

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 10 月 23 日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07135

研究課題名(和文) テネascinXとデコリンの脈絡膜新生血管と線維化での役割の解明

研究課題名(英文) Role of Tenascin X and Decorin in the development of choroidal neovascularization and fibrosis.

研究代表者

岩西 宏樹 (IWANISHI, HIROKI)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40784319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性は先進国における高齢者の失明原因の上位疾患である。脈絡膜新生血管とその周囲に生じる線維癍痕形成は滲出型加齢黄斑変性の最大の特徴である。新生血管の形成や線維癍痕形成には、細胞外マトリックスの関与が報告されてきた。我々は、テネascinXとデコリンの脈絡膜新生血管に対する作用をマウス実験的レーザー誘発脈絡膜血管新生モデルを用いて検討した。野生型マウスに比べデコリンノックアウトマウスではレーザー誘発脈絡膜新生血管が大きい傾向にあった。テネascinXノックアウトマウスでは、レーザー誘発脈絡膜新生血管は野生型と比較して有意差はなかった。

研究成果の概要(英文)：Age-related macular degeneration (AMD) is one of the leading causes of irreversible blindness in older people in developed countries. Choroidal neovascularization (CNV) and associated fibrotic tissue formation around CNV are the major features of the exudative form of AMD. It has been reported that extracellular matrix was involved in CNV and fibrotic tissue formation. We investigated the function of tenascin-X and decorin in an in vivo mouse laser induced CNV model. CNV in decorin KO mice was tend to be larger than that of WT mice. There is not significantly difference on the CNV formation between in tenascin-X KO mice and in WT mice.

研究分野：脈絡膜血管新生

キーワード：滲出型加齢黄斑変性 脈絡膜新生血管

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は滲出型と萎縮型に分類され、滲出型の最大の特徴である黄斑部脈絡膜血管新生発症には血管内皮細胞成長因子 (VEGF) が深く関与する。一方で、抗VEGF抗体の眼内投与による治療で脈絡膜新生血管が縮小したのちに、病巣部に線維・瘢痕組織が形成され、直接的あるいは組織収縮を介して間接的に黄斑部網膜機能を障害する。したがって、抗VEGF抗体による治療の残された大きな課題に、脈絡膜や網膜下の線維・瘢痕化組織に対する対策があげられる。

線維・瘢痕化疾患の病態では、筋線維芽細胞の出現とそれにとまなう過剰な細胞外マトリックスの沈着と組織収縮が大きな因子である。筋線維芽細胞とマクロファージを含んだ線維・瘢痕組織の形成には、さまざまは成長因子が関与することが知られているが、なかでもトランスフォーミング成長因子ベータ (TGF β) が大きな役割を演じている。TGF β は他の成長因子同様のシグナル伝達 (MAPキナーゼ、JNK、p38) を活性化する以外に、特異的なシグナル伝達機構として Smad2/3 シグナルを有する。申請者の所属では十数年に渡って、この Smad シグナルと眼組織の炎症や線維・瘢痕化の関係に焦点を絞って、遺伝子治療などの新規治療戦略の確立を念頭においた研究を展開している。この中で、申請者は Smad3 ノックアウトマウスなどを用い、アルゴンレーザー照射での Bruch 膜障害による脈絡膜血管新生とその周囲の線維・瘢痕組織形成が TGF β /Smad3 シグナルに依存していることから治療戦略ターゲットとしての Smad3 シグナルの重要性を報告した。この時、血管内皮細胞での TGF β から ALK1 受容体を介した Smad1/5 シグナルよりも、ALK5 受容体を介した Smad3 シグナルが大きな役割を演じている事の解明が評価された (*Iwanishi H et al. Lab Invest, 2016*)。上記の様に脈絡膜新生血管組織では、線

