



Title	病的血管新生の形成・退縮過程に関する遺伝子発現の経時的解析
Author(s)	
Citation	令和6（2024）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2025
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/101272
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

令和6年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	なかがわ ことね 中川 采音		学部 学科	医学部保健学 科	学年	3年
ふりがな 共 同 研究者氏名			学部 学科		学年	年
						年
						年
アドバイザー教員 氏名		辻川 元一	所属	医学系研究科保健学専攻		
研究課題名		病的血管新生の形成・退縮過程に関わる遺伝子発現の経時的解析				
研究成果の概要		研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

【概要】

血管新生は疾患においても重要な役割を果たす。糖尿病網膜症は異常な血管新生により失明に至る。私はこの血管新生がどのように出来上がって、なぜ、異常な血管となって失明に至らすのかに興味を持った。ヒトの糖尿病網膜症においてはひとたび異常血管が形成されると自然に退縮することはない。一方、網膜症モデルマウスでは自然に異常血管が退縮する。こうした種差を理解し、モデルマウスで起きていることを人で再現することができれば、新たな治療法に繋がる可能性があると考えた。

【方法および結果】

本研究では、作成した酸素誘導性網膜症(oxygen-induced retinopathy; OIR)モデルマウスから、眼球のうち網膜サンプルを採取して、遺伝子発現を経時的に解析した。あわせて、網膜のフラットマウント染色により観察した血管形態を参照し、血管新生・血管退縮の時期と遺伝子発現との関わりを検討した。

1. サンプル採取と RNA 抽出

①OIR モデルマウスの作成(引用[1])

新生仔マウスでは出生後から視神経乳頭から網膜周辺に向かって血管新生がおこる。およそ生後 7 日目までに網膜表層の血管網が形成され、生後 1 ヶ月で網膜深層・中間層の血管が構築され、成熟する。OIR モデルでは、まず新生仔マウスを生後 7 日(表層血管が完成した時期)から 12 日まで 75%酸素下で飼育し一旦完成した毛細血管を脱落させる。その後、通常大気下(20% 酸素)に戻すことで相対的に無血管領域ができた網膜は虚血に陥り、tufts とよばれる網膜外に突出する異常血管が形成される。異常血管は生後 17 日頃が最大で、その後は自然に退縮するとともに無血管領域にも血管再生がおこる。この OIR モデルマウスは糖尿病網膜症でみられる異常血管新生のモデルとして用いられる。本研究では、生後 7 日、12 日、15 日、17 日、25 日の OIR モデルマウスを解析した。

②OIR モデルマウス網膜の血管形態の観察

各時期の OIR モデルマウスの片眼を摘出し、網膜カップを作成した。この網膜に対して血管内皮細胞を抗 CD31 抗体で標識し、ホールマウント蛍光免疫染色を行った。網膜フラットマウント標本を作成し、蛍光スペクトルを取得できる共焦点レーザー走査顕微鏡 LSM980 with Airyscan2 Multiplex(Carl Zeiss)を用いてイメージングを行った。網膜の一部をタイリング法で撮影し、網膜全体像として再構築した。各時期の網膜の無血管領域、新生血管の変化を図 1 に示す。

図 1

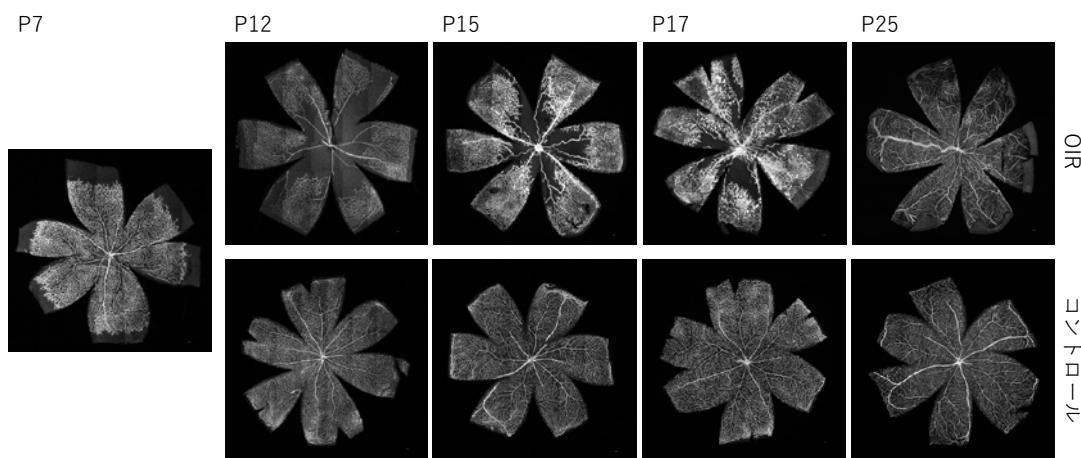


図 1：生後 7 日 (postnatal day 7; P7) から生後 25 日 (P25) までの OIR モデルマウス網膜および正常網膜のホールマウント免疫染色画像。抗 CD31 抗体で網膜血管を標識してある。OIR(上段)では、P12 では視神経乳頭周囲を中心として毛細血管が脱落している。P15 から P17 にかけて近位の動脈・静脈の拡張が顕著となり、無血管網膜の周囲に tufts とよばれる硝子体側に突出する異常血管新生がみられる。その後、異常新生血管は自然退縮するとともに無血管領域に血管網が再生される (P25)。正常網膜と比較すると階層構造が不整であるが、さらに経過すると正常と同等の構造を呈する。

