

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07801

研究課題名（和文）病的血管新生に働くVEGF下流分子を標的とする副作用のない未熟児網膜症治療の試み

研究課題名（英文）New treatment challenges for retinopathy of prematurity without side effects

研究代表者

福原 大介（Fukuhara, Daisuke）

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：10547805

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：未熟児網膜症の治療標的として、近年、その発症機序から血管内皮増殖因子（VEGF）シグナル系が注目されている。我々はこれまでにTSAdという分子がVEGFシグナル系の下流分子であることを見出し、VEGFが誘導する血管新生に必須であることを証明した。そこで本研究では、TSAdを欠損することにより未熟児網膜症マウスモデルの重症度の変化を解析した。結果、TSAdを欠損することにより、重症度の減弱化が観察され、TSAdは治療標的部位として可能性を秘めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗VEGF薬の眼内注射による治療は、従来のレーザー治療のように網膜を破壊することなく、この異常な血管新生を抑制し、ROPの進行を防ぐ。しかし、VEGFは脳などの中枢神経系の血管の発達にも重要であり、VEGFを直接阻害する治療は、その作用の多様性から、発達途上の小児期では副作用を慎重に考慮する必要がある。TSAdは、VEGFが病的に発現している環境下でより機能する分子の可能性があり、この分子を標的にする治療法は、抗VEGF薬に比し、効果が限定され、より副作用の少ない治療法として期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have identified that TSAd is a downstream molecule of the VEGF signaling and proved that it is essential for VEGF-induced angiogenesis. In this study, we analyzed the differences in the retinopathy of prematurity severity in a retinopathy of prematurity mouse model using TSAd knockout mice. TSAd knockout mice developed milder retinopathy of prematurity than wild-type littermates. Therefore, TSAd has potential as a therapeutic target for retinopathy of prematurity.

研究分野：小児科学

キーワード：TSAd

1. 研究開始当初の背景

未熟児網膜症 (Retinopathy of Prematurity : ROP) は、小児期の失明の原因として大きな割合を占める。近年、その発症機序から、治療の対象として血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor : VEGF) シグナル系が注目されている。ROP の発症の過程で、VEGF は過剰に誘導され異常な血管新生が起こり、この異常な血管新生が後の視神経の障害や牽引性の網膜剥離を引き起こす。抗 VEGF 薬の眼内注射による治療は、従来のレーザー治療のように網膜を破壊することなく、この異常な血管新生を抑制し、ROP の進行を防ぐ。しかし、一部の報告では眼内投与において、血清 VEGF 値の低下を認めており、新生児の網膜の未熟性から、局所投与であっても全身への影響が懸念される。さらに近年、ROP に抗 VEGF 薬を投与した群に有意に精神運動発達遅滞が多いという報告も見られている。以上より、VEGF は脳などの中枢神経系の血管の発達にも重要であり、VEGF を直接阻害する治療は、その作用の多様性から、発達途上の小児期では副作用を慎重に考慮する必要がある。

最近、我々は T-cell specific adopter (TSAd) という分子が VEGF シグナル系の下流分子であることを見出し、TSAd knockout (KO) マウスを用い、このシグナル系が VEGF 誘導性腫瘍モデルにおいて、血管新生に必須であることを証明した。興味深いことに、同 KO マウスの検討から、網膜の生理的な血管新生は阻害されないことを見出した。この結果から、TSAd が関与する血管新生は、腫瘍などの高 VEGF 環境下で特異的に働くと考えられる。これはすなわち、TSAd は同じく高 VEGF 環境下で発症する ROP にも関わることが予測され、治療標的部として有望である。言い換えると、TSAd は、VEGF が病的に発現している環境下でより機能する分子の可能性があり、この分子を標的にする治療法は、抗 VEGF 薬に比し、効果が限定され、より副作用の少ない治療法として期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ROP の発症に TSAd 分子が関わることを証明し、種々の方法でその働きを抑制することによる、ROP 発症への影響を明らかにすることである。これは最終的に TSAd を治療ターゲットとした創薬につながる。

抗 VEGF 薬による治療は VEGF 自体を標的としており、正常で必要とされる生理的作用を阻害する可能性が常に懸念されている。特に発達途上にある小児においては、その長期的な副作用が心配され、近年では中枢神経系における副作用の報告が見られている。一方、TSAd は申請者らが初めて病的血管新生に関わることを証明した分子であり、これを治療標的とする本研究では、VEGF の多岐にわたる作用のうち、この病的血管新生に、より特異的に働く治療法の開発が期待される。それはすなわち副作用の心配のない治療法となる。

