

熊本大学学術リポジトリ

Kumamoto University Repository System

Title	ラット脈絡膜新生血管モデルにおけるピタバスタチンの効果
Author(s)	相良, 仁奈
Citation	
Issue date	2008-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	http://hdl.handle.net/2298/11099
Right	

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文題名 : ラット脈絡膜新生血管モデルにおけるピタバスタチンの効果
(Effect of Pitavastatin in a Rat Model of Choroidal Neovascularization)

著者名 : 相良 仁奈
Nina Sagara

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻視機能病態学 谷原 秀信 教授

審査委員名 : 細胞病理学担当教授 竹屋 元裕
代謝内科学担当教授 荒木 栄一
循環器病態学担当教授 小川 久雄
分子遺伝学担当教授 尾池 雄一

2008年3月

目次

1	要旨	2
2	発表論文リスト	3
3	謝辞	4
4	略語一覧	5
5	本研究の背景と目的	6
5-1	加齢黄斑変性症 (AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION; AMD)	6
5-2	HMG-CoA 還元酵素阻害剤スタチン	10
5-3	AMD とスタチン	11
5-4	本研究の目的	12
6	実験方法	13
6-1	ラット実験的脈絡膜新生血管モデルの作製	13
6-2	薬剤投与	13
6-3	フルオレセイン蛍光眼底造影	14
6-4	FITC-DEXTRAN ANGIOGRAPHY	15
6-5	組織学的検査	16
6-6	REVERSE-TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)	16
6-7	リアルタイム定量 RT-PCR	18
6-8	統計解析	19
7	実験結果	20
7-1	フルオレセイン蛍光眼底造影	20
7-2	FITC-DEXTRAN ANGIOGRAPHY	21
7-3	組織学的検査	23
7-4	RT-PCR	25
7-5	リアルタイム定量 RT-PCR	26
8	考察	27
9	結語	31
10	参考文献	32

1 要旨

加齢黄斑変性症 (AMD) は主に脈絡膜新生血管からの滲出性変化により視機能障害をきたす難治性疾患であり、我が国でも患者数が増加している。近年 AMD と HMG-CoA 還元酵素阻害剤スタチンの内服との関連性についていくつか臨床研究がなされているが、スタチンが AMD の発症、進行に抑制的な効果があるという報告がある一方で、否定的な報告もある。本研究は実験モデルを用いて脈絡膜新生血管のスタチンの効果を評価することを目的とした。

Brown Norway ラットの両眼底にレーザー照射を行い、実験的脈絡膜新生血管を作製した。ラットはピタバスタチン内服 (ピタバスタチン 1mg/kg/day) 群とコントロール群に分け、投薬は脈絡膜新生血管作製の前日より開始した。脈絡膜新生血管の形成と活動性を評価するため、フルオレセイン蛍光眼底造影を行った。コントロール群に比べピタバスタチン群の脈絡膜新生血管の蛍光漏出は有意に少なく、活動性が低いことが示された。脈絡膜新生血管の面積を評価するため、fluorescein isothiocyanate-labeled dextran angiography を行ったところ、ピタバスタチン群の脈絡膜新生血管面積がコントロール群に比べ有意に小さかった。脈絡膜新生血管膜の厚さを評価するため組織学的検査を行ったところ、ピタバスタチン群の脈絡膜新生血管厚がコントロール群に比べ有意に小さかった。また vascular endothelial growth factor (VEGF)、C-C chemokine ligand-2(Ccl-2)、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)の発現および発現量を測定するために Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) とリアルタイム定量 RT-PCR を施行し評価した。VEGF、Ccl-2、ICAM-1 の mRNA 発現量はそれぞれピタバスタチン群のほうがコントロール群に比べ有意に少なかった。

本研究の結果、ピタバスタチン投与により実験的脈絡膜新生血管形成は有意に抑制され、脈絡膜新生血管形成に重要な役割をもつ VEGF、Ccl-2、ICAM-1 の発現低下がメカニズムの一端として示唆された。これはスタチンの脂質低下作用とは独立した多面的効果によるものと思われた。ピタバスタチン内服により AMD 患者の脈絡膜新生血管の発症や進行を抑えられる可能性が示唆された。

2 発表論文リスト

関連論文

1. Sagara N, Kawaji T, Takano A, Inomata Y, Inatani M, Fukushima M, Tanihara H.
Effect of pitavastatin on experimental choroidal neovascularization in rats.
Exp Eye Res. 2007; 84:1074-80.

その他の論文

2. Kawaji K, Inomata Y, Takano A, Sagara N, Inatani M, Fukushima M, Tanihara H, Honjo M.
Pitavastatin: Protection against Neuronal Retinal Damage Induced by Ischemia-Reperfusion Injury in Rats.
Current Eye Research. 2007; 32:991-997
3. Takano A, Hirata A, Ogasawara K, Sagara N, Inomata Y, Kawaji T, Tanihara H.
Posterior Vitreous Detachment Induced by Nattokinase (Subtilisin NAT): A Novel Enzyme for Pharmacologic Vitreolysis.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006; 47:2075-9.

3 謝辞

本研究を行うにあたり、御懇篤なる御指導をいただきました熊本大学大学院医学薬学研究科視機能病態学講座、谷原秀信教授に深謝いたします。

また、直接御指導と御鞭撻をいただきました熊本大学大学院医学薬学研究科視機能病態学講座、川路隆博先生に深謝いたします。

本研究および大学院において、さまざまな御指導と多大な御協力をいただきました熊本大学大学院医学薬学研究科視機能病態学講座、高野晃臣先生、猪俣泰也先生、稲谷大講師、福島美紀子准教授、佐賀大学医学部眼科学部講座、平田憲准教授に厚く感謝いたします。

4 略語一覧

AMD; Age-related macular degeneration, 加齢黄斑変性症

Ccl-2; C-C chemokine ligand-2

FITC; fluorescein isothiocyanate

HMG-CoA; 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A

ICAM-1; intercellular adhesion molecule-1

LDL; low-density lipoprotein oxidation

MCP-1; monocyte chemoattractant protein-1

PBS; phosphate buffered saline, リン酸塩緩衝液

RPE; retinal pigment epithelium, 網膜色素上皮

RT-PCR; Reverse-transcription polymerase chain reaction

VEGF; vascular endothelial growth factor, 血管内皮増殖因子

5 本研究の背景と目的

5-1 加齢黄斑変性症 (Age-related macular degeneration; AMD)

眼球は外界の物体をみるために光刺激を感受する光受容器である。眼に入った光は、角膜、水晶体、硝子体を通して網膜の上に像を結び、その情報は視神経を介して脳の視中枢に伝達されて最終的に影像として認識される。黄斑は網膜の中心の直径約2mmの場所をさし、網膜の中でも光刺激を感受する視細胞(錐体、杆体)が集中している部位で、物の形、大きさ、色、立体、距離など光の情報の大半を識別している。またその黄斑の中心には中心小窩という浅い凹みがあり、とくにその部位には色や形態の識別能が高い錐体のみが分布する。それゆえ、黄斑に異常が生じ、それが中心小窩に及ぶと著しい視力低下をきたすことになる。

