Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Antiangiogenic Effects of Bisphosphonates on Laser-Induced Choroidal Neovascularization in Mice

長井，隆行

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2009-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲4670

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004670

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏　　名	長井　隆行
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学　位　記　番　号	博い第 4670 号
学位授与の　要　件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の　日　付	平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Antiangiogenic Effects of Bisphosphonates on Laser-Induced Choroidal Neovascularization in Mice(マウスのレーザー誘発脈絡膜血管新生に対するビスフォスフォネートの血管新生抑制効果)

審　査　委　員

主　査　　教　授　竹縄　忠臣
　　教　授　平田　健一
　　教　授　黒坂　昌弘

【目的】

ビスフォスフォネートは破骨細胞を強力に抑制し、骨粗鬆症治療の第一選択薬となっている薬剤である。最近、血管新生抑制作用や腫瘍細胞でのアポトーシス誘発作用などビスフォスフォネートの多様な作用が報告されている。そこで眼科疾患で脈絡膜血管新生(CNV)を伴う血管新生疾患である加齢黄斑変性(AMD) に対するビスフォスフォネートの効果を評価するために、*in vivo*におけるマウスの脈絡膜血管新生と、*in vitro*における網膜色素上皮培養の血管新生遺伝子発現に対するビスフォスフォネートの抑制効果を検討した。

【方法】

5、6 週齢の C57BL/6 マウスを用い、レーザー光凝固処理施行前日（実験 0 日目）にアレンドロネート(1 mg/kg 体重)、クロドロネート(15 mg/kg 体重)、生理食塩水それぞれの腹腔内注射を行った。また追加投与を上記と同量で 7 日目に行った。

実験 1 日目に、レーザーによってブルッフ膜を破裂させることで CNV を誘発させた。レーザー光凝固の設定は、直径 50 μm、照射時間 0.05 秒、出力 50 mW で、麻酔下で各眼底に約 3 発ずつ施行し、ブルッフ膜破裂のサインとして気泡を確認した。

実験 7 日目、14 日目に、それぞれのマウスに対して、フルオレセイン蛍光眼底造影検査を麻酔下で施行し、4～6 分間撮影をおこなった。造影の結果から各眼球において造影剤が漏洩している範囲を選択し、ソフトウェア ImageJ を使用し、その範囲のピクセル数を測定し、半定量的に解析した。

実験 7 日目の各マウスから眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。14μm の凍結切片を作成し、HE 染色を行い、CNV の最大厚を観察測定した。また、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)とインテグリンαV の免疫染色を行い、観察した。

ヒト網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 を、type Ⅰコラーゲン(Collagen Matrix)またはコントロールとして基底膜マトリックス(Matrigel Matrix)上で培養し、その後ビスフォスフォネート添加または添加無しでさらに培養し、24 時間後における VEGF やインテグリンの遺伝子発現について以下のように観察した。

薬剤毒性を調べるため、培養した ARPE-19 の生細胞数とアポトーシスの割合を測定した。

培養した ARPE-19 細胞から全 RNA を抽出し、ランダムヘキサマーを用いて全 RNA を cDNA に逆転写した。対象遺伝子を VEGF-A、B、C、及びインテグリンαV、β1、β3 とし、PCR

反応を 50℃ 2 分、95℃ 10 分、その後 1 サイクルが 95℃ 15 分、60℃ 1 分のサイクルを 40 サイクルで施行した。発現した対象遺伝子の Threshold Cycle (Ct) 値と内在性コントロール cyclophilin A の Ct 値を計算し、対象遺伝子の Ct 値から内在性コントロールの Ct 値を差し引き、その値をΔCt 値とした。さらに対象遺伝子のΔCt 値から、基準として基底膜マトリックスでの培養での遺伝子のΔCt 値を差し引き、ΔΔCt 値とし発現量を比較した（ΔΔCt 法）。

【結果】

フルオレセイン蛍光眼底造影検査所見

実験 7 日目、生理食塩水を投与したコントロール群では、眼底のレーザー斑からの明らかな蛍光漏出を認め、CNV の存在を示唆していた。14 日目では漏出は自然に減少していた。アレンドロネートまたはクロドロネート投与群では、コントロール群と比較し、7 日目、14 日目ともに漏出は弱かった。半定量解析では、コントロール群と比較し、アレンドロネートまたはクロドロネート投与群で有意に漏出範囲が小さいことがわかった。

組織学的所見

実験 7 日目のコントロール群のマウスで、網膜色素上皮下および網膜下のスペースにブルッフ膜の破裂を伴って CNV が厚く広範囲に認められた。アレンドロネートまたはクロドロネート投与群で認められた CNV は、コントロール群と比較し明らかに小さかった。VEGF とインテグリンαV の免疫反応はコントロール群で認めた CNV 成分の最内層に認められたが、アレンドロネート投与群では殆ど免疫反応を認めなかった。クロドロネート投与群では、それらの弱い免疫反応を示していた。

細胞生存率

今回の培養条件で、アレンドロネート、クロドロネート添加した群、及び添加無しとしたコントロール群では、細胞生存率に違いはなかった。また、すべての条件下で数個の核凝集細胞を認めたものの、群間での差は認めなかった。

網膜色素上皮細胞での遺伝子発現

VEGF-A、B 及び C の遺伝子発現はすべて type Ⅰコラーゲン上の培養で増加していたが、アレンドロネートは VEGF-B 以外の VEGF サブタイプを抑制した。またインテグリンαV、β1、β3 すべてのサブタイプの遺伝子発現も type Ⅰコラーゲンで増加していたが、アレンドロネート添加により濃度依存的に抑制された。一方、クロドロネートでは明らかな抑制効果は認められなかった。

