

博士（医 学） 藤 原 辛 雄

学 位 論 文 題 名

糖尿病性網膜症の遺伝子発現解析

－マウス酸素誘導網膜症の遺伝子発現解析－

学位論文内容の要旨

糖尿病網膜症は、腎症および神経症とともに微小血管症に分類される重大な糖尿病合併症の一つである。糖尿病網膜症は、高血糖に起因する血管障害により網膜組織に虚血状態が引き起こされ、それにより血管新生が誘導される。VEGF が虚血誘導性の網膜血管新生において中心的な役割を果たすと考えられており、近年、VEGF を標的とした治療薬の開発がすすめられている。しかし、この虚血性血管新生の発生機序はいまだ不明な点が多い。

今回我々は、虚血性網膜血管新生を示す動物モデルである新生児マウスによる酸素誘導網膜症モデルを用いて糖尿病網膜症の血管新生にかかわる新たな遺伝子を探索し、病態との関連性を解析することを目的として実験を行った。

C57BL/6 Cr Slc マウス新生児を母動物とともに生後 7 日から 12 日までの連続 5 日間 75% 酸素分圧下に暴露し、その後通常の酸素分圧下で飼育した。75% 酸素分圧下に暴露したマウス新生児に FITC-dextran/saline 溶液を灌流し、網膜の whole-mount 標本を作製したところ、生後 17 日網膜には、視神經乳頭周囲に無灌流部位が認められ、その周辺部には新生血管の塊が顕著にみられた。さらに、網膜の HE 染色組織標本において生後 15 日以降、内境界膜を越えて硝子体内に存在する新生血管が顕著に認められた。CD31 抗体による免疫染色においても生後 15 日以降硝子体内の新生血管像が顕著であった。生後 12 日の 75% 酸素分圧暴露終了後 0, 12 および 24 時間における VEGF の mRNA 発現は時間の経

過とともに増加を示し、暴露終了後 24 時間では 0 時間に比し発現比はほぼ 2 倍にまで達した。以上より、酸素誘導網膜症モデルは適切に作成されていると判断した。

そこで生後 17 日のマウス新生児網膜における 75%酸素分圧下暴露と通常酸素分圧下 (20%O₂) での mRNA 発現を Differential display 法により網羅的に比較検討した。その結果、75%酸素分圧下暴露により発現が増加したバンドが 18 個、逆に発現が減少したバンドが 17 個であり、ホモロジー検索により発現が増加したバンドから 12 個、減少したバンドから 15 個の遺伝子を同定した。さらに、これら計 27 個の遺伝子の発現変化を real time RT-PCR により定量的に再確認した。その結果、75%酸素分圧下暴露により発現が増加した遺伝子は 4 個で、逆に発現が顕著に減少した遺伝子が 2 個であった。既知の遺伝子との相同性を検索したところ、発現が増加した遺伝子として、ABIN2 遺伝子が、また、発現が顕著に減少した遺伝子として代謝型グルタミン酸受容体 6(mGlu6) とヌクレオポリン 54 遺伝子が同定できた。

上記 3 遺伝子は、いずれも酸素誘導網膜症との直接的関連は不明である。しかし、ABIN2 に関しては、血管新生に関与することを強く示唆する報告がなされている。即ち、ABIN2 は Tie2 (Tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains-2) により活性化し、NF-κB 阻害作用を示す。また、ABIN2 は Angiopoietin-1 の抗 apoptosis 作用に関与することが報告されている。Angiopoietin-1 は Tie2 と結合し、PI3K/Akt シグナルおよび MAPK シグナル経路により血管新生を誘導する。ABIN-2 は PI3K/Akt シグナル経路の上流で機能し apoptosis を阻害することが示唆されている。したがって、糖尿病網膜症における血管新生を理解するうえで、ABIN-2 が血管新生にどの様な機能を有しているかより詳細な検討が必要と考えられる。

