

(要約)

博 士 論 文

マウス網膜における 新規異常血管形成モデルの確立とその応用

Establishment of abnormal vascular growth models in the mouse retina and
its applications

北里大学大学院薬学研究科 分子薬理学教室

DP15102 森田 茜

平成 29 年度

目 次

序 論.....	1
第一章 実験系の確立 (可視化・解析法／モデル動物の確立).....	6
1-1. 緒言	6
1-2. 結果	9
1-2-1. 網膜表層血管形成初期及び中期における KRN633 処置後に生じる血管形成.....	9
1-2-2. 網膜表層血管形成初期及び中期における KRN633 処置後に生じる血管構成成分 (基底膜・ペリサイト) の変化.....	11
1-2-3. 網膜表層血管形成初期及び中期における KRN633 処置後に生じる細胞増殖性の変化	17
1-3. 考察	19
1-3-1. 網膜表層血管形成初期における KRN633 処置後に生じる血管形成 ...	20
1-3-2. 網膜表層血管形成中期における KRN633 処置後に生じる血管形成..	21
1-3-3. ペリサイトのフェノタイプ変化が生じる機序	22
1-4. 結論	24
実験方法.....	27
4-1. 使用動物.....	27
4-2. 薬物処置.....	27
4-2-1. 第 1 章	27
4-3. 増殖性細胞の標識	28
4-5. 単離網膜の免疫染色と定量解析	28
4-5-1. 単離網膜の免疫染色.....	28
4-5-2. 定量解析	30
4-5-2-1. 第 1 章.....	30
4-13. 統計解析.....	31
総 括.....	32
参考文献.....	34
謝 辞.....	37

略語一覽

α SMA: α -smooth muscle actin

BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine

GCL: ganglion cell layer

INL: inner nuclear layer

IPL: inner plexiform layer

NG2: neuron-glial antigen 2

OIR: oxygen-induced retinopathy

ONL: outer nuclear layer

OPL: outer plexiform layer

PDGFR α : platelet-derived growth factor receptor- α

PDGFR β : platelet-derived growth factor receptor- β

PlGF: placental growth factor

TGF- β : transforming growth factor- β

VEGF: vascular endothelial growth factor

VEGFR: VEGF receptor

序 論

血管のネットワークは胎生期より臓器の発達に伴い形成される。その過程には血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) 等の血管新生関連因子が重要な役割を演じている。哺乳類では VEGF ファミリーは、VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D 及び胎盤成長因子 (placental growth factor; PlGF) の 5 種類で構成されており、それらリガンドの受容体として、1, 2 及び 3 型 VEGF 受容体 (VEGF receptor; VEGFR) が確認されている (Olsson *et al.*, 2006)。5 種類のリガンドの中で VEGF-A が血管の新生や透過性亢進において最も重要な役割を演じている (Ferrara *et al.*, 1996; Shibuya *et al.*, 2008)。これらの VEGF-A の作用は主に 2 型 VEGF 受容体 (VEGFR2) を介して引き起こされる (Quinn *et al.*, 1993; Shalaby *et al.*, 1995; Maharaj *et al.*, 2006)。胎生期における VEGF の欠損は胎生致死を引き起こす (Ferrara *et al.*, 1997)。一方で、胎生期を含む発達期における VEGF 作用の部分的な抑制は個体の死を招くことなく、各種臓器の血管形成と発達を抑制することが示されている (Haigh *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2014a)。発達期に生じる血管形成障害は、各種臓器の脆弱性と関連しており、将来の疾患発症リスクを高めるものと考えられている (Abe *et al.*, 2013)。例えば、発達期のラットへの VEGFR チロシンキナーゼ阻害薬 SU5416 投与により生じた肺の血管形成抑制が肺高血圧発症の危険因子となることが示されている (Le Cras *et al.*, 2002)。

網膜においても、発達期に血管形成が抑制されると、異常なパターンの血管ネットワークが形成されることがヒト及び実験動物において示されている

(Hellström *et al.*, 2004; Morita *et al.*, 2014b)。そして、旺盛な血管新生が生じ未熟児網膜症の発症に繋がることが知られている。壮年期・老年期においては、糖尿病や加齢により網膜血流障害並びに網膜色素上皮細胞の変性が生じると、糖尿病網膜症や加齢黄斑変性症を発症する可能性があるが、両疾患においても旺盛な血管新生が生じることが病態の進行や重症度に大きく関与している。

我が国において、未熟児網膜症は小児失明原因第 1 位であり、糖尿病網膜症及び加齢黄斑変性症はそれぞれ後天性失明原因の第 2 位と第 4 位である。ヒトは外界からの情報の 8 割以上を視覚から得ており、*quality of life* の維持という点で視覚障害並びに失明を回避する方法を確立することは極めて重要な研究課題となっている。

上述した未熟児網膜症、糖尿病網膜症、そして加齢黄斑変性のいずれも眼内に生じる異常な血管新生は、組織の低酸素状態に起因して生じる VEGF の発現増加により引き起こされる (Chan-Ling & Stone, 1993; Nakahara *et al.*, 2017) ため、現在、その治療薬として抗 VEGF 薬が使用されている。しかしながら、次に述べるような問題点も報告されている。例えば、1) 治療効果の消失に伴い再び血管が新生するため投与を定期的に行わなければならない、2) 治療を行っても視力回復が認められない患者が存在する (Rofagha *et al.*, 2013)、3) 治療を行った患者において網膜色素上皮剥離が生じることがある (Doguizi *et al.*, 2014)、4) VEGF が網膜に存在する血管、神経及びミューラー細胞の恒常性維持に関与していることから、血管や神経に悪影響を及ぼす可能性がある (Blaauwgeers *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 2001; Saint-Geniez *et al.*, 2008)、そして 5) 脈絡膜血管の血流低下や錐体細胞の機能低下が生じることがある (Kurihara *et al.*, 2012) 等である。従

って、異常血管の形成を選択的に抑制する新たな治療薬を発見する必要があるが、そのためには先ず異常な網膜血管の形成機序を十分に理解することが重要である。

Fig. 1 及び Fig. 2 には、網膜 whole-mount 標本の作製方法とマウス網膜血管の発達過程を示している。マウス網膜血管は、出生直後 (postnatal day 0; P0) から P8 頃までに網膜の表層でネットワークを形成した後、中間層及び深層へと伸長し、P21 頃までに 3 層からなるネットワークを形成する (Fig. 2)。そしてマウス網膜の血管のネットワークは全体像の可視化が容易であることに加えて、これまでの多くの検討により精巧なプログラムに基づき形成されることが明らかにされている (Stahl *et al.*, 2010)。

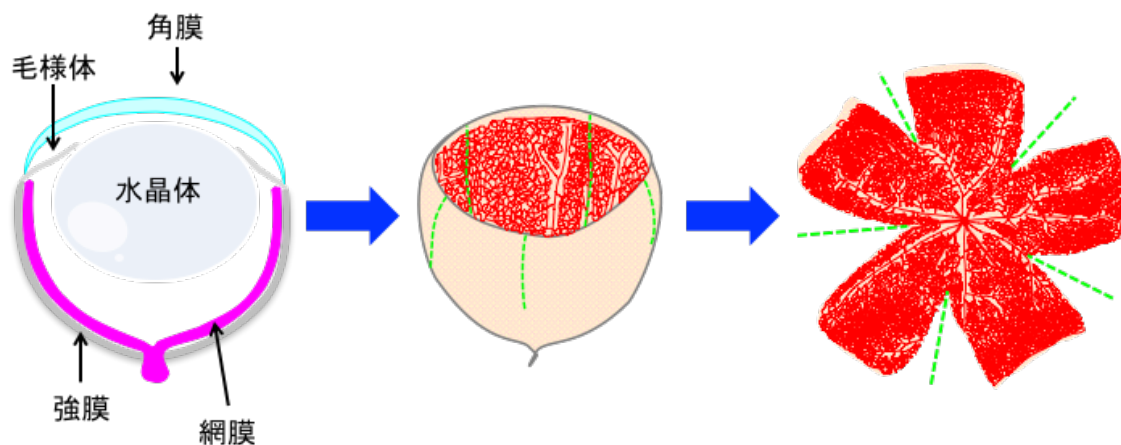


Figure 1. マウス網膜 whole-mount 標本の作製方法

眼球から網膜を単離後、切り込み (緑色点線) を入れ網膜を平面上に置くことで網膜血管 (赤) のネットワーク全体を観察することができる。

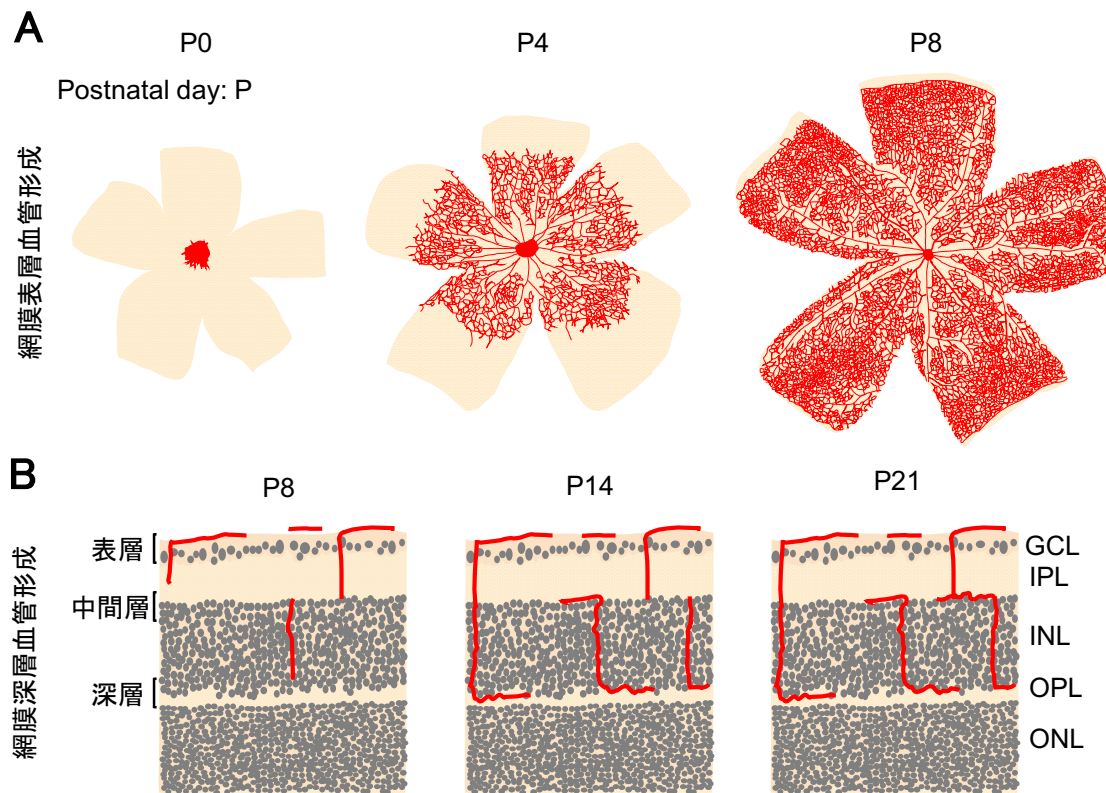


Figure 2. マウス網膜血管形成の模式図

マウス網膜血管は出生直後 (postnatal day 0; P0) から形成され始め、P8 頃までに網膜表層ネットワークを形成する。その後、中間層及び深層の血管ネットワークが形成される。光の入射方向 (A) 及び網膜断面 (B) から観察される血管 (赤) の分布を示している。GCL: 視神経節細胞層、IPL: 内網状層、INL: 内顆粒層、OPL: 外網状層、ONL: 外顆粒層