【考察】

今回の研究で、ビスフォスフォネートによるレーザー誘発 CNV の抑制が *in vivo* で観察され、アレンドロネートの血管新生遺伝子発現の抑制効果も網膜色素上皮細胞培養で示された。ビスフォスフォネートは骨組織に主に蓄積し、破骨細胞の機能を調整することが知られているが、最近の研究では抗腫瘍作用や血管新生抑制作用とビスフォスフォネートの関連が示唆され、新しい薬剤効果の可能性として提案されている。眼科領域におけるビスフォスフォネートはまれな合併症としてぶどう膜炎、強膜炎を引き起こす薬剤であることのみが報告されている。しかし、未発表ながら骨粗鬆症の患者のうちビスフォスフォネートによる治療を受けている患者群が受けていない患者群と比較し、AMD の有病率が有意に低いのを見出したこともあり、我々はビスフォスフォネートの眼に対する有益な効果を明らかにしようと試みている。

今回の研究ではアレンドロネートとクロドロネートで同等の CNV 抑制効果が *in vivo* で示されたが、*in vitro* での結果では両者に違いが認められた。ビスフォスフォネートの薬理効果のメカニズムは分子構造、窒素原子の有無で異なっており、クロドロネートは、窒素非含有ビスフォスフォネート(NN-BP)であり、代謝され非加水分解性細胞毒性 ATP 類似体となり破骨細胞のアポトーシスを誘導する。一方、アレンドロネートは窒素含有ビスフォスフォネート(N-BP)であり、メバロン酸経路のファルネシルジフォスフォネートシンターゼを阻害する。最近の研究では、N-BP が *in vitro* と *in vivo* においてマトリックスメタロプロテイナーゼやインテグリンファミリーの発現を抑制し、血管新生を抑制することが示されるなど、NN-BP、N- BP の機能が明らかになってきている。マトリックスメタロプロテイナーゼやインテグリン、VEGF の CNV への関与は最近よく報告されている。今回アレンドロネートとクロドロネートの *in vitro* で認められた違いは、それぞれの薬剤が異なるメカニズムでマウスモデルの CNV を抑制したことを示唆する。アレンドロネートは、血管内皮細胞増殖を直接抑制し、また細胞の血管新生遺伝子発現を調節する効果も含めて CNV を抑制している可能性がある。リポゾーム封入されたクロドロネートはマクロファージを減少させるのに使われ、血管新生を抑制することが報告されており、今回クロドロネートの CNV 抑制はマクロファージが引き起こす炎症に対するコントロールによるものかもしれない。そのような抗炎症作用は単核球の機能を抑制するアレンドロネートにもまた予想される。しかし、現在のところ血管新生を抑制するビスフォスフォネートのメカニズムすべてが明らかになったわけではないため、さらに研究していく必要があると考える。

この研究はビスフォスフォネートが骨粗鬆症に加えて、AMD の防止や治療の可能性がある薬剤として紹介した報告である。現在までに多種類のビスフォスフォネートが開発され、そのいくつかは眼への有害事象を認めないとされている。網膜疾患に使うための安全で効果的な要素を評価するのには、さらなる研究が必要である。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第2008 号	氏　名	長井　隆行
論文題目 Title of Dissertation	Antiangiogenic Effect of Bisphosphonates on Laser-Induced Choroidal Neovascularization in Mice マウスのレーザー誘発脈絡膜血管新生に対するビスフォスフォネートの血管新生抑制効果		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	竹縄 忠臣 平田 健一 黒坂 昌弘	

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

The number of age-related diseases such as osteoporosis and age-related macular degeneration (AMD) has remarkably increased over the years. It is a matter of urgency to establish preventive strategies for these disorders. Bisphosphonates were developed as powerful inhibitors of osteoclasts and are commonly used to treat and prevent osteoporosis. Many recent reports have suggested multiple pharmacologic effects of bisphosphonates, such as antiangiogenic effects and the induction of apoptosis in tumor cells, which make bisphosphonates widely interesting compounds. My purpose in the experiments here was to evaluate the therapeutic effects of bisphosphonates on ocular diseases, especially AMD.

Laser spots in control mice showed remarkable leakage in dye, indicating the existence of choroidal neovascularization (CNV) on experimental day 7 that naturally decreased on day 14. Mice treated with clodronate or alendronate showed weaker visual leakages on experimental day 7 and day 14. Semiquantitative analyses revealed a significantly smaller leakage area in mice treated with alendronate or clodronate than in control mice.

A thick, wide CNV was found at the sub-retinal pigment epithelium (RPE) and the subretinal space with ruptured Bruchmembranes on day 7 in control mice. CNVs found in alendronate- or clodronate-treated mice were obviously smaller than those in control animals. Immunoreactivities of VEGF and integrin aV were remarkably attenuated in mice treated with alendronate. Mice treated with clodronate showed weak VEGF and integrin aV immunoreactivities.

VEGF-A, -B, and -C gene expression was upregulated by type I collagen. Alendronate suppressed the gene expression of all VEGF subtypes dose dependently except for VEGF-B. The whole integrin gene family was upregulated by type I collagen and inhibited by alendronate in a dose-dependent manner. In contrast, clodronate did not show any effect on selected RPE gene expression patterns grown on type I collagen.

In the present study, I demonstrated the suppression of laser-induced CNV by the administration of bisphosphonates in vivo. However, these results suggest that each drug has a different mechanism to inhibit CNV.

The candidate, having completed studies on laser-induced choroidal neovascularization in mice, with a specialty in effect of bisphosphonates, and having advanced the field of knowledge in the area of Ophthalmology, is hereby recognized as having qualified for the degree of Ph.D.(Medicine)