黄斑に異常をきたす疾患の一つに加齢黄斑変性症(以下、AMD)がある。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¹。近年我が国においてもAMD患者数は増加傾向にあり、福岡県久山町研究によるとその発症率も今や欧米並みになってきている^{2,4}。

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⁵。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(図1A)。一方の滲出型のAMDの本態は脈絡膜新生血管である。脈絡膜新生血管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（図 2）。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。脈絡膜新生血管は透過性が亢進しており、出血や滲出性変化を生じる。この脈絡膜新生血管は網膜の黄斑部およびその周辺に生じやすく、そのため中心視力が著しく低下し視力予後が不良となる（図 1B、C）。脈絡膜新生血管の病因は、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⁶。

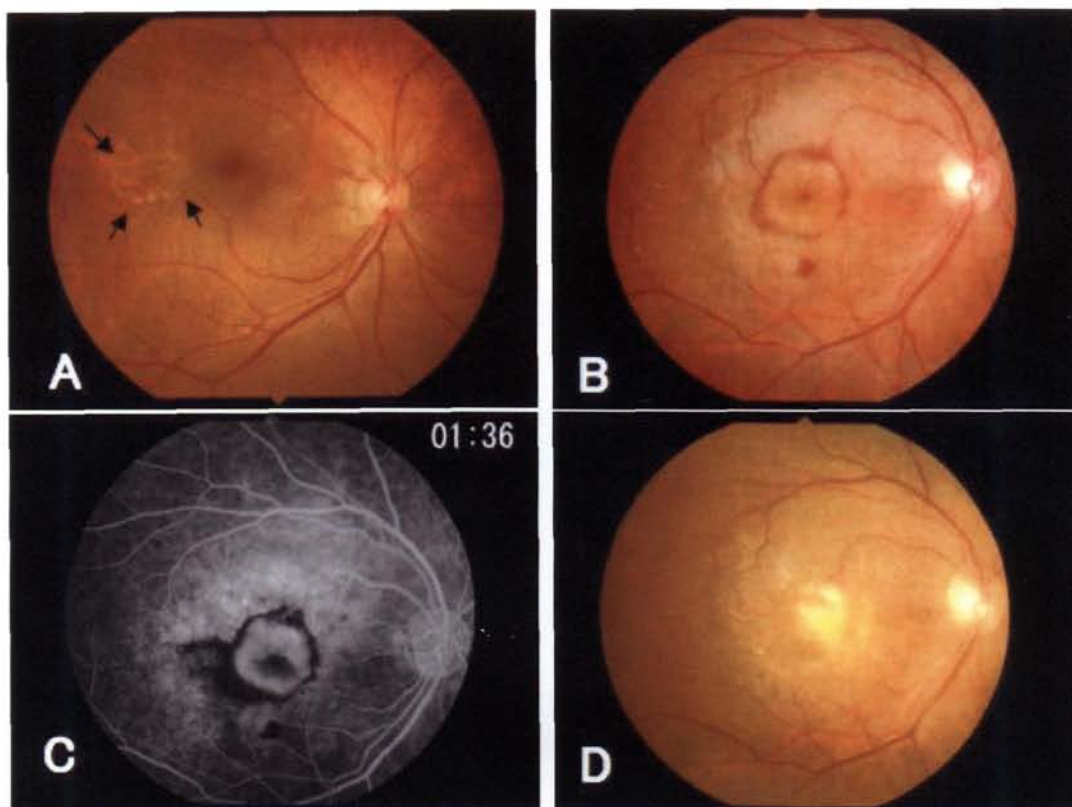


図1 加齢黄斑変性症の眼底写真

加齢黄斑変性症 (AMD) は萎縮型と滲出型とに大別される。

A: 萎縮型AMD。網膜色素上皮の萎縮(黒矢印に囲まれた領域)があり、脈絡膜血管がはっきり透見される。

B: 滲出型AMD。眼底写真では脈絡膜新生血管は結合組織を伴う白色の隆起病変として観察される。病変の周囲には出血や滲出を伴う。

C: Bのフルオレセイン眼底造影写真。脈絡膜新生血管は境界鮮明な過蛍光域として観察される。

D: 滲出型AMDの瘢痕期。白色の瘢痕性病変が黄斑部を破壊し、視力は不良である。

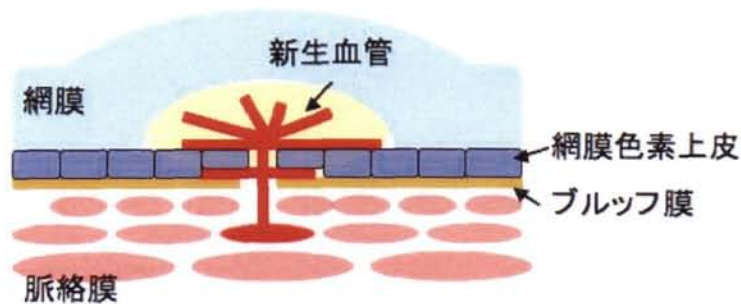


図2 脈絡膜新生血管の模式図

脈絡膜血管由来の新生血管は、ブルッフ膜を破壊して網膜色素上皮下や網膜下に侵入、発育する。

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ある。光凝固治療^{7,9}、手術、光線力学的療法^{10,11}、抗VEGF抗体の硝子体注入術¹²などがあり、いずれも一定の治療成績はあげているが十分な結果は得られていない。というのも、脈絡膜新生血管の閉塞が得られた場合でも、強い増殖性変化などにより網脈絡膜に瘢痕病変を残すため視力がでないことが多いためである（図1D）。満足の得られる視力、視機能を維持するという観点から脈絡膜新生血管の発生および進行を未然に防ぐことが望ましいが、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¹³や禁煙をすすめることなどである。AMD患者が増加傾向となっている今、脈絡膜新生血管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。

5-2 HMG-CoA 還元酵素阻害剤スタチン

スタチンは HMG-CoA 還元酵素阻害剤の総称であり、高脂血症の治療薬として広く臨床応用されている^{14,15}。スタチンは、肝でのコレステロール生合成における律速酵素である HMG-CoA 還元酵素を特異的かつ競合的に阻害する。肝細胞内のコレステロール含量低下により、LDL 受容体の発現を促進し、血液中から肝細胞への LDL-コレステロールの取り込みが増加し、その結果血清中のコレステロールが低下する。スタチンはこの脂質低下作用に加え、非脂質低下作用の多面的効果 (pleiotropic effect) を持つことでも注目されている。この多面的効果には血管内皮機能改善、LDL 酸化低下作用、泡沫細胞低下作用、白血球-血管内皮相互作用の低下、プラーク破裂の減少、平滑筋細胞増殖の低下作用などが含まれる¹⁶⁻¹⁸。さらにスタチンには抗炎症作用と抗血管新生作用も有している¹⁹⁻²¹。脂質低下作用と非脂質低下作用のいずれも心血管疾患の予防に効果的であると考えられている^{22,23}。

