



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1575号
学位記番号	第1130号
氏名	小椋 俊太郎
授与年月日	平成 29年 3月 24日
学位論文の題名	<p>Sustained inflammation after pericyte depletion induces irreversible blood-retina barrier breakdown (ペリサイト消失に伴う遷延した炎症による不可逆的な血液網膜関門の破綻)</p> <p>JCI Insight. 2017;2:e90905</p>
論文審査担当者	<p>主査： 松川 則之 副査： 飛田 秀樹, 小椋 祐一郎</p>

## 論文内容の要旨

中枢神経系では血管内皮細胞と周皮細胞(ペリサイト:PC)の相互依存により血液脳関門が形成され恒常性が保持されている。糖尿病網膜症では毛細血管壁のPCの消失を契機に血管バリア機能が破綻し、浮腫や出血を来す。通常年余にわたる高血糖を経た後に発症することから、病態の顕在化には血管障害の修復機転が破綻し、不可逆的な悪循環に陥ることが背景にあると考えられる。しかし高血糖モデル動物でヒト網膜症を再現できないことが、病態解明と治療法を開発する上で障壁となっていた。マウス網膜では生直後より血管が伸長し、新生血管の先端では血小板由来増殖因子(PDGF)Bが発現し、 $\beta$ 受容体を有するPCを集積させる一方、PCはアンジオポエチン1(Angpt1)を分泌し内皮を安定化させる。以前に我々は、PDGFR $\beta$ に対する阻害抗体を新生仔マウスに連日投与してPCを完全に消失させた網膜で糖尿病網膜症に似た血管異常を惹起できることを報告したが、急速な浮腫/出血が生じる結果、早い段階で網膜組織が完全に破綻するという問題があった。動物モデルに制限がある中、臨床において血管内皮増殖因子(VEGF)阻害剤やステロイドの有効性が示され、経験的に血液脳関門(BRB)の破綻にVEGFシグナルや炎症の関与が示唆されている。本研究により阻害抗体の投与法を改変することで新たな動物モデルが作製できればBRB破綻の機構の一端を解明でき、糖尿病網膜症の病態解明に繋がる可能性が考えられた。

まず我々はPCを部分的にのみ消失させることで網膜の破綻が回避できるという仮説の元、新生仔マウスへの阻害抗体を生後1日に少量投与する方法に改変したところ、成体マウス網膜で硬性白斑や出血、低灌流、血管蛇行/拡張、浮腫などヒト糖尿病網膜症に非常に類似した病態を再現することに成功した。この網膜ではPCは断続的であれば血管壁より遊離して存在することが確認された。他方、内皮は新生血管を伴う増殖/アポトーシスを繰り返し、PCを消失させた新生仔マウス同様に細胞間接着の開裂、トランスサイトーシスの亢進を認め、血管外漏出が持続していた。以上より新生仔の一時的なPCの消失は成体網膜でも正常化されず、異常なPC-内皮の相互依存によりBRBが破綻することが示唆された。

次にこのBRBの破綻を来す分子機構を知るため、PC消失網膜で内皮のみを単離してマイクロアレイ解析を行ったところ、VCAM-1やAng2などの炎症因子の発現上昇が確認された。また、内皮細胞で炎症性遺伝子を誘導するNFATの発現も上昇しており、シクロスポリンによりこの系を遮断すると浮腫、出血が抑制され網膜血管が正常化された。以上より炎症の関与が示唆された。また血管外の白血球数が有意に上昇しておりこの分画をフローサイトメトリーで解析したところ、単球/循環血由来のCD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>単球/マクロファージ(M $\phi$ )であることが分かった。これらM $\phi$ は内在性マイクログリアと比し細胞体が丸く大型で、突起が短く運

動能も低下していた。さらにクロドロン酸の投与により M $\phi$  を除去すると血管の恒常性が劇的に回復し、M $\phi$  が直接内皮へ悪影響を与える可能性が示唆された。

