

論 文 要 旨

Stromal cell-derived factor-1 is essential for photoreceptor cell protection in retinal detachment

Stromal cell derived factor-1 は網膜剥離における
視細胞保護に重要である

大塚 寛樹

【序論および目的】

Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)は血球の新生などに重要な因子であり、SDF-1 やその受容体である CXCR4 が欠損したマウスでは心臓、脳、大血管、骨髄などに異常をきたし胎生致死に至る。SDF-1 は骨髄で造血幹細胞の保持や増殖、生存に関与するばかりでなく、心臓や肝臓、眼内の血管新生や組織修復の場において骨髄由来細胞の集積を行っている。眼疾患では、増殖糖尿病網膜症 (PDR)や未熟児網膜症といった虚血を生じる血管新生性疾患で硝子体中の SDF-1 が高値であることが知られている。近年では内眼炎における CD4 陽性 T 細胞の集積や増殖硝子体網膜症の増殖膜形成に関与することも報告されており、SDF-1 の持つ血管新生以外の作用についても注目されている。一般的に血管新生を生じることの少ない疾患である網膜剥離における SDF-1 の関与について検討した。

【材料および方法】

倫理委員会の承認を得て採取された患者硝子体を用いて、硝子体中の SDF-1 濃度と血管内皮増殖因子 (VEGF)濃度を ELISA で、その他の炎症性サイトカイン/ケモカイン濃度を CBA にて測定し、統計学的解析を行った。また動物実験委員会の承認を得て、ラット網膜剥離モデルを作成し、網膜剥離作成後 3 日目の網膜を採取し、SDF-1 の発現をウエスタンブロットおよび免疫組織学的に検討した。網膜剥離時の SDF-1 の関与を検討するため、硝子体中に抗 SDF-1 抗体を投与し、剥離 3 日後および 7 日後の網膜の外顆粒層厚の測定を行い、視細胞数の変化の評価を行った。剥離 3 日後の網膜に対して TUNEL 染色を行いアポトーシスの評価を行い、抗 ED1 抗体による染色もを行い網膜下の浸潤細胞の評価も行った。網膜前駆細胞株 R28 を用いて、リコンビナント SDF-1 が無血清培養で誘導される細胞死に与える影響を検討するため、trypan blue dye exclusion assay を行った。また TUNEL 染色もを行い、アポトーシスに与える影響についても評価を行った。同様に R28 を用いて scratch wound healing assay を行い、リコンビナント SDF-1 が創部修復に与える影響も評価した。また R28 の生存に関連するシグナル蛋白として extracellular signal-regulated kinase (ERK)のリン酸化および Bcl-2 の発現をウエスタンブロットで評価した。

【結果】

裂孔原性網膜剥離 (RRD)の患者硝子体では黄斑上膜よりも有意に硝子体中 SDF-1 濃度が高値であった ($P<0.05$ Mann-Whitney U 検定)。血管新生性疾患である PDR では硝子体中の VEGF 濃度と SDF-1 濃度がともに高値であったのに対し、RRD ではほぼ測定限界以下であった。また RRD の硝子体中 SDF-1 濃度は罹病期間、剥離した範囲とそれぞれ正の相関を認めた ($P<0.01$ 、 $P<0.05$ 単回帰分析、 $P<0.05$ 、 $P<0.05$ Spearman 順位相関係数)。また炎症性サイトカイン/ケモカインである Interleukin (IL)-6、IL-8 とも正の相関を認めた ($P<0.01$ 、 $P<0.01$ Spearman 順位相関係数)。ラット網膜剥離モデルではウエスタンブロットにおいて剥離した網膜で著明に SDF-1 の発現を認め、免疫染色では GFAP 陽性のグリア細胞に一致して発現の亢進を認めた。硝子体中に抗 SDF-1 抗体を投与すると剥離 7 日後では抗体を投与した群で外顆粒層厚の菲薄化を認めた ($P<0.05$ Student's T 検定)。剥離 3 日後の網膜に TUNEL 染色を行うと、抗体を投与した群で外顆粒層のアポトーシスが増加し ($P<0.05$ Student's T 検定)、抗 ED-1 抗体陽性のマクロファージの浸潤が増加していた ($P<0.05$ Student's T 検定)。R28 を無血清で培養し細胞死を誘導すると、リコンビナント SDF-1 により細胞の生存が促進されアポトーシスが減少した ($P<0.05$ Student's T 検定)。また scratch wound healing assay では SDF-1 により、創部の修復が促進された ($P<0.01$ Student's T 検定)。SDF-1 が ERK のリン酸化を誘導し、その阻害剤である U0126 により Bcl-2 の発現が抑制されていることから、R28 に対する作用は ERK を介し、Bcl-2 の発現調節によって行われると考えられた。

