



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	乙第1876号
学位記番号	論 第1648号
氏名	大曾根 大典
授与年月日	平成 29年 3月 24日
学位論文の題名	<p>Tissue Plasminogen Activator as an Anti-Angiogenic Agent in Experimental Laser-Induced Choroidal Neovascularization in Mice (組織プラスミノゲン活性化因子によるマウスレーザー誘発脈絡膜血管新生の抑制)</p> <p>Investigative Ophthalmology & Visual Science October 2016, Vol.57, 5348-5354. doi:10.1167/iovs.16-19617.</p>
論文審査担当者	主査： 鵜川 眞也 副査： 大石 久史, 小椋 祐一郎

論文内容の要旨

加齢黄斑変性症（AMD）は、先進国では高齢者の社会的失明の主要な原因である。AMDの中でも視力低下の主な原因となる脈絡膜新生血管（CNV）の発症に血管内皮細胞増殖因子（VEGF）の関与が示唆されており、臨床では抗VEGFが著効するため、これを用いたCNVの抑制が加療の主力となっている。しかしCNVが消退するまで頻回の硝子体内投与が必要となる。組織プラスミノゲン活性化因子（tPA）は血栓症や塞栓症に対して使用されており、眼科領域では網膜下血腫の除去に効果的であり、また安全性が確立されている。過去の研究にてtPAは網膜下のフィブリンの抑制を行うことで2型CNVの退縮効果も有していることが示唆されている。

今回、マウスレーザー誘導CNVモデルを用いて、tPAによる脈絡膜新生血管抑制について検討した。

方法は生後約8週齢の雄のC57BL/6Jマウスにレーザーを200mw、100msec、100 μ mのスポット視神経周囲に3-4発過剰凝固し、ブルッフ膜を破壊することで脈絡膜新生血管（CNV）を誘導する。ベースとなる群はレーザー照射後まもなくtPAを硝子体内投与する。tPA40IU投与群、tPA4IU投与群とPBS投与群の3群に分けレーザー照射後7日目に蛍光眼底造影を行い、CNVからの蛍光漏出をグレーディングした後、眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、網膜色素上皮-脈絡膜-強膜フラットマウントを作成。FITCで染色されたレクチンを用いてCNVの免疫染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡で観察、CNV底部から上部までの面積を1 μ m間隔で測定し、CNV容積を計算し、対照群とtPAによる治療群間でCNV容積について比較し治療効果を検討した。

またtPA40単位投与群とPBS群でフィブリン/フィブリノゲン、CD31、を目標として免疫染色を行い、比較を試みた。

その他、臨床でtPAは網膜毒性を有するという報告があり、網膜電図（ERG）でのa波、b波の減弱が見られたというものであった。tPA40単位もしくはPBSを硝子体内投与後1週間での網膜電図（ERG）を比較しPBS群のERGのA波、B波を100%としてtPA投与群のERGと比較した。

蛍光眼底造影ではtPA40単位投与群では、tPA4単位投与群やPBS群に比してCNVからの漏出が有意に抑制されていた（ $P < 0.01$ ）。tPA40単位投与群では $89,793 \pm 619,440 \text{ lm}^3$ であり、tPA4単位投与群の $228,017 \pm 650,080 \text{ lm}^3$ やPBS群の $264,273 \pm 665,431 \text{ lm}^3$ に比べ有意にCNV容積を抑制した（ $P < 0.05$ ）。PBS群とtPA4単位群では有意差は認めなかった。

免疫染色ではPBS群に比べtPA40単位投与群はフィブリン/フィブリノゲンの析出が少なく、レーザー照射部位のCD31陽性細胞も少ない傾向が見られた。

網膜電図（ERG）での結果、tPA40単位投与群とPBS投与群のERGと比較し、統計学的有意差はA,B両波とも認めなかった。

論文審査の結果の要旨

滲出型加齢黄斑変性は脈絡膜新生血管（CNV）が原因であり、黄斑部組織の破壊が起こる。その過程で血管内皮増殖因子（VEGF）が重大な役割を担っており、抗 VEGF 薬の硝子体内投与が滲出性加齢黄斑変性の治療の第一選択である。しかし頻回投与で黄斑部の瘢痕形成や網膜色素上皮の地図状萎縮が発生し視力が低下したという報告が存在する。

