

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20323

研究課題名(和文)組織プラスミノゲン活性化因子による脈絡膜血管新生抑制

研究課題名(英文)Tissue Plasminogen Activator as an Antiangiogenic Agent in Experimental Laser-induced Choroidal Neovascularization in Mice

研究代表者

水谷 武史(Mizutani, Takeshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70770428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：私たちはマウスにおける実験的レーザー誘導脈絡膜新生血管(CNV)に対する組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)の血管新生作用の抑制効果について検討した。tPAを硝子体内注射投与することで、CNVの体積が小さくなることを示した。また、同モデルにおいて、tPAの投与が血液の凝固に関係するフィブリンノーゲンや血管新生を示唆するマーカーのCD31の発現を抑制することを示した。また、網膜の電気的活動を評価する網膜電図において、tPAの投与がその正常な活動に影響を与えないことを示した。以上の結果よりtPAが加齢黄斑変性に対する治療薬となりうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We investigate the antiangiogenic efficacy of tissue plasminogen activator (tPA) on experimental laser-induced choroidal neovascularization (CNV) in mice. Intravitreal administration of tPA significantly suppressed CNV leakage and CNV volume. Intravitreal injection of tPA suppressed fibrin/fibrinogen and CD31 expression in laser-induced lesions. Histologic examination and electroretinography showed no evidence of retinal toxicity in eyes injected with tPA. The current results suggested that tPA may be a potential therapeutic adjuvant for treating CNV.

研究分野：脈絡膜新生血管

キーワード：脈絡膜新生血管 プラスミノゲン活性化因子 CNV tPA

1. 研究開始当初の背景

組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)は、実験的に血管新生促進あるいは抑制という相反する作用の報告があるが、私たちはこれまでに、臨床で、脈絡膜新生血管(CNV)に合併する網膜下血腫移動に tPA 注入を併用すると CNV 鎮静化が得られ易いことを見いだしている(Mizutani T et al. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2011)。tPA は今までの報告から、病態に応じて異なる作用を示すと考えられるが、私たちが見いだした CNV 鎮静化作用は、フィブリン溶解により血管新生が進展する場がなくなるためではないか、と推論した。私たちはこれまでに、過剰なレーザー出力でブルッフ膜を破壊し、実験的に CNV を誘導するマウスレーザーCNV モデルを用いて、CNV 病態解明および新規治療法開発を目的に研究してきた(Mizutani T et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013)。

本研究では、臨床での推論を証明し、実験的なエビデンスを得ることを目的に、マウスレーザー CNV モデルを用いて、tPA の CNV に対する血管新生抑制作用およびその機序の解明、という着想に至った。

2. 研究の目的

滲出型加齢黄斑変性症(AMD)、特に脈絡膜新生血管に対する抗血管内皮増殖因子(VEGF)治療は、臨床で主流ではあるが、医療経済の圧迫、眼・全身副作用の点からも、新たな治療法の開発が社会的にも望まれている。組織プラスミノゲン活性化因子は眼科領域では網膜下血腫移動や網膜静脈閉塞症に対して使用されているが、私たちは、CNV による網膜下血腫症例に tPA を硝子体内に投与すると、CNV の鎮静化が得られやすいことを見いだした。tPA 自体には、血管新生促進あるいは抑制と相反する報告が過去にあり、病態に応じて異なる作用を示す可能性がある(Rakic JM et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.

2003, Hattenbach LO et al. *Retina* 1999, Gutierrez LS et al. *Cancer Res.* 2000)。本研究ではその点に着目し、tPA の実験的 CNV に対する血管新生抑制作用、さらにその機序を検討し、臨床的に抗 VEGF 治療補助となる新規 CNV 治療法開発を目指すものである。

3. 研究の方法

(1)マウスレーザーCNV モデルの作成

生後 8 週の雄 C57BL/6J マウスに、レーザーを 200mw、100msec、100 μ m のスポットサイズで 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 CNV を誘導する。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(RPE)-脈絡膜-強膜フラットマウントを作成。FITC で標識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 容積を計算する。