2. 網膜の RNA 抽出と定量 PCR による遺伝子発現量解析

①RNA 抽出

各時期の OIR モデルマウスの摘出した網膜(各時期 N = 3 眼)から RNA 抽出を行った。まず、内因性 RNase を不活性化させる目的で採取した網膜を RNA later に保存し、RNA 分解を防止した。つづいて、Lysis buffer を加え、組織をホモジナライズした。RNA 抽出は、Maxwell® RSC を用いたビーズ抽出法で行った。ビーズに結合した RNA を溶出した後、RNA 濃度 (ng/μl) を NanoDrop 分光光度計で測定し、十分量回収できていることを確認した。この RNA サンプルは、視細胞、双極細胞、アマクリン細胞、神経節細胞、アストロサイト、血管内皮細胞、周皮細胞など網膜を構成する細胞全体の遺伝子発現を反映する。

②逆転写 PCR (Reverse transcriptional PCR) と定量 PCR

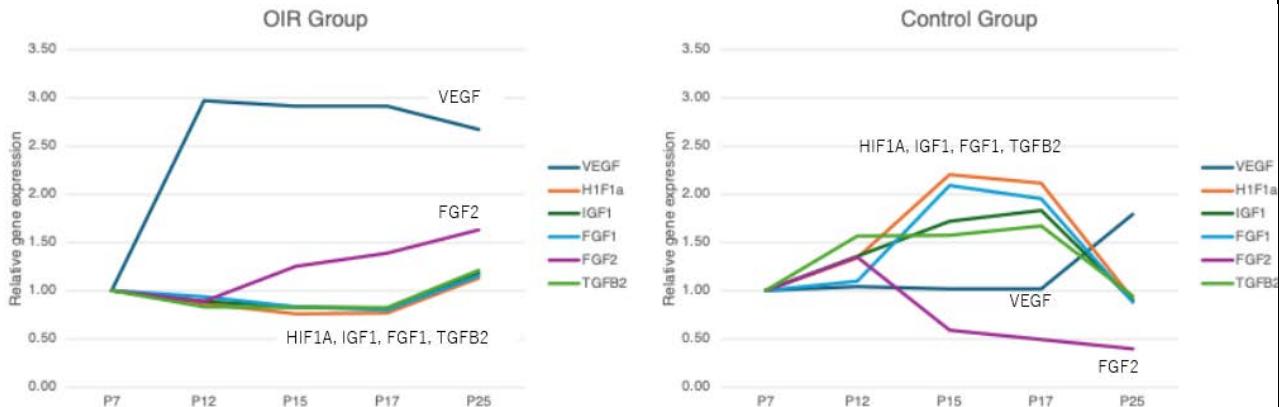
逆転写酵素を用いて RNA から相補的 DNA (complementary DNA) を合成した。逆転写後、RNase を添加して残存 RNA を除去した。つづいて、cDNA サンプルから、血管新生に関わる遺伝子群として低酸素誘導因子 (HIF1 α)、インスリン様成長因子 (IGF1)、線維芽細胞増殖因子 (FGF1)、線維芽細胞増殖因子 (FGF2)、トランスフォーミング成長因子 (TGF β 2)、 β -アクチン、血管内皮増殖因子 (VEGF) の 7 種の遺伝子発現量を解析した。遺伝子発現量の測定には、インターラント法を採用している。 β -アクチンをハウスキーピング遺伝子として、各遺伝子の発現量を補正した。プライマーの塩基配列は以下の表 1 に示す。

表 1

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
<i>vegf</i>	5' -GTACCTCCACCATGCCAAGT-3'	5' -GCATTCACATCTGCTGTGCT-3'
<i>actb2</i>	5' -GGCTGTATTCCCCCTCCATCG-3'	5' -CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'
<i>hif1a</i>	5' -CCTGCACTGAATCAAGAGGTTGC-3'	5' -CCATCAGAAGGACTTGCTGGCT-3'
<i>igf1</i>	5' -GTGGATGCTCTTCAGTTCTGCTG-3'	5' -TCCAGTCTCCTCAGATCACAGC-3'
<i>fgf1</i>	5' -CCAAGGAAACGTCCACAGTCAG-3'	5' -ACGGCTGAAGACATCCTGTCTC-3'
<i>fgf2</i>	5' -CAACCGGTACCTTGCTATGA-3'	5' -TCCGTGACCGGTAAGTATTG-3'
<i>tgfb2</i>	5' -TTGTTGCCCTCCTACAGACTGG-3'	5' -GTAAGAGGGCGAAGGCAGCAA-3'

