

氏 名 きたはらひでゆき
北原 英幸

学 位 の 種 類 博士（医学）

学 位 記 番 号 富医薬博甲第 233 号

学位授与年月日 平成 29 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
東西統合医学専攻

学位論文題目 PDGFR and VEGFR signaling play key roles in the onset
and progression of proliferative retinopathy
(PDGFRとVEGFRシグナル経路は増殖性網膜症の発症と進行に
重要な役割を果たす)

論文審査委員

(主査)	教 授	林 篤志
(副査)	教 授	一條 裕之
(副査)	教 授	森 寿
(副査)	教 授	絹川 弘一郎
(指導教員)	教 授	嶋田 豊

論文内容の要旨

【目的】

増殖性網膜症は、進行期の糖尿病網膜症（DR）などで認められる病態であり、ヒトの視力障害の主要な原因である。増殖性網膜症では脆弱な血管の新生と退縮が反復し、出血や網膜の循環障害がもたらされる。さらに網膜表面には増殖膜が形成され、その収縮によって牽引性網膜剥離が生じ、視力低下や失明の原因となる。増殖性網膜症の初期変化として、網膜の血管内皮細胞を被覆する周皮細胞（pericyte）の減少が重要であり、DR では pericyte に発現する PDGF 受容体 β （PDGFR- β ）の機能が高血糖により低下することが示唆されている。また、従来の DR モデルでは軽微な血管病変や細胞減少などの早期の病態を再現するが、重度の血管新生や出血、網膜剥離などの増殖性網膜症の病態は十分に再現できていない。我々は、増殖性網膜症の病態を再現できる新たなマウスモデルを開発し、その網膜病変の解析によって、増殖性網膜症の病態解明と治療ターゲットの同定を目指した。

【方法】

研究は富山大学の動物実験指針に準じて実施した。*Pdgfrb* 遺伝子の conditional knockout を誘導するため Cre / loxP システムを採用した。*Pdgfrb*^{lox/lox} マウス（PDGFR- β 細胞外ドメインをエンコードする exon4-7 を loxP 配列で挟んだ 129SV 系統マウス）と、*Nestin-Cre* マウス（*Nestin* promotor/enhancer-driven Cre recombinase を有するコンジェニック系統の C57BL/6-Ly5.1）を wild-type（WT）の C57BL/6 マウスとの間で、それぞれ 15 代にわたって戻し交配を行った後に交配実験を実施した。得られた [*Nestin-Cre*^{+/+}; *Pdgfrb*^{lox/lox}（N-PR β -KO マウス）] マウスに非常に高い浸透率で発症する重症網膜症が発症することを見出し、これらを解析した。各週齢の N-PR β -KO、WT マウスの網膜のサンプリングを実施した。免疫組織染色で使用する場合は、PBS、1% paraformaldehyde（PFA）によるマウスの灌流固定の後に眼球を摘出して、さらに 1% PFA で眼球を 1 overnight 固定した後に網膜を分離して使用した。また、Western blotting、real-time PCR、ELISA で使用する場合は、PBS のみの灌流後に眼球を摘出し、分離した網膜を凍結破砕して使用した。

【結果と考察】

成体 N-PR β -KO の解析において、血糖値は WT と同様であった。雌雄とも同様に、ほぼすべての個体で両側眼球の硝子体混濁、網膜出血および牽引性網膜剥離を認め、網膜が高度に菲薄化した。網膜の組織学的観察では、血管は不規則な拡張や蛇行を示し、特に異常増生した毛細血管と、基底膜のみからなる毛細血管が退縮した痕跡（empty sleeve）が分布した。CD31⁺血管内皮細胞の密度が WT よりも有意に上昇し、CD13⁺ pericyte が血管周囲から著しく消失した。網膜の表面には α SMA 陽性の増殖膜が認められ、牽引網膜剥離の原因と考えられた。以上のように、N-PR β -KO 網膜は高度の血管病変と、増殖膜を伴う牽引網膜剥離と変性を含む増殖性網膜症の類似病変を再現した。

