

氏名	飯田 知子
(ふりがな)	(いいた ともこ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成31年1月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Differential localization of laminin subunits and MMP-9 in mouse retinal angiogenesis (マウス網膜血管新生におけるラミニンサブユニットと MMP-9 の異なる局在様式)
論文審査委員	(主) 教授 池田 恒彦 教授 高井 真司 教授 岡田 仁克

学位論文内容の要旨

《緒言》

基底膜は、皮膚・角膜・肺・消化器官などの上皮組織や、血管内皮組織の細胞層直下に存在する薄膜状の細胞外基質である。血管基底膜はすべての血管に存在し、血管新生において重要な役割を果たす。血管内皮細胞は基底膜を足場として互いに密着して内皮構造を保っている。血管新生は正常な器官発生に加え、糖尿病における増殖網膜症など病態生理的状态においても認められる。これらの病態と新生血管の出現とは密接に関連しているため、血管新生の機構解明は生命科学における研究テーマとしても非常に重要な意味を持つと思われる。

胚発生期の器官形成過程では血管組織のダイナミックな形態変化が起こっており、基底膜の構成も大きく変化すると考えられる。しかし、血管発達時の基底膜の詳細な変化はいまだ明らかにされていない。

本研究では、出生後に血管が形成されるマウス新生仔網膜における血管網形成を生理的な血管新生モデルとし、血管新生時の血管内皮細胞と基底膜の関係性および基底膜の形態や組成の変化を詳細に観察した。

《方法》

生後 5～7 日目の新生仔マウス網膜のホールマウントを様々な抗体を使用して免疫組織化学染色を行い共焦点顕微鏡にて観察した。

基底膜の主要な構成タンパク質の局在を確認するため、抗ラミニン、抗ニドジェン-1、抗パールカン、抗IV型コラーゲン抗体を免疫染色に使用した。血管周囲に存在するペリサイト存在を調べるため抗 NG-2 抗体を使用した。基底膜を分解する酵素の局在を確認するため抗 MMP-9 抗体を使用した。血管内皮細胞はアイソレクチン B4 を使用して染色した。

ラミニンサブユニットの局在については、ラミニン全体の局在を可視化するために大半のラミニンアイソフォームを認識する抗ラミニンポリクローナル抗体を使用した。同時にラミニンサブユニットを特異的に認識する抗ラミニン α 4 および α 5 モノクローナル抗体を使用し、網膜血管の先端と起始部におけるそれぞれのサブユニットの免疫染色の蛍光強度を定量化して比較した。

《結果と考察》

新生仔マウス網膜では、血管は網膜中心部の視神経乳頭から進入し、辺縁部に向かって血管網を形成しながら放射状に進展する。形成された血管網は次第に統合・整理され、放射状の主要な血管から階層的な分枝構造へとリモデリングされる。この形成期の血管の先端部に着目し、詳細に解析した。

基底膜を構成するタンパク質の免疫染色では、血管起始部から伸長先端に位置するtip細胞まで染色が見られた。検討した4種類の基底膜タンパク質はいずれも同様の局在を示したことから、ダイナミックに移動や形態変化をおこす伸長先端のtip細胞の周囲においても基

本的な構造をもった基底膜が形成されていることが分かった。しかし、tip細胞から伸びるフィロポディアは、アイソレクチンB4では染色されるが、基底膜を構成するタンパク質の抗体では染色されないことが分かった。つまりtip細胞から伸長するフィロポディアには局所的に基底膜がないことが示唆された。

基底膜の構成タンパク質のラミニンにはいくつかのアイソフォームが存在する。その発現は組織ごとに異なり、特に α 鎖の組成は特徴的である。血管基底膜はラミニン α 4と α 5が発現していることが知られており、本研究でもそれらの局在を免疫染色にて確認した。ラミニン α 4特異的抗体による染色では網膜血管基底膜の起始部からtip細胞まで全長にわたって染色されたのに対し、ラミニン α 5は血管起始部では染色されるが先端部分では染色が弱いことが分かった。このことより、ラミニン α 5は先端部の伸長には関与せず、成熟血管に存在し血管の安定化に関係していることが示唆された。一方ラミニン α 4はtip細胞を含む血管内皮細胞に必須な役割を果たしていることが示唆される。

