

# 学位論文内容要旨

氏名： 森 田 茜

題目：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

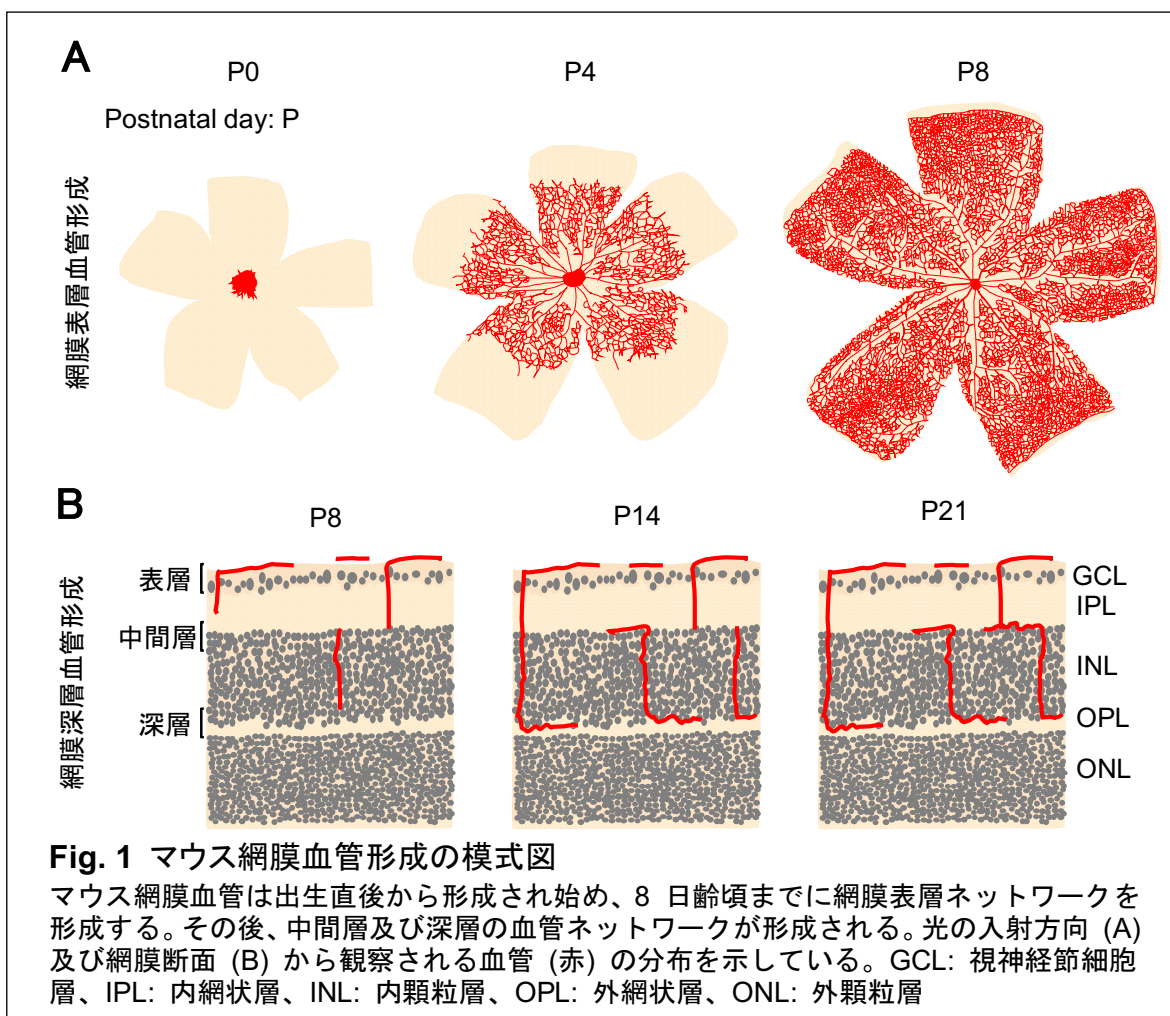
## 背景

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 (VEGF) 等の血管新生関連因子が重要な役割を演じている<sup>[1]</sup>。胎生期における VEGF の欠損は胎生致死を引き起こすが、胎生期を含む発達期における部分的な VEGF の作用抑制は各種臓器の血管形成と発達を抑制する。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<sup>[2]</sup>、将来の疾患発症リスクを高めるものと考えられている。例えば、発達期の肺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<sup>[3]</sup>。