【結論及び考察】

眼内において SDF-1 は PDR のような血管新生性疾患において注目されており、VEGF と共同して血管新生に関与すると考えられていた。しかし RRD では硝子体中の SDF-1 濃度が増加しており、病態や炎症性サイトカイン/ケモカインと相関しているにも関わらず、VEGF は明らかな増加を認めなかったため、血管新生以外の作用をもっていることが示唆された。ラット網膜剥離モデルにおいて硝子体中の SDF-1 をブロックすると剥離 7 日後の視細胞が減少することから、網膜剥離において視細胞保護的に作用していることが考えられる。現在眼科の臨床で使用されている抗 VEGF 剤では、ターゲット以外の SDF-1 も影響を受けることが報告されており、網膜剥離を伴う病態での安易な治療による予想外の影響も懸念される。今後さらに検討することで、より安全な治療につながる可能性がある。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 128 号	学位申請者	大塚 寛樹
審査委員	主査	乾 明夫	学位
	副査	金蔵 拓郎	副査
	副査	時村 洋	副査
			博士 (医学)
			上村 裕一
			中尾 久美子

Stromal cell-derived factor-1 is essential for photoreceptor cell protection in retinal detachment

(Stromal cell-derived factor-1 は網膜剥離における視細胞保護に重要である)

Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)は血球の新生などに重要な因子であり、骨髄で造血幹細胞の保持や増殖、生存に関与するばかりでなく、心臓や肝臓、眼内の血管新生や組織修復の場において骨髄由来細胞の集積を行っている。眼疾患では、増殖糖尿病網膜症 (Proliferative diabetic retinopathy; PDR)などの虚血を生じる血管新生性疾患で硝子体中の SDF-1 濃度が高値であることが知られている。近年では内眼炎における CD4 陽性 T 細胞の集積や増殖硝子体網膜症の増殖膜形成に関与することも報告されており、SDF-1 の持つ血管新生以外の作用についても注目されている。本研究では一般的に血管新生を生じることの少ない疾患である網膜剥離における SDF-1 の関与について検討している。

患者硝子体の液性因子測定では、裂孔原性網膜剥離 (Rhegmatogenous retinal detachment; RRD)のほうに黄斑上膜よりも有意に硝子体中 SDF-1 濃度が高値であった ($P<0.05$)。PDR では血管内皮増殖因子 (VEGF)濃度と SDF-1 濃度がともに高値であったのに対し、RRD の VEGF 濃度はほぼ 0 pg/ml であった。また RRD の硝子体中 SDF-1 濃度は罹病期間、剥離した範囲とそれぞれ正の相関を認めた。また炎症性サイトカイン/ケモカインである Interleukin (IL)-6、IL-8 とも正の相関を認めた。ラット網膜剥離モデルの実験ではウエスタンブロットにおいて剥離した網膜で著明に SDF-1 の発現を認め、免疫染色では GFAP 陽性のグリア細胞に一致して発現の亢進を認めた。硝子体中に抗 SDF-1 抗体を投与すると剥離 7 日後で外顆粒層厚の菲薄化を認めた ($P<0.05$)。剥離 3 日後の網膜に TUNEL 染色を行うと、抗体を投与した群で外顆粒層のアポトーシスが増加し、抗 ED-1 抗体陽性のマクロファージの浸潤が増加していた。網膜前駆細胞株である R28 を無血清で培養し細胞死を誘導すると、リコンビナント SDF-1 により細胞の生存が促進されアポトーシスが減少した ($P<0.05$)。また scratch wound healing assay ではリコンビナント SDF-1 により、創部の修復が促進された ($P<0.01$)。リコンビナント SDF-1 が ERK のリン酸化を誘導し、その阻害剤である U0126 により Bcl-2 の発現が抑制されていることから、R28 に対する作用は ERK を介し、Bcl-2 の発現調節によって行われると考えられた。