本研究では、新生仔マウスに本来備わっている網膜血管形成のプログラムを乱し、その後に形成される血管の異常性と異常血管の形成機序を明らかにすることを目的とした。第 1 章では、新生仔マウスに VEGFR チロシンキナーゼ阻害薬を投与することにより網膜血管形成プログラムを乱したマウスを作製し、形成される網膜血管の異常性について検討した。血管内皮細胞の増殖、血管を構成している基底膜やペリサイト (Fig. 3A) 及び血管の周囲に存在する神経細胞やアストロサイト (Fig. 3B) を可視化する方法を確立し、網膜血管の異常性を独自に開発した解析方法により評価した。第 2 章と第 3 章では第 1 章で確立した方法を用いて、網膜の表層及び深層の血管形成における神経細胞の役割及び血

管新生の方向性調節機序についてそれぞれ検討した。

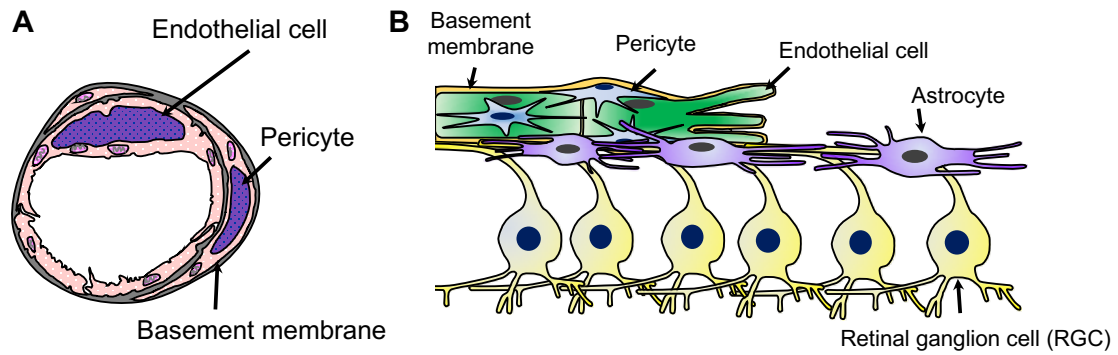


Figure 3. マウスの血管構造と網膜表層の模式図

A: 血管内皮細胞と周囲に存在するペリサイトが基底膜に包まれている。B: 網膜表層には、視神経節細胞、アストロサイト及び血管（血管内皮細胞、ペリサイト及び基底膜）が存在している。

第一章

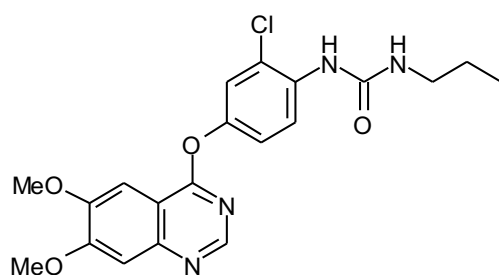
実験系の確立（可視化・解析法／モデル動物の確立）

1-1. 緒言

現在、異常血管新生の機序解析及び治療薬の探索研究には、Smith らが開始した新生仔マウスの網膜異常血管新生モデル、即ち網膜表層の大部分を血管が覆う 7 日齢から 5 日間、マウスを 75 % 酸素濃度のチャンバー内で飼育し、12 日齢から通常大気下で飼育することで作製する酸素誘導網膜症 (oxygen-induced retinopathy; OIR) モデルが用いられている (Smith *et al.*, 1994; Stahl *et al.*, 2010)。OIR モデルマウスでは、先ず 75% の高酸素濃度に暴露されることで血管内皮細胞にアポトーシスが生じ、その結果、網膜中心部の血管が退縮する。そして、血管が退縮した状態で通常の大気下で飼育されることにより、網膜組織が相対的な低酸素状態に陥り血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) の発現が増加し、網膜表層と網膜から逸脱して硝子体方向へと血管新生が生じる。高酸素暴露終了時から 2 週間後には、硝子体方向へ新生した血管は消失するものの、8 週齢の成熟したマウスにおいても血管や神経に構造的・機能的な異常が認められる (Nakamura *et al.*, 2012)。OIR モデルマウスでは、ヒトの未熟児網膜症と類似した硝子体方向への新生血管は認められるものの、ヒトで観察される血管形成領域と血管未形成領域との間に形成される境界線は認められないという問題点がある。そこで、ヒトの未熟児網膜症で観察される網膜血管異常を模倣した新規の異常血管形成モデルを確立し、そのモデルを用いて異常血管形成の機序解析を行う必要があると考えた。

網膜血管形成において、VEGF は重要な役割を演じており (Ozaki *et al.*, 2000; Feeney *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2014a; Okabe *et al.*, 2014)、出生直後から 8 日齢までの間に VEGF シグナルを阻害すると網膜表層血管形成が抑制される (Ozaki *et al.*, 2000; Feeney *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2014b)。これまでに、血管内皮細胞における VEGF 依存性は発達に伴い減弱し (Ozaki *et al.*, 2000)、血管内皮細胞に対する VEGF 受容体 (VEGF receptor; VEGFR) チロシンキナーゼ阻害薬の抑制効果は網膜表層血管が形成されるのにつれて減弱する (Yagasaki *et al.*, 2014) ことが示されている。そこで、新生仔マウスの網膜表層血管形成期における様々なタイムポイントで VEGF シグナルを抑制すると、様々な程度並びにパターンでの網膜血管形成抑制を引き起こすことができ、次いで生じる様々な血管の再形成過程を観察できるのではないかと考えられた。

KRN633 は、1, 2 及び 3 型 VEGFR (VEGFR1, 2 及び 3) のチロシンキナーゼを阻害することで VEGF シグナル全般を阻害する (Nakamura *et al.*, 2004; Fig. 4)。



	IC ₅₀ (nM)
VEGFR1	170
VEGFR2	160
VEGFR3	125
PDGFR α ^{*1}	965
PDGFR β ^{*2}	9850

^{*1} PDGFR α : platelet-derived growth factor receptor- α

^{*2} PDGFR β : platelet-derived growth factor receptor- β

Figure. 4 KRN633 の構造

N-{2-chloro-4-[(6,7-dimethoxy-4-guinazolinyl)oxy]phenyl}-*N'*-propylurea

そこで、網膜表層血管形成期を前期 (~postnatal day 1; P1)、中期 (~P5) 及び後期 (~P8) と分け、各時期のマウスに KRN633 を短期間投与することで、一時的な網膜血管形成抑制を引き起こし、その後の血管形成及び形成された血管における血管構成成分 (血管内皮細胞、ペリサイト及び基底膜; Fig.3A) のフェノタイプについて検討することにより、新規の異常血管形成モデルを確立することができるか否かについて検討することとした。本章では、血管内皮細胞の VEGF 依存性が高く、KRN633 の血管形成に対する抑制効果が大きかった網膜表層血管形成初期の P0 と P1 又は中期の P4 と P5 の 2 日間、KRN633 を処置した後に生じる血管形成を詳細に検討した。

1-2. 結果

1-2-1. 網膜表層血管形成初期及び中期における KRN633 処置後に生じる血管形成

正常マウス P0 では、血管は網膜中心の視神経乳頭部付近のみで認められた (Fig. 5A)。その後、血管は視神経乳頭部から網膜末端へと伸長し (Fig. 5B-D)、P8 で網膜表層部ほぼ全体を覆った (Fig. 5E-H, Fig. 6)。

網膜血管形成初期に KRN633 を処置することで血管形成を抑制した場合、処置翌日の P2 には網膜血管は全く観察されなかった (Fig. 5I)。P4 以降、血管は形成され始め、ゆっくりと網膜末端へと伸長した (Fig. 5J-O, Fig. 6)。P6 から P10 までの間、正常と比較して密に毛細血管が存在している領域が観察された (Fig. 5K-M) が、P12 以降の血管密度は正常と同程度となった (Fig. 5N, O)。更に、矢頭で示している動脈と静脈が交叉している箇所が多数認められた (Fig. 5M-O)。網膜血管形成中期に血管形成を抑制した場合には、処置翌日の P6 に血管網の進展抑制と既存血管の脱落が観察された (Fig. 5P)。そして、P8 には血管の脱落した網膜中心領域 (血管退縮領域) への血管が新生する様子が観察されるようになったが、網膜末端部への血管新生は認められなかった (Fig. 5P-R)。血管退縮領域が多く毛細血管で覆われた P10 以降、血管は網膜末端部へと向かって伸長するようになり (Fig. 5S, T, Fig. 6)、P8 から P10 までの間には、血管網先端部において、矢印で示している太く異常な形態の血管が認められた (Fig. 5Q-S)。このように、正常な網膜表層血管形成を一時的に抑制すると、その後に生じる血管形成の形成過程は正常とは異なることが示された。

