



Title	眼内血管新生性疾患の病態形成における候補分子の探索 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	山本, 拓
Description	配架番号 : 2790
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15472号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/90019">https://hdl.handle.net/2115/90019</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	YAMAMOTO_Taku_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 山本 拓

## 学位論文題名

眼内血管新生性疾患の病態形成における候補分子の探索

(Exploration of the candidate molecules for the pathogenesis of ocular neovascular diseases)

### 第1章: 網膜色素上皮細胞における低酸素条件下でのガレクチン-1 発現解析

【背景と目的】 滲出型加齢黄斑変性の病態形成において、網膜組織の低酸素や血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) が大きく関わっていることが知られている。VEGF ファミリー分子には VEGF 受容体 (VEGFR)-1 のリガンドである VEGF-A、胎盤成長因子 (placental growth factor; PlGF) などが含まれている。滲出型加齢黄斑変性の治療で用いられる VEGF 阻害薬の 1 つに VEGFR-1 の一部分を含有する組換えタンパクのアフリベルセプトがあり、過去に我々の研究室ではアフリベルセプトが VEGF ファミリー分子ではないガレクチン-1 と呼ばれる糖鎖結合性タンパクと結合することを明らかにした。さらに、滲出型加齢黄斑変性の病態形成に関与する網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium; RPE) 細胞の低酸素条件下での培養、および滲出型加齢黄斑変性モデルマウスの RPE でガレクチン-1 発現が亢進することを報告してきた。これらを踏まえ、低酸素とそれに伴う RPE からガレクチン-1 発現が滲出型加齢黄斑変性の病態に関与していることが推察されるが、詳細な機序は明らかになっていない。本研究では、低酸素条件下における RPE でのガレクチン-1 発現制御機構について明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】 ヒト不死化 RPE 細胞を 1%O<sub>2</sub> 低酸素条件ならびに VEGF ファミリーなどのタンパク添加下で培養し、関連分子の発現変化を逆転写定量ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-qPCR)、ウェスタンブロッティング、Enzyme-linked immunosorbent assay、ルシフェラーゼレポーターアッセイ、クロマチン免疫沈降 qPCR によって確認した。また、滲出型加齢黄斑変性患者由来の網膜切片を用いて免疫組織化学染色を行った。

【結果】 RPE 細胞において低酸素条件下でガレクチン-1 発現が亢進し、それにはガレクチン-1 遺伝子のプロモーター領域における hypoxia inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  結合が関与していた。また、アフリベルセプトが低酸素条件下におけるガレクチン-1 発現上昇を抑制し、その作用は VEGFR-1 阻害作用によるものであった。低酸素条件下において VEGFR-1 のリガンドである PlGF 発現が亢進し、それに伴う VEGFR-1 リン酸化を介して RPE 細胞におけるガレクチン-1 発現上昇が誘導されていた。この発現誘導にはガレクチン-1 遺伝子のエンハンサー領域における転写因子 activator protein-1 の結合が関与していた。さらに、RPE 細胞には PlGF による PlGF の発現誘導機構が存在し、それは VEGFR-1 活性化による複数の細胞内シグナル分子のリン酸化を介していた。最後に、これらの RPE 細胞における様々なガレクチン-1 発現制御機構が、実際の滲出型加齢黄斑変性患者の網膜においても生じていることを示すため、滲出型加齢黄斑変性患者由来の網膜組織において RPE 細胞に HIF-1 $\alpha$ 、PlGF、VEGFR-1 がガレクチン-1 と共局在していることを確認した。

【考察】 滲出型加齢黄斑変性の背景には脈絡膜循環減弱による RPE での低酸素が関与していると考えられ、その過程で HIF-1 $\alpha$  によるガレクチン-1 発現誘導が関与していることが示唆された。さらに、PlGF は病的な血管新生に関与することが知られており、RPE 細胞における低酸素での PlGF 発現誘導、PlGF によるガレクチン-1 発現誘導、PlGF の自己発現誘導が滲出型加齢黄斑変性の病態増悪をもたらすと考えられた。今後の課題として、解析に適した疾患モデルマウスでの検討などが期待される。

