

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	平林 一貴
論文審査担当者	主 査 菅野 祐幸 副 査 田淵 克彦 ・ 多田 剛
論文題目 Development of a novel model of central retinal vascular occlusion and the therapeutic potential of the adrenomedullin-RAMP2 system (網膜中心血管閉塞モデルの新規開発とアドレノメデュリン-RAMP2 系の治療応用への可能性)	
(論文の内容の要旨) [背景と目的] 網膜静脈閉塞 (RVO) は糖尿病網膜症 (DR) に次いで多い網膜血管疾患であり、網膜毛細血管の脱落、虚血、および黄斑浮腫により重度の視力障害を引き起こす可能性がある。アドレノメデュリン (ADM) は、全身で産生される血管拡張性ペプチドで、抗炎症作用、血管新生作用など様々な作用が報告されている。また RAMP2 は ADM の受容体活調節タンパクであり、血管においては AM-RAMP2 系が重要な働きをしていることが明らかとなっている。一方、ADM および RAMP2 は眼内でも高発現し、炎症や虚血により発現上昇することが報告されている。我々はこれまで、ADM ヘテロノックアウトマウス (ADM ^{+/-}) および受容体活性調節タンパク RAMP2 ヘテロノックアウトマウス (RAMP2 ^{+/-}) を用いた酸素誘発性網膜症モデルにおいて、網膜血管新生に ADM-RAMP2 系が重要な働きをすることを示し、また ADM 投与は DR モデルにおける血管透過性と炎症を抑制することを示した。これらの所見から、本研究では RVO における ADM-RAMP2 系の意義を検討することにした。現在のところ、網膜中心静脈閉塞 (CRVO) の病態を正確に再現する標準動物モデルは存在しないため、本研究ではマウスで CRVO を簡便に再現するモデルを開発し、このモデルを用いて毛細血管脱落、虚血、黄斑浮腫および炎症などの病態を解析した。さらに、ADM の CRVO 治療薬としての可能性を検討した。 [材料および方法] 9~12 週齢雄の、1) 野生型マウス (WT)、2) ADM ^{+/-} および RAMP2 ^{+/-} 、3) 浸透圧ポンプを用いて ADM を全身投与した WT を用いた。ローズベンガル腹腔内投与後、網膜血管起始部に低出力レーザーを照射し、CRVO モデルを作成した。処置後 1、3、7 日目にフルオレセインナトリウムを用いて蛍光眼底造影検査 (FA) を行い、Angio Tool [®] を用いて血管密度を測定した。7 日後にフルオレセインイソチオシアネートデキストラン (FITC) を心注後に、眼球摘出して網膜展開標本作製し、蛍光顕微鏡にて Angio Tool [®] を用いて血管密度を測定した。また、光干渉断層計 (OCT) を用いて網膜厚、体積を経時的に測定し、網膜浮腫を評価した。OCT による血管造影 (OCTA)、および網膜標本のアイソレクチン B4 (IB4) 染色、免疫染色にて血管構造の評価を行った。処置後の網膜のリアルタイム PCR とアレイアッセイにて、遺伝子発現の評価を行った。4) 不死化ラット血管内皮細胞ライン TR-iBRB 細胞に対して、TNF α 20ng/ml、TNF α + AM10 ⁻⁷ M、10 ⁻⁹ M を添加し、24 時間後に遺伝子発現を検討した。	

〔結果〕

- 1) CRVO 処置マウスでは、ヒト臨床で認められる所見に類似した網膜出血及び、静脈の拡張蛇行を認めた。FA、FITC 画像では、未処置と比較し血管密度が低下した。また OCT では処置後に網膜浮腫を認め、網膜層構造が粗造であった。OCTA では、処置後は中小血管および毛細血管が描出されず、大血管も経時的に狭小化した。FITC 非灌流領域では樹状または球状の形態の IB4 染色強陽性を認め、かつ F4/80 染色陽性となることから、マクロファージ、活性化ミクログリアと考えられた。リアルタイム PCR、アレイアッセイでは CRVO 群において炎症因子が上昇し、血管新生因子の発現が抑制されていた。また CRVO 群では ADM が著明に発現上昇し、凝固因子や白血球接着分子、炎症因子、酸化ストレスマーカーの経時の上昇を認めた。
- 2) ADM+/-および RAMP2+/-では、CRVO 処置後に FA、FITC で血管密度減少を認めた。また ADM+/-の網膜では WT と比較し、凝固因子や白血球接着分子、炎症因子、酸化ストレスマーカーの発現が上昇し、免疫染色にて CD68 陽性マクロファージ、ミクログリアは増加し、抗炎症作用を持つ CD206 陽性ミクログリアは減少した。
- 3) 反対に CRVO モデルへの ADM 投与は、FA、FITC で血管密度が上昇し、凝固因子や白血球接着分子、炎症因子、酸化ストレスマーカーの低下を認め、CD68 陽性マクロファージ、ミクログリアは減少し、CD206 陽性ミクログリアは増加した。処置後の網膜層構造の破壊は、ADM+/-で増悪し、ADM 投与マウスでは抑制された。ADM+/-は酸化ストレスマーカーの発現が亢進していた。
- 4) TR-iBRB 細胞では、TNF- α 刺激により白血球接着分子、炎症因子、酸化ストレスマーカー、VEGF 受容体である VEGFR-2 の発現が亢進したが、ADM 添加によって抑制されることから、ADM が網膜血管内皮細胞傷害を直接抑制することが示された。

〔結論〕

ADM は CRVO 処置後の血管再灌流を改善し、抗凝固効果や内皮細胞傷害抑制効果を示す。また血管透過性亢進による網膜浮腫を抑制し包括的に CRVO の病態を改善する。以上の事から ADM-RAMP2 系は CRVO 治療の有望な治療標的となると考えられる。