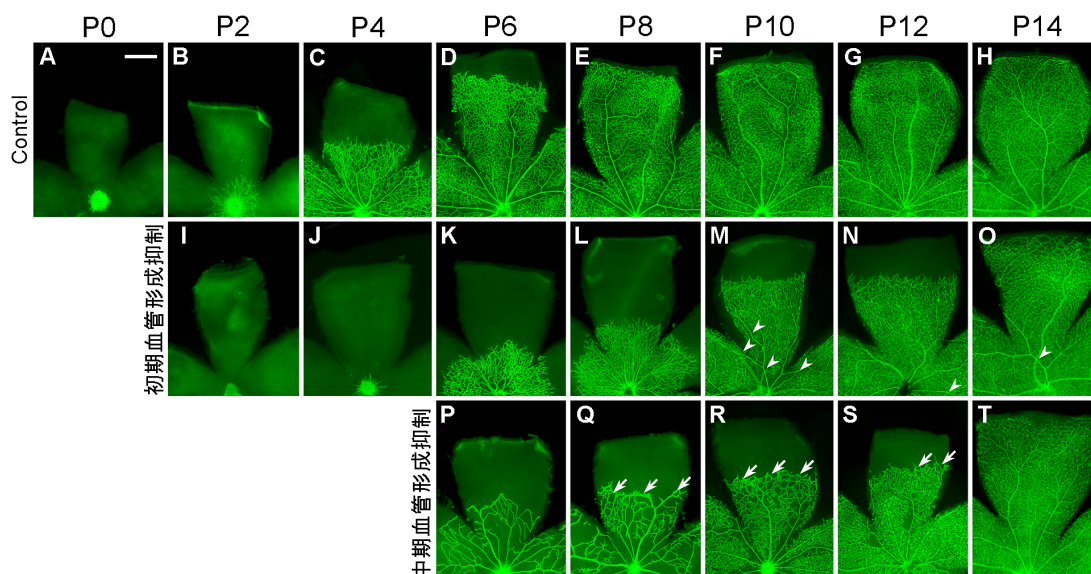


Figure 5. 網膜表層血管形成初期及び中期における KRN633 処置後の網膜血管形成
正常及び網膜表層血管形成初期又は中期に KRN633 を処置した網膜の血管内皮細胞 (PECAM-1 に対する抗体で染色) を示している。矢頭は動脈と静脈の交叉している箇所を、矢印は太く異常な血管を示している。Scale bar, 500 μ m.

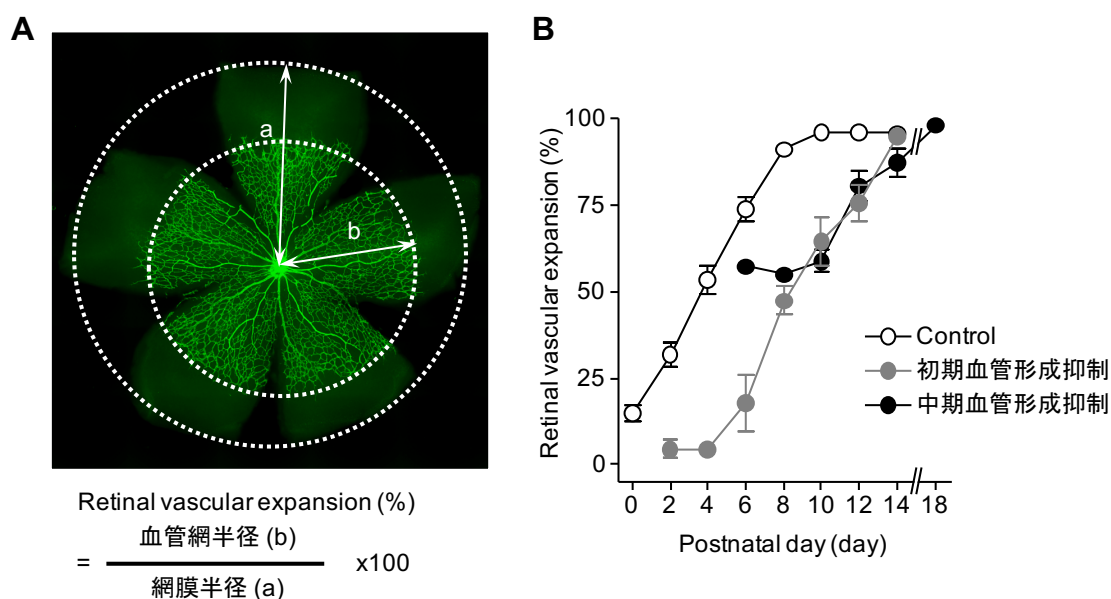


Figure 6. 網膜表層血管形成初期及び中期における KRN633 処置後の網膜血管形成率
A: 網膜半径に対する血管網半径の割合を網膜血管形成率とした。B: 正常及び網膜表層血管形成初期又は中期に KRN633 を処置した網膜の網膜血管形成率を示している。n=5-13.

1-2-2. 網膜表層血管形成初期及び中期の KRN633 処置後における血管構成成分 (基底膜・ペリサイト) の変化

網膜表層血管形成初期及び中期のいずれの場合においても、KRN633 を処置することで血管形成を抑制すると、その後に形成された血管の密度や形態に異常が認められたため、血管の構造について詳細に検討した。血管は、血管内皮細胞とその外側にペリサイトが接着しており、それを基底膜が覆うように存在する構造をしている (Fig. 3A)。そこで基底膜とペリサイトについて検討した。

正常の網膜表層血管形成過程では、type IV collagen 抗体で染色された基底膜は、PECAM-1 抗体で染色された血管内皮細胞を包み込むように存在していた (Fig. 7A) が、毛細血管のリモデリングに伴い生じる血管内皮細胞が脱落して基底膜のみ残存している箇所 (basement membrane sleeves; 矢頭で示している) も観察された (Fig. 7Aa-f)。P14 では、不要な血管が間引かれる血管のリモデリングの進行に伴い basement membrane sleeves はほとんど観察されなくなった (Fig. 7Ag-i)。網膜表層血管形成初期の血管形成抑制後においても、基底膜は血管内皮細胞を包み込むように存在していた (Fig. 7Ba-c)。しかしながら、P10 では basement membrane sleeves が多く観察された (Fig. 7Bd-f)。更に、矢印で示すように基底膜は正常よりも肥厚している様子が認められた (Fig. 7Bf')。これらの異常は、P14 までに消失した (Fig. 7Bg-i)。網膜表層血管形成の中期に血管形成を抑制した場合、P6 では毛細血管が脱落し basement membrane sleeves が生じていたが、その程度は正常とほぼ同程度であった。また、基底膜が広範囲に消失している領域も認められた (Fig. 7Ca-c)。その後、P10 では基底膜は正常とほぼ同様に存在し (Fig. 7Cd-f)、P14 で観察された多数の basement membrane sleeves は

血管のリモデリングを経て P18 には消失した (Fig. 7Cg-l)。

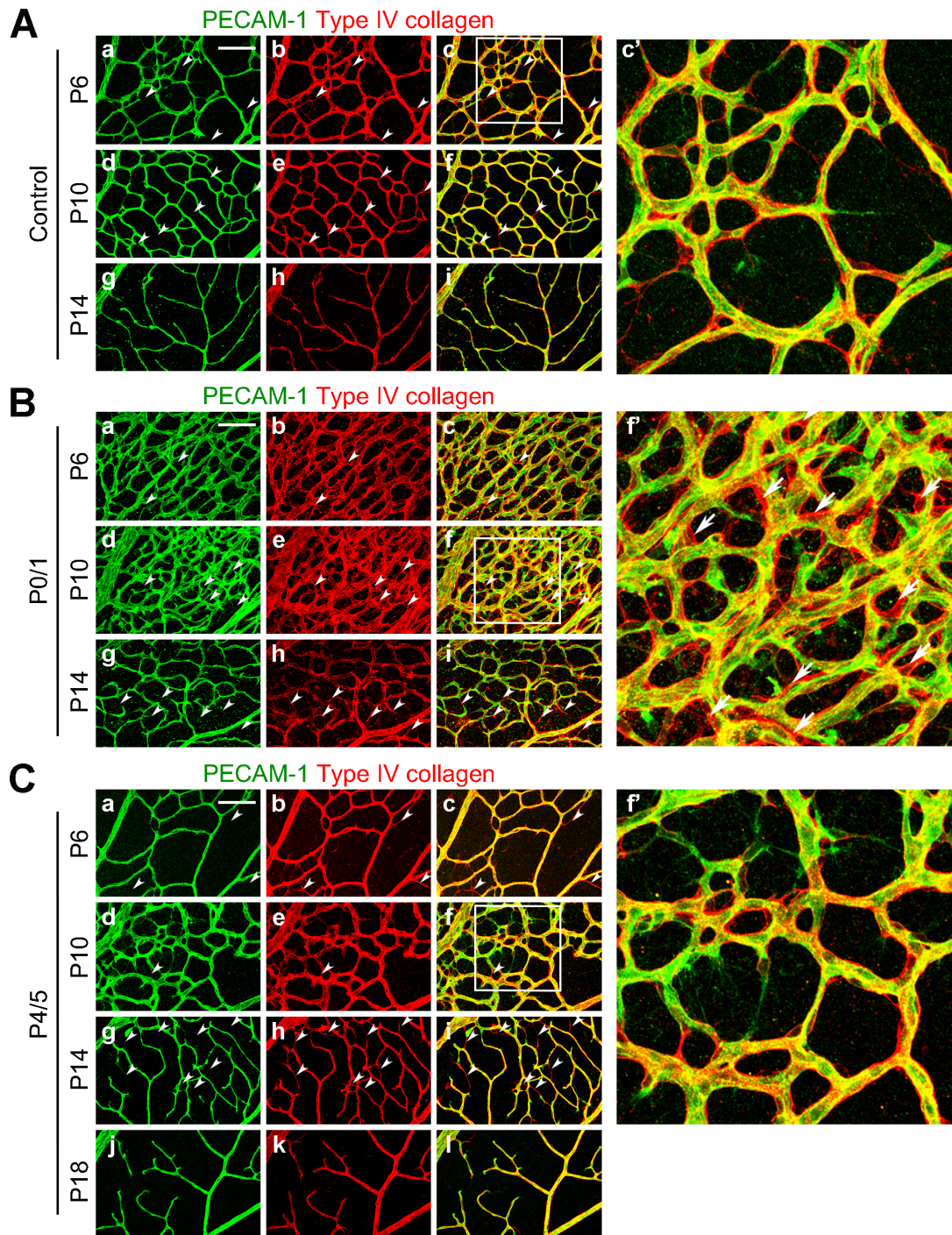


Figure 7. 網膜表層血管形成初期又は中期の KRN633 処置後における血管内皮細胞と基底膜の変化

正常 (A) 及び網膜表層血管形成初期 (B) 又は中期 (C) に KRN633 を処置した網膜の血管内皮細胞 (PECAM-1 に対する抗体で染色、緑) と基底膜 (type IV collagen に対する抗体で染色、赤) を示している。矢頭は basement membrane sleeve を、矢印は基底膜が太くなっている部位を示している。Ac', Bf' 及び Cf' はそれぞれ Ac, Bf 及び Cf を拡大して示している。Scale bar, 100 μm in a-l (16 μm for c', f').

