



Title	Sema3E-PlexinD1 signaling selectively suppresses disoriented angiogenesis in ischemic retinopathy in mice
Author(s)	福嶋, 葉子
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59069
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【94】			
氏 名	福 嶋 葉 子		
博士の専攻分野の名称	博 士 (医学)		
学 位 記 番 号	第 2 5 1 4 0 号		
学 位 授 与 年 月 日	平 成 24 年 3 月 22 日		
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当		
	医学系研究科外科系臨床医学専攻		
学 位 論 文 名	Sema3E-PlexinD1 signaling selectively suppresses disoriented angiogenesis in ischemic retinopathy in mice (Sema3E-PlexinD1 シグナルは虚血性網膜症における異常新生血管を選択的に抑制する)		
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 西田 幸二 (副査) 教 授 熊ノ郷 淳 教 授 不二門 尚		

論 文 内 容 の 要 旨

- [目 的]
- 発生期網膜では新生血管が網膜表層を整然と伸長する一方で、虚血性網膜症では新生血管が網膜外に逸脱して伸長する。発生期と同様に、虚血網膜内に血管新生を誘導することができれば、網膜血管網を再生する根治的治療法の開発に繋がると思われる。網膜新生血管の伸長方向は、内皮細胞が形成する糸状仮足により規定されることが明らかとなっているが、特に、可溶性リガンド分子semaphorin 3E (Sema3E) は膜貫通型受容体PlexinD1に結合し、内皮細胞の糸状仮足形成を抑制する。本研究では、発生期網膜および虚血性網膜症の血管新生におけるSema3E-PlexinD1シグナルの役割について検討した。
- [方法ならびに成績]
- マウス網膜血管発生における*Vegf*および*Plxnd1*遺伝子の発現をホールマウント*in situ* hybridization (ISH)法を用いて検討した。*Vegf*は新生血管周囲のアストロサイトに強く発現する一方で、*Plxnd1*は新生血管の内皮細胞に発現していた。VEGF受容体蛋白の眼内投与によりVEGFシグナルを阻害すると*Plxnd1*の遺伝子発現が低下することから、血管内皮細胞ではVEGFシグナルがPlexinD1の発現を誘導することが示唆された。
- 次いで網膜血管発生におけるPlexinD1およびVEGFシグナルの役割を調べるため、各々の受容体蛋白を新生仔マウスの眼内に投与し、内在性リガンド分子を中和した。VEGFシグナルの阻害により網膜血管内皮細胞の糸状仮足形成が抑制されたのに対し、PlexinD1シグナルの阻害により糸状仮足の数および長さが有意に増加した。これらの結果から、網膜血管発生ではPlexinD1シグナルがVEGFシグナルに拮抗して内皮細胞の糸状仮足形成を抑制すると考えられた。
- 新生仔マウス網膜では新生血管に近接する神経節細胞が*Sema3e*遺伝子を発現すること、さらに*Sema3e*遺伝子欠損マウスの網膜では血管が神経節細胞層に迷入することから、網膜表層におけるSema3E蛋白の拡散が新生血管の伸長方向を規定すると考えられた。

マイクロアレイ法およびISH法により網膜新生血管の内皮細胞に発現する遺伝子を網羅的に解析した結果、低分子量G蛋白質*RhoJ*遺伝子が*Plxnd1*遺伝子と同様の発現パターンを示すことが確認された。培養ヒト血管内皮細胞や新生仔マウス網膜血管内皮細胞で*RhoJ*を過剰発現させると、内皮細胞の収縮に伴うmembrane blebbing現象が観察された。培養ヒト血管内皮細胞では、Sema3E刺激による細胞収縮が*RhoJ*遺伝子ノックダウンにより解消されることに加え、Sema3Eが*RhoJ*を活性化することから、*RhoJ*はSema3E-PlexinD1シグナルの下流で内皮細胞の糸状仮足形成を抑制するシグナル伝達分子であると考えられた。

次に、虚血性網膜症モデルマウスを用いて、網膜外に逸脱して伸長する異常血管新生の成因を解析した。虚血網膜では主に神経細胞が*Vegf*遺伝子を発現することが確認された。また、*Sema3e*遺伝子が神経節細胞に発現するのに対し、*Plxnd1*および*RhoJ*遺伝子の発現は異常新生血管の内皮細胞に局限していた。これらの結果から、神経節細胞由来のSema3E蛋白が、異常新生血管に発現するPlexinD1受容体に結合して*RhoJ*を活性化すると考えられた。

続いて、タモキシフェン投与により*Plxnd1*ないし*Vegfr2*遺伝子が不活化されるコンディショナルノックアウトマウスを用いて虚血性網膜症モデルを作成した。*Vegfr2*遺伝子の不活化では異常新生血管が消失するのに対し、*Plxnd1*遺伝子の不活化では異常新生血管が増加した。一方、虚血性網膜症モデルマウスにて*RhoJ*遺伝子を過剰発現させると異常血管新生が減少することから、Sema3E-PlexinD1-RhoJシグナルはVEGFシグナルに拮抗して異常血管新生を抑制すると考えられた。

最後に、虚血性網膜症モデルマウスの血管内皮細胞に発現するPlexinD1を分子標的としてSema3E合成蛋白を眼内に投与したところ、濃度依存的に異常血管新生が抑制された。しかしながら、網膜内に伸長する新生血管はPlexinD1を発現しないため、網膜血管再生に対する抑制効果は認められなかった。一方、VEGFシグナルの阻害では、網膜血管再生が抑制される結果、広範な無血管領域が形成された。

〔 総 括 〕

発生期網膜では神経節細胞から分泌されるSema3Eが血管内皮細胞のPlexinD1に結合し、*RhoJ*を活性化することによって糸状仮足の形成を抑制する。その結果、新生血管の伸長方向が規定され、網膜表層に血管網が形成される。一方、虚血性網膜症ではPlexinD1および*RhoJ*が異常新生血管に局限して発現することを利用し、Sema3E眼内投与にて網膜外に逸脱する血管新生を選択的に抑制することができた。本研究の成果は、虚血性網膜症における血管再生療法の開発に応用されることが期待される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

未熟児網膜症や糖尿病網膜症に代表される虚血性網膜症は先天失明および中途失明の上位を占める疾患群である。この虚血性網膜症に起因する病的血管新生は虚血を改善しない上、出血や網膜剥離につながり失明の原因となりうる。本論文ではSema3E-PlexinD1シグナルが病的血管新生を選択的に抑制し、さらに低分子量G蛋白である*RhoJ*が細胞内シグナル伝達分子として働くことを明らかにした。これまで神経軸索のガイダンス分子として知られていたSema3E-PlexinD1シグナルが、網膜では発生期および疾患モデルのいずれにおいても新生血管の伸展方向を規定する重要なシグナルであることを初めて示したものである。

現在、臨床で行われている抗VEGF薬投与は非選択的に血管新生を抑制するのに対し、Sema3E-PlexinD1シグナルの制御は病的血管を標的とした選択性の面で非常に優れており、理想的な治療すなわち病的新生血管の抑制ならびに虚血領域へ機能的血管再生の誘導につながる特筆すべき一歩である。この結果は臨床系医学雑誌におけるトップジャーナルであるThe Journal of Clinical Investigationに掲載されており、学位論文に値するものと認める。