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<sup>[4,5]</sup>、また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報告されている。異常な血管新生は、組織の低酸素に起因して生じる VEGF の発現増加により引き起こされる<sup>[6,7]</sup>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、VEGF の作用抑制は正常な血管や神経に対して悪影響を及ぼす可能性が示されている。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。

マウス網膜血管は、出生直後から 8 日齢頃までに網膜表層でネットワークを形成した後、中間層及び深層部へと伸長し、21 日齢頃までに 3 層からなるネットワークを形成する (Fig. 1)<sup>[8]</sup>。マウス網膜の血管ネットワークは可視化が容易であること及び精巧なプログラムに基づき形成されることから、血管研究に汎用されている。本研究の目的は、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である。第 1 章では、新生仔マウスに VEGF 受容体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、血管を構成する基底膜や周皮細胞 (ペリサイト) 及び血管の周囲に存在する神経細胞やアストロサイト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。

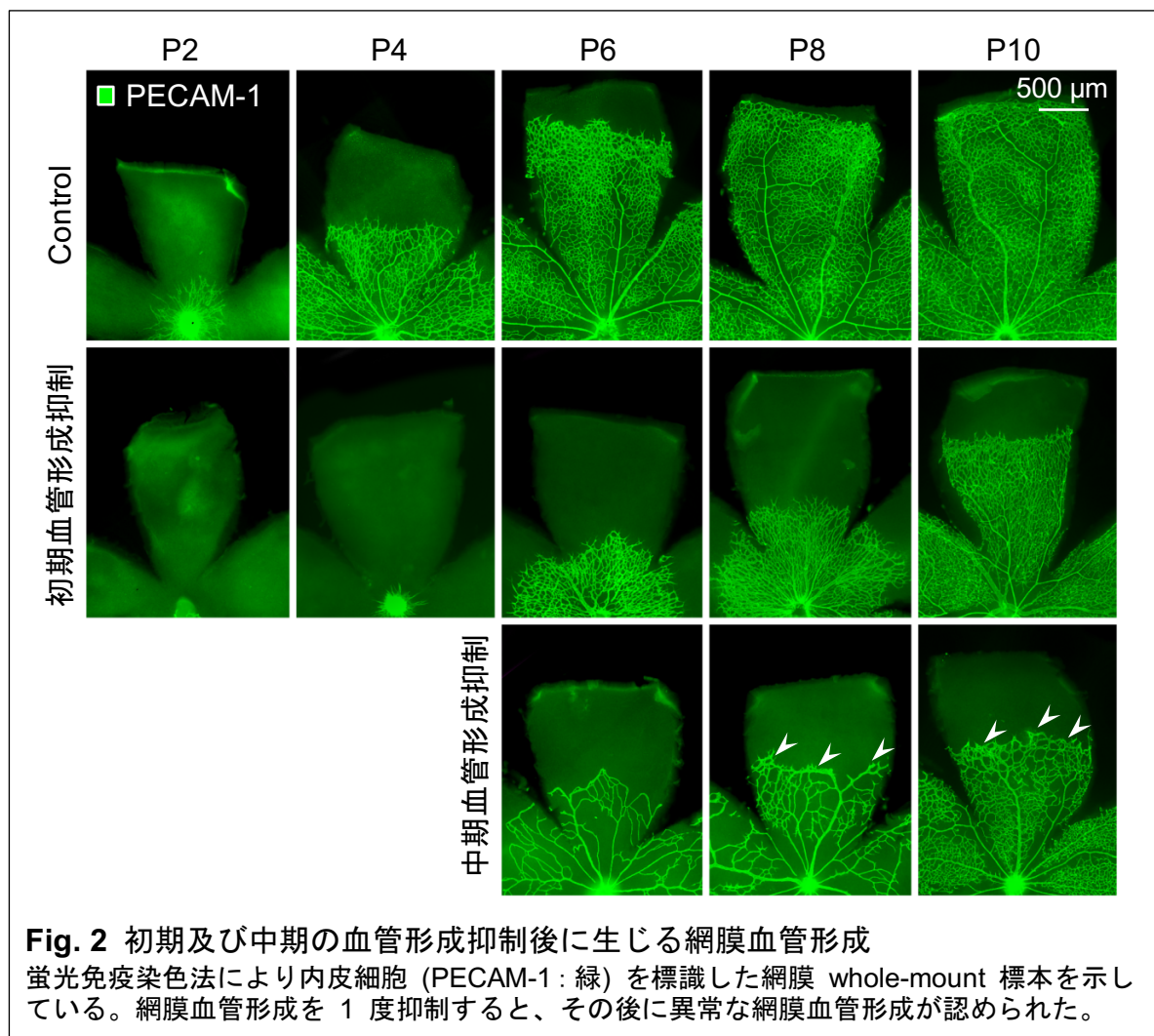


## 第 1 章 実験系の確立 (可視化・解析法／モデル動物の確立)

まず、VEGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬により網膜血管形成を抑制する条件を明らかにするために、網膜表層血管における血管内皮細胞の VEGF 依存性の経時変化について検討した。0, 4 及び 8 日齢から 2 日間 VEGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬 KRN633 (5 又は 10 mg/kg) をマウスの背部皮下に投与した。その結果、KRN633 は、いずれの投与プロトコールにおいても毛細血管の新生抑制と既存毛細血管の脱落を引き起こし、その程度は処置開始の日齢に依存して減弱することが示された。このように、網膜血管内皮細胞の VEGF 依存性は成長に伴い低下することが明らかになった。

次に、血管内皮細胞の VEGF 依存性が高かった 0 日齢 (網膜表層血管形成初期) 及び 4 日齢 (網膜表層血管形成中期) から KRN633 を 2 日間投与した後の網膜血管の形成並びに形成された血管のフェノタイプについて検討した。