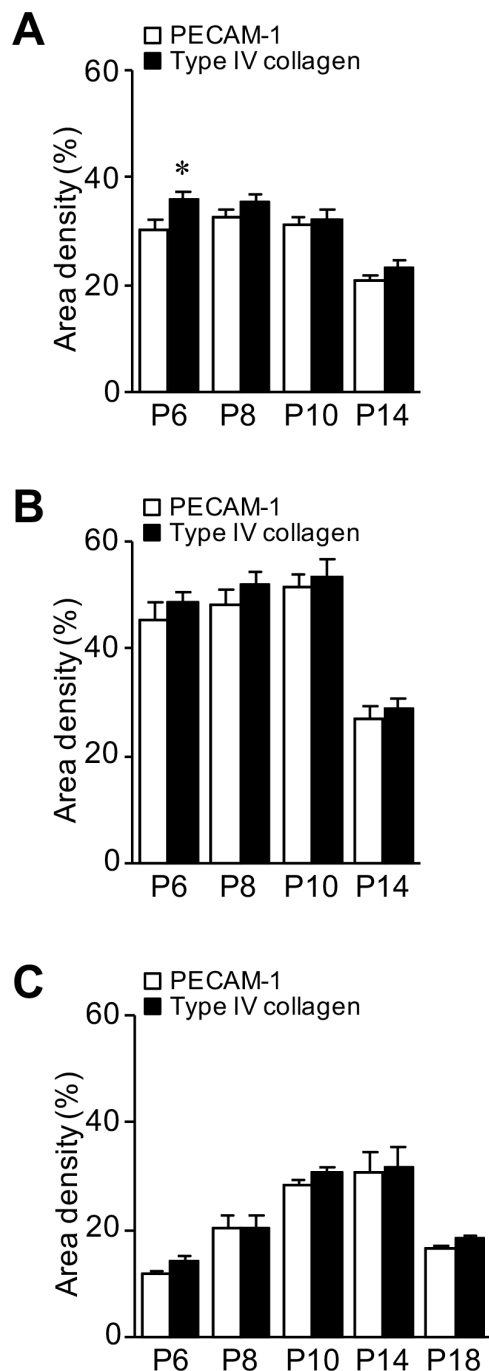


Figure 8. 網膜表層血管形成初期又は中期の KRN633 処置後における血管内皮細胞と基底膜密度の変化
 正常 (A) 及び網膜表層血管形成初期 (B) 又は中期 (C) に KRN633 を処置した網膜の血管内皮細胞及び基底膜の密度の定量結果を示している。n=4-6.
 * $P < 0.05$, versus PECAM-1.

血管形成領域において PECAM-1 又は type IV collagen 由来である閾値以上の蛍光強度をもつ pixel 数を求め、選択範囲の総 pixel 数に対する割合を血管又は基底膜の密度とし、定量した結果を Fig. 8 に示している。いずれの処置条件及び日齢においても、血管内皮細胞と基底膜の密度は、ほぼ同じであった (Fig. 8)。しかしながら、網膜表層血管形成初期に血管形成を抑制したマウスでは、P6 から P10 までの間、血管内皮細胞及び基底膜の密度は正常マウスと比較して高かった (Fig. 8A, B)。一方、網膜表層血管形成中期の血管形成抑制後 P6 の密度は、同日齢の正常マウスのものと比較して低かった (Fig. 8A, C)。網膜表層血管形成初期に血管形成を抑制した場合には、P14 までに血管のリモデリングを経て血管内皮細胞及び基底膜の密度は正常レベルになった (Fig. 8A, B)。網膜表層血管形成中期に血管形成を抑制した場合には血管内皮細胞及び基底膜の密度は、P18 で著しく低下し正常と同レベルにな

った (Fig. 8C) ことから、正常及び網膜表層血管形成初期抑制のものよりも遅れて血管のリモデリングが起こることが示された。

Neuron-glia antigen 2 (NG2) で染色される細胞は血管内皮細胞と接着して存在しており、網膜実質にはほとんど認められなかった。その細胞の形態と存在部位から NG2 陽性細胞はペリサイトであると考えられた。NG2 陽性ペリサイトはいずれの処置条件においても、ほとんど全ての網膜血管に存在していた (Fig. 9)。しかしながら、網膜表層血管形成を抑制したマウスでは、ペリサイトの形態に異常が認められるようになった (Fig. 9B, C)。正常マウスでは平滑筋マーカーである α -smooth muscle actin (α SMA) の発現は動脈に存在するペリサイトにおいてのみその局在が強く認められたが、静脈や毛細血管ではほとんど観察されなかった (Fig. 9A)。網膜表層血管形成を抑制したマウスでは、 α SMA の発現は血管網先端部の毛細血管領域においても認められるようになった (Fig. 9B, C)。

血管網先端部において PECAM-1, NG2 又は α SMA 由来である閾値以上の蛍光強度をもつ pixel 数を求め、PECAM-1 の pixel 数に対する NG2 又は α SMA 割合を血管被覆率として評価した。網膜表層血管形成を抑制したマウスにおいて、血管網先端部の毛細血管における α SMA 陽性ペリサイトの被覆率は増加した (Fig. 10)。そして、NG2 と α SMA の共局在領域を求めてみると、網膜表層血管形成初期又は中期に血管形成を抑制した P10 のマウスにおいて、それぞれ 68% と 79% であった。このことは、網膜表層血管形成抑制後に形成される血管網では先端部の毛細血管に存在するペリサイトにおける α SMA 発現が増加したことを示唆している。これらの α SMA 発現の増加は、それぞれの処置条件で表層血管が網膜を覆う P14 又は P18 (Fig. 6) で観察されなくなった。これら

の結果は、網膜表層血管形成の抑制は、その後に形成される血管のフェノタイプを一時的に異常なものとすることを示している。

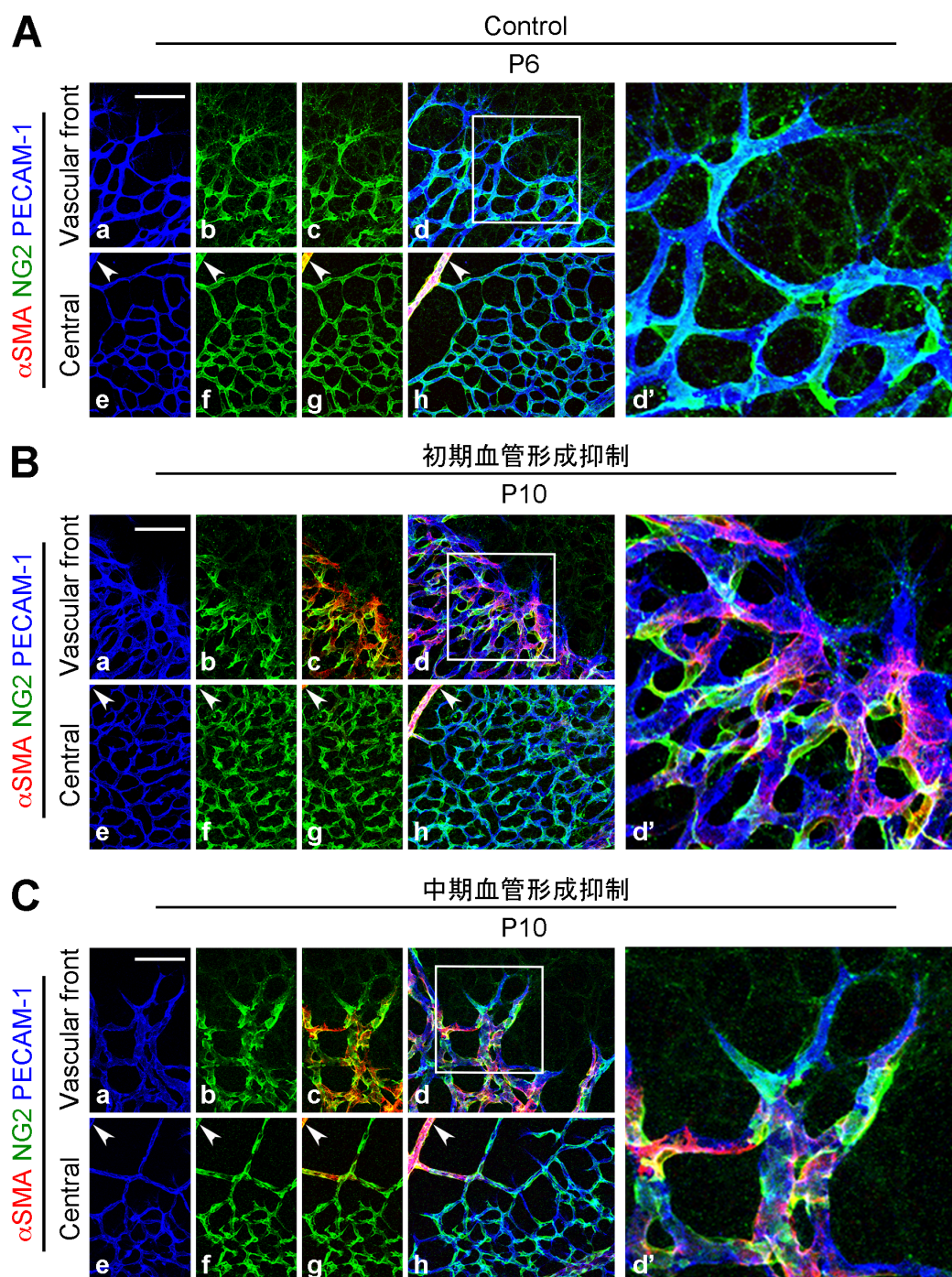


Figure 9. 網膜表層血管形成初期又は中期の KRN633 処置後におけるペリサイトの変化
 正常 (P6; A) 及び網膜表層血管形成初期 (B) 又は中期 (C) に KRN633 を処置した (P10)
 網膜の血管内皮細胞 (PECAM-1 に対する抗体で染色、青) とペリサイト (NG2 又は αSMA
 に対する抗体で染色、緑又は赤) を示している。矢頭は動脈を示している。Ad', Bd' 及び Cd'
 はそれぞれ Ad, Bd 及び Cd を拡大して示している。Scale bar, 100 μm in a-h (16 μm for d').