N-PR β -KO 網膜の病変形成過程を明らかにするため、幼弱なマウスを含めた解析を実施した。線維

増殖性組織反応を誘導する PDGF ファミリーの発現を解析した。WT と比較して、N-PR β -KO 網膜の PDGF-BB、PDGFR- α の発現が有意に増加し、PDGFR- β の発現が有意に減少した。WT の網膜では、PDGFR- β^+ NG2 $^+$ α SMA $^-$ pericyte は細動脈、細静脈、およびそれらの主枝を、PDGFR- β^+ NG2 $^+$ α SMA $^+$ pericyte が毛細血管系を、それぞれ優先的に被覆した。これらのうち N-PR β -KO では前者が高度に減少し pericyte による被覆率が著しく低下した。他方、後者は残存したが、血管から剥離し、NG2 発現を失い、増殖膜へ組み込まれており、pericyte-fibroblast transition (PFT) が α SMA $^+$ 網膜線維芽細胞の起源となることを示した。また、PDGFR- α^+ GFAP $^+$ アストロサイトによるグリア瘢痕も認められた。過剰な PDGF-BB が PFT を介して牽引性網膜剥離に寄与し、グリア瘢痕形成を促して網膜の構造変化に寄与する可能性が示唆された。

次に、N-PR β -KO 網膜の病的血管新生に関与する分子メカニズムを同定するため、血管新生に関与する VEGF ファミリーの発現レベルを解析した。WT と比較して、N-PR β -KO 網膜の VEGF-A、PlGF の発現が有意に増加した。VEGF-A、PlGF が結合する VEGFR1 (Flt1) をノックアウトした Flt1TK $^{-/-}$ マウスと N-PR β -KO を交配したマウスでは (N-PR β -KO-Flt1TK $^{-/-}$)、N-PR β -KO と比較して血管新生や血管径拡張が有意に改善した。N-PR β -KO 網膜で増加した PlGF、VEGF-A が活性化する VEGFR1 が網膜血管新生に関連することが示された。

【結論】

増殖性網膜症は DR で認められる病態であり、ヒトの視力障害を引き起こす。現在行われている DR に対する抗 VEGF 療法は病的血管新生に対して確立された治療であるが十分な効果は得られていない。本研究では増殖性網膜症の血管病変と増殖膜形成を高い浸透率で再現しうるマウスモデルを確立した。当該モデルの解析から、増殖性網膜症において、PDGF-BB が PFT を介して牽引性網膜剥離に関与し、PlGF、VEGF-A による VEGFR1 活性化が病的血管新生に関与することを明らかにした。従って、失明の深刻な脅威となる増殖膜形成に対しては PDGF-BB/PDGFR- α 、 β シグナル経路が、DR の根本的な病態である病的血管新生に対しては VEGF-A、PlGF/VEGFR1 シグナル経路が、それぞれ予防するための治療ターゲットとして期待される。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

[目的]

増殖性網膜症は進行期の糖尿病網膜症（DR）などで認められる病態であり、ヒトの視力障害の主要な原因である。増殖性網膜症では脆弱な血管の新生と退縮が反復し、出血や網膜の循環障害がもたらされる。さらに網膜表面には増殖膜が形成され、その収縮によって牽引性網膜剥離が生じ、視力低下や失明の原因となる。増殖性網膜症の初期変化として、網膜の血管内皮細胞を被覆する周皮細胞（pericyte）の減少が重要であり、DR では pericyte に発現する PDGF 受容体 β （PDGFR- β ）の機能が高血糖により低下することが示唆されている。本研究では、増殖性網膜症の病態を再現できる新たなマウスモデルを開発し、その網膜病変の解析によって、増殖性網膜症の病態解明と治療ターゲットの同定を目指した。

[方法ならびに成績]