2 群における各遺伝子の発現量の経時変化を図 2 に示す。OIR では、相対的な虚血を生じた P12 に VEGF 発現が顕著にあがり、その後も高い発現量を維持する。異常新生血管が退縮する時期には徐々に減少傾向がみられた。一方、FGF2 は P12 から P25 にかけて緩やかに発現は上昇し。他の遺伝子は異常新生血管が退縮し、虚血網膜に血管が再生される時期に発現上昇がみられた。コントロール群では、網膜の中間層・深層血管ができる P12-17 にかけて、HIF1a, IGF, FGF1, TGFB2 が上昇するが、VEGF は P25 に発現が高くなかった。対照的に FGF2 は表層血管が完成して以降、発現は低下した。

図 2



【考察】

本研究では、解析を行った遺伝子群はいずれも、血管新生に関わることがよく知られている。VEGF は血管透過性や血管新生を強力に促進する因子で、HIF1 α によって発現を誘導される [5]。HIF1A は低酸素で発現上昇し、低酸素により応答する多数の遺伝子の発現を制御する転写因子である[6][7]。

IGF1 も VEGF の発現を増加させる役割をもつ。FGF 1 および 2 は、虚血による発現誘導をうけず VEGF とは独立した血管新生促進因子である。TGFb2 は血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の増殖や分化に寄与する。また、チロシンキナーゼ受容体を介した経路で内皮細胞に作用する VEGF とは異なり、Ser/Thr キナーゼ受容体を介した経路でシグナルを伝達することが報告されている。

本研究では、OIR における異常血管新生と血管退縮、虚血領域への血管再生、正常発生における血管新生と成熟の各時期における遺伝子発現を解析した。OIR でみられる異常血管新生の時期に VEGF が上昇することは既報と一致する。一方、FGF2 が異常血管新生から血管再生までの期間で継続して上昇することはこれまでに明らかにされていなかった新たな知見である。また、HIF1 α , IGF1, FGF1, TGF β 2 は、血管再生の時期に発現の上昇がみられた。つまり、異常血管新生と血管再生を制御する遺伝子は異なることが示唆された。さらに、OIR 群とコントロール群を照らし合わせると、HIF1 α , IGF1, FGF1, TGF β 2 は類似の発現パターンを示すこと、VEGF と FGF は異なる発現パターンをもつこと、そして VEGF と FGF は対照的な発現パターンをとること、が明らかになった。特に、VEGF と FGF は相補的ともいえる経時変化を示しており、独立したシグナル伝達経路であるが互いにクロストークして、異常血管新生と血管退縮、血管再生の制御に関与している可能性がある。

今回は、単一実験での結果での評価であったため、再現性について検証を進めたい。異常血管新生から網膜内への血管再生時期に発現が増加していく遺伝子 FGF2 の役割と、FGF の VEGF の発現バランスの意義などを検討することで、ヒト網膜症での課題を解決する治療法に繋がることが期待される。

参考文献

- [1] Andreas Stahl, Kip M Connor, Przemyslaw Sapieha, Jing Chen, Roberta J Dennison, Nathan M Krah, Molly R Seaward, Keirnan L Willett, Christopher M Aderman, Karen I Guerin, Jing Hua, Chatarina Löfqvist, Ann Hellström, Lois E H Smith; The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Jun;51(6):2813-26. doi: 10.1167/iovs.10-5176.
- [2] G S Robinson, E A Pierce, S L Rook, E Foley, R Webb, L E Smith; Oligodeoxynucleotides inhibit retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 May 14;93(10):4851–4856. doi: 10.1073/pnas.93.10.4851
- [3] L P Aiello 1, E A Pierce, E D Foley, H Takagi, H Chen, L Riddle, N Ferrara, G L King, L E Smith; Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Nov 7;92(23):10457-61. doi: 10.1073/pnas.92.23.10457.
- [4] Marcus Fruttiger; Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis.* 2007;10(2):77-88. doi: 10.1007/s10456-007-9065-1.
- [5] 吉富徹, 吉本敬太郎; 血管内皮増殖因子(VEGF)受容体を認識する核酸アプタマー. *BUNSEKI KAGAKU* Vol. 73, No. 3, pp. 71-78 (2024)
- [6] 池田栄二; 低酸素刺激による血管系の改築と疾患. *山口医学 第58巻 第4号 137~142頁, 2009年*
- [7] 武田憲彦; 低酸素誘導因子(HIF)と循環器疾患. *日本循環器学会専門医誌 循環器専門医 30巻*