PC 消失網膜では虚血/低灌流に伴い網膜全体で VEGF の発現が増加していたが、さらなる解析により内在性マイクログリアでは発現を認めない VEGF が M $\phi$  で分泌されていることが分かった。また内皮における VEGFR2 の発現上昇を認め、VEGF シグナルへの感受性が増強していることが示唆された。M $\phi$  は胎盤成長因子 (PIGF) も分泌し、さらに VEGFR1 の発現も M $\phi$  で上昇していることが確認された。この VEGFR1+M $\phi$  の影響を調べるために *Flt1-TK<sup>-/-</sup>* マウスに APB5 を投与したところ、M $\phi$  数の増加は認めず、網膜の恒常性が保たれた。以上より M $\phi$  由来の VEGF と PIGF が自身の VEGFR1 に作用し、遊走促進と病態悪化に関与していることが示唆された。

さらに内皮の病態悪化に関係する因子を特定するにあたり、我々はマイクロアレイで 2.9 倍上昇している *Angpt2* に着目した。*Angpt2* は通常新生血管の先端でのみ発現するが、PC 消失網膜では発現が亢進していた。ここで、内在性アンタゴニストであることが知られる *Angpt2* の PC 消失網膜での作用を調べるべくウェスタンブロットを行ったところ、予想に反し網膜全体では Tie2 のリン酸化が上昇していた。しかし、漏出点である毛細血管瘤では FOXO1 の核移行と *Angpt2* の過剰発現が見られ、局所的には Tie2 のアンタゴニストとして作用して病態悪化に寄与していると考えられた。さらに Tie1 の遺伝子発現に差はないものの、免疫染色では Tie1 の発現低下が確認された。以上より、M $\phi$  から分泌された TNF $\alpha$  と VEGF により Tie1 の細胞外ドメインが切断され、内皮から過剰に分泌された *Angpt2* が局所的に Tie2 アンタゴニストとして FOXO1 を活性化し、*Angpt2* を含む遺伝子群の転写を促進し、血管をさらに不安定化する悪循環を来したと考えられる。これらの血管異常や炎症は *Angpt2* と VEGF/PIGF の同時阻害により相乗的に是正された。

中枢神経の一部である網膜の血管異常では脳血管障害と同様の細胞/分子機構が存在すると考えられ、網膜をモデルとした本研究の成果が糖尿病網膜症のみならず脳疾患の病態解明と治療法開発にも応用できると期待される。