眼内において SDF-1 は PDR のような血管新生性疾患において注目されており、VEGF と共同して血管新生に関与すると考えられていた。しかし RRD では硝子体中の SDF-1 濃度が増加しており、病態や炎症性サイトカイン/ケモカインと相関しているにも関わらず、VEGF 濃度の増加を認めなかった。このことは SDF-1 が VEGF と非依存的に血管新生以外の作用を持つことを示唆している。その作用はラット網膜剥離モデルと R28 の検討から直接的な視細胞保護作用である可能性が考えられる。

本研究は、SDF-1 という最近注目される分子について、その眼科疾患への関与を検討した研究である。患者検体、動物モデル、培養細胞と多方面からの検討を行っており、SDF-1 をブロックすることによる有害な影響も示され、抗 VEGF 剤等の抗体治療を考える上でも重要な知見を提供している。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 123 号	学位申請者	大塚 寛樹
審査委員	主査	乾 明夫	学位
	副査	金蔵 拓郎	副査
	副査	時村 洋	副査
			博士 (医学)
			上村 裕一
			中尾 久美子

主査および副査の5名は、平成23年2月17日、学位申請者 大塚 寛樹君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めるとともに、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。

質問1) Figure 1A で裂孔原性網膜剥離、黄斑円孔、黄斑上膜の硝子体中 SDF-1 濃度の平均値が、論文の数値と異なっているのはなぜか。

(回答) Figure1 のグラフで平均値を示しているが、本文中では中央値を示しているため。

質問2) Wound healing assay の結果から、SDF-1 はアポトーシスの抑制だけでなく、細胞の増殖を促進する作用もあると考えてよいか。

(回答) 細胞の遊走、増殖等の創傷治癒に関連するものを総合的に評価していると考え。増殖に与える影響についても別に評価することが望ましいが、行っていない。

質問3) SDF-1 を誘導する因子で、虚血以外のは考えられるか。また HIF-1 について網膜で検討しているのか。

(回答) 網膜で SDF-1 を分泌する細胞のひとつであるミュラー細胞は網膜の外層まで存在している。虚血以外にも網膜剥離による機械的な刺激が原因となっている可能性はある。HIF-1 については免疫染色等の検討方法が考えられるが行っていない。

質問4) 網膜剥離における SDF-1 の発現は病態にとってどういう位置づけなのか。SDF-1 によってインターロイキンなどが産生されるのか。あるいはマクロファージの集積が先でインターロイキン等を産生し SDF-1 の発現が誘導されるのか。

(回答) SDF-1 によってインターロイキンなどが産生されるかどうかは十分な検討ができていない。網膜、マクロファージの両方でインターロイキンの産生が考えられており、相互に影響を受けていると考えるのが自然だが、詳細は今後の課題である。

質問5) 治療への応用はどのように考えているのか。発症予防であるのか。発症後の進行を抑えるのか、あるいは機能回復まで可能性があるのか。

(回答) 心筋梗塞の治療としては慢性期の機能回復を目的としている。眼科領域でも網膜剥離の手術できない患者などの機能保護に応用できる可能性もある。

質問6) 網膜剥離の範囲を評価するのに Quadrant で分類しているが、臨床の方法で一般的であるのか。

(回答) 臨床の手術前の記録から剥離の範囲を分類して SDF-1 との関連をみた検討法である。臨床でも一般的に剥離の範囲を示す単位として使われている。

質問7) 動物実験ではどれくらいの大きさの網膜剥離を作成するのか。

(回答) 網膜全体の約 1/3 程度の網膜剥離を作成した。

質問8) VEGF の測定限界以下という表現があるのに、論文上で数値がでているのはどういうことか。

(回答) ELISA で測定して測定限界以下であったものは、すべて 0pg/ml としているため。

質問9) SDF-1 の神経保護作用が述べられているが、臨床での脳虚血などに応用できるのか。

(回答) 脳でも虚血の際に SDF-1 が上昇することが報告されており、SDF-1 が神経前駆細胞の誘導に関わっていることもいわれている。脳虚血などの治療に応用できる可能性もある。