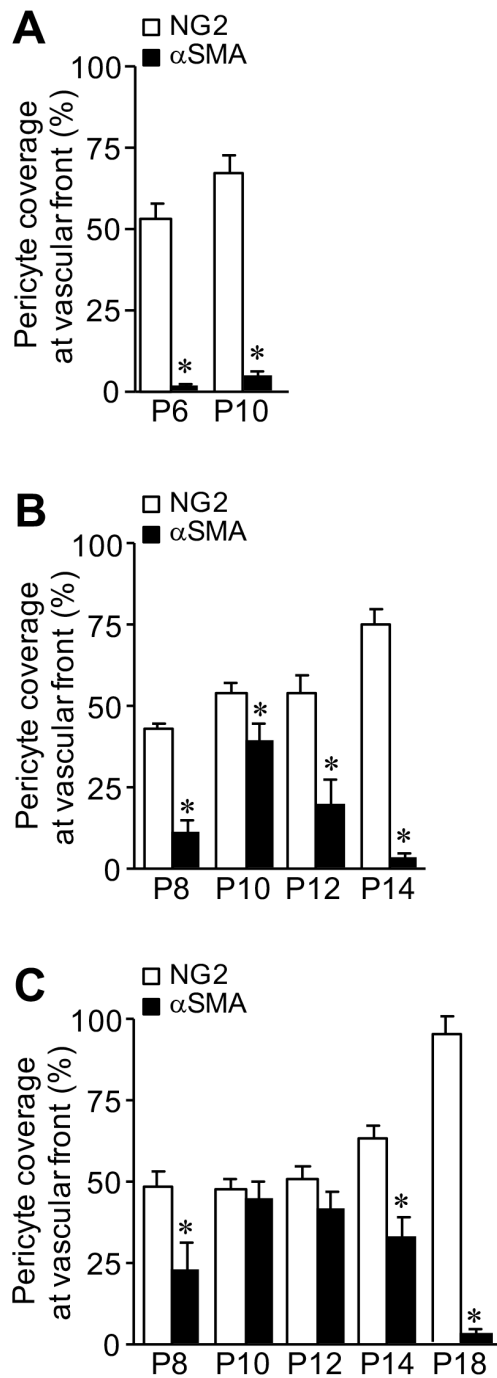


Figure 10. 網膜表層血管形成初期又は中期の KRN633 処置後におけるペリサイト被覆率の変化
 正常 (A) 及び網膜表層血管形成初期 (B) 又は中期 (C) に KRN633 を処置した網膜の血管網先端部におけるペリサイトの血管被覆率の定量結果を示している。
 n=4-6. * $P < 0.05$, versus NG2.

1-2-3. 網膜表層血管形成初期及び中期における KRN633 処置後に生じる細胞増殖性の変化

血管網先端部において異常な構造の血管が観察されたため、血管網先端部の観察を行うことができる正常マウスの P6 及び各網膜表層血管形成抑制マウスの P10 において、細胞増殖について検討することとした。

細胞の増殖状態は、増殖マーカーである 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) をマウスの解剖 2 時間前に 100 mg/kg 腹腔内投与し、その時間内に標識された細胞数を評価することにより検討した。Fig. 11A に示すようにいずれの処置条件においても、BrdU 陽性の細胞は血管網先端部及び中央部の血管形成領域、そして血管がまだ形成されていない血管未形成領域において観察された。

血管形成領域及び血管未形成領域において BrdU で染色された増殖性細胞の数を求め、単位面積あたりの増殖性細胞の数を評価した。血管形成領域内の BrdU 陽性細胞数は、正常マウス P6 と網膜表層血管形成中期に血管形成を抑制したマウス P10 と比較すると、網膜表層血管形成初期に血管形成を抑制したマウス P10 において増加していた (Fig. 11B)。このように、網膜表層血管形成初期に血管形成を抑制したマウスでは、血管内皮細胞の異常増殖が密な血管網の形成に関与していることが示唆された。一方、網膜表層血管形成を抑制した P10 マウス網膜の血管未形成領域における BrdU 陽性細胞数は、正常マウス P6 と比較して少なかった (Fig. 11B)。正常マウスにおいても P6 から P10 への日齢依存的な血管未形成領域における BrdU 陽性細胞の減少が認められた (データは示していない)。

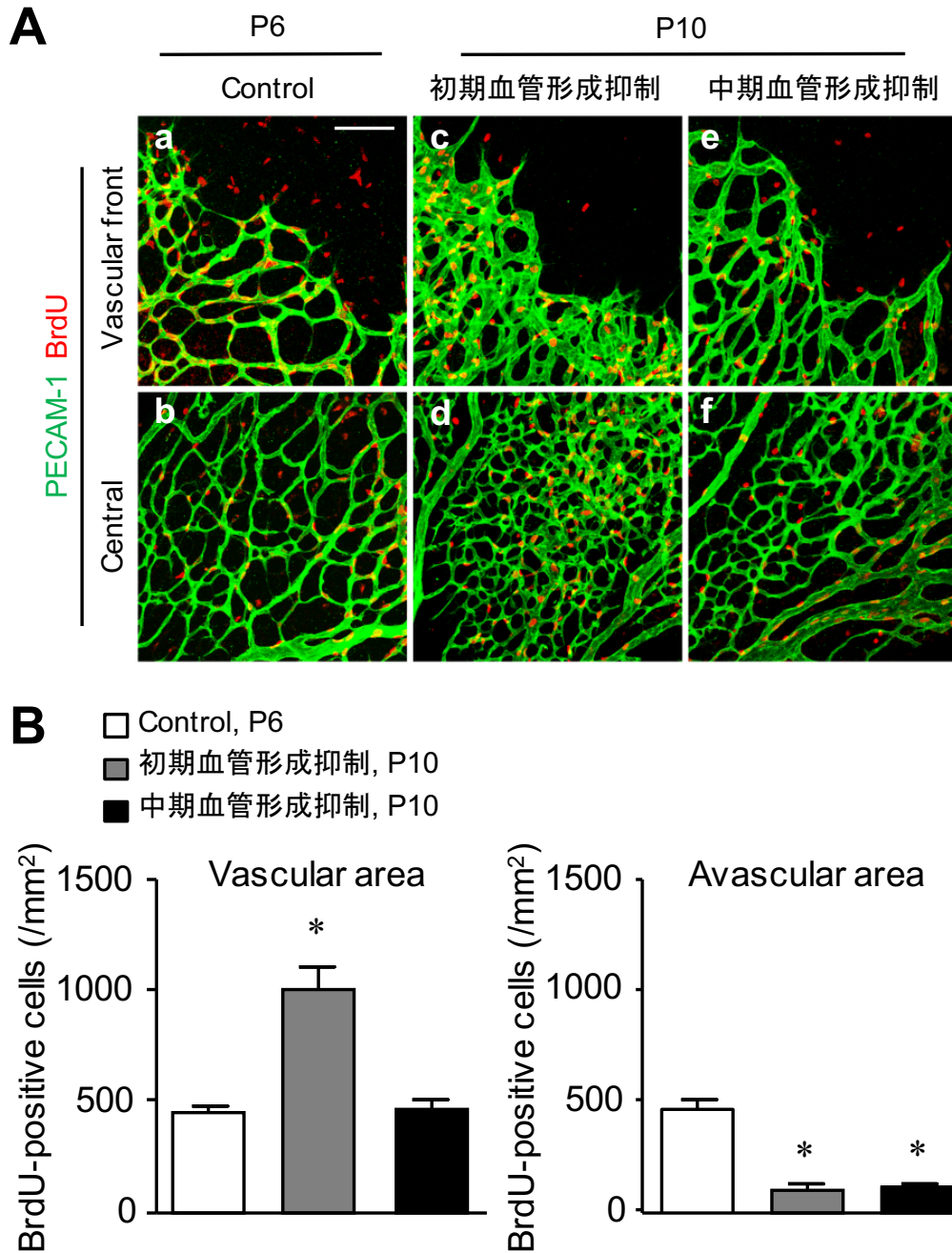


Figure 11. 網膜表層血管形成初期又は中期の KRN633 処置後における増殖性細胞の変化
 A: 正常 (P6) 及び網膜表層血管形成初期又は中期に KRN633 を処置した (P10) 網膜の血管内皮細胞 (PECAM-1 に対する抗体で染色、緑) と増殖性細胞 (BrdU に対する抗体で染色、赤) を示している。Scale bar, 100 μ m. B: 血管形成領域と血管未形成領域に存在する BrdU 陽性細胞の数を定量した結果を示している。n=5. * P < 0.05, versus P6 control mice.

1-3. 考察

網膜表層の血管網は形成に伴い、血管の VEGF に対する依存性が急激に減少する。本章では、血管の新生抑制及び脱落が著しかった網膜表層血管形成期の初期と中期に 2 日間 KRN633 を処置したマウスの網膜を解析し、1) 初期及び中期処置のいずれにおいても、その後に生じる血管形成の過程が正常のものとは異なること、2) 初期に抑制した場合、基底膜の肥厚、毛細血管のペリサイトにおける α SMA 発現の増加及び血管内皮細胞の異常増殖が生じること、3) 中期に抑制した場合には、毛細血管のペリサイトにおける α SMA 発現が増加することが見出された (Fig. 12)。これらの結果は、VEGFR チロシンキナーゼの作用を 1 度阻害して網膜血管新生を抑制すると、その後に生じる血管の形成過程と形成される血管の性質が異常となることを示している。