血管新生は血管基底膜の分解により促進されることが分かっており、基底膜分解酵素マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) のうち基底膜分解に関与するとされている MMP-2, 3, 9 に対する抗体を用いた免疫染色を行った。そのうち MMP-9 のみが網膜血管の血管壁に沿って染色された。また網膜血管より先の辺縁部にも網目状に染色が認められた。網膜辺縁部の網目状の染色は、先行研究で報告されている血管新生前のアストロサイトネットワークの網状構造に類似していた。このことより、アストロサイトと血管の相互作用において MMP-9 が関係していることが示唆された。MMP-9 が血管新生に関与していることは複数の報告があるが、マウス網膜血管の生理的な発達において MMP-9 の関与が示唆されたのは新たな知見である。

《結論》

血管新生における血管内皮細胞や基底膜の形態について様々な研究が行われているが、未だ分子生物学的な詳細は明らかにはなっていない。本研究により、正常な新生血管時の基底膜の局在、基底膜構成蛋白質のラミニンの局在、蛋白質分解酵素 MMP-9 の局在が明

らかになった。

血管新生は正常な器官発生に加え、糖尿病における増殖糖尿病網膜症やがん細胞への血管浸潤など病理生理的状態においても密接に関連しており、本研究結果がその治療にも発展することが期待される。

論文審査結果の要旨

血管基底膜はすべての血管に存在し、血管新生において重要な役割を果たす。血管新生は正常な器官発生に加え、糖尿病における増殖糖尿病網膜症などの病理生理とも密接に関連しており、血管新生の機構解明がその治療にも発展すると思われる。

血管はダイナミックな組織であり、周囲の微小環境の変化に応じて血管新生や退縮などの形態変化をおこす。このとき基底膜にも細胞と協調した形成・分解などの変化がおこると考えられるが、その変化の分子的な詳細は明らかとなっていない。

申請者らは、出生後に血管網が形成されるマウス新生仔網膜における血管網形成を生理的な血管新生モデルとし、血管新生やリモデリング時の基底膜の形態や組成の変化を詳細に観察し報告している。

基底膜タンパク質抗体の免疫組織学的解析の結果、基底膜は新生血管の先端に位置する tip 細胞の周囲にも存在することが確認された。一方 tip 細胞の先端から突出したフィロポディア様突起の大半は基底膜を持たないことも確認された。これらの結果から、申請者らは血管基底膜の形成と分解が伸長先端に位置する tip 細胞において重要な役割を果たしているとの考察を示している。

基底膜の基本構成タンパク質の一種であるラミニンのサブユニット局在パターンには、網膜の中心と先端とで異なっていた。網膜血管起始部の基底膜にはラミニン $\alpha 4 \cdot \alpha 5$ が局在するが、網膜血管先端の基底膜ではラミニン $\alpha 4$ のみが局在することが確認された。このことより、ラミニン $\alpha 5$ は成熟血管に存在し血管の安定化に関係し、一方ラミニン $\alpha 4$ は tip 細胞を含む血管内皮細胞に必須な役割を果たしていることが示唆される。

また、申請者らはマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は血管周囲の基底膜を分解することにより血管新生を促進することが知られており、そのうち、基底膜構成因子を分解する活性を持つ MMP-9 が血管壁に沿って局在することを見出している。また網膜血管より先の辺縁部にも MMP-9 が網目状に染色され、血管新生前のアストロサイトネットワークの網状構造に類似することも明らかにしている。このことより、アストロサイトと血管の相互作用において MMP-9 が関係していることが示唆された。網膜血管の生理的な

発達過程における、MMP-9 の局在はこれまで報告されていなかった新たな知見である。

今回の研究で明らかにされた基底膜タンパク質の局在パターンや基底膜分解酵素 MMP-9 局在についての知見は、様々な病態に関わる血管新生の機序を明らかにする手がかりとなることが期待される。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

（主論文公表誌）

Bulletin of the Osaka Medical College 64(1-2): 2018, in press