

論文の内容の要旨

論文題目

In vitro および in vivo モデルを用いた病的血管新生阻害の解析

指導教官 新家 眞 教授

東京大学医学系研究科

平成8年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

上 順子 (旧姓 齋藤)

目的

加齢黄斑変性は欧米では高齢者の失明原因として主要な疾患であり、近年我が国においてもその患者数の増加が指摘されている。加齢黄斑変性は黄斑部の脈絡膜新生血管 choroidal neovascularization (CNV)を合併する滲出型と、網膜色素上皮萎縮を主とする萎縮型に分類されるが、前者の視力予後は極めて不良である。一般に血管新生を促進する因子として血管内皮細胞増殖因子 vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)が知られているが、加齢黄斑変性における CNV の形成においても CNV 摘出術標本の解析などにより VEGF-A の関与が示唆されている。

VEGF-A の受容体としては VEGFR-1, fms-like tyrosine kinase (Flt-1)と VEGFR-2, kinase domain containing receptor/ fetal liver kinase (KDR/Flk-1)の二つの受容体型チロ

シンキナーゼが存在する。受容体の自己リン酸化は Flt-1 よりも KDR/Flk-1 の方が強いが、現在までのところ、CNV 形成における両者の関与についての検討はなされていない。

本研究の目的は、脈絡膜新生血管の発症機構について、動物モデルを用いて分子生物学的、細胞生物学的に検討することである。特に、血管新生において中心的役割を占めると考えられている VEGF-A とその受容体系の CNV 形成への関与を解析し、その阻害薬を用いた血管新生抑制療法の可能性につき検討した。

結果

我々は、有色マウス及びラットの眼底に半導体レーザーを照射することにより CNV モデルを作成した。CNV の発生を蛍光眼底造影検査による凝固部位の蛍光漏出（血管透過性の指標）と、血管内皮細胞特異的、抗 CD31 抗体を用いた免疫組織染色により解析した。照射後 3 日目より 14 日目まで蛍光眼底造影にてレーザー照射部位に蛍光漏出を認め、また免疫組織学的検討においても、同部位において血管と線維芽細胞様の細胞によって構成される新生血管膜の形成が見られた。これらの所見は、ヒトでの加齢黄斑変性に認められる CNV の変化と類似しており、モデル動物としての有用性が示唆された。

このマウスモデルに対し、VEGF-A の 2 つの受容体特異的なチロシンキナーゼ阻害剤である SU5416 をレーザー照射直後より 14 日間隔日に、25mg/kg 腹腔内投与した。SU5416 投与 3 日、7 日、14 日目において、蛍光眼底造影検査における凝固部位よりの蛍光漏出を 4 段階にスコア化した。対照群と比較して SU5416 投与群における CNV 蛍光漏出スコアは、それぞれ 38%、14%、40%低値であり ($p < 0.01$)、組織学的検討においても、SU5416 投与群において形成された CNV 膜の断面積は対照群と比較して、21.8%小さく ($p < 0.01$)、内部に形成された血管内腔面積は 22.8%、血管密度は 23.0%小さかった(いずれも $p < 0.01$)。ラットはレーザー照射直後より、

SU5416 を連日 30mg/kg 皮下注射した。光凝固後 7 日目の蛍光眼底造影にて、対照群に比べて 10%凝固部位よりの蛍光漏出は有意に低値であった ($p<0.05$)。

次に Flt-1 のチロシンキナーゼ部位を欠損した Flt-1 TK(-/-)マウスに対し同様に CNV モデルを作成した。この群では 7 日目の蛍光眼底造影において対照群と比較して蛍光漏出スコアは 22%低値であり ($p<0.01$)、血管内腔面積は対照群と比べ、15.2%小さかった ($p<0.05$)。このことは、加齢黄斑変性の動物モデルにおいて、Flt-1 のチロシンキナーゼ活性が一定の役割を担うことを示唆している。一方 KDR/Flk-1 の片方の allele のみを欠損した Flk-1 (+/-)マウスでは対照群と比べて蛍光漏出の程度、及び組織学的検討においても有意差は見られず、この結果は Flk-1 (+/-)マウスでは正常血管形成および病的血管新生に異常は見られないという報告と矛盾しないと考えられた。しかし、Flt-1 TK(-/-)マウスに SU5416 を投与したところ、投与していない群と比較して 21~24%蛍光漏出が軽度であり ($p<0.01$)、また CNVM の断面積は 16.4%小さかった ($p<0.05$) ことより、本モデルにおける CNV 形成には Flt-1 のみならず KDR/Flk-1 からの情報伝達も関与しているものと考えられた。

最後に SU5416 の作用機序について検討した。VEGF-A は *in vitro*, *in vivo* において、血管内皮細胞の増殖、分化、並びにアポトーシスを抑制する働きが知られている。SU5416 投与開始後 1 4 日目のマウスの CNV を TUNEL 法にて染色したところ、陽性細胞が検出され、血管内皮細胞がアポトーシスを起こしていることが示された。一方、対照群のマウスの CNV では殆どアポトーシスは見られなかった。この結果は、VEGF-A が内皮細胞の survival factor としてアポトーシスを抑制し、CNV の発生のみならず、新生血管の維持にも関与していることを示唆した。

結論

本研究を通じ、マウス、ラットの CNV モデルにおいて、CNV の形成に VEGF-A とその受容体である KDR/Flk-1 と Flt-1 のいずれもが関与していることが示され

た。VEGF-A は血管内皮細胞の survival factor としてアポトーシスを抑制しており、CNV の発生のみならず、新生血管の維持にも関与していると考えられた。また、VEGF-A—VEGF-A 受容体系を阻害することで CNV が抑制することができ、その阻害薬である SU5416 を用いた加齢黄斑変性の血管新生抑制療法の可能性が示唆された。