



Title	難治性眼疾患における病態解明と新規治療法の開発 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	長谷, 敬太郎
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14087号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/77924
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号 : 2553
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Keitaro_Hase_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 長谷 敬太郎

学位論文題名

難治性眼疾患における病態解明と新規治療法の開発

(Elucidation of pathogenesis and development of novel treatments for refractory eye diseases)

第1章:増殖糖尿病網膜症患者における血漿可溶型(プロ)レニン受容体と炎症関連分子の関連性解析

【背景と目的】糖尿病網膜症とは、高血糖により網膜微小血管障害を生じ、それによって網膜血流障害を起こす疾患である。網膜症が進行し、網膜に新生血管や線維血管組織を形成する増殖糖尿病網膜症 (PDR) まで至ると、血管新生緑内障や牽引性網膜剥離を併発し、重篤な視力障害を起こす。

一方、血圧や体液を調節する循環ホルモンシステムであるレニン・アンジオテンシン系 (RAS) が、臓器局所では、細胞の分化と増殖、炎症、線維化などに関与して組織の修復など生理的な役割を担っており、組織 RAS と呼ばれている。近年、我々はこの組織 RAS の上流に位置する (プロ)レニン受容体 [(P)RR] が、眼内における血管内皮増殖因子 (VEGF) などの炎症性サイトカインの発現を制御し、PDR をはじめとした炎症・血管新生を特徴とする眼疾患の病態形成に関与していることを示した。そこで本研究では、PDR 患者の血漿中における可溶型 (プロ)レニン受容体 [s(P)RR] タンパク質濃度と糖尿病による全身的要因との関連性について検討した。

【対象と方法】2型糖尿病に合併した PDR 患者 20 名と対照群として非糖尿病患者 (特発性黄斑上膜もしくは黄斑円孔) 20 名の手術前に採取した血漿を用いて検討した。血漿中における s(P)RR やプロレニン、様々な糖尿病誘発性炎症関連分子のタンパク質濃度はマルチプレックス解析システムおよび酵素免疫測定法を用いて測定・解析を行った。さらに、ヒト網膜血管内皮細胞を用いて種々の条件下における遺伝子発現変化を定量的リアルタイム PCR にて解析した。

【結果と考察】PDR 群において血漿 s(P)RR、プロレニンおよび活性型プロレニンが非糖尿病群に比べ高値であり、また炎症関連分子ではロイシンリッチ $\alpha 2$ グリコプロテイン (LRG) 1、腫瘍壊死因子 (TNF) $-\alpha$ 、補体 D 因子 (CFD) が有意に上昇していた。さらに、s(P)RR とそれら分子は有意な相関が認められたが、プロレニンとは相関がなかった。また、臨床検査項目と s(P)RR との関連性について調べたところ、腎機能障害のパラメーターである推算糸球体濾過値や血清クレアチニン値との相関が認められた。ヒト網膜血管内皮細胞を LRG1、TNF $-\alpha$ 、CFD で刺激したところ、TNF $-\alpha$ でのみ (P)RR/*ATP6AP2* 遺伝子の発現が上昇したが、プロレニン/*REN* の発現は変化しなかった。また、高血糖条件下ではヒト網膜血管内皮細胞における (P)RR/*ATP6AP2* とプロレニン/*REN* の両方の発現が上昇した。

【結論】慢性炎症、腎機能障害および高血糖など糖尿病誘導因子が血漿中 s(P)RR 濃度を上昇させ、さらには組織 RAS の活性化を誘導して PDR における網膜新生血管を促進していることが示唆された。

第2章:増殖糖尿病網膜症患者における血漿中のガレクチン-1 と炎症関連分子との相関解析

【背景と目的】我々は血管新生因子ガレクチン-1 が PDR 患者の眼内において VEGF 非依存的に増加していること、ガレクチン-1 の発現制御に低酸素以外に終末糖化産物 (AGEs) およびインターロ

