

氏名(本籍)	岡 本 平
学位の種類	医学博士
学位記番号	医 第 2232 号
学位授与年月日	平成 2 年 9 月 12 日
学位授与の条件	学位規則第 5 条第 2 項該当
最終学歴	昭和 49 年 3 月 25 日 三重大学農学部農芸化学コース卒業
学位論文題目	家兔眼組織の血管新生因子と抑制因子

(主 査)

論文審査委員	教授 豊田隆謙	教授 阿部圭志
	教授 玉井 信	

論文内容要旨

【目的】

血管新生は腫瘍の転移、創傷治癒、糖尿病性網膜症等の疾患時に生じるが、その原因には血管新生促進因子の遊離が考えられている。糖尿病性網膜症では網膜より硝子体中に血管新生因子が遊離することが報告されているが、硝子体中には血管新生抑制因子の存在も報告されており、疾患時にはこれら両因子が変化することにより血管新生が促進されることが考えられる。本研究では糖尿病性網膜症の基礎的研究として、家兎眼組織中に存在する血管新生因子と抑制因子について実験を行い、さらに家兎に糖尿病を発症させ、病態時における血管新生抑制因子の変化について検討した。

【方法】

in vivoにおける血管新生作用の検討には、鶏の受精卵を用いた、chorioallantoic membrane (CAM) 法を用いた。in vitroに於ける血管新生作用の検討には、家兎末梢血管内皮細胞、牛肺動脈血管内皮細胞を用いた。家兎眼組織を摘出後、各組織を分離し、1 mlのphosphate buffer (PBS) を加えて、室温にて3時間置き組織抽出物とした。家兎末梢血管内皮細胞は、家兎耳介をトリプシンで灌流し調製した。牛肺動脈血管内皮細胞は、大日本製薬より購入した。前房穿刺は局所麻酔剤点眼後、27G注射針を用いて行った。家兎糖尿病はアロキササン120mg/kgを静脈投与することにより作製した。活性の測定はGrowth Index (GI%) として以下の式により求めた。 $GI = \text{試料添加群の細胞数} / \text{PBS添加群の細胞数} \times 100$

【結果】

①眼組織中血管新生促進因子；CAM法において網膜抽出物 (RE) 添加群では、1 $\mu\text{g}/\text{filter}$ から有意な血管新生の促進が認められ、10 $\mu\text{g}/\text{filter}$ まで濃度依存的に作用の増強が認められた。しかし、100 $\mu\text{g}/\text{filter}$ ではさらに増強されることはなかった。網膜以外の眼組織について検討した結果、血管新生作用は虹彩一毛様体、視神経に認められ、硝子体など他の組織中には認められなかった。各種臓器についても検討したが、眼組織以外 (心、肝、腎、血管、血清) には作用が認められなかった。家兎耳介より血管内皮細胞を調製し、血管内皮細胞に対する作用を検討した結果、REは内皮細胞の増殖、Thymidineの取り込み及び細胞蛋白質に対して、それぞれ濃度依存的に増加させた。しかし線維芽細胞、平滑筋細胞等種々の細胞種に対してもその増殖を促進させた。そこで血管内皮細胞の増殖を指標に本因子の部分精製を試みた。アセトン沈澱後、本因子は

へパリンに吸着し、NaCl0.5~1.5Mで溶出された。部分精製した因子は血管内皮細胞にのみ作用し、他の細胞種には作用しなかった。本因子は56°C10分間の熱処理で約60%失活し、アルカリ処理で不安定であった。ゲル濾過法で分子量を推定したところ約150KDであった。②眼組織中血管新生抑制因子；眼組織中には水晶体と房水に血管新生抑制因子が存在した。そこで房水中血管新生抑制因子について検討し、家兎に糖尿病を惹起させ本因子の変化について検討した。房水は血管内皮細胞に対しては、その増殖を抑制したが、線維芽細胞、3T3細胞に対しては増殖を促進させた。内皮細胞に対する作用は房水添加10%で約50%増殖が抑制され、20%以上の添加で最大に達した。前房穿刺24時間後房水中の活性は消失し増殖は促進されたが、3、7日後には再度抑制活性が出現した。房水中抑制活性は温度処理に対しては、56°C10分間の処理では殆ど失活しなかったが、80°Cでは35%が失活した。又pH処理に対しては、酸性側では約50%が失活し、アルカリ側では殆ど失活した。糖尿家兎において房水中抑制活性を検討したところ、糖尿発症3、11日目では活性の消失は認められなかったが、30日以上では消失した。一部の家兎ではアロキサン投与後一過性に血糖値が上昇したが、その様な家兎では血糖上昇後20~30日後に活性の消失が認められ、血糖が正常に戻った20~30日後に再度抑制活性が認められた。CAM法において血管新生抑制作用を検討したところ、房水単独では正常、糖尿病いずれも作用は認められなかったが、REと一緒に添加すると、REの血管新生促進作用を、正常家兎房水は有意に抑制したが、糖尿家兎房水ではその作用が減弱していた。さらにin vitroにおいてREに対する作用を検討したところ、正常家兎房水はREの増殖作用を有意に抑制したが、糖尿家兎房水は高濃度RE添加時にのみ僅かに抑制した。

