未熟児網膜症の発症機転における VEGF 受容体2新規下流分子 TSAd の役割

福原大介

杏林大学医学部小児科学教室

【背景と目的】

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ではVEGFにより誘導される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ため、抗VEGF薬の眼内注射による治療が行われつつある。これまで明らかな有害事象は報告されていなかったが、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¹⁾。以上より、抗VEGF薬はその作用の多様性から、発達途上の小児期では副反応を慎重に考慮する必要がある。

最近、我々はノックアウトマウス(KO)を用いた腫瘍モデルにおいて、新規シグナリング系であるVEGF-VEGFR2-TSAd-Src pathwayがVEGF過剰により誘導される血管新生に必須であることを証明した $^{2)}$ 。このことから、TSAdは高VEGF環境下で発症するROPにおいても関与することが予測され、新たな治療標的として期待できる。

【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³⁾。 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を分泌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

クの試料作製を行った。

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、我々が日常的に行っているプロトコールに従い、ホールマウントで免疫蛍光染色した 4)。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 5)。②OIR 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を抽出し、TSAdの動態を、染色、Real-time PCR で観察した。

染色は上記①と同様に内皮細胞を可視化し評価した。 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。

③TSAd constitutive 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、Claesson-Welshらが作製したTSAd constitutive 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。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。

【結果】

プロトコールに従いOIRの作成を行ったところ、中枢側の血管の退縮と硝子体側への血管新生が観察された。無血管野の平均面積の割合は、全体の約14%で、血管新生の割合は約2.8%であった(図1b)。

また、その網膜を材料にRNAを抽出し、VEGF及びTSAdのreal-time PCRで比較したところ、VEGFについては有意な増加が観察された(図1c)。TSAdについては、増加する傾向が観察できたが、統計学的な有意差は見られ

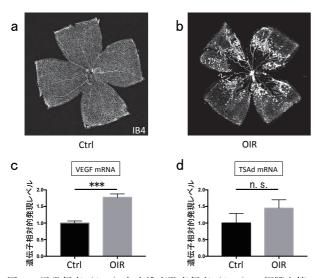


図1 通常飼育 (Ctrl) と高濃度酸素飼育 (OIR) の網膜血管 の比較 (a,b) 各環境下における VEGFと TSAd mRNA の発現量の比 較 (c,d)

なかった (図1d)。

さらに、TSAd KOマウスを用い、同様にOIRマウスを作製し、網膜の血管新生の形態の観察を行った。無血管野についてはWT、KOそれぞれ14.3%、12.7%とKOマウスの方が小さい傾向が観察されたが、統計学的な有意差はなかった(図2)。新生血管については、それぞれ2.8%、3.5%と予測に反し、TSAd KOマウスで促進している傾向が見られたが、こちらも有意差はなかった(図2)。

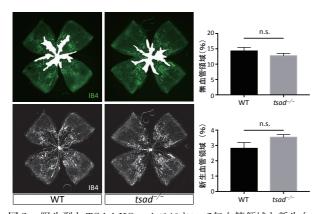


図2 野生型とTSAd KOマウスにおいて無血管領域と新生血 管領域の面積の比較

【考察】

野生型マウスを用いたOIRモデルにおいて有意差はないものの、TSAd mRNAの増加傾向を認め、未熟児網膜症発症に関連することが示唆され、治療標的となる可能性が考えられた。しかし、今回の実験では、有意差は観察できず、その要因として、元々の発現量が極端に少なく、バラツキが大きいことがあげられる。今後さらにサンプル数を増やし検討を行うとともに、タンパクでの検討も行っていく。

TSAd KOマウスを用いたOIRマウスの検討では、無血管野と新生血管という2つのOIR病変に有意差を認めなかった。仮説とはむしろ逆に、無血管野が小さい傾向があり、これは、TSAd KOの方が、正常な血管新生が早く行われていることを意味する。また、異常な新生血管についても促進されていることがうかがわれる。これらの現象が起こる一つの可能性に、KOマウスにおいて、すでに何らかの代償機転が働いている可能性が考えられるため、今後conditional KOマウスを用い、さらなる検討を行っていく。

今回の実験からTSAd欠損により網膜症発症時に他の因子が新たに関わっている可能性があり、そのときに動態が変化している分子の探索を質量解析で調べていく。

Reference

- Morin J, et al. Neurodevelopmental Outcomes Following Bevacizumab Injections for Retinopathy of Prematurity. Pediatrics. 2016
- Gordon EJ, et al. The endothelial adaptor molecule TSAd is required for VEGF-induced angiogenic sprouting through junctional c-Src activation. Sci Signal. 2016
- Connor KM, et al. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. Nat Protoc. 2009
- Koch S, et al. NRP1 presented in trans to the endothelium arrests VEGFR2 endocytosis, preventing angiogenic signaling and tumor initiation. Dev Cell. 2014
- Stahl A, et al. Computer-aided quantification of retinal neovascularization. Angiogenesis. 2009