## 論文審査の結果の要旨

【発表の概略】成人の主要な失明原因である糖尿病網膜症では、ペリサイトが消失することにより血管バリア機能が破綻し、浮腫や出血を来すと考えられている。しかし、高血糖モデル動物ではヒト網膜症を再現できず、糖尿病網膜症進展の細胞/分子機構の理解が不十分であった。ペリサイトの集積には内皮より分泌される血小板由来増殖因子(PDGF)Bが重要であり、以前の研究では新生仔マウスへ抗 PDGFR $\beta$ 抗体を連日投与することでペリサイトを完全消失させた。これによりヒト網膜症に類似した病態が惹起されたが急激に網膜の破綻を来したが、今回抗体の投与量と時期を生後1日に1度投与することに改変したところ継続した病態の観察が可能であった。新生仔網膜では抗体投与量依存的にペリサイトの被覆率が減少し、血管の伸長阻害並びに血管拡張が見られた。また内皮過増殖とアポトーシスの亢進を認め、毛細血管瘤が形成されることを確認した。さらに、細胞間接着の開裂やトランスサイトシスの亢進による不可逆的な血液網膜関門(BRB)の破綻を示した。抗体の投与量を調節することで破綻を免れたマウス網膜を成体で観察したところ低灌流、低酸素、血管拡張/蛇行硬性白斑など、ヒト糖尿病網膜症と非常に類似した所見を示した。さらに一時的に阻害されたペリサイトは成体まで機能不全が持続し、新生仔時期と同様なバリア破綻を呈した。次に、BRBの破綻を来す分子機構の解析を進めたところ、内皮で炎症に関与する遺伝子発現の上昇を確認し、レポーターマウスに抗 PDGFR $\beta$ 抗体を投与することで血管内皮増殖因子(VEGF)シグナルの下流で炎症を誘導する NFAT が関与し、シクロスポリンによりこの系が抑制されたことより、ペリサイトの消失により直接炎症が誘導されることが示唆された。また白血球接着因子の発現亢進と白血球の有意な増加が確認されたが、この白血球の分画を解析したところ、循環血由来の CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>+</sup> マクロファージ (M $\phi$ )であることが明らかとなった。これらの M $\phi$ は、形態、運動能が内在性マイクログリアと異なることを新生仔 *ex vivo* 並びに成体 *in vivo* のイメージングにより示した。さらにクロドロン酸により M $\phi$ を除去すると血管の恒常性が回復した。以上から M $\phi$ が直接内皮へ悪影響を与える可能性が示唆された。ヒト増殖糖尿病網膜症の患者硝子体液中では炎症性タンパクのみならず、VEGF、胎盤成長因子(P1GF)、アンジオポエチン(Angpt)2が上昇していたが、本モデルでもこれらの発現が上昇していることを確認した。血管内皮で VEGFR2 の発現が上昇し、M $\phi$ では VEGF、P1GF が分泌され、VEGFR1 を発現していることが明らかになった。この VEGFR1<sup>+</sup> M $\phi$ の影響を調べるために Flt1-TK<sup>-/-</sup>マウスを用いたところ、正常血管発生に異常を来さなかった一方、網膜症モデルでは M $\phi$ 数は有意に減少し、網膜の恒常性が保持された。このことから M $\phi$ より分泌された VEGF/P1GF が M $\phi$ 自身の VEGFR1 に作用し、遊走促進と病態悪化に関与していることが示唆された。さらに Angpt-Tie2 の関係にも着目した。Angpt2 は内皮で発現が上昇しており、網膜全体では Tie2 のリン酸化が上昇していた。しかし、毛細血管瘤では FOXO1 の転写と Angpt2 の過剰発現が見られ、局所的に Angpt2 が病態を悪化させていると考えられた。以上より、ペリサイト消失により NFAT 系が活性化され血管が不安定となり、網膜内へ流入した M $\phi$ より分泌された TNF $\alpha$  と VEGF により Tie1 が切断され、内皮から過剰に分泌された Angpt2 が局所的な Tie2 アンタゴニストとして FOXO1 を活性化し、Angpt2 を含む遺伝子群の転写を促進し、血管をさらに不安定化する悪循環を来したと考えられる。最後にこれらの血管異常や炎症は Angpt2 と VEGF/P1GF の同時阻害により相乗的に是正され、本モデルを用いた今後の治療薬への可能性が伺われた。

【審議の内容】審査委員会では主査(松川則之教授)より、動物実験の原則、蛍光顕微鏡の原理、抗体の特異性、炎症反応の持続について等 17 項目、また第一副査(飛田秀樹教授)より、網膜電図の原理方法、ヒト糖尿病網膜症と本モデルとの相同性、使用したレポーターマウスの特徴について等 11 項目、第二副査(小椋祐一郎教授)より現在臨床で承認されている抗 VEGF 薬治療の特徴、効果、副作用等について等 3 項目につき質問があった。いずれの質問も概ね満足のいく回答を得られた。従って学位申請者は学位論文の内容を十分に把握しているとともに、専攻分野に関する知識を習得していることを確認した。本研究は、ペリサイトの消失させることにより惹起される炎症のメカニズムとヒト糖尿病網膜症との相同性を示し、現在臨床で広く使用されている VEGF 阻害抗体と今後眼科領域への応用が期待される Angpt2 に対する阻害抗体を投与することで相乗的に BRB の回復を来すことができ、網膜症病態進展のメカニズムの理解を深めたものである。さらにヒト糖尿病網膜症の病態を理解のみならず中枢神経系のペリサイトの理解する上で重要な知見を得たもので意義の高い研究と言える。以上より、本論文の著者には博士(医学)の学位を授与するに値すると判定した。

論文審査担当者 主査 松川 則之

副査 飛田 秀樹、小椋祐一郎