

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791881

研究課題名(和文) POMGnT1欠損マウス網膜の増殖性変化におけるサイトカインの関与

研究課題名(英文) Participation of cytokine in the proliferative change in retina of POMGnT1-deficient mice

研究代表者

高橋 永幸 (Takahashi, Hisatomo)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：10445801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：Muscle-Eye-Brain diseaseのモデルマウスであるPOMGnT1欠損マウスの網膜硝子体において、各種サイトカインの発現を解析し、アストロサイトの異常増殖が生ずるメカニズムの解明を試みた。抗VEGF抗体、抗HGF抗体、抗PDGF抗体を一次抗体とし免疫組織化学染色を行った結果、POMGnT1欠損マウスの網膜表面及び硝子体中でのVEGF及びPDGF-Aの発現亢進が認められた。

研究成果の概要(英文)：In retina and vitreous body of POMGnT1-deficient mice which was a model mouse of Muscle-Eye-Brain disease, We analyzed expression of various cytokine and tried elucidation of the mechanism that an astrocytic abnormal increase produced. As a result of immunohistochemistry for VEGF, HGF, and PDGF, it was recognized that the expression of VEGF and PDGF-A in retinal surface and vitreous bodies of POMGnT1-deficient mice was increased.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：POMGnT1 VEGF PDGF

## 1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーはジストロフィンと呼ばれる細胞内蛋白質および一群の膜蛋白質からなるジストロフィン糖蛋白質複合体

(dystrophin-glycoprotein complex: DGC) の異常により生ずる遺伝性疾患である。DGC は細胞外マトリックスと細胞骨格を結ぶ連結軸として細胞膜の安定化に寄与していると考えられており、DGC の中でもジストログリカンは連結軸形成において中心的な役割を果たしている。

ジストログリカンは一つの遺伝子でコードされており、蛋白質に翻訳された後に  $\alpha$ -ジストログリカンと  $\beta$ -ジストログリカンに切断される。 $\alpha$ -ジストログリカンは細胞膜外表在性糖蛋白質であり、膜貫通糖蛋白質  $\beta$ -ジストログリカンに結合することによって細胞膜周囲に局在している。

先天性筋ジストロフィーの多くの病型で骨格筋・眼球・脳に異常を認め、 $\alpha$ -ジストログリカンの糖鎖修飾に関する遺伝子の異常が明らかとなっている (Muntoni et al. *Neuromuscle Disord.* 2004)。これらはジストログリカノパチーと呼ばれており、Muscle-Eye-Brain disease (MEB)、福山型先天性筋ジストロフィー、Walker-Warburg 症候群、先天性筋ジストロフィー 1C 型 (MDC1C)、肢体型筋ジストロフィーおよび筋強直性ジストロフィーが報告されている。このうち MEB は先天性筋ジストロフィーに眼奇形と脳の形態形成異常を伴った常染色体劣性遺伝病である。臨床的には運動発達遅滞を認め、多くの症例で独歩を確保するに至らない。また脳では神経細胞の遊走異常による形成異常が認められ、知的発達障害は高度でいくつかの単語を獲得する程度である。眼球異常は多岐にわたっており、これまでに小眼球、先天緑内障、牛眼、眼球陥凹、白内障、病的近視、網膜異形成、網膜剥離などが報告されている。患者はフィンランドを中心にヨーロッパで多く認められるが、日本や韓国を含む世界中に分布している (Taniguchi et al. *Hum. Mol. Genet.* 2003)。

MEB の原因遺伝子は 1p32-34 に存在する POMGnT1 であることが明らかとなっている (Yoshida et al. *Dev. Cell.* 2001)。 $\alpha$ -ジストログリカンの糖鎖は O-マンノース型糖鎖であるが、POMGnT1 はこの糖鎖の形成において N-アセチルグルコサミンを O-マンノースに転移させる機能を持っており、糖鎖の形成に不可欠であると考えられている。

POMGnT1 の糖鎖修飾の標的である  $\alpha$ -ジストログリカンを含む DGC については、眼球内組織では網膜において比較的良好に研究されている。網膜において DGC は、外網状層 (outer plexiform layer: OPL)、網膜内層の網膜血管周囲、および内境界膜 (inner limiting membrane: ILM) に存在することが知られている。OPL ではリボンシナプスを形成する視細胞末端に存在する。網膜血管

