

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きている。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 (VEGF b) 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、VEGFa 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、VEGFb 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) VEGFa が減少したこと、2) VEGFa 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 VEGFb 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 VEGFb 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 VEGFb 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 VEGFb 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。