スタチン系の化合物は多くの種類が開発されていて、微生物の代謝物から単離されたプラバスタチンなどの第一世代スタチン系薬剤、これに対しさらに強力な薬理活性をもち完全な化学合成品である第二世代スタチン系薬剤および第三世代のスタチン系薬剤がある。本研究で用いたピタバスタチン（販売名：リバロ、別名；NK-104）は第三世代のスタチン系薬剤であり、構造式は図3のと

おりで、分子式： $C_{50}H_{46}CaF_2N_2O_8$ 、分子量：880.98 である。血管内皮と親和性が高く、いわゆる vascular statin ともいわれる。

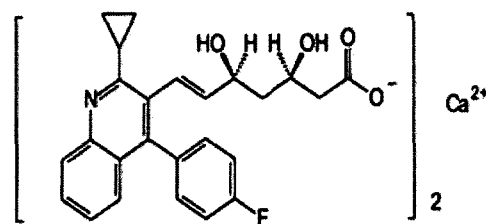


図3 ピタバスタチンの構造式

5-3 AMD とスタチン

AMD が動脈硬化と共通の危険因子を有することが今までの多くの疫学的調査で示されている。AMD と動脈硬化の共通の危険因子には加齢、喫煙、高血圧、肥満、脂質摂取などが含まれる²⁴⁻²⁷。さらにスタチンは心血管疾患に対する保護効果が確立されているため、AMD に対しても保護的作用を有しているのではな

いかと推察されている。最近、小規模の cross-sectional survey ではあるが、スタチンが AMD の発症予防に効果的であるとの報告があった²⁸。しかしながら、スタチンが AMD 発症を予防するかどうかについては、報告によって意見が分かれる^{26,29-31}。

5-4 本研究の目的

今回、スタチンの AMD への効果を調べることを目的とし、実験的に脈絡膜新生血管を誘発した実験動物にピタバスタチンを内服させ研究を行った。げっ歯類はスタチンのコレステロール低下作用に抵抗性であるため、実験動物にはラットを用いた^{32,33}。

6 実験方法

6-1 ラット実験的脈絡膜新生血管モデルの作製

以下のすべての実験における動物の取り扱い、Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) で決められたガイドラインを遵守して行った。6週令雄、体重 120-160g の Brown Norway (BN) ラット (Seac Yoshitomi, Fukuoka) を用いた。麻酔は、塩酸ケタミン (Ketalar; Sankyo, Tokyo) と塩酸キシラジン (Seraktar; Bayer, Tokyo) を 1:1 に混合した液 (1 mL/kg) の筋肉内注射を用いた。また両眼に 0.5% トロピカミド (0.5% Mydrin M; Santen, Osaka) を点眼し散瞳させ、過去の報告に準じてレーザー誘発実験的脈絡膜新生血管を作製した³⁴。レーザー光凝固装置および細隙灯照射システムを用いて、各眼球の視神経乳頭周囲 (主要網膜血管は避けて) にレーザー光凝固を 4 発ずつ施行した。実験的脈絡膜新生血管作製のための光凝固の条件は、レーザー出力 150mW、波長 521 nm、凝固時間 100 ms、スポットサイズ 100 μ m とした。ブルッフ膜が破れるのをエアバブルサインで確認し、レーザー光凝固施行の際に網膜出血や脈絡膜出血などを生じたものは除外した。

6-2 薬剤投与

全部で 38 匹の BN ラットを 2 群 ; ピタバスタチン投与群 (n=19) 及びコントロール群 (n=19) にわけた。ピタバスタチンは興和創薬株式会社 (Tokyo) より

提供された。ピタバスタチンを 0.5% カルボキシメチルセルロースナトリウム (Wako, Osaka) 溶液に溶解し、ピタバスタチン群のラットにはピタバスタチン溶液(1mg/ kg/ day)を投与した。コントロール群には 0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液のみを投与した。投与方法は 20 ゲージのゾンデ針を用いて内服させた。レーザーによる脈絡膜新生血管作製の前日より 1 日 1 回の投与を開始し、眼球摘出時まで毎日投与した。

6-3 フルオレセイン蛍光眼底造影

レーザー誘発脈絡膜新生血管作製から 14 日目に、脈絡膜新生血管の発達と活動性を評価するためにフルオレセイン蛍光眼底造影検査を施行した。塩酸ケタミンと塩酸キシラジン (1:1 に混合、1 mL/kg) 筋肉内注射で麻酔し、両眼を 0.5%トロピカミドにて散瞳させた後に、0.5mL の 10%フルオレセインナトリウム (フルオレサイト; Alcon, Tokyo) を腹腔内注射し投与し、眼底造影写真を scanning laser ophthalmoscope (SLO101; Rodenstock, Germany)を用いて撮影した。既報に従って、脈絡膜新生血管は大きさおよび蛍光漏出の程度により判定した^{34,35}。脈絡膜新生血管判定のガイドラインは以下のとおりとした。脈絡膜新生血管スコア 0 : 蛍光漏出なし、スコア 1 ; わずかに蛍光漏出を認めるあるいは組織染のみのも、スコア 2 ; 中等度の蛍光漏出、小さいが明らかに 1/4 視神経乳頭径以下の蛍光漏出をみとめるもの、スコア 3 ; 高度の蛍光漏出、大きく、旺盛な蛍光漏出を認めるもの。典型的な脈絡膜新生血管の蛍光眼底造影写真を図 4 に

示す。脈絡膜新生血管スコアは二人の検査者が判定した。

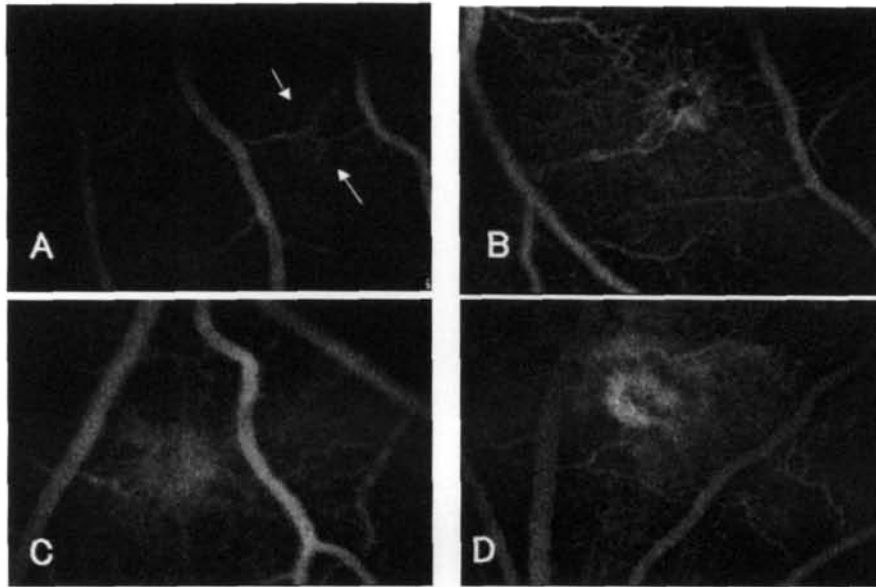


図4 脈絡膜新生血管のフルオレスセイン蛍光眼底造影写真

- A: スコア0, 蛍光漏出なし(白矢印はレーザー照射部位を示す)
- B: スコア1, 蛍光漏出最小もしくは組織染のみ
- C: スコア2, 中等度の蛍光漏出
- D: スコア3, 高度の蛍光漏出