維・瘢痕化組織が病態で大きな役割を演じ、その形成には TGF β /Smad3 シグナルが関与している。一方、これまでの申請者の所属と他施設での研究成果から、線維・瘢痕化組織の構成成分であるマトリセルラー蛋白質が逆に TGF β リガンドの活性化と TGF β /Smad3 シグナルの制御に関与していることが報告された。このマトリセルラー蛋白質には、オステオポンチン、テネイシン C、テネイシン X、ルミカンやデコリンなどが含まれる。たとえば所属からオステオポンチンが Smad3 シグナルのサポートを介して、アルゴンレーザー照射による脈絡膜血管新生を促進することが報告された。具体的には申請者は角膜血管新生形成にテネイシン C が関係していることを共同研究者として解明した (*Sumioka T, Kitano A, Flanders KC, Okada Y, Yamanaka O, Fujita N, Iwanishi H, Kao WW, Saika S. Lab Invest, 2013*)。一方、テネイシン X がインテグリンを介して TGF β の不活性型から活性型への変化をサポートすることがドイツの研究者によって報告された。また、デコリンに TGF β をトラップして中和する作用があることは以前から知られているものの、脈絡膜血管新生での役割は報告されていない。

2. 研究の目的

我々はこれまで TGF β シグナルがマウスにおいて脈絡膜血管新生の形成に大きな役割を演じていることを報告した。今回、周囲の細胞外マトリックスに存在するマトリセルラー蛋白質の中でもテネイシン X とデコリンの脈絡膜血管新生の形成過程での TGF β 活性の制御に焦点を充てて、病態メカニズムの解明と新規治療戦略の確立を目的とする。

3. 研究の方法

6-8週齢の雄テネイシンXノックアウトマウスとデコリンノックアウトマウス(ともに所属に導入後、繁殖中)を用い、アルゴンレーザー誘発実験的脈絡膜新生血管モデルを作成し、炎症の抑制と脈絡膜新生血管の変化を野生型マウスと比較検討した。実験的レーザー誘発脈絡膜新生血管モデルは、ヒト滲出型加齢黄斑変性のモデルとして確立されたモデルであり、レーザー照射7-14日後に脈絡膜新生血管が最大となる。

マウスを全身麻酔下でNIDEKアルゴンレーザー装置(所属研究室に設置)で、各象限に1箇所ずつ申請者の報告(Iwanishi H, et al. Lab Invest, 2016)に準じてアルゴンレーザー照射(200 mW, スポットサイズ 80 μm, 照射時間100 ms)した。照射14日後にフルオレスセインデキストラン(2 × 10⁶ MW; Sigma, 10% デキストランで溶解)50 mg/mL を心腔から注入することで血管造影を行いApotome2 (Zeiss)蛍光顕微鏡を用いフラットマウント法で観察し、脈絡膜新生血管の大きさを上記の報告に従って、コンピューターソフトウエアWinROOF(三谷)で解析した。

野生型マウスと比較し、レーザー誘発脈絡膜新生血管に有意差を認めた場合には組織病理学、免疫組織化学、real-time RT-PCRなどの手法を用いて、メカニズムを検討し、in vitroで血管新生作用も検討を予定した。最終的には中和抗体の尾静脈投与による再現を目指した。

4. 研究成果

野生型マウスに比べデコリンノックアウトマウスではレーザー誘発脈絡膜新生血管が大きい傾向にあった。本研究期間中に点突然変異によると思われる表現型を認めた。よって、デコリンノックアウトマウス導入初期、

つまりまだ正常な形質を維持していた頃に作製した凍結胚を回復し、正常形質に戻す、

正常B6マウスに戻し交配を行い、異常な遺伝性素因を排除した後、デコリンノックアウト遺伝子をホモ化して再建する、の必要性が生じ、本研究機関に予定していた研究は終了しなかった。デコリンはTGFを抑制することが知られており、滲出型加齢黄斑変性を含む脈絡膜新生血管関連疾患へのデコリン投与の有効性を検証するため今後も継続して研究予定である。テネイシンXノックアウトマウスでは、レーザー誘発脈絡膜新生血管は野生型と比較して有意差はなかった。

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

岩西宏樹 テネイシンXノックアウトマウスにおける実験的レーザー誘発脈絡膜新生血管、第4回 MatriCell フォーラム 2016.9.3-2016.9.4 東京理科大神楽坂キャンパス

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩西 宏樹 (IWANISHI HIROKI)
和歌山県立医科大学 医学部 講師

研究者番号：40784319

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()