

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 陽子

学位論文題名

増殖組織形成を伴う視力予後不良疾患の病理学的検討
(Pathological analysis on vision threatening diseases complicated by
proliferative tissue formation)

【緒言】糖尿病網膜症、特発性黄斑上膜、翼状片等の後天性に重篤な視力低下を引き起こす疾患の共通病態の一つに組織増生がある。本学位論文では増殖組織形成を病態基盤とする眼疾患について臨床検体を用いておこなった検討結果についてまとめた。

第一章：増殖糖尿病網膜症の病態形成におけるリン酸化 α Bクリスタリンの関与

【背景と目的】増殖糖尿病網膜症は進行すると、虚血による網膜血管新生を原因とする線維血管組織の増殖・進展が生じ、vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)がその病態責任分子である。低酸素条件下では、ストレス等によってセリン残基 (Ser59, Ser45, Ser19) がリン酸化されて生理活性を獲得した α B-クリスタリン (α BC) が分子シャペロンとして血管新生を誘導することが知られ、中でもSer59 リン酸化 α BC (pSer59 α BC) が重要とされる。そこで、線維血管組織におけるリン酸化 α BC (p α BC)の局在やその関連分子の局在を検討した。

【対象と方法】硝子体手術によって得られた増殖糖尿病網膜症患者の線維血管組織と正常網膜（悪性黒色腫患者の非腫瘍部位）のパラフィン切片を用いて、免疫染色法によってp α BC、VEGF-A、p-p38 MAPKの局在を検討した。

【結果】線維血管組織ではpSer59 α BC, pSer45 α BC, pSer19 α BCが血管内皮細胞に発現し、pSer59 α BCはVEGF-Aとも共局在していた。また線維血管組織ではpSer59 α BCとp-p38 MAPKが共局在していたが、正常網膜ではその発現が確認できなかった。

【考察と結論】糖尿病網膜症の血管新生では、p-p38 MAPKを介してリン酸化されたpSer59 α BCが増殖組織の血管新生にVEGF-Aの分子シャペロンとして関与する可能性が示された。

第二章：増殖糖尿病網膜症の病態形成におけるアクロレインの関与

【背景と目的】増殖糖尿病網膜症の病態には、虚血以外に脂質過酸化や酸化ストレスが関与する。そこで、脂質過酸化を経て産生されるアクロレインとアクロレイン結合タンパクであるN ϵ -(3-formyl-3,4-dehydropiperidino) lysine adduct (FDP-Lys)の増殖糖尿病網膜症における関与について検討した。

【対象と方法】硝子体手術によって得られた増殖糖尿病網膜症患者の線維血管組織を用いて、FDP-Lysの局在を免疫組織学的に検討した。また、培養ヒト網膜血管内皮細胞(HRMECs)を用いてアクロレイン刺激による生細胞率変化をRealTime-GloTMMT cell viability assayで、増殖能変化を5-bromo-2' deoxyuridine (BrdU) cell proliferation ELISAキットで、VEGF-A発現を誘導することで血管新生に関与するheme oxygenase-1 (HO-1)のmRNA発現をquantitative real-time PCR (qPCR)を用いて解析した。

【結果】FDP-Lysは線維血管組織のグリア細胞、血管内皮細胞および血管周皮細胞

に存在し、FDP-Lys 陽性の血管が存在した線維血管組織は血管密度が高値であった。また、低濃度アクロレイン刺激により HRMECs の生細胞率、細胞増殖および *HO-1* の遺伝子発現が増加した。

【考察と結論】アクロレインや FDP-Lys が細胞増殖や血管新生を介して増殖糖尿病網膜症の病態進展に関与している可能性が示された。

第三章：特発性黄斑上膜の病態形成における受容体結合プロレニン系の関与

【背景と目的】特発性黄斑上膜は、Müller 細胞を含む線維性膜状組織（黄斑上膜）が黄斑部上に形成されることにより網膜組織の形状変化が生じる疾患であり、様々な線維化関連分子が病態形成に関与するとされる。そこで、特発性黄斑上膜の病態進展における receptor-associated prorenin system（受容体結合プロレニン系；RAPS）の関与を検討した。

【対象と方法】硝子体手術によって得られた特発性黄斑上膜組織を用いて RAPS コンポーネントの遺伝子発現と prorenin、(pro)renin receptor[(P)RR]、angiotensinogen, angiotensin II receptor 1 (AT1R)、fibroblast growth factor 2 (FGF2)、glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)、nerve growth factor (NGF)、transforming growth factor- β 1 (TGFB1) の発現を transcription-PCR および蛍光免疫染色で確認した。また、培養ヒト Müller 細胞を用いて RAPS コンポーネントの遺伝子発現と prorenin および angiotensin II 刺激後のこれらの線維化関連分子の遺伝子発現変化を qPCR で解析した。

【結果】特発性黄斑上膜組織で RAPS コンポーネントの遺伝子発現と prorenin、(P)RR、angiotensinogen、AT1R および上記の線維化関連分子のタンパク発現を確認した。また、prorenin 刺激により Müller 細胞から (P)RR 活性化を介して *FGF2* の遺伝子発現が増加し、Ang II 刺激により AT1R を介して *GDNF*、*NGF*、*TGFB1* の遺伝子発現が増加した。

【考察と結論】Müller 細胞における RAPS の活性化が線維化関連分子の発現を亢進させ、特発性黄斑上膜の病態進展に関与している事が示唆された。

第四章：翼状片の病態形成における VEGF-C の関与

【背景と目的】翼状片は角膜へ結膜上皮が異所性に増殖したものであり、その病態進展には VEGF-C と VEGF 受容体-3 の経路に起因したリンパ管形成が関与するとされる。本検討では、結膜上皮細胞からの VEGF-C 分泌を誘導する分子の探索を行った。

【対象と方法】手術で摘出された翼状片組織を用いて tumor necrosis factor (TNF) 受容体 1 (TNFR1) の発現を免疫学的手法で確認した。また、培養ヒト結膜上皮細胞を用いて TNF- α 刺激後の VEGF-C の発現変化を qPCR および ELISA 法を用いて検討し、かつ TNFR1 および VEGF-C のタンパク発現を免疫学的手法で検討した。

【結果】翼状片組織では VEGF-C および TNFR1 が存在していた。また培養ヒト結膜上皮細胞は TNF- α 刺激により VEGF-C の遺伝子発現およびタンパク分泌が亢進した。

【考察と結論】TNF- α 刺激により結膜上皮細胞から VEGF-C の分泌が亢進し、その結果 VEGF-C を介したリンパ管形成が促進され、翼状片の病態の進展に関与している可能性が示された

【総括】現在、これらの増殖を病態に有する疾患の治療は外科的加療しかなく、治療を経ても増殖組織により生じた変化は不可逆的であり、視力低下は免れないことも多い。このため、薬剤を用いた侵襲の少ない早期の治療介入が求められており、その開発は急務である。今後これらの研究結果を基に更なる病態解明と治療薬の開発に結びつけていきたいと考えている。