組織プラスミノゲン活性化因子（tPA）は、フィブリン溶解作用を持ち、塞栓等の治療に用いられており、眼科領域では黄斑下血腫移動に併用されている。過去の報告でフィブリンを伴う CNV は、ラニビズマブ単独複数回投与で退縮しなかったが、tPA の硝子体内投与併用により、フィブリン塊と CNV の縮小が確認されている。本研究では tPA を CNV の抑制に使用することを検討した。C57BL/6J マウスの網膜にレーザーを照射しブルッフ膜を破壊、CNV を発生させ、tPA 投与で抑制する試みを行った。レーザー照射後 7 日目に蛍光眼底造影を行った後、脈絡膜フラットマウントを作成し FITC アイソレクチン B4 で染色、レーザー共焦点顕微鏡で CNV の容積を測定した。蛍光眼底造影は、造影後期の CNV からの造影剤の漏出をグレード分類し、最も漏出の多いグレード 3 の割合を各群で計算した。蛍光眼底造影の結果、tPA 40 単位投与群で PBS と比べ有意に漏出が抑制されたが、tPA 4 単位投与群では PBS と比較し統計学的有意差は認められなかった。CNV 容積は 40 単位投与群では PBS と比較して統計学的に有意に抑制され、PBS 群と tPA 4 単位群では有意差は認めなかった。血管新生の開始として血管基底膜が分解され、この段階に tPA が必要である。続いて血管透過性の亢進、血液漏出、組織離解 が起こり、析出したフィブリンが足場となり、血管内皮細胞の増殖/遊走が起これと考えられ、tPA 投与でフィブリン析出が阻害されるために、血管新生が抑制されるのではないかと考えられた。レーザーCNV モデルにおけるフィブリン析出は照射後 3 日目に最も顕著であるという報告があり、これと同一の抗体を用い免疫染色を行った。レーザー照射後 3 日目に眼球を摘出、凍結切片を作成、フィブリン-フィブリンノーゲンに対する抗体、CD31 に対する抗体を用いて 2 重染色を行った。HE 染色では PBS 群に比べ tPA40 単位投与群は照射部位の形態変化が少ない傾向が認められた。染色では PBS 群に比べ tPA 群はフィブリンの析出が少なく、照射部位の CD31 陽性細胞も少ない傾向が認められた。tPA を用い網膜下血腫移動術後に視力低下が起こり、網膜電図（ERG）での a 波、b 波の減弱が見られ tPA は網膜毒性を有するという臨床報告があった。ヒトへの tPA 投与はマウスへの 40 単位投与とほぼ同じ濃度となる為、tPA40 単位もしくは PBS を硝子体内投与後 1 週間の ERG を比較した。HE 染色の比較では tPA40 単位投与群は PBS 群に比べ明らかな形態的变化を認めなかった。ERG では PBS 群の a 波、b 波を 100% とし tPA 投与群の ERG と比較し統計学的有意差は a, b 両波とも認めなかった。過去に tPA-プラスミン系は血管新生の促進、抑制の両方の報告がみられた。血管新生において今回のタイミングで tPA を投与するとプラスミノゲン活性化因子の働きが PAI-1 に勝りレーザー照射部のフィブリンの析出が抑制され、血管内皮細胞の増殖/遊走が阻害され CNV が抑制されたと考えられた。フィブリンは血管周囲に血管内皮細胞が移動、増殖するための足場を提供していると考えられ、tPA 投与が繊維素溶解によりフィブリンの足場を崩壊させ、血管新生における移動、増殖、またそれ以降の段階を阻害したと考えられた。本研究では、組織プラスミノゲン活性化因子は、今回の投薬のタイミングではマウス実験的レーザーCNV を有意に抑制しており、加齢黄斑変性、特に 2 型脈絡膜新生血管に対する新たな治療法として、抗 VEGF 治療の補助療法として値する可能性があるという報告が行われた。

主査：鶴川眞也教授より、tPA は加齢黄斑変性の前段階病変等に効果があるか、2 型 CNV 以外の加齢黄斑変性への tPA の効果、ERG の実際の施行方法等について、また第一副査：大石久史教授より、マウスの視機能の測定、評価の方法の有無、PA/PAI-1、tPA の効果は全身レベルでも有効に起こるか、等について、第二副査：小椋祐一郎教授より tPA が血管新生と血管新生抑制の両方に働く原理、糖尿病網膜症における病期、診断、治療、最近の話題につき質問があった。これらの質問に対して申請者から適切な回答が得られ、学位論文の内容を十分に把握しており大学院博士課程修了者と同等以上の学力を有することを確認した。よって、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された。

論文審査担当者 主査 鶴川 眞也 教授、副査 大石 久史 教授、小椋祐一郎 教授