さらに、我々が共同研究で探索している TSAd の阻害物質はその多くが低分子化合物であり、現在行われている眼内注射以外の非侵襲的な点眼や内服などの投与方法にも希望が持てる。

3. 研究の方法

(1) Oxygen-induced Retinopathy (OIR) マウスモデルの作成

Retinopathy of prematurity (ROP) のモデルとして、広く用いられている OIR マウスモデルを利用する。C57BL/6 マウスを日齢 7 から母マウスとともに 75%酸素下で飼育し、日齢 12 に酸素投与を中止することにより、眼内の VEGF を過剰発現させ網膜症を惹起した。その網膜症マウスから日齢 17 に麻酔下で両眼球を摘出し、stereo microscope 下にて網膜のみを単離した。網膜の単離後、片眼から免疫蛍光染色用、対側から RNA、およびタンパクの試料を作製した。

まず、OIR が誘導されている評価を染色にて行う。染色用サンプルはパラホルムアルデヒドで固定後、得られた網膜を、ホールマウントで免疫蛍光染色した。染色については、Alexa Fluorescence conjugated isolectin B4 を用い、血管内皮細胞を可視化することによって、共焦点レーザー顕微鏡下にて主に新生血管野および無血管野の評価を行った。画像解析は NIH の ImageJ を用い施行した。

(2) OIR マウスモデルにおける TSAd の検討

OIR が誘導されていることを確認できた網膜の対側から RNA 抽出し、TSAd の動態を、Real-time PCR で観察した。

OIR 誘導の確認のための染色は上記①と同様に内皮細胞を可視化し評価した。解析は同様に ImageJ を使用し行った。

RNA レベルの検討は TSAd 特異的 Primer を作製し、Cyber green 法 Real-time PCR で定量的に行った。

(3) TSAd Knockout (KO) マウスを用いた OIR の検討

TSAd の OIR 発症への関与を検証するため、TSAd KO マウスおよび、コントロールとして同胎の WT を用い、OIR モデルを作製した。マウスは同胎から各々3 匹以上を実験の対象とし、遺伝子背景の評価は眼球摘出時の日齢 17 に行う耳の皮膚生検から DNA を抽出して行い、これらのマウスの網膜症の評価は、①同様の方法で行った。

(4) TSAd KO マウスにおける OIR 発症時の代償因子の検討

TSAd KO マウスにおいて代償因子として働き、TSAd 阻害治療の抵抗因子の同定のため、③同様の方法で OIR モデルを作製し、網膜を単離、質量解析を施行した。

(5) 誘導性内皮細胞特異的 TSAd KO マウスを用いた OIR の検討

TSAd KO マウスにおいて、代償による影響を除外する目的で、後天的 KO マウスを誘導し上記③同様の解析を施行した。KO の誘導のため、誘導性内皮細胞特異的 TSAd KO マウスに日齢 12 にタモキシフェンを腹腔投与した。

4. 研究成果

(1) 未熟児網膜症の病態を解析するため、高濃度酸素飼育により OIR マウスモデルを作製し、生後 17 日齢 (P17) に網膜の血管の発生を染色で確認した。高濃度酸素飼育 (P7-P12) による血管退縮の影響が中枢側の無血管領域として、また、その後の通常酸素飼育 (P12-P17) に起こる VEGF 過剰発現に伴う房状血管新生が観察された。得られた画像を解析したところ、無血管野の平均面積の割合は、全体の約 14%で、病的な房状血管新生の割合は平均約 2.8%であった。このマウスモデルから得られた網膜を資料として、total RNA を作成し、real-time RT-PCR 法を用いて、VEGF と TSAd の転写産物の定量化を行なった。VEGF、TSAd とともに転写産物の発現が upregulate されており、この病態において、TSAd が何らかの役割を担っていると推察できた(図 1)。

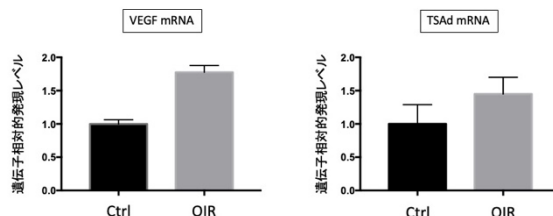


図1 OIRマウスモデル網膜における転写産物の比較

(2) 上記の結果における TSAd の OIR モデルへの関与を検討するため、TSAd KO マウスを用い、OIR モデルを作製した。同胎より出生した野生型マウスを比較対象として比較検討した。無血管領域は大きな差は認めなかったが、房状血管新生については、KO マウスにおいて増加していることが確認された(図 2)。TSAd の欠如による病的血管新生の増加するメカニズムは不明だが、TSAd が胎生期より欠損しているため、何らかの代償分子の関与した可能性が考えられた。代償する分子の存在を探索するため、KO マウスを用い同様に OIR モデルを作製、単離した網膜からタンパクを抽出し、質量解析を施行した。その結果増加している分子は 50 以上認められ、何らかの代償機構の存在が推察された。