6-4 FITC-dextran angiography

レーザー誘発脈絡膜新生血管作製から 14 日後に、FITC-dextran angiography を既報の方法に一部変更を加え施行した^{36, 37}。ラットに前述と同様の麻酔をかけ、開胸し心臓を露出させた。左心室に 20G カニューレを挿入し、PBS 50ml に溶解した FITC-dextran 250mg (分子量; 2×10^6 , Sigma, St Louis, MO, USA) をかん

流させた。直ちに眼球を摘出し、4%パラフォルムアルデヒドに浸漬した。浸漬5時間後に眼球の角膜、水晶体を切除し、網膜を剥離してRPE-脈絡膜-強膜フラットマウント標本を作成し、蛍光顕微鏡 (BX51, OLYMPUS) で FITC-dextran にて描出された脈絡膜新生血管を撮影した。さらに画像解析ソフト (Lumina Vision; Mitani Corporation, Fukui) にて脈絡膜新生血管の面積を計測した。

6-5 組織学的検査

また別の数匹のラットから、レーザー誘発脈絡膜新生血管作製より14日後に眼球を摘出した。その眼球を4%パラフォルムアルデヒドと2.5%グルタルアルデヒドの混合液に24時間浸漬した。その後 posterior eye cup (網膜-RPE-脈絡膜-強膜) とし、パラフィン包埋した。このパラフィン標本より6 μ m連続切片を作製した。切片はヘマトキシリン・エオジン (HE) で染色し、光学顕微鏡 (BX51, OLYMPUS) で脈絡膜新生血管形成部位 (脈絡膜新生血管膜) を撮影した。撮影した脈絡膜新生血管膜の厚さを前述の画像解析ソフトにて計測した。なお脈絡膜新生血管膜の厚さは、各脈絡膜新生血管形成膜の切片の中で垂直方向に最も厚みのある部分を測定した。

6-6 Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

ピタバスタチン群およびコントロール群それぞれの眼球をレーザー誘発脈絡

膜新生血管作製より3日後に摘出した。直ちに角膜と水晶体をとりのぞいた posterior eye cupとし、SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて総RNAを抽出した。ゲノムDNAを取り除くためにDnase I (Promega, Tokyo, Japan)で処理した。ラット VEGF、 Ccl-2、 ICAM-1 と内因性コントロール Actin beta (Actb) の mRNAを検出するために、RT-PCRを施行した。RT-PCR は10ng の総RNA、 SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) Taqman Gene Expression assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用い、9800 Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems) にて行った。Taqman Gene Expression assaysのRT-PCR用のプライマーのシークエンスは公開されていないが、エクソン2とエクソン3にまたがるようにデザインされ、ゲノムのDNAを増幅しないように設計されている。ラット VEGF、 Ccl-2、 ICAM-1、 Actbの assay IDおよびPCR産物の長さは表1のとおりである。RT-PCRのプログラムは50°Cで30分間、95°Cで10分間を1サイクルずつ、95°Cで15秒間、60°Cで1分間を40サイクルとした。PCR産物10 μ lをエチジウムブロマイド染色された3%アガロースゲルで電気泳動し、Printgraph (model AE-6911, ATTO, Tokyo) と Image Saver (model AE-6905H, ATTO, Tokyo) で撮影、保存した。

表1 Assay IDs

	Assay ID	PCR産物
VEGF	Rn 00582395_m1	75 bp
Ccl-2	Rn 00580555_m1	95 bp
ICAM-1	Rn 00564227_m1	61 bp
Actb	Rn 00667869_m1	91 bp

6-7 リアルタイム定量 RT-PCR

ラットVEGF、Ccl-2、ICAM-1、ActbのmRNAsの定量のため、前述の10 ng の 総 RNA、SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq 、Taqman Gene Expression assaysを用い、ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) にてリアルタイム定量RT-PCR を施行した。リアルタイム定量RT-PCR のプログラムは、50°Cで30分間、95°Cで10 分間を1サイクルずつ、95°Cで15秒間、60°Cで1分間を50サイクルとした。50サイクルの反応終了後、特異的なPCR産物が得られていることを確認するため、増幅曲線を確認した。標準曲線から得られた

VEGF、Ccl-2、ICAM-1の mRNA値 は Actbの mRNA値により補正して表した。

6-8 統計解析

データは平均値 ± 標準誤差であらわす。脈絡膜新生血管スコア、脈絡膜新生血管面積、脈絡膜新生血管厚については、unpaired t-testにて解析した。リアルタイム定量RT-PCRにおけるVEGF、Ccl-2、ICAM-1の mRNA値 (Actbにて補正) についてはMann-Whitney U-test にて解析した。p値<0.05を統計学的に有意差ありとした。

7 実験結果

7-1 フルオレセイン蛍光眼底造影

ピタバスタチン投与群 (n=8) およびコントロール群 (n=8) の各レーザー照射部位の蛍光漏出程度は脈絡膜新生血管スコア(図4)にて評価した。図5Aに示すようにピタバスタチン投与群では脈絡膜新生血管スコアが小さいものが多かった。コントロール群の平均脈絡膜新生血管スコアが 1.89 ± 0.12 だったのに対し、ピタバスタチン投与群は 1.36 ± 0.09 であり、両群間には統計学的有意差を認めた ($p < 0.05$) (図5B)。