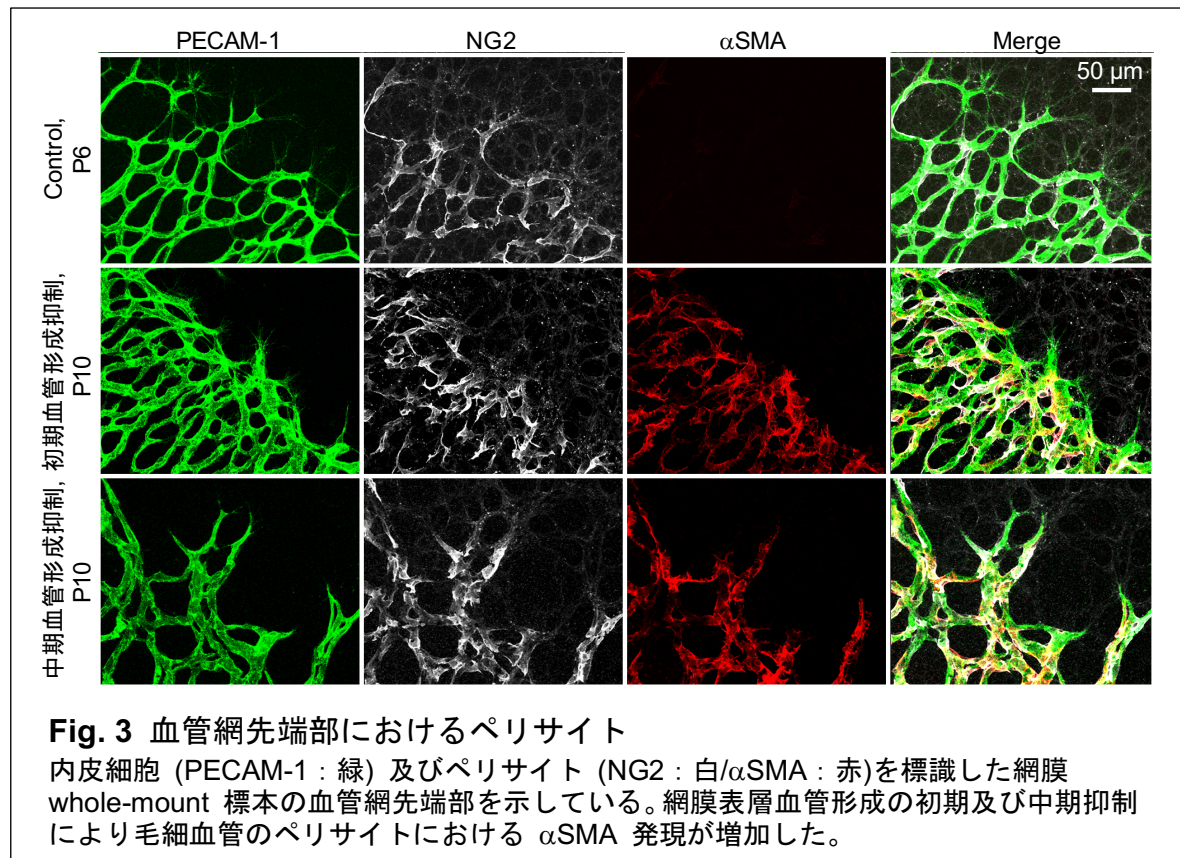
網膜表層血管形成初期に KRN633 を投与した場合には、網膜末端への血管網の進展が遅れ、形成された血管網には毛細血管が密に存在するようになった (Fig. 2 中段)。また、動・静脈の数の減少や動静脈の交叉箇所の増加等の血管パターン異常も認められた<sup>[9]</sup>。同様な異常血管の形成は、網膜表層血管形成初期において別の VEGF 受容体阻害薬である axitinib を投与した場合<sup>[10]</sup>、及び高酸素曝露を行った場合<sup>[11]</sup>にも認められた。網膜表層血管形成中期に KRN633 を投与した場合においても初期に KRN633 を投与した場合と同様に、網膜末端への血管網の進展は遅延した。しかし、正常マウスや初期に KRN633 を投与したマウスの場合とは異なり網膜末端への血管網進展は一時的に停止し、既存の毛細血管が脱落した網膜中心領域における血管形成が優先的に生じた。進展が抑制された血管網の先端部には太く形態が異常な血管 (矢頭 Fig. 2 下段) が認められた。