周囲では網膜血管の基底膜と接する血管周囲アストロサイトのフットプロセスに存在する。ILM では Muller 細胞のフットプロセスに存在する。

近年我々は、POMGnT1 欠損マウスの眼球における形態的および機能的特徴について解析し、網膜血管周囲アストロサイトの異常増殖に伴い高頻度に網膜剥離が生じることを明らかにした (Takahashi et al. *Mol Cell Neurosci.* 2011)。また以前他のグループにより、POMGnT1 欠損マウスの大脳皮質において軟膜くも膜の基底膜の障害とともに異所性線維芽細胞の増殖を認め、この結果異常なアストロサイトの活性化が生じることが示されているが (Yang et al. *J. comp. Neurol.* 2007) 我々は網膜においても異所性線維芽細胞の増殖が認められることを明らかにし、これに伴い網膜血管周囲アストロサイトの異常増殖が生ずる可能性を示した。

こうした増殖性変化に伴う網膜剥離は、臨床的には増殖性糖尿病網膜症 (proliferative diabetic retinopathy: PDR) や増殖性硝子体網膜症 (proliferative vitreoretinopathy: PVR) においてみられる。

糖尿病網膜症においては、持続する高血糖状態により網膜血管内皮細胞周囲の基底膜が分解されて血管内皮細胞が遊走・増殖を始め、新生血管が形成されると考えられている。また Muller 細胞の基底膜である内境界膜も分解され、新生血管が網膜内から硝子体内へ侵入すると考えられる。この新生血管はコラーゲンなどの細胞外マトリックスやグリア細胞、マクロファージ、線維芽細胞など様々な成分を伴って増殖組織を形成する。また増殖組織の形成には多様なサイトカインが関与しており、アストロサイトや Muller 細胞などの網膜グリア細胞はそのサイトカインの発現に広く関与している。糖尿病網膜症に最も関連が深いと言われているサイトカインが血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) であり、グリア細胞により VEGF が放出されると網膜血管透過性が亢進し、血清中のサイトカインが硝子体中に放出されてさらに増殖組織の形成が促進されると考えられている。また近年、PDR 患者の増殖組織中では肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) の発現が増加していることがわかり、HGF は VEGF の分泌を促進すること、グリア細胞の走化性を亢進させることも判明した (Hollborn et al. *Lab Invest.* 2004)。

一方、増殖性硝子体網膜症は網膜剥離や網膜外傷に対する網膜構成細胞の創傷治癒反応に起因して生ずる。通常、創傷治癒過程では網膜グリア細胞が増殖して障害された網膜の機械的な強度を強める。しかし重度の網膜障害により血液網膜関門が破綻すると、血清中のサイトカインが眼内に流入し、網膜色素上皮細胞や網膜グリア細胞の遊走および過剰な増殖が生ずると考えられている。網膜

上や硝子体中に異所性に遊走したこれらの細胞は形質転換により線維芽細胞様の形態をとり、自身も種々のサイトカインを放出しながら増殖組織を形成する。多くのサイトカインの中で特に PVR の病態形成に関わると考えられているのが血小板由来細胞増殖因子 (platelet-derived growth factor: PDGF) であり、網膜色素上皮細胞及びグリア細胞に対して強い遊走・形質転換促進作用を持つと考えられている。また PVR 患者の増殖組織中でも HGF の発現が増加しており、網膜色素上皮細胞の遊走および形質転換を促進させることが判明している (Hinton et al. Eye 2002)。

PDR および PVR の病態形成には多くのサイトカインが関与しているが、おのこの病態に共通して関与していると考えられているサイトカインも存在する。POMGnT1 欠損マウスでみられる線維芽細胞およびアストロサイトの異常増殖にもまたこれらのサイトカインが関与している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

POMGnT1 欠損マウスの網膜でみられる増殖組織において、PDR および PVR の病態形成に関与しているサイトカインの発現について解析し、異所性線維芽細胞およびアストロサイトの異常増殖が生ずるメカニズムの解明を試みた。

## 3. 研究の方法

POMGnT1 欠損マウスは研究協力者である国立精神・神経センター神経研究所のグループにより作成されており (Miyagoe-Suzuki et al. Mec Dev. 2009)、個体の譲渡を受けた。野生型対象として用いる C57BL/6J マウスは日本クレアより購入し、継代飼育を行った。

POMGnT1 欠損マウスは繁殖力が非常に弱く、ヘテロ同士の掛け合わせによってホモの個体を獲得するしかない (ヘテロの個体の表現型は野生型マウスと全く同一である)。ホモの出生率は自施設では 100 匹に 1 匹程度であり、出生後間もなく死亡する個体も少なくなかったため、まずホモの個体を獲得するのに苦慮した。