(2)組織プラスミノゲン活性化因子硝子体内注入

レーザー直後に tPA を 33G シリンジを用いて硝子体内に投与する。投与量として 4 IU あるいは 40 IU を選択し、7 日後に蛍光眼底造影、CNV 容積評価を行い、最も CNV 抑制効果の得られた投与日、投与量を決定する。

(3)CNV 発症後の組織プラスミノゲン活性化因子投与の血管新生作用

レーザー直後に tPA を硝子体内に投与して、7 日後に CNV 抑制効果について、蛍光眼底造影およびフラットマウントによる CNV 容積を測定し、検討する。

(4)組織プラスミノゲン活性化因子の硝子体内注射によるフィブリンノーゲン、CD31 の発現の反応

レーザー直後に tPA を硝子体内に投与して、

3日後にフィブリンノーゲンおよび CD31 の発現を免疫組織学的に評価する。

(5) 組織プラスミノゲン活性化因子の硝子体内注射の網膜毒性

レーザー直後にtPAを硝子体内に投与して、7日後に網膜電図を用いて、網膜の電気生理学的機能およびレーザー照射部位の組織学的形態を評価する。

4. 研究成果

(1) 組織プラスミノゲン活性化因子の脈絡膜新生血管からの蛍光漏出抑制効果

蛍光眼底造影検査において、レーザー直後に40IUのtPAを硝子体内投与した群では、PBSや4IUのtPAを投与した群と比較して有意にCNVからの蛍光漏出が抑制された($P < 0.01$) (図1)。

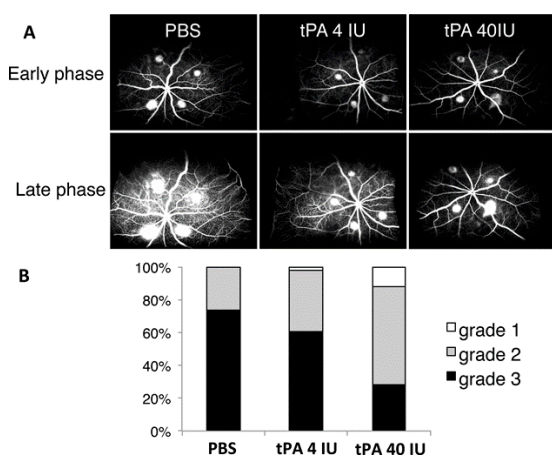


図1 組織プラスミノゲン活性化因子による脈絡膜新生血管の血管漏出抑制

(2) 組織プラスミノゲン活性化因子による脈絡膜新生血管の容積の抑制効果

レーザー直後に40IUのtPAを硝子体内投与した群では、PBSや4IUのtPAを投与した群と比較して有意にCNVの容積が抑制した($P < 0.05$) (図2)。

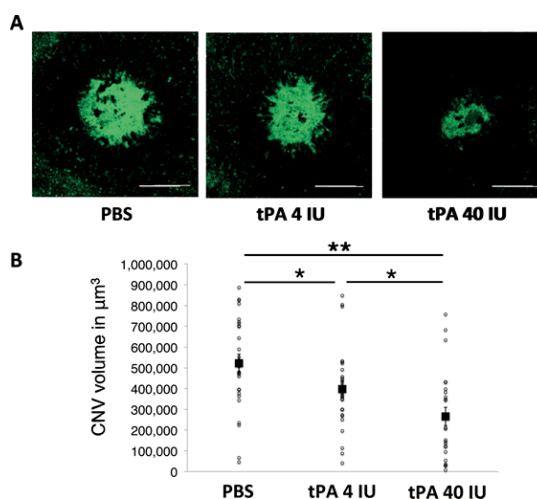


図2 組織プラスミノゲン活性化因子による脈絡膜新生血管の容積の抑制

(3) 組織プラスミノゲン活性化因子によるフィブリン/フィブリンノーゲンおよび CD31 の抑制

レーザー直後に40IUのtPAを硝子体内投与した群では、PBSを投与した群と比較してフィブリン/フィブリンノーゲンの発現およびCD-31陽性細胞が有意に減少した(図3)。