**Fig. 2** 初期及び中期の血管形成抑制後に生じる網膜血管形成

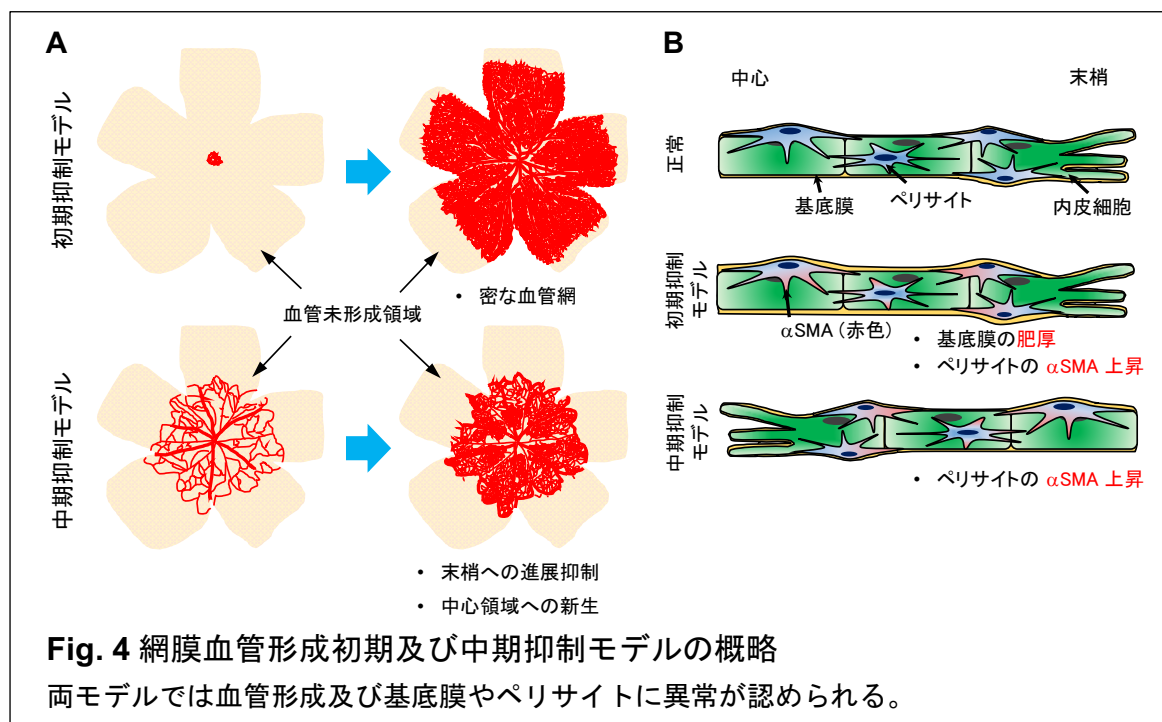
蛍光免疫染色法により内皮細胞 (PECAM-1: 緑) を標識した網膜 whole-mount 標本を示している。網膜血管形成を 1 度抑制すると、その後に異常な網膜血管形成が認められた。

血管構成成分である基底膜及びペリサイトについて検討したところ、網膜血管の形成抑制後に形成された血管においても血管内皮細胞の周囲に存在していた。しかし、初期の網膜表層血管形成抑制後に形成された血管の基底膜は太く異常であり、加えて初期及び中期の網膜表層血管形成抑制後に形成された毛細血管のペリサイトにおいては、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) の免疫活性が増大していた (Fig. 3)<sup>[12]</sup>。



以上の結果から、正常な網膜表層血管形成が抑制されるとその後に形成される血管は異常なフェノタイプを示すことが明らかとなった。このような異常な血管形成に関する報告はこれまでになく、本研究で用いた KRN633 を投与したマウスは新規の網膜異常血管形成モデルとなる可能性が示された (Fig. 4)。





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。

## 謝辞

KRN633 を合成してくださいました本学薬学部薬品製造化学教室 長光亨先生及び有馬志保先生に厚く御礼申し上げます。また、本研究の一部は、日本学術振興会特別研究員 DC1 として研究奨励金をいただき行いました。

## 参考文献

- [1] Ferrara *et al.* 1996. *Nature* 380, 439–442.
- [2] Abe N *et al.* 2013. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 98, 297–303.
- [3] Le Cras TD *et al.* 2002. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 283, L555–L562.
- [4] Hellström *et al.*, 2004. *Pediatrics* 113, e77–80.
- [5] Morita *et al.*, 2014. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 101, 293–9.
- [6] Chan-Ling, T., Stone, J. 1993. *Prog. Ret. Res.* 12, 155–178.
- [7] Nakahara T *et al.*, 2017. *Biol. Pharm. Bull.* 40, 1–6.
- [8] Stahl A *et al.* 2010. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 2813–2826.
- [9] Morita *et al.*, 2014. *Exp. Eye Res.* 120, 127–137.
- [10] Morita *et al.*, 2014. *Biol. Pharm. Bull.* 37, 1986–9.
- [11] Morita *et al.*, 2016. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 107, 216–224.
- [12] Morita *et al.* *Dev. Dyn.* (in press)