網膜および硝子体内でのサイトカインの発現および局在を検討するため、VEGF 及び PDGF に対する抗体を用いて免疫組織化学的解析を行った。ホモの個体が 4 週齢となった時点で同週齢の野生型マウスとともに眼球を摘出し、OCT コンパウンド (サクラファインテックジャパン) に包埋し、マイクロトームで 6 ミクロンの無固定凍結切片を作成した。使用した一次抗体は VEGF: abcam(ab46154)、PDGF-A: SCZ(sc-7958)、PDGF-B: SCZ(sc-7878)である。

またサイトカインの発現を定量的に評価するため、網膜及び硝子体組織を採取し ELISA 法を行った。4 週齢の POMGnT1 欠損マ

ウスおよび野生型マウスの網膜及び硝子体組織を溶解バッファーにて溶解し、プロテアーゼ阻害薬を加えて超音波破碎した。溶解物を遠心した後、VEGF、HGF、PDGF の濃度を ELISA キット (R&D Systems) を用いて測定した。

## 4. 研究成果

免疫組織化学染色の結果、POMGnT1 欠損マウスの網膜表面及び硝子体中での VEGF 及び PDGF-A の発現亢進が認められた (図 1-3)。

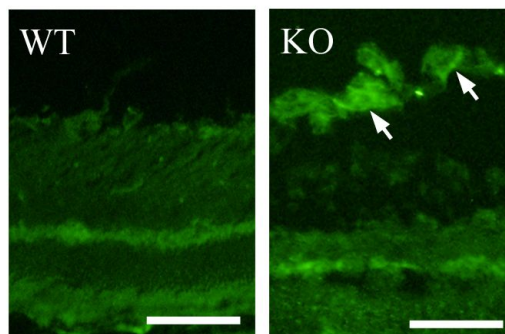


図 1: 野生型マウス及び POMGnT1 欠損マウスの網膜組織における VEGF に対する免疫組織化学染色の結果。POMGnT1 欠損マウスでは網膜面上から硝子体中に伸びる増殖組織において、VEGF の発現が増強している (矢印)。スケールバー: 100μm。

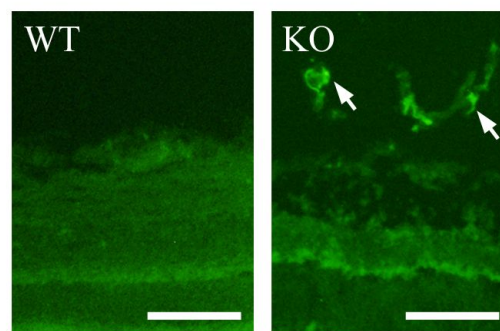


図 2: 野生型マウス及び POMGnT1 欠損マウスの網膜組織における PDGF-A に対する免疫組織化学染色の結果。POMGnT1 欠損マウスでは網膜面上から硝子体中に伸びる増殖組織において、PDGF-A の発現が増強している (矢印)。スケールバー: 100μm。

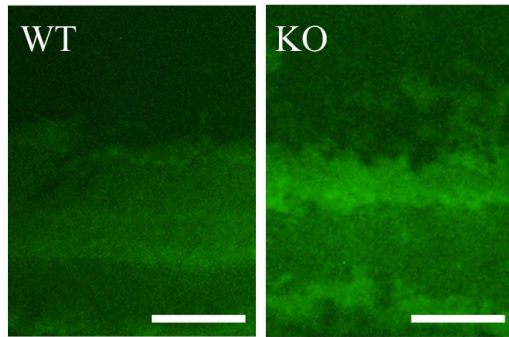


図 3：野生型マウス及び POMGnT1 欠損マウスの網膜組織における PDGF-B に対する免疫組織化学染色の結果。いずれのマウスにおいても、PDGF-B の明らかな発現は認められなかった。

スケールバー：100um。

このことから、POMGnT1 欠損マウスの網膜で生ずるアストロサイトの異常増殖において、PDR 及び PVR と同様のサイトカインが関与している可能性が示唆された。

次に、VEGF、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、HGF の各サイトカインについて ELISA 法を施行したが、マウス個体数が少なく反復した施行が困難であったため、安定した定量を行えるまでに至らなかった。

#### 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 0 件)

〔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

高橋 永幸 (TAKAHASHI, Hisatomo)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：10445801