【結論】 RPE 細胞におけるガレクチン-1 発現制御機構として、低酸素によるガレクチン-1 と PlGF 発

現誘導、PIGF によるガレクチン-1 発現誘導、PIGF の自己誘導という 3 点が存在し、滲出型加齢黄斑変性の病態形成への関与が示唆される。

## 第 2 章: 増殖糖尿病網膜症における $\alpha$ B-クリスタリンの発現解析

【背景と目的】最重症の糖尿病網膜症は増殖糖尿病網膜症(proliferative diabetic retinopathy; PDR)と呼ばれ、網膜循環障害の遷延化によって新生血管増生や線維血管膜の形成などをきたす。PDR の病態形成には VEGF とともに炎症性サイトカインも関与しており、相互に作用している。我々の研究室では、終末糖化産物(advanced glycation endproduct; AGE)に起因するマクロファージ/ミクログリアからの interleukin(IL)-1 $\beta$  が、網膜の主要なグリア細胞である網膜ミュラー細胞由来のガレクチン-1 発現上昇を介して PDR における血管透過性亢進や新生血管増生に関与すること、および PDR における線維血管膜の形成という病理的な作用でも網膜ミュラー細胞が重要な役割を有していることを過去に報告してきた。一方でヒートショックプロテインの 1 つである  $\alpha$ B-クリスタリンは VEGF のシャペロンとして知られているが、PDR 患者の線維血管膜において  $\alpha$ B-クリスタリンおよびセリン 59 リン酸化  $\alpha$ B-クリスタリンが新生血管と共局在していること、PDR 患者の硝子体液中で  $\alpha$ B-クリスタリン濃度が上昇することが知られている。しかしながらこれらの病態形成への関与の詳細は未だ明らかではなく、網膜ミュラー細胞における AGE や VEGF・炎症性サイトカインを介した PDR の病態形成過程に  $\alpha$ B-クリスタリンが関与している可能性を考えた。本研究では、PDR における硝子体液中の  $\alpha$ B-クリスタリンの由来と、網膜ミュラー細胞における  $\alpha$ B-クリスタリンの PDR への病態関与について調べることを目的とした。

【対象と方法】北海道大学病院眼科にて硝子体手術を施行した PDR 患者の血清における  $\alpha$ B-クリスタリンおよび AGE 濃度を測定し、相関を確認した。培養ヒト網膜ミュラー細胞を各種分子の添加下で培養し、関連分子の発現変化を RT-qPCR、ウエスタンブロッティング、Enzyme-linked immunosorbent assay、細胞機能変化を生細胞率測定、カスパーゼ 3/7 活性測定、TdT-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL)染色によって確認した。また、PDR 患者由来の線維血管膜切片を用いて免疫組織化学染色を行った。

【結果】PDR 患者の血清中において、AGE 濃度は上昇するが  $\alpha$ B-クリスタリン濃度の上昇は認めず、両者の有意な相関を認めなかった。網膜ミュラー細胞において、IL-1 $\beta$  は  $\alpha$ B-クリスタリンの発現を抑制すると同時に、p38 mitogen-activated protein kinase を介して  $\alpha$ B-クリスタリンのセリン 59 残基リン酸化を促進することで、細胞外濃度は減少する一方で細胞内濃度は維持されていた。網膜ミュラー細胞において  $\alpha$ B-クリスタリンはアポトーシス抑制作用を有し、 $\alpha$ B-クリスタリンをノックダウンすることによってカスパーゼ 3/7 活性の亢進と TUNEL 陽性細胞率の増加を認めた。PDR 患者の線維血管膜組織切片において、グリア細胞マーカーである Glial fibrillary acidic protein と  $\alpha$ B-クリスタリンおよびセリン 59 残基リン酸化  $\alpha$ B-クリスタリンの共局在を確認した。

【考察】PDR における硝子体中  $\alpha$ B-クリスタリン濃度上昇は血清中の高値を反映したわけではないことが示唆された。網膜ミュラー細胞においても細胞外  $\alpha$ B-クリスタリン分泌が低下しており、血管内皮細胞といった他細胞に由来する可能性などが考えられた。網膜ミュラー細胞におけるセリン 59 残基リン酸化が  $\alpha$ B-クリスタリンの細胞内保持をもたらし、アポトーシス抑制作用を介したグリア増生によって線維血管膜形成に関与すると考えられた。今後の課題として、 $\alpha$ B-クリスタリンの細胞内保持が網膜ミュラー細胞におけるグリア-間葉転換に関与している可能性などを検討したい。

【結論】網膜ミュラー細胞において、IL-1 $\beta$  によって  $\alpha$ B-クリスタリンの新規合成は減少する一方、セリン 59 残基のリン酸化によって細胞内濃度が維持されており、線維血管膜におけるグリア細胞のアポトーシス抑制作用を介した PDR の病態形成への関与が示唆される。