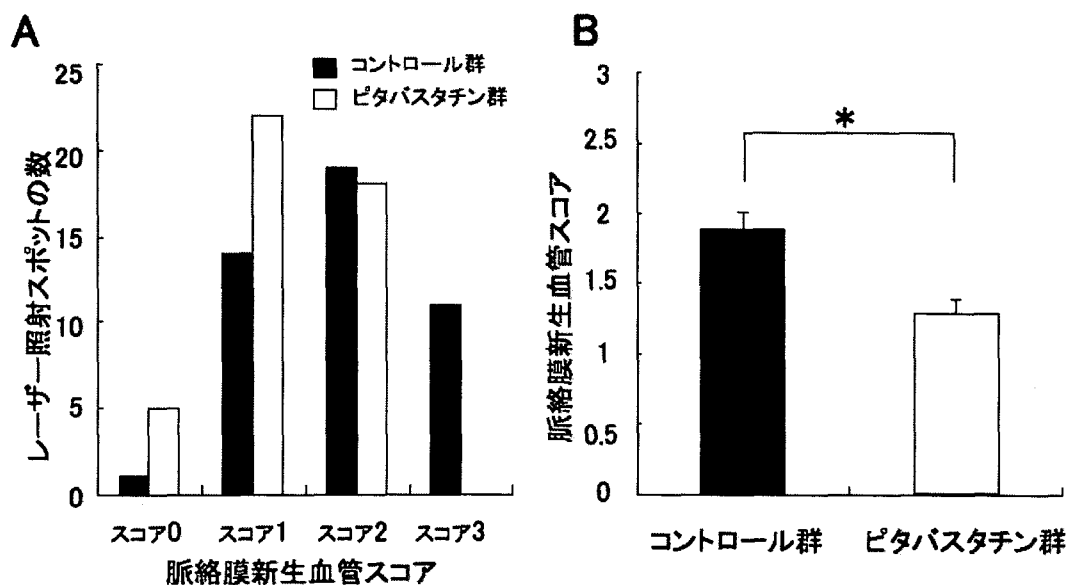


図5 レーザー誘発脈絡膜新生血管作製14日後の脈絡膜新生血管スコア

A: コントロール群、ピタバスタチン群の各スコア0-3のレーザー照射スポットの数。

B: コントロール群、ピタバスタチン群の平均脈絡膜新生血管スコア。

*: $p < 0.05$, unpaired t-test.

7-2 FITC-dextran angiography

図 6 A、Bのようにレーザー誘発脈絡膜新生血管は、FITC-dextranで血管壁がラベリングされ、緑色蛍光で描出される。この緑色蛍光で描出された領域を脈絡膜新生血管の面積として測定した。脈絡膜新生血管の面積はコントロール群 (n=11) が $41.24 \pm 2.48 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ であるのに対し、ピタバスタチン群 (n=11) が $29.51 \pm 2.85 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ であり、両群間には有意差を認めた ($p < 0.05$) (図 6 C)。

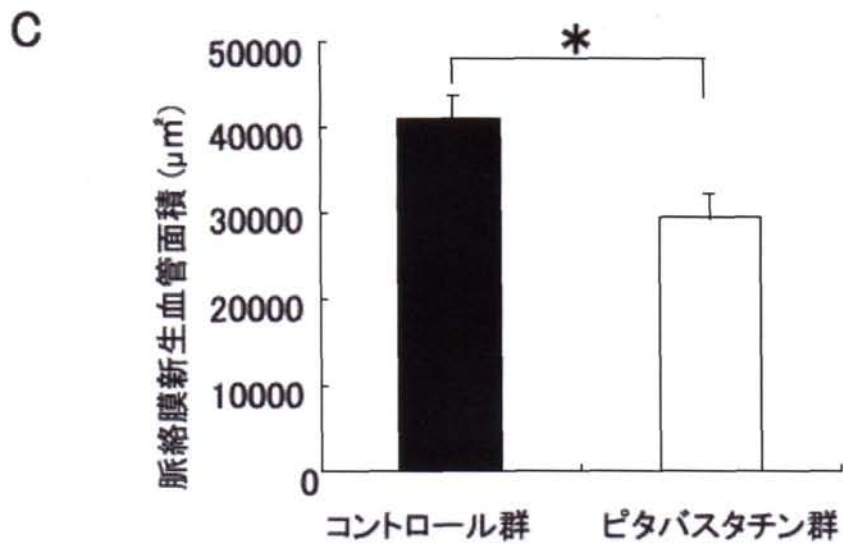
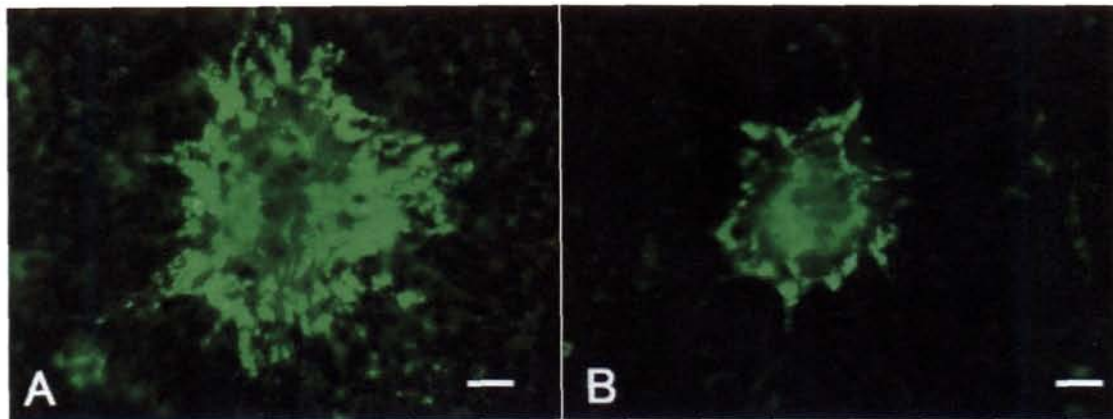


図6 レーザー誘発脈絡膜新生血管作製14日後の脈絡膜新生血管面積

A,B: FITC-dextran angiography により脈絡膜新生血管は緑色蛍光に描出される。

A: コントロール群。B: ピタバスタチン群。Scale bar=100 μm.

C: 脈絡膜新生血管の平均面積。

コントロール群に比べピタバスタチン群の面積は有意に小さかった。

* : $p < 0.05$, unpaired t-test.

7-3 組織学的検査

レーザー照射より14日後の脈絡膜新生血管膜のH-E染色の写真を図7 (A、B) に示す。組織学的に実験的脈絡膜新生血管膜は、脈絡膜からRPEおよび網膜下を占拠する、脈絡膜由来の新生血管とともに線維芽細胞やRPEを含む増殖膜として観察される。脈絡膜新生血管膜の厚さを計測したところ、コントロール群は $114.2 \pm 8.1 \mu\text{m}$ (n=3) で、ピタバスタチン群は $73.4 \pm 8.1 \mu\text{m}$ (n=3) であり、ピタバスタチン群の脈絡膜新生血管の厚さは有意に小さかった ($p < 0.05$) (図7C)。