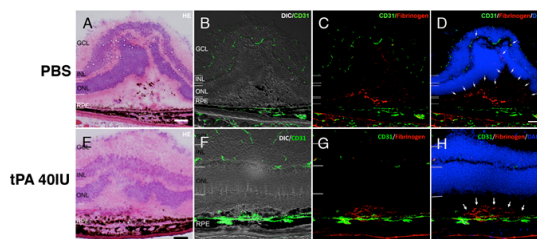


図3 組織プラスミノゲン活性化因子によるフィブリン/フィブリンノーゲンおよび CD31 の抑制

(4) 組織プラスミノゲン活性化因子の硝子体内注射の網膜毒性評価

レーザー直後に40IUのtPAを硝子体内注射し、7日目にtPAに関連した網膜毒性について評価した。PBS投与群とtPA投与群では組織学的に差はなく、網膜毒性を示唆する所見は認めなかった。また網膜電図においても、PBS群、tPA投与群ともに異常なく、網膜毒性を示唆する所見は認めなかった(図4)。

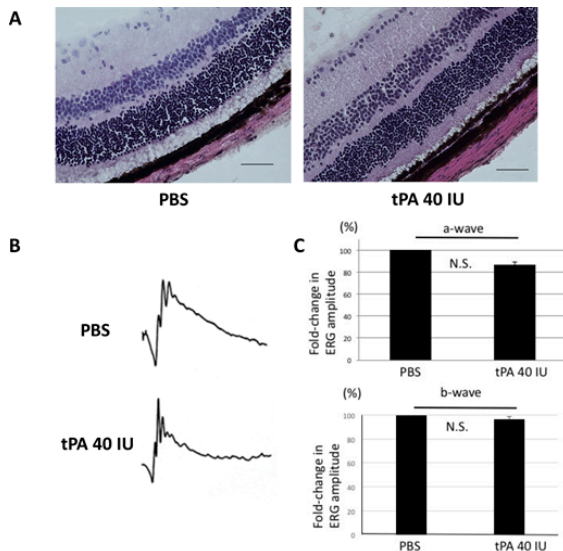


図4 tPA の網膜毒性の評価

以上の結果より、tPA の投与によりマウスにおけるレーザー誘導 CNV モデルにおいて、作成した CNV の部位におけるフィブリン/フィブリノーゲンの発現が抑制され、また CNV 容積が抑えられたことから、フィブリンが CNV 形成の足場となる疎な組織である細胞外マトリックスの架橋において重要な役割をしており、tPA 硝子体内投与が CNV 形成の足場における、フィブリン役割を阻害することで血管新生を抑制している可能性が考えられた。

<引用文献>

1. Mizutani T, Yasukawa T, Ito Y, et al. Pneumatic displacement of submacular hemorrhage with or without tissue plasminogen activator. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011; 249: 1153-1157.
2. Mizutani T, Ashikari M, Tokoro M, Nozaki M, Ogura Y. Suppression of laser-induced choroidal neovascularization by a CCR3 antagonist. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54: 1564-1572.
3. Rakic JM, Lambert V, Munaut C, et al. Mice without uPA, tPA, or plasminogen genes are resistant to experimental choroidal neovascularization. *Invest*

Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44: 1732-1739.

4. Hattenbach LO, Allers A, Gumbel HO, Scharrer I, Koch FH. Vitreous concentrations of TPA and plasminogen activator inhibitor are associated with VEGF in proliferative diabetic vitreoretinopathy. *Retina.* 1999; 19: 383-389.
5. Gutierrez LS, Schulman A, Brito-Robinson T, Noria F, Ploplis VA, Castellino FJ. Tumor development is retarded in mice lacking the gene for urokinase-type plasminogen activator or its inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1. *Cancer Res.* 2000; 60: 5839-5847.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Ozone D, Mizutani T, Nozaki M, et al. Tissue plasminogen activator as an antiangiogenic agent in experimental laser-induced choroidal neovascularization in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016 Oct 1; 57(13): 5348-5354. doi: 10.1167/iovs.16-19617.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://ncu-ganka.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

水谷 武史 (MIZUTANI, Takeshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号:70770428