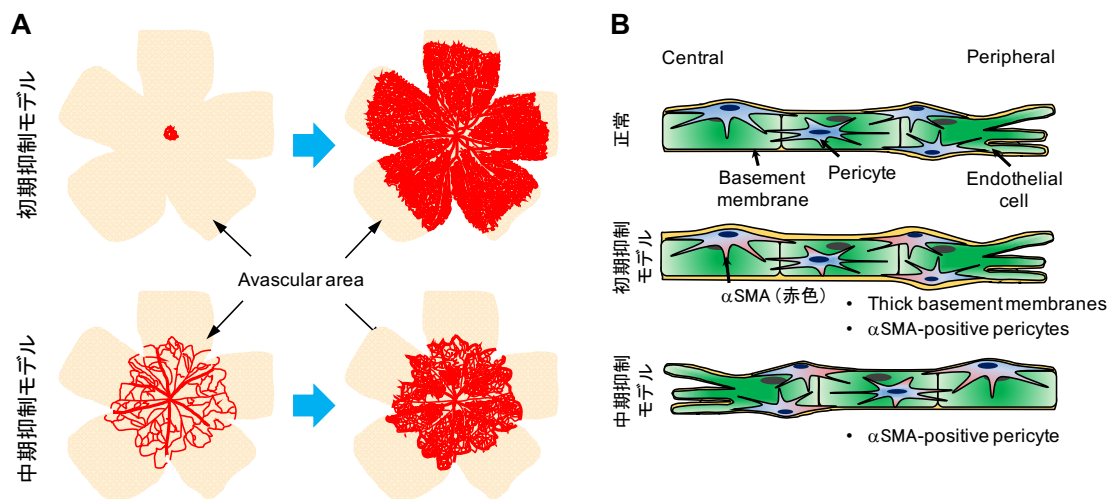


Figure 12. 第 1 章の要約

A: 初期抑制モデル (上段) 及び中期抑制モデル (下段) では異なった様式の血管形成異常が認められた。B: ペリサイトの α SMA 発現増加は両モデルで認められたが、基底膜の肥厚は初期抑制モデルにおいてのみ特徴的に生じた。

1-3-1. 網膜表層血管形成初期における KRN633 処置後に生じる血管形成

網膜血管形成初期の KRN633 処置マウス P2 において血管新生が完全に抑制されたが、KRN633 の効果の消失に伴い血管は新生した。しかしながら、その血管形成は正常と比較すると緩徐なものであった。そして、Fig. 11 で示したように BrdU 陽性の増殖性血管内皮細胞が多数観察され、血管網内の血管は密になった。血管内皮細胞の増殖及び血管密度の増加に、血管形成遅延に伴い生じる網膜の低酸素状態となった網膜で誘導される VEGF の発現増加が関与していること (Morita *et al.*, 2014a)、KRN633 処置マウスで認められた異常血管形成は他の VEGFR チロシンキナーゼ阻害薬である axitinib を処置した場合や高酸素に暴露した場合においても認められること (Morita *et al.*, 2014c; Morita *et al.*, 2016) から、本章で観察される異常血管形成は、VEGFR シグナル経路抑制によって引き起こされる血管形成遅延に起因しているものと考えられる。

新生仔期のマウス網膜では、アストロサイト、神経細胞及びミューラー細胞が VEGF を発現している (Feeney *et al.*, 2003; Okabe *et al.*, 2014; Yagasaki *et al.*, 2014; Morita *et al.*, 2017)。これまでに VEGF mRNA の分布がアストロサイトのネットワークと類似していること及び VEGF タンパク質がアストロサイトと共局在していることを見出している。従って、少なくともアストロサイトにおける VEGF 発現増加が密な血管網の形成及び血管内皮細胞の増殖に関与しているものと考えられる。また、新生仔マウス網膜において、アストロサイトは血管内皮細胞の足場となる fibronectin を産生し、血管新生を促進する (Gerhardt *et al.*, 2003)。網膜血管の形成遅延は、アストロサイトの増殖亢進及び遊走抑制を引き起こす (Morita *et al.*, 2017)。従って、これらの異常も異常血管形成に関与してい

るものと考えられる。

Fig. 7 で示したように、血管が網膜表層を覆う期間までに認められる密な血管網では、血管基底膜の肥厚が観察された。このような血管基底膜の異常は、血管新生が旺盛な腫瘍血管においても認められる (Baluk *et al.*, 2003)。今回の検討では、基底膜の密度の増加が血管形成領域における BrdU 陽性細胞の増加及びアストロサイトの VEGF 発現増加と同時期、即ち血管新生が旺盛な時期、に認められた。また、硝子体内へ投与された VEGF は fibronectin や type IV collagen 等の血管基底膜の構成成分の発現を増加させる (Kuiper *et al.*, 2007) ので、旺盛な血管新生と増加した VEGF が基底膜の肥厚を引き起こしているのかもしれない。

1-3-2. 網膜表層血管形成中期における KRN633 処置に生じる血管形成

血管が網膜表層の半分程度を覆う網膜血管形成中期に KRN633 を処置した場合には、P6 において血管形成領域における毛細血管の退縮と網膜末端への血管新生の抑制が観察された。網膜末端側に血管未形成領域があるにもかかわらず、その後の血管新生は、網膜中心の血管退縮領域へと優先的に生じ、末端への血管新生は P10 まで抑制された。

VEGFR 阻害薬を投与した成熟期マウスの気管や膀胱では、basement membrane sleeves が残存しており、それらを足場として血管が再形成される (Baffert *et al.*, 2006; Kamba *et al.*, 2006; Mancuso *et al.*, 2006)。しかしながら、今回の結果はそれらの報告とは異なり、basement membrane sleeves の数は正常と同程度であった。従って、今回観察された血管退縮領域へ優先的に生じた血管新生に

は残存した basement membrane sleeves が重要な役割を演じているとは考えにくい。一方、発達期の網膜血管未形成領域において、アストロサイトは、血管内皮細胞の $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンに結合し、血管内皮細胞の遊走のための足場となる fibronectin を産生する (Uemura *et al.*, 2006)。従って、血管退縮領域への血管新生にはアストロサイトによって新規に産生される fibronectin が関与している可能性が考えられる。更に、網膜表層血管形成中期に血管形成を抑制した後に形成された血管網先端部の血管は、正常とは異なり太く歪な構造になっていたことから、血管網先端部で認められる異常な血管が末梢の血管未形成領域への血管網進展抑制に関与している可能性も考えられる。

VEGF は、血管内皮細胞の分裂配向性に影響を及ぼすことが知られている (Zeng *et al.*, 2007)。また、硝子体内への VEGF 投与は、血管新生の時に認められる血管新生芽を短く太いものとする (Gerhardt *et al.*, 2003)。従って、血管網先端部と接した血管未形成領域の VEGF 発現上昇が正常とは異なる方向への血管形成や血管網先端部に存在する血管の形態異常に関与している可能性がある。

1-3-3. ペリサイトのフェノタイプ変化が生じる機序

血管内皮細胞とペリサイト間の相互作用は、血管の形成及び成熟化に関与する (Bergers & Song, 2005)。本章において、Fig. 9 及び Fig. 10 で示したように、正常及び網膜血管形成初期又は中期に血管形成を抑制したマウスのいずれにおいても、ペリサイトはほとんど全ての血管で認められ、血管に対する被覆率に有意な差は認められなかった。しかしながら、網膜血管形成を抑制したマウスのペリサイトの形態にはわずかな異常が認められた。正常では、毛細血管のペリサイ

トにおける α SMA 発現は非常に低く免疫組織化学的手法での検出は困難である。一方で、網膜血管形成を抑制した場合には、血管網先端部の毛細血管においてペリサイトの α SMA 発現の増加が認められた。ペリサイトにおいて α SMA 免疫活性が増加した機序は明らかではないが、細胞の増殖等に関与する transforming growth factor- β (TGF- β) シグナルの活性化の関与が考えられる。これまでに、TGF- β が網膜のペリサイトにおける α SMA の発現を増加させることが示されている (Papetti *et al.*, 2003; Sieczkiewicz & Herman, 2003)。また、 α SMA 陽性ペリサイトは、正常な網膜では動脈に存在していることから、KRN633 処置後に形成される血管の構造が異常であるために、正常では生じないような強い血行学的力学負荷が毛細血管にかかっていることも考えられる。

網膜血管形成初期に血管形成を抑制したマウスでは、血管が網膜表層を覆い、正常と類似した血管網となる P14 において、血管網先端部におけるペリサイトの α SMA 発現の増加は認められなくなった。従って、血管網の正常化による血行学的力学負荷の正常化が α SMA 発現の減少に関与しているかもしれない。一方、網膜表層血管形成中期に抑制をした場合には、血管網の正常化は初期に抑制をした場合よりも遅かった。この違いは、血管形成を阻害するタイミングの違いにより生じたと考えられる。血管形成を完全に抑制した場合と比較して、血管形成途中での抑制は、より大きな血行学的力学負荷の変化をもたらすのかもしれない。

網膜表層血管形成初期又は中期での血管形成抑制後に生じる血管網の形成様式に違いは認められたものの、毛細血管ペリサイトにおける形態異常や α SMA 発現の増加等には差が認められなかった。これらの異常は、眼内異常血管新生を

伴う疾患に対して抗血管新生療法を施した後にも生じているかもしれない。

1-4. 結論

以上のように、本章において、網膜表層血管形成初期及び中期の VEGFR 阻害薬処置後の血管形成及び形成された血管のフェノタイプが正常とは異なることが明らかになった。今回の検討では、ヒトの未熟児網膜症や OIR モデルマウスで認められるような硝子体方向への新生血管はほとんど観察されなかった。しかしながら、網膜表層血管形成初期に血管形成を抑制した場合には網膜内に多数の血管が新生し、異常に密な血管網が観察された。また、データを示していないが、私は、網膜表層血管形成初期に血管形成を抑制した場合に、動脈と静脈の数の減少及び動脈と静脈の交叉箇所が増加等、血管パターン異常が認められることを見出している (Morita *et al.*, 2014a)。血管パターン異常は、ヒトの未熟児においても生じること (Hellström *et al.*, 2004) から、網膜表層血管形成初期に血管形成を抑制したマウスは、ヒトで生じる血管パターン異常の形成機序の解析に有用であると考えられる。また、網膜表層血管形成中期に血管形成を抑制した場合には、ヒトの未熟児網膜症で認められる旺盛な血管新生と血管形成領域と血管未形成領域との間に生じる境界線と類似した血管形成領域と血管未形成領域との境界部に太く歪な血管が形成された。境界線は OIR モデルマウスでは観察されないため、網膜血管形成中期に血管形成を抑制した場合の特徴であると考えられる。このように、中期抑制モデルでは、これまでの病態モデルマウスでは再現されなかったヒトの未熟児網膜症で認められる代表的な血管異常の一部を再現できたと考えられる。以上のように、本章で見出された異常血管形成に