学位論文審査の要旨

主査 教授 上出利光

副査 教授 小野江和則

副査 教授 大野重昭

学位論文題名

糖尿病性網膜症の遺伝子発現解析

—マウス酸素誘導網膜症の遺伝子発現解析—

糖尿病網膜症は、腎症および神経症とともに微小血管症に分類される重大な糖尿病合併症の一つである。糖尿病網膜症は、高血糖に起因する血管障害により網膜組織に虚血状態が引き起こされ、それにより血管新生が誘導される。血管増殖因子(VEGF)が虚血誘導性の網膜血管新生において中心的な役割を果たすと考えられており、近年、VEGFを標的とした治療薬の開発がすすめられている。しかし、この虚血性血管新生の発生機序はいまだ不明な点が多い。本研究は、虚血性網膜血管新生を示す動物モデルである新生児マウスによる酸素誘導網膜症モデルを用いて糖尿病網膜症の血管新生にかかわる新たな遺伝子を探査し、病態との関連性を解析することを目的として実験を行った。C57BL/6 Cr Slc マウス新生児を母動物とともに生後 7 日から 12 日までの連続 5 日間 75%酸素分圧下に暴露し、その後通常の酸素分圧下で飼育した。75%酸素分圧下に暴露したマウス新生児に FITC-dextran/saline 溶液を灌流し、網膜の whole-mount 標本を作製したところ、生後 17 日網膜には、視神経乳頭周囲に無灌流部位が認められ、その周辺部には新生血管の塊が顕著にみられた。さらに、網膜の HE 染色組織標本において生後 15 日以降、内境界膜を越えて硝子体内に存在する新生血管が顕著に認められた。CD31 抗体による免疫染色においても生後 15 日以降硝子体内の新生血管像が顕著であった。生後 12 日の 75%酸素分圧暴露終了後 0、12 および 24 時間における VEGF の mRNA 発現は時間の経過とともに増加を示し、暴露終了後 24 時間では 0 時間に比し発現比はほぼ 2 倍にまで達した。以上より、酸素誘導網膜症モデルは適切に作成されていると判断した。そこで生後 17 日のマウス新生児網膜における 75%酸素分圧下暴露と通常酸素分圧下(20%O₂)での mRNA 発現を Differential display 法により網羅的に比較検討した。その結果、75%酸素分圧下暴露により発現が増加したバンドが 18 個、逆に発現が減少したバンドが 17 個であり、ホモロジー検索により発現が増加したバンドから 12 個、減少したバンドから 15 個の遺

伝子を同定した。さらに、これら計 27 個の遺伝子の発現変化を real time RT-PCR により定量的に再確認した。その結果、75%酸素分圧下暴露により発現が増加した遺伝子は 4 個で、逆に発現が顕著に減少した遺伝子が 2 個であった。既知の遺伝子との相同性を検索したところ、発現が増加した遺伝子として、ABIN2 遺伝子が、また、発現が顕著に減少した遺伝子として代謝型グルタミン酸受容体 6 (mGlu6) とヌクレオポリン 54 遺伝子が同定できた。このうち、ABIN2 に関しては、血管新生に関与することを強く示唆する報告がなされている。即ち、ABIN2 は Tie2 (Tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains-2) により活性化し、NF- κ B 阻害作用を示す。また、ABIN2 は Angiopoietin-1 の抗 apoptosis 作用に関与することが報告されている。Angiopoietin-1 は Tie2 と結合し、PI3K/Akt シグナルおよび MAPK シグナル経路により血管新生を誘導する。ABIN2 は PI3K/Akt シグナル経路の上流で機能し apoptosis を阻害することが示唆されている。したがって、糖尿病網膜症における血管新生を理解するうえで、ABIN2 が血管新生にどの様な機能を有しているかを今後より詳細に検討することが必要と考えられる。発表に当たり、副査の大野教授より、今回の研究に用いた動物モデルを糖尿病網膜症のモデルとするとの根拠及びその妥当性、ABIN2 の発現増加の意義等について質問があった。次いで、副査の小野江教授より、糖尿病マウスモデルによる解析の実施、高酸素ストレスによる影響等について質問があった。最後に、主査の上出教授より、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いた管腔構造形成モデルと虚血性血管新生病態の類似性、in vitro 虚血性血管新生モデルの情報および過去に報告された糖尿病網膜症の網羅的遺伝子発現解析結果との整合性について質問があった。これらの質問に対して、申請者は自己のデータや糖尿病網膜症モデルおよび ABIN2 に関するこれまでの論文報告を引用し、概ね適切な回答をなし得た。この論文は、糖尿病網膜症を含む虚血性網膜血管新生に関与することが示唆される新規分子を同定したことで高く評価され、今後の病態メカニズム解明および新規治療法開発への応用が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（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。