



|                     |                                                                                                                                         |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/55587">https://hdl.handle.net/2115/55587</a>                                                       |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                         |
| File Information    | Dong_Zhenyu_review.pdf, 審査の要旨                                                                                                           |



## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称      博士（医 学）      氏 名   董   震宇

主査 教 授   佐々木   秀直  
審査担当者   副査 教 授   石田   晋  
副査 准教授   森松   組子  
副査 准教授   松本   美佐子

### 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)

本研究において、申請者は serine/arginine-rich (SR) protein kinase (SRPK) 阻害による脈絡膜血管新生抑制効果を検討した。

血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor、VEGF)は脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)をとともなう滲出型加齢黄斑変性(age-related macular degeneration, AMD)の病態責任分子であり、血管新生促進因子と従来考えられてきた。しかし、近年 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 (VEGF b) も産生されることが報告され、血管新生促進型 VEGF と血管新生抑制型 VEGF のバランス制御が血管新生抑制に非常に重要であることが認識されるようになった。VEGF pre mRNA の選択的スプライシングは、serine/arginine-rich (SR) proteins と呼ばれる一群の蛋白およびそれらをリン酸化する SRPK によって複雑に制御され、SRPK 阻害が血管新生促進型 VEGF の産生を抑制することも明らかとなった。そこで、申請者は 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、SRPK 阻害による CNV 形成抑制効果を検討した。

今回の検討では、SRPK 阻害剤として SRPIN340 という化合物を使用した。SRPIN340 は、用量依存性に CNV 形成を抑制した。また、網膜色素上皮-脈絡膜複合体中の total VEGF、エキソン 8a を含む VEGF の遺伝子発現はともに SRPIN340 に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。CNV 形成に関与する炎症性サイトカインも CNV 近傍への浸潤マクロファージも SRPIN340 によって抑制された。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、マウスから VEGFb は検出できなかった。申請者はマウスにおいて血管新生抑制型 VEGF が存在しない可能性が高く、SRPK 阻害がおそらく mRNA レベルで VEGF の転写および選択的スプライシング両方を抑制して、VEGF 産生抑制とそれに続く炎症性サイトカイン産生抑制およびマクロファージ浸潤抑制を介して CNV 形成を抑制したと結論付けた。

質疑応答では主査と副査から以下の質問があった。最初に副査森松組子准教授から「レーザー誘導モデルマウスはヒトの AMD の病態モデルとして適切か」との質問があった。これに対して申

請者はレーザー誘導モデルマウスは炎症により CNV を誘導するものなので厳密にはヒトの AMD とは異なるが、VEGF やマクロファージが介在する血管新生反応などがヒト AMD における病態機序に類似しているため、薬剤効果の確認やメカニズムの検討に広く使用されている。よって、今回の実験での使用も適切であると考えていると回答した。ついで副査松本美佐子准教授から「実際 VEGF165b 蛋白も VEGF165b 抗体も論文で使用されている。これについてどう説明するか」との質問があった。これに対して申請者はまだ議論が続いている段階ではあるが、いわゆる血管新生抑制型 VEGF の存在を示した論文の結果が再現されていないことに加え、血管新生抑制型 VEGF を示す PCR 結果も実はミスプライミングの産物であることが報告されていること、また、蛋白は実際には存在しなくても遺伝子配列に応じて合成可能であり、指摘のあった論文では合成された VEGF165b 蛋白が使用されていることを回答した。副査石田晋教授から「血管新生抑制型 VEGF が存在しないことを証明するにはさらに何が必要か」との質問があった。これに対して申請者は Western blotting で VEGF165b 抗体により認識された蛋白の質量解析をおこなう必要があると回答した。最後に主査の佐々木秀直教授から「SRPK 阻害は VEGF に特異的か」との質問があった。これに対して申請者は SRPK は全ての分子の pre mRNA スプライシングに関与するもので、VEGF に特異的ではないこと、従って本実験でも VEGF 以外の分子も抑制され、血管新生抑制につながった可能性も考えられこと、今後は各分子における SRPK 阻害効果を確認する必要があることを回答した。申請者は全ての質問に対して自らの実験結果にもとづいて、適宜文献を引用しつつ、適切に回答した。

審査員一同は、本研究内容が英文誌 Molecular Vision に既に原著論文として掲載されていること、また申請者の大学院課程における研鑽や取得単位などを評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。