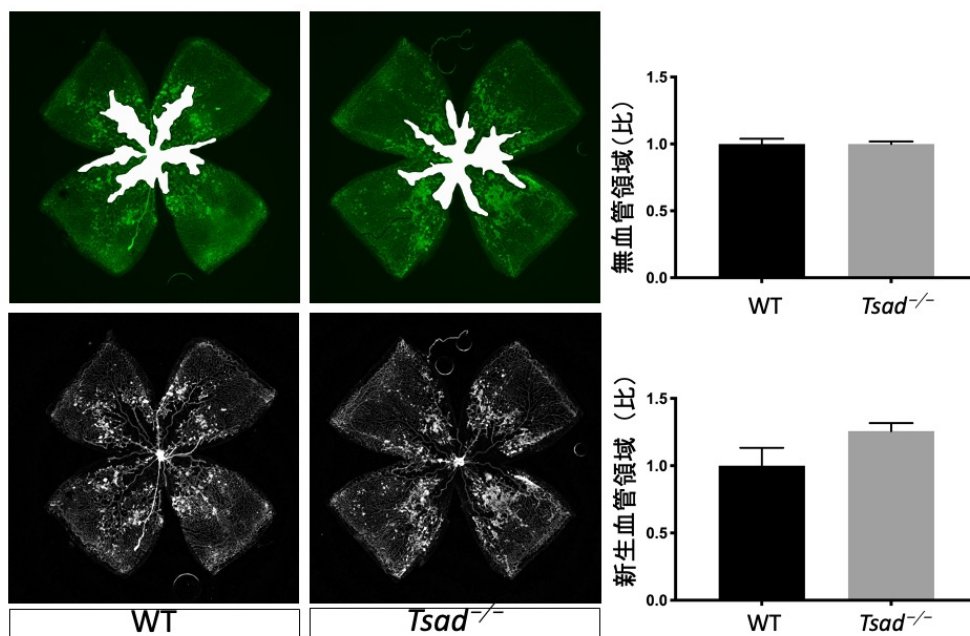


図2 TSAdノックアウトによる血管新生の比較

(3) 上記の代償の影響を除外することを目的に、誘導性内皮細胞特異的 TSAd KO マウスを用い OIR マウスモデルを作製した。今回内皮細胞特異的 KO 誘導には Cdh5-CreERT2 マウスを用い、通常酸素再飼育による VEGF 過剰発現の始まる時期である P12 にタモキシフェンを投与した。本検討において、同胎の野生型に比し病的房状血管新生の軽減が観察された(図 3)。TSAd は VEGF レセプターの下流に動員される分子であり、この結果から、OIR マウスモデルのような病的血管新生の治療標的として有望である可能性がある。

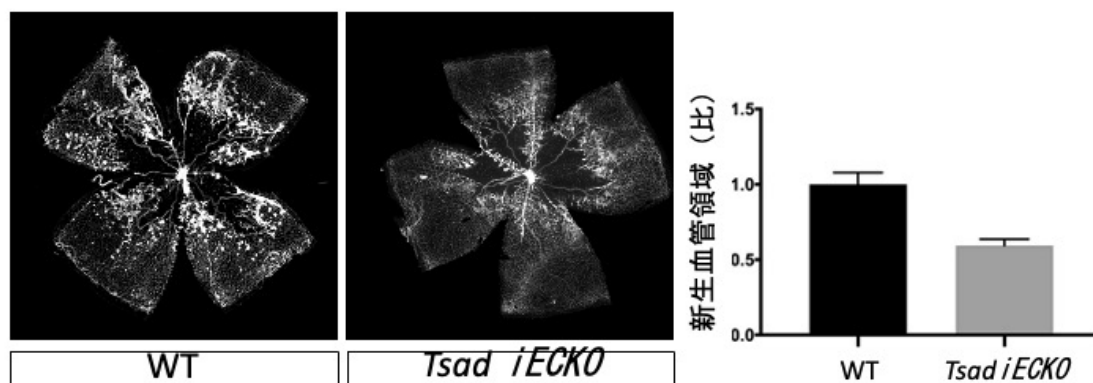


図 3 TSAdノックアウト誘導による房状血管新生の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	福富 俊之 (Fukutomi Toshiyuki) (30439187)	杏林大学・医学部・助教 (32610)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関