大多数の細胞が細胞死に至る。今回最も抑制が見られた濃度を使用している。

質問 1 8) Figure 3 で用いたブロムフェナクの濃度は、生体内と同じ濃度か。

(回答) 生体内での濃度と比べると数十倍程度高い濃度ではあるが、2.5 μM と非常に低い濃度である。

質問 1 9) Figure 6B で、ブロムフェナク群とコントロール群の光凝固を行ったもの同士では有意差はあったか。

(回答) Mann-Whitney U test で p < 0.01 であり有意差があった。

質問 2 0) Figure 9 でブロムフェナクが VEGF を抑えているが、COX2 を介していると考えているか。

(回答) 今回 HO-1 の阻害剤を用いて、HO-1 の関連に焦点を当てたため、COX との関連については多くを検討していない。過去の報告から考えると、網膜に多く発現している COX2 も少なからず関連して VEGF が抑制された可能性が高い。

質問 2 1) マクロファージ浸潤と VEGF の抑制ではどちらが CNV の抑制により関連していると考えられるか。

(回答) 更なる検討が必要であるが、NSAIDs の点眼によって、浸潤マクロファージ数は大きく抑えられていた。浸潤マクロファージの減少による VEGF 産生の低下は過去にも報告されており、双方深く関連していると考えられる。

質問 2 2) Materials and methods で二次抗体に抗マウス抗体を用いていると書いてあるがこれは何に使ったか。

(回答) 抗マウス抗体は動物モデルで HO-1 とそれぞれの細胞のマーカーとの共染色を検討する際に用いた。

質問 2 3) Figure 2 でインドメタシンによる HO-1 の誘導は 50 μM と 100 μM でほぼ同様に見える。これに対し Figure 1 の免疫染色では 50 μM より 100 μM の刺激で HO-1 が強く誘導されているように見える。これはどう考えるか。

(回答) Western blot では多くの細胞を回収して発現をみるのに対し、免疫染色では培養された細胞の一部を撮影して発現をみている。その差が現れた可能性が考えられる。

質問 2 4) Figure 2 で、インドメタシン 50 μM と 100 μM の刺激で核内での Nrf2 は濃度依存的に増加しているが、HO-1 は 50 μM 刺激の時点で 100 μM 刺激とほぼ同程度に達しているように見える。どう解釈するか。

(回答) 50 μM 刺激で Nrf2 の核内移行が始まった時点で十分に転写のスイッチが入った可能性が考えられる。必要以上の刺激を受けた後誘導される HO-1 の量は Nrf2 の核内蓄積量には必ずしも依存しない可能性がある。

質問 2 5) NSAIDs が Nrf2 を活性化し HO-1 を誘導する機序は、どのように働きかけているのか。

(回答) Nrf2 は keap1 と結合し細胞内に留められ、分解されているが、刺激により keap1 の構造が変化し、Nrf2 が活性化されて核内に入り HO-1 が誘導されると考えられている。NSAIDs による刺激で keap1 の構造変化が起こったものと考えられる。HO-1 が事前に誘導されることでその後の大きな酸化ストレスからの保護作用があったと考えられる。

質問 2 6) Figure 3a,b の PI 染色では H₂O₂ 刺激が 3 時間なのに対し MTT 法では刺激が 15 分だが、この違いはどう解釈するか。

(回答) アポトーシス細胞の割合を調べた実験では、H₂O₂ 刺激をしていないコントロールでも 15% 程度アポトーシスに陥っている。同様のストレスの強い状況ではミトコンドリア機能を評価する MTT 法では有意差が出なかった可能性が考えられる。

質問 2 7) ラットへの点眼とヒトに点眼するのでは、量はどうか。ラットへの点眼量が多すぎではないか。

(回答) 今回ラットへの点眼は、5 μl 程度と結膜嚢に貯まる程度の量を点眼した。ヒトの点眼でも結膜嚢に貯まる量より多い点眼液は溢れ出して意味がないとされており、点眼液として量が過剰ということはないと考えられる。

質問 2 8) Stannic mesoporphyrin の HO-1 阻害の機序はどのようなものか。

(回答) HO-1 特異的にその活性を阻害すると報告されている。

質問 2 9) COX2 と今回の動物モデルとの関連について過去の報告ではどうか。

(回答) 今回の実験と同じマウスの CNV モデルで過去にも COX2 の阻害から CNV が抑制されるとする報告はある。今年 COX2 null マウスを用いた報告もされており、眼組織中の VEGF は低下しているという結果であった。

質問 3 0) Nrf2 によって活性化されるほかの因子の関与の可能性についてはどうか。

(回答) Nrf2 からは他に NADH デヒドロゲナーゼ、グルタチオン S トランスフェラーゼ、チオレドキシニンなど、いずれも抗酸化に関わるタンパクが誘導される。一般に Nrf2 の下流の抗酸化タンパクとしては HO-1 が代表的なもので、今回阻害剤を用いた実験でも強くその関連が示唆されており、HO-1 の関連が最も強いと考えている。

質問 3 1) 論文要旨で、脈絡膜血管新生と脈絡膜新生血管、二つの表現が出てきている。これは一つに統一したほうが良い。

(回答) 脈絡膜新生血管に統一したい。要旨は訂正する。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。