

論文内容の要旨

Disulfiram ophthalmic solution inhibited macrophage infiltration by suppressing macrophage pseudopodia formation in a rat corneal alkali burn model

(訳) → ラット角膜アルカリ外傷モデルにおいてジスルフィラム点眼薬は仮足形成を抑制することでマクロファージの浸潤を抑制した

日本医科大学大学院医学研究科 眼科学分野

大学院生 池袋東陽

International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(1) 掲載

FROUNT はマクロファージ上のケモカイン受容体 C-C chemokine receptor types 2 (CCR2) および C-C chemokine receptor types 5 (CCR5) に結合して、マクロファージの仮足形成を促進する細胞内蛋白質である。近年、これまでアルコール依存症治療薬として使用されてきたジスルフィラム (Disulfiram, DSF) が FROUNT 阻害活性を有することが明らかになり、その抗炎症効果が注目を集めている。

本研究では、ラット角膜アルカリ外傷モデルにおける DSF 点眼薬の効果を検討した。角膜アルカリ外傷モデルとは、人為的にアルカリ外傷を加えることで、角膜の炎症や瘢痕化、新生血管を評価するモデルである。0.5%DSF 点眼 (DSF 群) および基材点眼 (Vehicle 群) を作成し、アルカリ外傷後のラットに 1 日 2 回点眼投与した。アルカリ外傷後 6 時間、1、4、7 日目の 4 つのエンドポイントを設定し、免疫組織学的観察およびリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を行い、炎症細胞浸潤、サイトカイン発現、角膜瘢痕化、新生血管について評価を行った。また低真空走査型電子顕微鏡 (low-vacuum scanning electron microscope, LV-SEM) を用いて、浸潤マクロファージの仮足形成について評価を行った。

周辺部角膜では外傷後 1 日以降、中央部角膜では 4 日以降で、DSF 群で有意に浸潤マクロファージ数が減少していた。一方、好中球数はいずれのエンドポイントでも両群間に差は認めなかった。DSF は FROUNT と CCR2/CCR5 との相互作用を阻害するため、これらのケモカイン受容体を有するマクロファージの遊走を阻害し、受容体を持たない好中球の遊走

は阻害しなかったと考えられた。

今回のモデルの浸潤マクロファージ上に標的分子が存在するかどうかを調べるため、汎マクロファージのマーカーである ED-1 (CD68) と標的分子を蛍光多重免疫染色し、観察を行った。その結果 ED-1 陽性細胞上に FROUNT と、FROUNT が関与する PI3K 経路の産物であるリン酸化 AKT が存在することがわかった。また同様にマクロファージ関連サイトカインである、TNF- α 、TGF- β 1、IL-1 β も ED-1 陽性細胞上に存在していた。これらのサイトカインについてアルカリ外傷後 4 日のラット角膜を用いて RT-PCR を行うと、DSF 群で有意に発現が低下しており、DSF のマクロファージ浸潤抑制効果により、これらのサイトカインの発現が低下したことが示唆された。

III 型コラーゲンは主に創傷治癒過程で発現が上昇し、角膜透明性低下の原因となる。角膜癒着化の評価のため、アルカリ外傷後 7 日のラット角膜で III 型コラーゲン陽性となる角膜実質の面積を両群間で比較した。その結果 DSF 群では有意に III 型コラーゲン陽性領域が少なかった。RT-PCR では線維化を促進するマクロファージ関連サイトカインである TGF- β 1 が DSF 群で有意に減少しており、浸潤マクロファージの減少により、角膜の癒着化が抑制されたことが示唆された。

角膜新生血管の評価のため、アルカリ外傷後 4 日のラット角膜で Nestin 染色を行い、Nestin 陽性となる血管内皮細胞をカウントした。その結果、DSF 群では有意に陽性細胞が減少していた。また RT-PCR では血管内皮細胞増殖因子である VEGF-A とその発現を増加

させるマクロファージ関連サイトカインである TNF- α 、IL-1 β の発現が DSF 群で有意に低下していた。このことから浸潤マクロファージの減少により、新生血管が抑制された可能性が示唆された。

DSF は FROUNT を阻害することで、マクロファージの仮足形成を阻害し、組織浸潤と遊走を抑制する。そのため FROUNT を介したマクロファージ浸潤抑制機構を評価するためには仮足形成の評価が重要である。我々は仮足形成時に細胞が長くなることに着目し、浸潤マクロファージの長さを測ることで間接的に仮足形成を評価することとした。アルカリ外傷後 1 日のラット角膜で ED-1 染色を行い、より正確に計測するために LV-SEM を用いて 2000 倍から 8000 倍の高倍率で浸潤マクロファージを観察した。両群ともそれぞれ 392 個のマクロファージの長さを計測したところ、DSF 群ではマクロファージの長さが有意に短かった。このことから DSF がマクロファージの仮足形成を阻害したことが示唆された。

DSF 点眼は仮足形成を抑制することでマクロファージの浸潤を抑制し、角膜の癒痕化や新生血管を抑制した可能性がある。DSF 点眼は眼科領域において炎症性疾患の治療薬の選択肢の一つとなることが期待される。今後 DSF 点眼の長期的な作用など、臨床応用を目指した更なる研究が必要である。