関する報告はなく、新規の異常血管形成モデルとなる可能性がある。

第 2 章及び第 3 章は学術雑誌へ投稿する予定があるため、論文の公表を延期いたします。なお、学術雑誌への投稿後は全文を公表いたします。

実験方法

4-1. 使用動物

全ての動物実験は、北里大学薬学部動物実験委員会の承認を得て行った。

成熟期の ICR マウスを、Charles River Laboratory (Tokyo, Japan) から購入し、12 時間の明暗サイクルで、自由摂食・自由飲水可能なケージで飼育した。雌雄のマウスを同一ケージで飼育した後、膣栓を認めた雌マウスを別ケージで飼育した。出生日を postnatal day 0 (P0) と記し、出生の n 日目を Pn と記した。

4-2. 薬物処置

4-2-1. 第 1 章

マウスの網膜血管は、出生直後に視神経乳頭部から網膜末端へと形成され P8 で表層部を覆う (Fig. 2)。そこで、血管がほとんど形成されていない時期を網膜表層血管形成初期 (P0)、血管が網膜表層を半分程度覆う時期を中期 (P4)、そして血管が網膜表層ほぼ全体を覆う時期を後期 (P8) とした。そして、P0, P4 及び P8 から 2 日間、マウスに VEGFR チロシンキナーゼ阻害薬である KRN633 (10 mg/kg, s.c.) を投与した。各処置条件を、それぞれ初期、中期及び後期処置とした。予備検討において、血管内皮細胞の VEGF 依存性が高く KRN633 の効果の大きかった網膜表層血管形成初期及び中期の KRN633 処置後について詳細に検討することとした。対照は、非処置のマウスとした。

P0, P2, P4, P6, P8, P10, P12, P14 又は P18 のマウスを pentobarbital sodium (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) で麻酔後、1% paraformaldehyde (PFA; Nacalai Tesque)

含有 phosphate-buffered saline (PBS) で灌流固定した。眼球を摘出し、摘出した眼球を 4°C で 4% PFA 含有 PBS 中に置き 30 分間更に固定した。その後、眼球から、角膜、虹彩、水晶体、強膜及び硝子体を除去した。単離した網膜を、4°C でさらに一晩 4% PFA 含有 PBS 中に置き固定した。翌日、網膜を 25%, 50%, 75% そして 100% と methanol の濃度を段階的に高めながら処理し、-20°C の 100% methanol 内で使用するまで保存した。

4-3. 増殖性細胞の標識

増殖期にある細胞を標識するために、眼球を摘出する 2 時間に 100 mg/kg の 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU; Nacalai Tesque) をマウスの腹腔内に投与した。その後、灌流固定を行い、網膜を単離し、100% methanol 中、-20°C で保存した。

抗 BrdU 抗体を用いた染色では、ブロッッキングの前に 37°C の温浴で 30 分間 0.1% TritonX-100 含有 2N HCl に浸漬した。その後、網膜を 10 分毎に合計 3 回 PBS-T で洗浄し、biotin-conjugated 抗 BrdU 抗体 (Table 1) を用いて蛍光免疫染色を行った。

4-4. 単離網膜の免疫染色と定量解析

4-4-1. 単離網膜の免疫染色

100% methanol もしくは 1% PFA 中で保存した網膜を 10 分毎に合計 3 回 0.5% TritonX-100 含有 PBS (PBS-T) で洗浄した。PBS-T により洗浄した網膜を、5% normal goat serum 含有 PBS-T で 30 分間ブロッッキングした。その後、Table 1 に示す 1 次抗体と各々に対応した 2 次抗体 (Table 2) を 5% normal goat

serum 含有 PBS-T で希釈して一晩又は 3 時間反応させた。網膜を 10 分毎に合計 3 回 PBS-T で洗浄し、10 分間 4% PFA 含有 PBS に浸漬した。最後に網膜を 10 分毎に 3 回 PBS で洗浄し、スライドグラス上に広げて VECTASHIELD® Mounting Medium (Vector laboratories Inc., CA, USA) で封入した。これらの操作は全て室温で行った。抗 VEGF 抗体を用いた染色では、ブロッキングを行わず、抗体反応の際、4°C で PBS-T 中で反応させた。

蛍光顕微鏡 (BZ-9000; KEYENCE, Osaka, Japan) と共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710; Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて画像を取得した。

抗体名	メーカー	希釈倍率
血管内皮細胞		
Hamster monoclonal anti-PECAM-1, clone 2H8	Chemicon, Temecula, CA, USA	1:500
Rat monoclonal anti-PECAM-1, clone MEC 13.3	BD Biosciences, San Diego, CA, USA	1:500
ペリサイト		
Cy3-conjugated mouse monoclonal anti- α SMA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	1:500
FITC-conjugated mouse monoclonal anti- α SMA	Sigma-Aldrich	1:500
Rabbit monoclonal anti-PDGFR β	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:500
Rabbit polyclonal anti-NG2 chondroitin sulfate proteoglycan (NG2)	Millipore, Temecula, CA, USA	1:500
細胞外マトリックス		
Rabbit polyclonal anti-type IV collagen	Cosmo Bio, Tokyo, Japan	1:8000
増殖性細胞		
Biotin-conjugated anti-BrdU	BioLegend, San Diego, CA, USA	1:200

Table 1. 蛍光免疫染色に使用した 1 次抗体リスト

抗体名	メーカー	希釈倍率
Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure donkey anti-rat IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA, USA	1:400
Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure donkey anti-rabbit IgG (H+L)		1:400
Alexa Fluor 647-conjugated AffiniPure goat anti-armenian hamster IgG (H+L)		1:400
Biotin-conjugated donkey anti-rabbit IgG (H+L)		1:200
Cy3-conjugated streptavidin		1:400
Cy3-conjugated AffiniPure donkey anti-rat IgG (H+L)		1:400
Cy3-conjugated AffiniPure donkey anti-rabbit IgG (H+L)		1:400
Cy3-conjugated AffiniPure goat anti-rat IgG (H+L)		1:400
Cy5-conjugated AffiniPure goat anti-rat IgG (H+L)		1:400
FITC-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L)	BioLegend	1:400
FITC-conjugated streptavidin		1:200

Table 2. 蛍光免疫染色に使用した 2 次抗体リスト

4-4-2. 定量解析

取得した蛍光画像の解析には、画像解析ソフト ImageJ (version 1.48) (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いた。

4-4-2-1. 第 1 章

1) 表層血管網の評価 (Fig. 6) : Fig. 6A に示した方法で、網膜と血管網の半径をそれぞれ求め、網膜半径に対する血管網半径の割合を網膜血管形成率とした。また、血管形成領域において PECAM-1 由来である閾値以上の蛍光強度をもつ pixel 数を求め、選択範囲の総 pixel 数に対する割合を血管密度とした。

2) 基底膜の評価 (Fig. 8) : 血管形成領域において type IV collagen 由来である閾値以上の蛍光強度をもつ pixel 数を求め、選択範囲の総 pixel 数に対する割合を基底膜の密度とした。また、前述の方法に従い、同領域における血管密度も求めた。

3) ペリサイトの評価 (Fig. 10) : 血管網先端部において NG2 又は α SMA 由来である閾値以上の蛍光強度をもつ pixel 数を求め、選択範囲の総 pixel 数に対する割合をペリサイト密度とした。また、前述の方法に従い、同領域における血管密度も求めた。ペリサイト密度を血管密度で割り、血管被覆率とした。

4) 増殖性細胞の評価 (Fig. 11) : 血管形成領域において BrdU で標識された増殖性細胞の数を求め、単位面積あたりの増殖性細胞の数を評価した。

4-5. 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。2 群間の検定には t -検定を行い、多群間の比較には one-way ANOVA を行った後、Tukey-Kramer の多重検定又は Dunnett's テスト (GraphPad, San Diego, CA, USA) を行った。 $P < 0.05$ をもって統計学的に有意差有りとした。

総 括

本研究では、新生仔マウスに本来備わっている網膜血管形成のプログラムを VEGFR チロシンキナーゼ阻害薬を投与することにより乱し、その後に形成される血管の異常性と異常血管の形成機序について検討を行った。

第 1 章では、血管内皮細胞の VEGF 依存性が高い網膜表層血管形成初期及び中期に VEGF シグナルを一時的に阻害して網膜血管の形成を抑制することにより作製する 2 種類の新規異常血管形成モデル (初期抑制モデル及び中期抑制モデル) を確立した。新規異常血管形成モデルを詳細に解析することにより、網膜血管形成抑制後の血管形成は異常となり未熟児網膜症で認められる網膜血管異常と類似していることを見出した。更に、形成された血管のフェノタイプが正常とは異なることを明らかにした。近年、糖尿病網膜症や加齢黄斑変性等の眼内血管新生を伴う疾患の治療に抗 VEGF 薬が用いられている (Nicholson & Schachat, 2010, Mutlu & Sarici, 2013; Holzet *al.*, 2014)。抗 VEGF 薬は劇的に病的血管新生を抑制し、両疾患の画期的な治療薬として臨床現場では高く評価されているものの、抗 VEGF 薬の使用時に生じる問題点も幾つか報告されてきている。また、治療後に生じる血管の形成及び血管内皮細胞やペリサイト等の血管構成細胞のフェノタイプに及ぼす影響については全く明らかにされていない。糖尿病網膜症や加齢黄斑変性では、糖尿病や加齢に伴い網膜内の環境が大きく変化しており、今回研究に用いた新生仔期の網膜とは全く異なる環境にあるかもしれない。しかしながら、正常に新生しつつある血管でさえ、VEGFR チロシンキナーゼ阻害薬を用いた VEGF シグナルの OFF-ON によって血管のフェノタ

イプが変化したことは糖尿病や加齢という要因が加わった際の新生血管に対する抗 VEGF 治療が血管のフェノタイプをより大きく変化させる可能性を想像させる。第 1 章で得られた研究成果が、未熟児網膜症で生じる網膜血管異常の機序解明、並びに糖尿病網膜症や加齢黄斑変性に対する抗 VEGF 治療後に生じ得る血管異常のリスクへの注意喚起に繋がれば幸いである。

以上、本研究において作製した新規異常血管形成モデルは、糖尿病網膜症、未熟児網膜症及び加齢黄斑変性等、失明リスクの高い虚血性網膜疾患で生じる異常血管形成の機序の解明のみならず、それら疾患の新規治療薬の標的の探索にも有用であるものと考えられる。本研究で作製した新規異常血管形成モデルが異常血管新生を伴う眼疾患の新規治療薬の開発への一助となることを期待したい。