Pdgfrb 遺伝子の conditional knockout を誘導するため Cre / loxP システムを採用した。*Pdgfrb*^{lox/lox} マウス（PDGFR- β 細胞外ドメインをエンコードする exon4-7 を loxP 配列で挟んだ 129SV 系統マウス）と、*Nestin-Cre* マウス（*Nestin* promotor/enhancer-driven Cre recombinase を有するコンジェニック系統の C57BL/6-Ly5.1）を wild-type（WT）の C57BL/6 マウスとの間で、それぞれ 15 代にわたって戻し交配を行った後に交配実験を実施した。得られた [*Nestin-Cre*^{+/-}; *Pdgfrb*^{lox/lox}（N-PR β -KO マウス）] マウスに非常に高い浸透率で重症網膜症が発症することを見出し、これらを解析した。

成体 N-PR β -KO の血糖値は WT と同様であった。網膜の組織学的観察では、血管は不規則な拡張や蛇行を示し、特に異常増生した毛細血管と、基底膜のみからなる毛細血管が退縮した痕跡（empty sleeve）が分布した。CD31⁺ 血管内皮細胞の密度が WT よりも有意に上昇し、CD13⁺ pericyte が血管周囲から著しく消失した。網膜の表面には α SMA 陽性の増殖膜が認められ、牽引網膜剥離の原因と考えられた。また、N-PR β -KO の網膜が高度に菲薄化し、Müller 細胞、水平細胞など網膜内顆粒層に存在する細胞に、酸化ストレスマーカーの 8OHdG が発現し、高度の血管病変と、増殖膜を伴う牽引網膜剥離と変性を含む増殖性網膜症の類似病変を再現した。

N-PR β -KO 網膜では WT と比較して、N-PR β -KO 網膜の PDGF-BB、PDGFR- α の発現が有意に増加し、PDGFR- β の発現が有意に減少した。WT の網膜では、PDGFR- β ⁺NG2⁺ α SMA⁻ pericyte は細動脈、細静脈、およびそれらの主枝を、PDGFR β ⁺NG2⁺ α SMA⁺ pericyte が毛細血管系を、それぞれ優先的に被覆した。これらのうち N-PR β -KO では前者が高度に減少し pericyte による被覆率が著しく低下した。他方、後者は残存したが、血管から剥離し、NG2

発現を失い、増殖膜へ組み込まれており、pericyte-fibroblast transition (PFT) が α SMA⁺網膜線維芽細胞の起源となることを示した。また、PDGFR- α ⁺ GFAP⁺アストロサイトによるグリア瘢痕も認められた。

次に、N-PR β -KO 網膜における血管新生に関与する VEGF ファミリーの発現レベルを解析した。WT と比較して、N-PR β -KO 網膜の VEGF-A、PlGF の発現が有意に増加した。VEGF-A、PlGF が結合する VEGFR1 (Flt1) をノックアウトした *flt1*^{TK-/-} マウスと N-PR β -KO を交配したマウスでは (N-PR β -KO-Flt1TK^{-/-})、N-PR β -KO と比較して血管新生や血管径拡張が有意に改善した。

[総括]

本研究では増殖性網膜症の血管病変と様々な増殖性の病変を高い浸透率で再現しうるマウスモデルを確立した。当該モデルの解析から、増殖性網膜症において、PDGF-B が PFT を介して牽引性網膜剥離に関与し、PlGF、VEGF-A による VEGFR1 活性化が病的血管新生に関与することを明らかにした点で新規性が高く医学における学術的重要性が認められる。本研究により増殖性網膜症において増殖膜形成に対しては PDGF-BB/PDGFR- α 、 β シグナル経路が、病的血管新生に対しては VEGF-A、PlGF/VEGFR1 シグナル経路が、それぞれ治療ターゲットとなりうることを示した点で臨床的発展性が大きく期待される。以上より、本審査委員会は本研究を博士（医学）の学位に十分値するものと判断した。