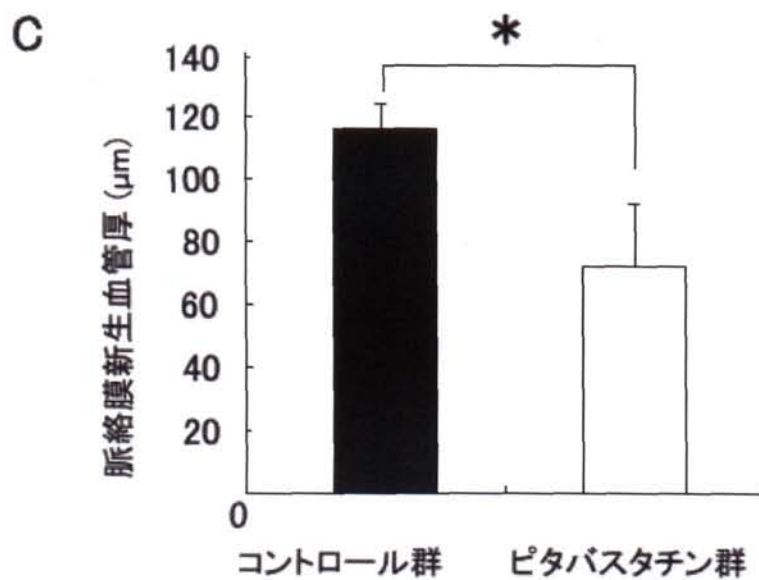
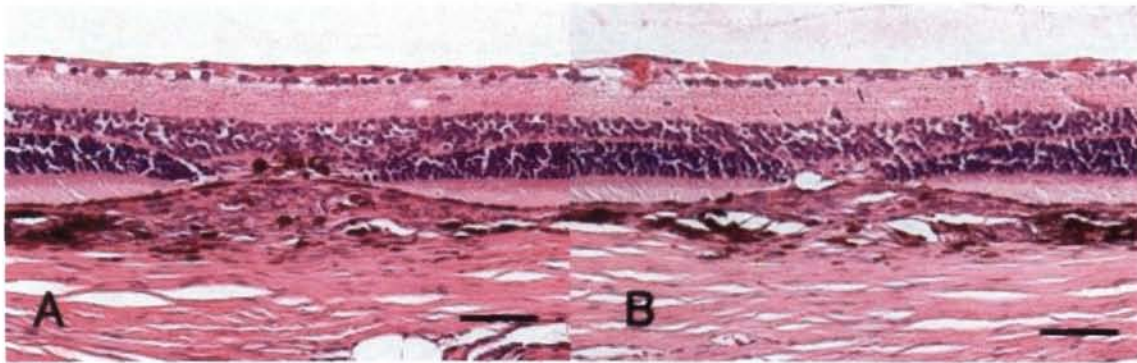


図7 レーザー誘発脈絡膜新生血管作製14日後の脈絡膜新生血管厚

A,B:脈絡膜新生血管部位(Hematoxylin & Eosin染色)の光学顕微鏡写真。

A:コントロール群。B:ピタバスタチン群。Scale bar=100 μ m.

C: 脈絡膜新生血管の平均の厚さ。

コントロール群に比べピタバスタチン群の厚さは有意に小さかった。

* : $p < 0.05$, unpaired t-test.

7-4 RT-PCR

脈絡膜新生血管の形成に重要な役割をもつ分子と考えられる VEGF, Ccl-2, ICAM-1 の遺伝子発現をみるために、RT-PCR を施行した。VEGF, Ccl-2, ICAM-1 mRNA の発現はいずれもコントロール群に比べピタバスタチン群のものが少なかった (図8)。

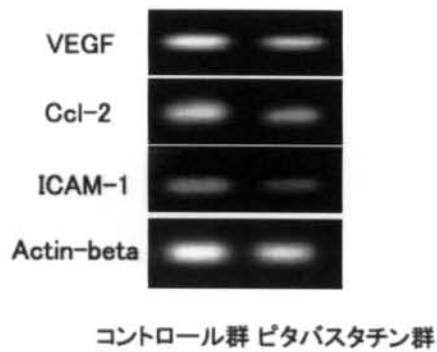


図8 RT-PCR

レーザー誘発脈絡膜新生血管作製3日後のVEGF, Ccl-2, ICAM-1, Actin-betaのmRNAの発現をRT-PCRにて分析した。ピタバスタチン群のVEGF, Ccl-2, ICAM-1のmRNA発現はコントロール群に比べ少なかった。

7-5 リアルタイム定量 RT-PCR

リアルタイム定量 RT-PCR にて VEGF, Ccl-2, ICAM-1 mRNA を定量したところ、図 9 に示すように VEGF, Ccl-2, ICAM-1 mRNA のいずれもコントロール群に比べ、ピタバスタチン群で有意に抑制されていた ($p < 0.05$ 、各群 $n = 5$ ずつ)。なお、Actb の発現量はコントロール群とピタバスタチン群はほぼ同等であった。

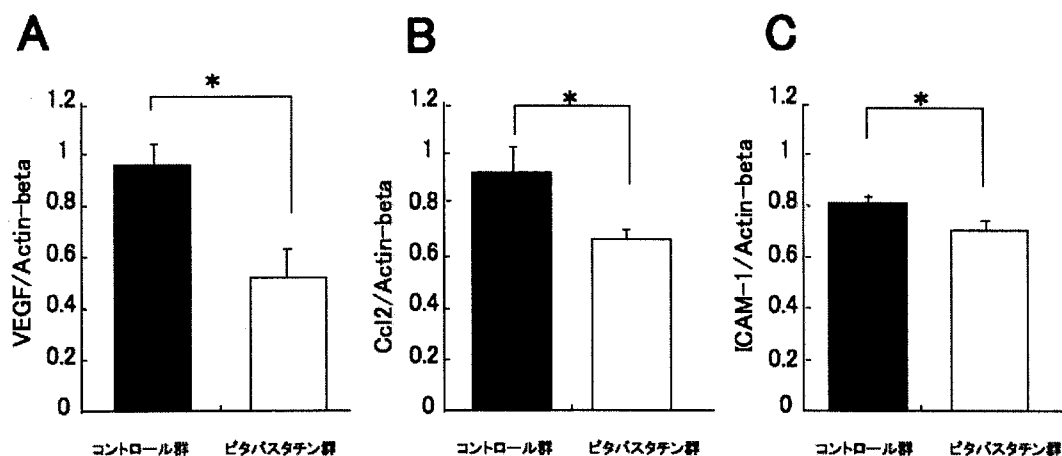


図9 リアルタイム定量RT-PCR

レーザー誘発脈絡膜新生血管作製3日後のVEGF(A)、Ccl-2(B)、ICAM-1(C)のmRNAの発現量をリアルタイム定量RT-PCRにて評価した。ピタバスタチン群のVEGF、Ccl-2、ICAM-1のmRNA発現量はコントロール群に比べ有意に少なかった。

* : $p < 0.05$, unpaired t-test.