イキン (IL) -1β が関与していることを明らかにした。本研究では、血漿中ガレクチン-1 と低酸素誘導および炎症関連分子との相関について検討を行った。

【対象と方法】対象は、2型糖尿病 (DM) による PDR 患者 20 例、DM の既往がない特発性黄斑上膜および黄斑円孔患者 20 例から手術前に採取した血漿を用いて、マルチプレックス解析システムと酵素免疫測定法で種々の血漿中タンパク質濃度を測定した。

【結果と考察】PDR 患者血漿中のガレクチン-1、AGEs、IL- 1β 濃度は、非 DM 群に比べ有意に高値であった。さらに、PDR 群では血漿ガレクチン-1 は AGEs や IL- 1β と正の相関を示したが、非 DM 群では相関はなかった。また、PDR 群と非 DM 群の両者ともに血漿中におけるガレクチン-1 は VEGF ならびに低酸素誘導分子 (IL-6、エリスロポエチンなど) との相関は認められなかった。

【結論】眼内と関与する細胞成分は異なるが、血漿中ガレクチン-1 も AGEs と IL- 1β の経路を介した発現制御系が存在し、他の DM 合併症における様々な臓器での病態形成に関与していることが示唆された。

第3章：マクロファージ様人工多能性幹細胞由来免疫抑制細胞を用いたマウス実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎の軽症化

【背景と目的】ぶどう膜炎は、虹彩、毛様体、脈絡膜で構成される眼球の中間層に生じる炎症である。これまでぶどう膜炎の治療には主としてステロイド薬、消炎鎮痛薬、免疫抑制薬が用いられてきた。しかし、これらの治療は対症療法にすぎないため、減量とともに再発することが多いことや、長期投与による副作用も高頻度に見られることが問題となっている。そこで、疾患の根幹にあると考えられる過剰な自己免疫反応を抑え、対症療法に頼らない根治治療を目指すべく、免疫抑制細胞を用いた免疫治療に着目した。本研究では、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) から誘導したマクロファージ様 iPS 細胞由来免疫抑制細胞 (iPS-SCs) を用いて、マウス実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) の抑制効果を検討した。

【対象と方法】C57BL/6J マウスに、ヒト網膜視細胞間レチノイド結合蛋白由来合成ペプチド (hIRBPp1-20) と完全フロイントアジュバントのエマルジョンを皮下注射して EAU を誘導した。一方、C57BL/6J マウス脾臓 B 細胞由来の iPS 細胞から iPS-SCs を誘導した。治療群には iPS-SCs、対照群には溶媒のみをマウスに腹腔内投与した。臨床的重症度を経時的に観察し、21 日目に眼球を摘出して組織学的重症度を評価した。また、免疫後の所属リンパ節から抽出した CD4 陽性 T 細胞を抗原刺激する際に iPS-SCs を加えて、抗原特異的 T 細胞増殖反応と各種サイトカイン濃度を検討した。

【結果と考察】マウス EAU における臨床的重症度は、iPS-SCs 投与群では対照群に比較して有意に炎症が軽症化しており、組織学的重症度においても有意な炎症の軽症化が認められた。次に、*in vitro* 解析の結果、抗原特異的 T 細胞の増殖は iPS-SCs の細胞数に依存して有意に抑制されることが示された。また、この T 細胞増殖抑制は iPS-SCs と他の細胞との接触がない状況下でも同様の結果が得られたことから、iPS-SCs 由来の液性因子に T 細胞増殖抑制能があると考えられた。そして培養上清では、ぶどう膜炎の病態に関わる炎症性サイトカインである TNF- α やインターフェロン (IFN) $-\gamma$ の産生は、iPS-SCs の細胞数依存的に対照群と比べて有意に抑制されていた。また、iPS-SCs を含む培養上清では、免疫抑制に関わる分子である一酸化窒素 (NO) とトランスフォーミング増殖因子 (TGF) $-\beta 1$ 濃度は有意に高値であった。

【結論】iPS-SCs が液性因子を分泌することで、抗原特異的 T 細胞の増殖を抑制し、EAU における炎症病態を軽症化することが示唆された。