参考文献

- Abe N, Nakahara T, Morita A, Wada Y, Mori A, Sakamoto K, Nagamitsu T, Ishii K., 2013. KRN633, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase, induces intrauterine growth restriction in mice. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 98, 297–303.
- Baffert F, Le T, Sennino B, Thurston G, Kuo CJ, Hu-Lowe D, McDonald DM. 2006. Cellular changes in normal blood capillaries undergoing regression after inhibition of VEGF signaling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H547–H559.
- Baluk P, Morikawa S, Haskell A, Mancuso M, McDonald DM. 2003. Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* 163, 1801–1815.
- Bergers G, Song S. 2005. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol* 7, 452–464.
- Blaauwgeers HGT, Hotkamp BW, Rutten H, Witmer AN, Koolwijk P, Partanen TA, Alitalo K, Kroon ME, Kijlstra A, van Hinsbergh VWM, et al., 1999. Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris: evidence for a trophic paracrine relation. *Am. J. Pathol.* 155, 421–428.
- Chan-Ling, T., Stone, J., 1993. Retinopathy of prematurity: its origins in the architecture of the retina. *Prog. Ret. Res.* 12, 155–178.
- Doguizi S, Ozdek S., 2014. Pigment epithelial tears associated with anti-VEGF therapy: incidence, long-term visual outcome, and relationship with pigment epithelial detachment in age-related macular degeneration. *Retina.* 34, 1156–62.
- Feeney, S.A., Simpson, D.A., Gardiner, T.A., Boyle, C., Jamison, P., Stitt, A.W., 2003. Role of vascular endothelial growth factor and placental growth factors during retinal vascular development and hyaloid regression. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 839–847.
- Ferrara N, Davis-Smyth T., 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18, 4–25.
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C. 2003. VEGF guides angiogenic sprouting

- utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* 161, 1163–1177.
- Haigh JJ, Morelli PI, Gerhardt H, Haigh K, Tsien J, Damert A, Miquerol L, Muhlner U, Klein R, Ferrara N, Wagner EF, Betsholtz C, Nagy A. 2003. Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reductions in VEGF-A paracrine signaling. *Dev. Biol.* 262, 225–241.
- Hellström A, Dahlgren J, Marsál K, Ley D., 2004. Abnormal retinal vascular morphology in young adults following intrauterine growth restriction. *Pediatrics* 113, e77–80.
- Holz FG, Schmitz-Valckenberg S, Fleckenstein M. 2014. Recent developments in the treatment of age-related macular degeneration. *J. Clin. Invest.* 124, 1430–1438.
- Kamba T, Tam BY, Hashizume H, Haskell A, Sennino B, Mancuso MR, Norberg SM, O'Brien SM, Davis RB, Gowen LC, Anderson KD, Thurston G, Joho S, Springer ML, Kuo CJ, McDonald DM. 2006. VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H560–H576.
- Kuiper EJ, Hughes JM, Van Geest RJ, Vogels IM, Goldschmeding R, Van Noorden CJ, Schlingemann RO, Klaassen I. 2007. Effect of VEGF-A on expression of profibrotic growth factor and extracellular matrix genes in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 248, 4267–4276.
- Kurihara T, Westenskow PD, Bravo S, Aguilar E, Friedlander M., 2012. Targeted deletion of Vegfa in adult mice induces vision loss. *J. Clin. Invest.* 122, 4213–7.
- Le Cras TD, Markham NE, Tuder RM, Voelkel NF, Abman SH., 2002. Treatment of newborn rats with a VEGF receptor inhibitor causes pulmonary hypertension and abnormal lung structure. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 283, L555–L562.
- Mancuso MR, Davis R, Norberg SM, O'Brien S, Sennino B, Nakahara T, Yao VJ, Inai T, Brooks P, Freemark B, Shalinsky DR, Hu-Lowe DD, McDonald DM. 2006. Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J. Clin. Invest.* 116, 2610–2621.
- Morita A, Nakahara T, Abe N, Kurauchi Y, Mori A, Sakamoto K, Nagamitsu T, Ishii K., 2014a. Effects of pre- and post-natal treatment with KRN633, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase, on retinal vascular development and patterning in mice. *Exp. Eye Res.* 120, 127–137.
- Morita A, Nakahara T, Abe N, Kurauchi Y, Mori A, Sakamoto K, Nagamitsu T, Ishii K., 2014b. Treatment of mid-pregnant mice with KRN633, an inhibitor of vascular

- endothelial growth factor receptor tyrosine kinase, induces abnormal retinal vascular patterning in their newborn pups. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 101, 293–9.
- Morita A, Nakahara T, Ushikubo H, Mori A, Sakamoto K, Ishii K., 2014c. Treatment of newborn mice with inhibitors of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase induces abnormal retinal vascular patterning. *Biol. Pharm. Bull.* 37, 1986–9.
- Morita A, Ushikubo H, Mori A, Sakamoto K, Nakahara T., 2016. Exposure to High-Concentration Oxygen in the Neonatal Period Induces Abnormal Retinal Vascular Patterning in Mice. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 107, 216–224.
- Morita A, Ushikubo H, Mori A, Arima S, Sakamoto K, Nagamitsu T, Ishii K., 2017. Nakahara T. A delay in vascularization induces abnormal astrocyte proliferation and migration in the mouse retina. *Dev. Dyn.* 246, 186–200.
- Mutlu FM, Sarici SU. 2013. Treatment of retinopathy of prematurity: a review of conventional and promising new therapeutic options. *Int. J. Ophthalmol.* 6, 228–236.
- Nakahara T, Morita A, Yagasaki R, Mori A, Sakamoto K., 2017. Mammalian target of rapamycin (mTOR) as a potential therapeutic target in pathological ocular angiogenesis. *Biol. Pharm. Bull.* 40, 1–6.
- Nakamura K, Yamamoto A, Kamishohara M, Takahashi K, Taguchi E, Miura T, Kubo K, Shibuya M, Isoe T. 2004. KRN633: A selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase that suppresses tumor angiogenesis and growth. *Mol Cancer Ther* 3:1639–1649.
- Nakamura, S., Imai, S., Ogishima, H., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Hara, H., 2012. Morphological and functional changes in the retina after chronic oxygen-induced retinopathy. *PLoS One* 7, e32167.
- Nicholson BP, Schachat AP. 2010. A review of clinical trials of anti-VEGF agents for diabetic retinopathy. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 248, 915–930.
- Okabe K, Kobayashi S, Yamada T, Kurihara T, Tai-Nagara I, Miyamoto T, Mukouyama YS, Sato TN, Suda T, Ema M, Kubota Y. 2014. Neurons limit angiogenesis by titrating VEGF in retina. *Cell* 159:584–596.
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L., 2006. VEGF receptor signalling in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 359–71.
- Ozaki, H., Seo, M.S., Ozaki, K., Yamada, H., Yamada, E., Okamoto, N., Hofmann, F., Wood, J.M., Campochiaro, P.A., 2000. Blockade of vascular endothelial cell growth

- factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. *Am. J. Pathol.* 156, 697–707.
- Papetti M, Shujath J, Riley KN, Herman IM. 2003. FGF-2 antagonizes the TGF-beta1-mediated induction of pericyte alpha-smooth muscle actin expression: a role for myf-5 and Smad-mediated signaling pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:4994–5005.
- Robinson GS, Ju M, Shih SC, Xu X, McMahon G, Caldwell RB, Smith LE., 2001. Nonvascular role for VEGF: VEGFR-1, 2 activity is critical for neural retinal development. *FASEB J.* 15, 1215–1217.
- Rofagha S, Bhisitkul RB, Boyer DS, Sadda SR, Zhang K., 2013. SEVEN-UP Study Group. Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: a multicenter cohort study (SEVEN-UP). *Ophthalmology* 120, 2292–9.
- Saint-Geniez M, Maharaj AS, Walshe TE, Tucker BA, Sekiyama E, Kurihara T, Darland DC, Young MJ, D'Amore PA., 2008. Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on müller cells and photoreceptors. *PLoS One* 3, e3554.
- Shibuya M., 2008. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep.* 41, 278–286.
- Sieczkiewicz GJ, Herman IM. 2003. TGF-beta 1 signaling controls retinal pericyte contractile protein expression. *Microvasc. Res.* 66, 190–196.
- Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, D'Amore PA. 1994. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 101–111.
- Stahl A, Connor KM, Sapienza P, Chen J, Dennison RJ, Krah NM, Seaward MR, Willett KL, Aderman CM, Guerin KI, Hua J, Lofqvist C, Hellstrom A, Smith LE. 2010. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 2813–2826.
- Uemura A, Kusuhara S, Wiegand SJ, Yu RT, Nishikawa S. 2006. Tlx acts as a proangiogenic switch by regulating extracellular assembly of fibronectin matrices in retinal astrocytes. *J. Clin. Invest.* 116, 369–377.
- Yagasaki R, Nakahara T, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. 2014. Effects of mTOR inhibition on normal retinal vascular development in the mouse. *Exp. Eye Res* 129, 127–134.
- Zeng G, Taylor SM, McColm JR, Kappas NC, Kearney JB, Williams LH, Hartnett ME, Bautch VL. 2007. Orientation of endothelial cell division is regulated by VEGF signaling during blood vessel formation. *Blood* 109, 1345–1352.

謝 辞

本研究を行うにあたり、このような機会を与えてくださいました北里大学大学院薬学研究科分子薬理学教室・中原努教授に謹んで御礼申し上げます。

また、ご多忙の中、主査を引き受けてくださいました薬理学教室・田辺光男教授、副査を引き受けてくださいました生化学教室・服部成介教授、微生物薬品製造学教室・供田洋教授に心より感謝致します。

本研究において、KRN633 の合成にご協力くださいました薬品製造化学教室・長光亨教授、有馬志保助教に深く感謝致します。

そして、本研究を遂行する上で終始御指導、御鞭撻を賜り、3 年間にわたる研究生活を有意義に過ごさせて下さいました分子薬理学教室・坂本謙司准教授、森麻美助教、牛久保裕子助教、川島紘一郎客員教授に心より御礼申し上げます。更に、本研究の立ち上げ時期に多くの御指導を頂きました分子薬理学教室・石井邦雄前教授及び培養細胞を用いた実験において御指導を頂きました愛知医科大学医学部生理学講座・林寿来講師に深く感謝いたします。

最後に、長年にわたり、研究をする機会を頂き、支えとなってくれた家族に心から感謝致します。

本研究の一部は、科学研究費 特別研究員奨励費 (15J11782) の助成を受けて実施されました。