最終試験の結果の要旨

質問 10) 抗 VEGF 剤は眼科の臨床で一般的に使用されるのか。

(回答) 現在では加齢黄斑変性、増殖糖尿病網膜症などの治療に広く使用されている。

質問 11) Figure1 で罹病期間が短いに関わらず、SDF-1 濃度が高い症例がある。特殊な症例であったり、増殖硝子体網膜症になっているなどの特徴はなかったのか。

(回答) 期間が短い割に高い濃度の症例は、剥離範囲が広い症例でもあり、それが影響しているかもしれない。手術記録で調べた限り、強い増殖性変化を示すような症例は含まれていない。

質問 12) 剥離している部分の免疫染色を示しているが、剥離眼のなかで剥離していない部分についてはどうか。

(回答) 論文には示していないが、観察した範囲では剥離していない部分はほぼ正常の網膜と同様の所見であった。剥離部に近づくにつれ、グリア細胞の活性化や SDF-1 の発現も亢進している。

質問 13) 3 日後の剥離網膜で SDF-1 の発現を見ているが、7 日後やそれ以降についてはどうか。

(回答) ウェスタンブロット、免疫染色とも 3 日後でしか評価しておらず、十分な根拠はないが、患者硝子体の検討では剥離期間が長くなると硝子体中の SDF-1 濃度が低い症例が少なくなる傾向があり、虚血モデルと異なり、徐々に濃度が上昇するのかもしれない。

質問 14) 網膜剥離で硝子体手術をうけると SDF-1 など硝子体中から除去されてしまうが、その影響はどうか。バックリング手術のほうが優れていると言えるのか。

(回答) 硝子体手術では SDF-1 を含む保護的な因子以外にも、増悪因子なども同時に除去することになり、そのバランスについては今後も検討が必要である。場合によっては液性因子についての眼内環境を変えないバックリング手術のほうがよいこともあるのかもしれない。

質問 15) SDF-1 は全身的に存在する因子であるが、網膜剥離においては局所の産生であると考えてよいのか。

(回答) SDF-1 について血清中と硝子体中の濃度を比較したものはないが、Monocyte chemoattractant protein-1 では眼科疾患の際、硝子体中で血清中よりも有意に濃度が高いと報告されており、SDF-1 についても網膜での発現を考慮すると局所の産生が中心ではないかと考えている。

質問 16) Figure 7 でリコンビナント SDF-1 により R28 のアポトーシスが抑制される効果を示している。100ng/ml でも抑制効果が少ないが、他の細胞でもそうなのか。

(回答) 他の細胞では 100ng/ml で大きな差がつくことも報告されており、細胞の違いで効果が異なっていると考えられる。

質問 17) SDF-1 は IL-6, IL-8 とも弱く相関しているが、IL-6 や IL-8 も病態に関わっていると考えてよいのか。

(回答) IL-6 は網膜剥離の際の神経保護作用があり、IL-8 も白血球遊走などに関して網膜剥離の病態と関わっていると考えられる。またそれらの因子が少量でも存在することで、SDF-1 ともバランスをとっている可能性もある。

質問 18) 眼科で治療に応用できるとすれば SDF-1 は全身的に投与するのか。局所投与のほうがよいのか。

(回答) 心不全の治療などでは局所投与の例がある。眼科に応用すれば硝子体注射などによる投与方法が考えられる。

質問 19) SDF-1 の研究に注目した経緯はどういうものか。

(回答) 当教室から 2007 年に虚血性疾患である網膜静脈閉塞症患者で硝子体中の SDF-1 濃度を測定し、報告しているが、その際に対象疾患のひとつとして裂孔原性網膜剥離でも測定しており、今回の研究につながっている。

質問 20) 細胞において Bcl-2 の発現を検討しているが、剥離網膜での検討は行っていないのか。

(回答) 網膜剥離モデルでは SDF-1 ブロックがアポトーシス増加につながることを示しているが、Bcl-2 の発現は評価していない。本来は検討すべきであると考えられる。

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。