8 考察

本研究で、ピタバスタチンがラット実験的脈絡膜新生血管を効果的に抑制することが示された。ピタバスタチン群ではコントロール群と比し有意に脈絡膜新生血管からの蛍光漏出が抑制されていることがフルオレセイン蛍光眼底造影検査で確認できた。また FITC-dextran angiography、組織学的検査にて、脈絡膜新生血管の面積および脈絡膜新生血管膜の厚さがピタバスタチン群で有意に小さかったことも確認した。これらのデータは、ピタバスタチンが実験的脈絡膜新生血管の形成、発達を抑制することを示唆する。また、脈絡膜新生血管形成にて重要な役割をもつ分子と考えられている VEGF、Ccl-2、ICAM-1 などの遺伝子発現もピタバスタチンにて抑制されたことも示した。VEGF、Ccl-2、ICAM-1 の遺伝子発現の低下は、ラット実験的脈絡膜新生血管の形成を抑えるメカニズムのひとつの要因ではないかと考えられる。

AMD の病因はいまだ不明瞭であり、AMD の本態である脈絡膜新生血管形成にどのような病理学的機構が関わっているのかもよくわかっていない。AMD と動脈硬化とはいくつかの危険因子を共有していることは示されており³⁸、この二つの疾患が似た病因をもっているのではないかと考えられている。さらにスタチンには心血管疾患の保護作用が確立されており、動脈硬化と深い関係のある心血管イベントの予防効果がある。このような背景から、AMD とスタチンの関連性についていくつかの臨床研究が報告されている。しかしながら、スタチン内服が AMD の発症・進行を抑えるかどうかについてはそれぞれの研究によって

意見がわかれている^{26,28-31}。

VEGF は血管新生において中心的な役割をもつ分子としてよく知られており、AMD 患者の脈絡膜新生血管も VEGF をはじめその他いくつかの分子や炎症細胞などが関連している。VEGF の発現は、手術で摘出された脈絡膜新生血管膜^{39,40} および実験的脈絡膜新生血管^{41,42} で確認されている。スタチンと血管新生に関する過去の報告によると、*in vitro* でスタチンが低用量の場合には血管新生を促進するが、別の条件下ではスタチンが抑制効果を示すことが知られている⁴³⁻⁴⁵。つまりスタチンは濃度や条件の違いで血管新生に対して促進方向にも抑制方向にも作用しうる。最近、Zambarakji らは臨床上での標準用量のピタバスタチンはマウス実験的脈絡膜新生血管の発症を抑えるが、100 倍の高用量では逆に脈絡膜新生血管の活動性が増加することを報告した⁴⁶。しかし網膜 VEGF 濃度の結果は、脈絡膜新生血管の抑制効果と相関する結果ではなかった。おそらくそれはスタチンの VEGF とは独立したメカニズムであろうと考察されている。一方で、本研究では臨床上での標準用量のピタバスタチンがラットの実験的脈絡膜新生血管の形成を抑制したことに加え、VEGF の遺伝子発現も抑制した(VEGF 蛋白レベルは未検討)ことを示した。VEGF の合成は研究の条件にも影響され、VEGF の効果も血管内皮細胞の血管新生の活動性と平行しないこともある⁴⁵。そのため、Zambarakji らの研究と本研究ではいくつかの点で相違が生じたのではないかと考えられる。

炎症細胞マクロファージが AMD の発症に関与していることもよく知られている。Ccl-2(MCP1 ともいわれる)はマクロファージ走化因子の一つであるが、脈絡膜新生血管の発達に強く関与していると考えられている^{47,48}。さらに、

lymphocyte function associated antigen-1 を介して白血球-血管内皮の接着と遊走に関わる ICAM-1⁴⁹ が、実験的脈絡膜新生血管モデルに関与していることも知られている^{41,50}。この Ccl-2 と ICAM-1 に関してスタチンの抑制効果がいくつか報告されている。スタチンは *in vitro* で Ccl-2 発現の抑制効果があり、*in vivo* で Ccl-2 の生成を抑えるとの報告がある⁵¹。また、Honjo ら⁵²、当研究室の Kawaji ら⁵³ はラット網膜虚血再灌流モデルで3つのスタチン（プラバスタチン、セリバスタチン、ピタバスタチン）が P-selectin と ICAM-1 を阻害し白血球-血管内皮相互作用を抑制し、網膜神経保護効果があると報告した。これらの報告同様に本研究ではピタバスタチンによる Ccl-2 と ICAM-1 の発現低下が認められた。

本研究では、ピタバスタチンがラット実験的脈絡膜新生血管の VEGF、Ccl-2、ICAM-1 の遺伝子発現を抑制することを示したが、脈絡膜新生血管は VEGF、Ccl-2、ICAM-1 以外の分子もさまざまに相互作用し形成されると考えられるため、もちろんこの結果では実験的脈絡膜新生血管に対するピタバスタチンの分子メカニズムについて十分に評価できたわけではない。また本研究はスタチンのコレステロール低下作用に抵抗性であるラットを用いているため、コレステロール低下作用とは独立した、スタチンの抗炎症作用などのいわゆる多面的効果を介したものであることが示唆される。さらにピタバスタチンは *vascular statin* ともよばれる、血管内皮に高親和性のあるスタチンである。血管内皮との高親和性が実験的脈絡膜新生血管により効果的に働いた可能性もある。

現在の AMD の治療法は活動性のある脈絡膜新生血管に対するものが主流で制限もあり、失明を防ぐという点で十分な効果は得ていない⁷⁻¹²。視機能維持には脈絡膜新生血管の形成を抑えることが最も重要である。しかしながら、現在

のところ AMD の発症、進行予防としては禁煙とサプリメントの服用をすすめることなどに限られている¹³。それゆえ AMD の発症、進行予防の新しい方法が必要であると考えられている。本研究におけるデータはピタバスタチン内服が AMD 患者の脈絡膜新生血管予防に有益である可能性を示唆した。ただスタチンと AMD に関しては今後プロスペクティブ無作為比較研究にて更なる検討が必要であると考ええる。

9 結語

本研究の結果、ピタバスタチンは実験的脈絡膜新生血管に対して抑制的な効果があることが示された。ピタバスタチン内服により AMD 患者の脈絡膜新生血管の発症や進行を抑えられる可能性が示唆された。

10 参考文献

1. Fine SL, Berger JW, Maguire MG, Ho AC. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2000;342:483-92.
2. Oshima Y, Ishibashi T, Murata T, Tahara Y, Kiyohara Y, Kubota T. Prevalence of age related maculopathy in a representative Japanese population: the Hisayama study. *Br J Ophthalmol* 2001;85:1153-7.
3. Miyazaki M, Nakamura H, Kubo M, et al. Risk factors for age related maculopathy in a Japanese population: the Hisayama study. *Br J Ophthalmol* 2003;87:469-72.
4. Miyazaki M, Kiyohara Y, Yoshida A, Iida M, Nose Y, Ishibashi T. The 5-year incidence and risk factors for age-related maculopathy in a general Japanese population: the Hisayama study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:1907-10.
5. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol* 1995;39:367-74.
6. Zarbin MA. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration *Arch Ophthalmol* 2004;122:598-614.
7. Macular Photocoagulation Study Group. Argon laser photocoagulation for senile macular degeneration. Results of a randomized clinical trial. *Arch Ophthalmol* 1982;100:912-8.
8. Macular Photocoagulation Study Group. Laser photocoagulation of subfoveal neovascular lesions in age-related macular degeneration. Results of a randomized clinical trial. *Arch Ophthalmol* 1991;109:1220-31.
9. Macular Photocoagulation Study Group. Laser photocoagulation for juxtafoveal choroidal neovascularization. Five-year results from randomized clinical trials. *Arch Ophthalmol* 1994;112:500-9.
10. Treatment of age-related macular degeneration with photodynamic therapy (TAP) Study Group. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: one-year results of 2 randomized clinical trials--TAP report. *Arch Ophthalmol* 1999;117:1329-45.
11. The Japanese Age-Related Macular Degeneration Trial (Jat) Study Group. Japanese age-related macular degeneration trial: 1-year results of photodynamic therapy with