【考 察】

家兎眼組織中には血管新生促進因子と抑制因子が存在していた。新生因子は網膜、虹彩一毛様体、視神経に存在し、抑制因子は房水と水晶体に存在した。糖尿病家兎では房水中抑制活性の低下が認められることから、糖尿病性網膜症の発症原因には、血管新生促進因子が遊離される他に、血管新生抑制因子の活性の低下も原因の1つと考えられた。

審査結果の要旨

網膜における血管新生は網膜中の血管新生因子、および硝子体中の血管新生抑制因子により制御されることが想定されている。本研究の目的は糖尿病性網膜症における血管新生の機序を明らかにすることである。実験1では鶏受精卵を用いたchorioallantoic membrane (CAM) 法により、in vivoにおける家兎網膜の血管新生作用を検討した。またin vitroにおける血管新生作用として、家兎末梢血管およびウシ肺動脈の培養内皮細胞増殖に対する影響を検討した。家兎眼組織を摘出後、各組織を分離し、1 mlのリン酸緩衝液 (PBS) で3時間室温に静置し、これを組織抽出物とした。実験2ではアロキサン (120mg/kg体重を静注) 糖尿家兎の前房水における血管新生抑制作用をCAM法、および培養血管内皮細胞増殖に対する作用の面から検討した。

実験1—家兎眼組織中血管新生促進因子

CAM法において網膜抽出物添加により、血管新生の有意な促進を認めた。これは抽出物100 μ g/filter添加まで、用量依存性であった。網膜以外の眼組織では、虹彩—毛様体、視神経でも同様の作用を認めた。しかし眼組織以外の各臓器 (心、肝、腎、血管、血清) にはこのような作用を認めなかった。いずれの培養血管内皮細胞に対しても、網膜抽出物は濃度依存性に増殖を促進した。しかし線維芽細胞・血管平滑筋細胞にも同様に作用した。この抽出物のアセトン沈澱分画をヘパリンに吸着し、NaCl 0.5—1.5Mで溶出された部分精製分画は血管内皮細胞に特異的に作用した。この増殖因子は56°C10分間の熱処理で60%が失活し、アルカリ処理に不安定であり、分子量約150KDであった。

実験2—眼組織中血管新生抑制因子

実験1の眼組織の血管新生に対する作用の検討のなかで、水晶体と房水に抑制作用を認めた。そこで糖尿病家兎の前房水における血管新生抑制作用を検討した。正常家兎前房水はCAM法による網膜抽出物の血管新生作用を抑制し、培養血管内皮細胞増殖を抑制した。一方、培養線維芽細胞・3T3細胞の増殖を促進した。前房水の血管新生抑制作用は酸・アルカリ処理で失活した。また56°C10分の熱処理に安定で、80°Cの処理で35%が失活した。これに対して糖尿病家兎前房水ではこのような作用が減弱～消失していた。作用の低下は糖尿病発症20～30日後にみられた。

以上のことから家兎眼組織には①網膜に代表される血管新生因子、および前房水に代表される抑制因子 (血管内皮細胞に特異的) が存在すること、②糖尿病では血管新生抑制因子の作用が減弱～消失することが明らかにされた。このことより糖尿病性網膜症の新生血管出現には血管新生促進因子の遊離と共に、抑制因子の活性低下が関与することが示唆された。

このように本研究では糖尿病性網膜症における重要な新知見が明らかにされ、学位に値するものと考えられる。