



Title	Novel Molecular Targets for Treatment of Ocular Neovascular Diseases [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	董, 震宇
Description	配架番号 : 2098
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11226号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55587
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Dong_Zhenyu_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 董 震宇

学 位 論 文 題 名

Novel Molecular Targets for Treatment of Ocular Neovascular Diseases

(眼内血管新生性疾患治療における新規標的分子の探索)

【背景と目的】 滲出型加齢黄斑変性(age-related macular degeneration, AMD)や増殖糖尿病網膜症(proliferative diabetic retinopathy, PDR)はともに眼内血管新生を病態機序とする疾患であり、高齢化や生活習慣の変化にともなって我が国でも近年は中途失明原因の上位を占めるようになっていく。眼内血管新生のプロセスには種々のサイトカインを含む複数の因子が関与しているが、その中で血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor、VEGF)がAMDやPDRの病態責任分子であることが近年の基礎研究によって明らかとなった。その知見はすでに臨床に応用され、現在ではVEGFを標的とする複数の生物学的製剤、抗VEGF製剤が両疾患に対する治療薬剤として臨床導入されており、良好な治療成績の報告が相次いでいる。しかしその一方で、抗VEGF製剤の長期投与による眼局所あるいは全身合併症のリスクも報告されるようになり、眼内血管新生性疾患のさらなる病態解明および新規治療標的の探索が求められている。

2002年、血管新生を抑制する新たなVEGFアイソフォーム、血管新生抑制型VEGF(VEGFb)が報告されて以来、従来知られている血管新生促進型VEGF(VEGFa)の産生亢進と血管新生抑制型VEGFbの産生低下、すなわちVEGFaがVEGFbに対して優位になることが血管新生性疾患の病態基盤にあるとする概念が提唱されるようになった。VEGFaとVEGFbは同一VEGF遺伝子から転写されるVEGF pre mRNAが選択的スプライシングを受けることにより産生されるが、この選択スプライシングはserine/arginine-rich (SR) proteins (SR蛋白質)と呼ばれる一群の蛋白質によって制御されており、SR蛋白質をリン酸化するSR protein kinase (SRPK)が活性化するとVEGFa産生の方向にシフトするとされる。近年、このSRPKを阻害する低分子化合物(SRPIN340)が合成され、SRPIN340によるSRPK阻害は網膜血管新生の動物モデルにおいてVEGFa産生亢進を抑制することが報告された。

そこで、申請者らはAMDにおける主要病態、脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)のモデル動物であるレーザー誘導CNVモデルマウスを用いて、SRPIN340によるSRPK阻害がCNV形成に対する抑制効果を有するかを検討した。

【対象と方法】C57BL/6J(♂、8週齢)マウス眼球にレーザー照射(4発/眼)後、各種濃度のSRPIN340またはその基剤である0.1%DMSOを硝子体内注射した。7日後に眼球摘出し、脈絡膜フラットマウントを作製してCNVサイズを計測することで、SRPIN340のCNV形成に対する抑制効果を検討した。さらに、抑制機序を調べるためにレーザー照射及びSRPIN340または0.1%DMSOの硝子体内注射3日後に網膜色素上皮-脈絡膜複合体を回収し、total VEGF、VEGFa、VEGFbの発現をreal-time PCRで、VEGF蛋白濃度をELISA法でそれぞれ測定した。また、網膜色素上皮-脈絡膜複合体における

単球走化因子(monocyte chemoattractant protein-1、MCP-1)および白血球接着分子(intercellular adhesion molecule-1、ICAM-1)の蛋白濃度をELISA法で測定した。最後に、VEGF産生細胞であるマクロファージのCNV近傍への浸潤を評価するために、マウスマクロファージ表面分子マーカーであるF4/80に対する免疫染色およびreal-time PCRを施行し、網膜色素上皮-脈絡膜複合体におけるマクロファージ浸潤を定量した。

【結果】SRPIN340は用量依存性にCNV形成を抑制し、特に20 μ M投与で有意にCNV形成を抑制した。SRPIN340によって網膜色素上皮-脈絡膜複合体中のtotal VEGF、VEGF α の遺伝子発現はともに基剤投与群より有意に抑制され、VEGF蛋白濃度も基剤投与群より有意に低かった。しかし、複数のプライマーを作成してPCRによる検討をおこなったが、VEGF β はマウス網膜色素上皮-脈絡膜複合体からは検出できなかった。網膜色素上皮-脈絡膜複合体中のMCP-1とICAM-1はCNV形成によってその産生が亢進したが、SRPIN340投与により有意に抑制された。CNV近傍への浸潤マクロファージ数もSRPIN340によって抑制され、F4/80の発現もSRPIN340投与によって低下していた。

【考察】本研究によって、SRPIN340によるSRPK阻害がレーザー誘導CNVモデルマウスにおけるCNV形成を抑制することが示された。レーザー誘導CNVモデルマウスでは、VEGFが血管内皮細胞におけるICAM-1産生を亢進させる一方、VEGFレセプター1を介してマクロファージをCNV近傍に遊走させ、同部位でマクロファージがさらにVEGFを産生するという機序でCNVが形成されることが知られている。このことから、SRPIN340によるCNV形成の抑制機序は1) VEGF α が減少したこと、2) VEGF α の下流で制御されるMCP-1とICAM-1も網膜色素上皮-脈絡膜複合体で発現が低下したこと、3) その結果としてVEGF産生細胞であるマクロファージのCNV近傍への浸潤が抑制されたこと、によると考えられた。

一方、SRPIN340投与後に増加すると予想したVEGF β は今回の検討では検出することができず、SRPIN340によるCNV形成抑制がVEGF β 増加をともなったかについては明らかにできなかった。しかしながら、生体におけるVEGF β の存在に関しては再検討を要するという報告、あるいは存在そのものを否定する報告も近年なされており、自験データも考慮するとSRPIN340によるCNV形成抑制機序はVEGF β 増加以外のメカニズムも想定された。例えば、SRPKは選択的スプライシングのサイトセレクションに関与するだけではなく、転写などの細胞機能を幅広く制御している。そのため、SRPIN340によるSRPK阻害でVEGFの転写自体が阻害され、その結果VEGF産生が低下し、前述の機序でCNV形成が抑制された可能性も考えられる。今後、その機序についてはさらに検討をおこなう予定である。

【結論】SRPK阻害はCNV形成を抑制することが示され、SRPKはAMD治療における新しい治療標的分子になり得ると考えられた。