- verteporfin in Japanese patients with subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2003;136:1049-61.
12. Spaide RF, Laud K, Fine HF, et al. Intravitreal bevacizumab treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Retina* 2006;26:383-90.
13. Age-related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol* 2001;119:1417-36.
14. Mahley RW, Huang Y, Rall SC, Jr. Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *J Lipid Res* 1999;40:1933-49.
15. Vaughan CJ, Gotto AM, Jr., Basson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1-10.
16. Bellosta S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A. Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med* 2000;32:164-76.
17. Hess DC, Fagan SC. Pharmacology and clinical experience with simvastatin. *Expert Opin Pharmacother* 2001;2:153-63.
18. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1712-9.
19. Pruefer D, Scalia R, Lefer AM. Simvastatin inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against inflammatory processes in normocholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2894-900.
20. Jialal I, Stein D, Balis D, Grundy SM, Adams-Huet B, Devaraj S. Effect of hydroxymethyl glutaryl coenzyme a reductase inhibitor therapy on high sensitive C-reactive protein levels. *Circulation* 2001;103:1933-5.
21. Kwak B, Mulhaupt F, Veillard N, Pelli G, Mach F. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin inhibits IFN-gamma induced MHC class II expression in human vascular endothelial cells. *Swiss Med Wkly* 2001;131:41-6.
22. Plenge JK, Hernandez TL, Weil KM, et al. Simvastatin lowers C-reactive protein within 14 days: an effect independent of low-density lipoprotein cholesterol reduction. *Circulation* 2002;106:1447-52.
23. Wassmann S, Faul A, Hennen B, Scheller B, Bohm M, Nickenig G. Rapid effect of

- 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition on coronary endothelial function. *Circ Res* 2003;93:e98-103.
24. Mitchell P, Smith W, Attebo K, Wang JJ. Prevalence of age-related maculopathy in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 1995;102:1450-60.
25. Klaver CC, Assink JJ, van Leeuwen R, et al. Incidence and progression rates of age-related maculopathy: the Rotterdam Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2237-41.
26. McCarty CA, Mukesh BN, Fu CL, Mitchell P, Wang JJ, Taylor HR. Risk factors for age-related maculopathy: the Visual Impairment Project. *Arch Ophthalmol* 2001;119:1455-62.
27. Mitchell P, Wang JJ, Smith W, Leeder SR. Smoking and the 5-year incidence of age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol* 2002;120:1357-63.
28. Hall NF, Gale CR, Syddall H, Phillips DI, Martyn CN. Risk of macular degeneration in users of statins: cross sectional study. *Bmj* 2001;323:375-6.
29. McGwin G, Jr., Owsley C, Curcio CA, Crain RJ. The association between statin use and age related maculopathy. *Br J Ophthalmol* 2003;87:1121-5.
30. Klein R, Klein BE, Tomany SC, Danforth LG, Cruickshanks KJ. Relation of statin use to the 5-year incidence and progression of age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol* 2003b;121:1151-5.
31. Wilson HL, Schwartz DM, Bhatt HR, McCulloch CE, Duncan JL. Statin and aspirin therapy are associated with decreased rates of choroidal neovascularization among patients with age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2004;137:615-24.
32. Endo A, Tsujita Y, Kuroda M, Tanzawa K. Effects of ML-236B on cholesterol metabolism in mice and rats: lack of hypocholesterolemic activity in normal animals. *Biochim Biophys Acta* 1979;575:266-76.
33. Fujioka T, Nara F, Tsujita Y, Fukushige J, Fukami M, Kuroda M. The mechanism of lack of hypocholesterolemic effects of pravastatin sodium, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, in rats. *Biochim Biophys Acta* 1995;1254:7-12.
34. Takehana Y, Kurokawa T, Kitamura T, et al. Suppression of laser-induced choroidal neovascularization by oral tranilast in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:459-66.

35. Tanemura M, Miyamoto N, Mandai M, et al. The role of estrogen and estrogen receptorbeta in choroidal neovascularization. *Mol Vis* 2004;10:923-32.
36. Edelman JL, Castro MR. Quantitative image analysis of laser-induced choroidal neovascularization in rat. *Exp Eye Res* 2000;71:523-33.
37. Semkova I, Peters S, Welsandt G, Janicki H, Jordan J, Schraermeyer U. Investigation of laser-induced choroidal neovascularization in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:5349-54.
38. Delcourt C, Michel F, Colvez A, Lacroux A, Delage M, Vernet MH. Associations of cardiovascular disease and its risk factors with age-related macular degeneration: the POLA study. *Ophthalmic Epidemiol* 2001;8:237-49.
39. Kvant A, Algvere PV, Berglin L, Seregard S. Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1929-34.
40. Lopez PF, Sippy BD, Lambert HM, Thach AB, Hinton DR. Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:855-68.
41. Shen WY, Yu MJ, Barry CJ, Constable IJ, Rakoczy PE. Expression of cell adhesion molecules and vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularisation in the rat. *Br J Ophthalmol* 1998;82:1063-71.
42. Yi X, Ogata N, Komada M, et al. Vascular endothelial growth factor expression in choroidal neovascularization in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997;235:313-9.
43. Urbich C, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S. Double-edged role of statins in angiogenesis signaling. *Circ Res* 2002;90:737-44.
44. Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation* 2002;105:739-45.
45. Frick M, Dulak J, Cisowski J, et al. Statins differentially regulate vascular endothelial growth factor synthesis in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2003;170:229-36.
46. Zambarakji HJ, Nakazawa T, Connolly E, et al. Dose-dependent effect of pitavastatin on VEGF and angiogenesis in a mouse model of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:2623-31.

47. Grossniklaus HE, Green WR. Histopathologic and ultrastructural findings of surgically excised choroidal neovascularization. Submacular Surgery Trials Research Group. *Arch Ophthalmol* 1998;116:745-9.
48. Ambati J, Anand A, Fernandez S, et al. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med* 2003;9:1390-7.
49. Mesri M, Liversidge J, Forrester JV. ICAM-1/LFA-1 interactions in T-lymphocyte activation and adhesion to cells of the blood-retina barrier in the rat. *Immunology* 1994;83:52-7.
50. Sakurai E, Taguchi H, Anand A, et al. Targeted disruption of the CD18 or ICAM-1 gene inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:2743-9
51. Romano M, Diomedea L, Sironi M, et al. Inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 synthesis by statins. *Lab Invest* 2000;80:1095-100.
52. Honjo M, Tanihara H, Nishijima K, et al. Statin inhibits leukocyte-endothelial interaction and prevents neuronal death induced by ischemia-reperfusion injury in the rat retina. *Arch Ophthalmol* 2002;120:1707-13.
53. Kawaji T, Inomata Y, Takano A, et al. Pitavastatin: Protection against Neuronal Retinal Damage Induced by Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Curr Eye Res* 2007;32:991-7.