

# 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	横田陽匡
<b>学位論文題目</b>			
Role of prorenin in the pathogenesis of retinal neovascularization (網膜血管新生におけるプロレニンの関与)			
<b>共著者名</b>			
高宮 央			
長岡 泰司			
森 文彦			
引地 泰一			
北谷 智彦			
石田 雄一			
鈴木 文昭			
吉田 晃敏			
未公表			
<b>研究目的</b>			
<p>増殖糖尿病網膜症は、我が国の中途失明原因の第一位と多く、未熟児網膜症は、極低出生体重児や超低出生体重児の生命予後の向上により、増加傾向にある。これら2つの疾患は網膜血管新生という共通の特徴を有し、難治性で、しかも既存の光凝固術や硝子体手術には限界があり、血管新生そのものの抑制が究極の目標である。</p> <p>近年になり、増殖網膜症にレニン-アンジオテンシン系の関与が報告されている。しかしながら、増殖糖尿病網膜症では、レニン-アンジオテンシン系の律速段階反応を司るレニンの濃度が血中や組織中で低下していることや、レニンの前駆体であるプロレニンの濃度が上昇することが知られており、これらの事象は従来のレニン-アンジオテンシン系の概念では説明できず、増殖網膜症におけるレニン-アンジオテンシン系の活性のメカニズムは解明されていない。</p> <p>最近、レニンの前駆体として考えられていたプロレニンが、生体内でレニン様活性を発揮し、この活性化にプロセグメント内の "handle" regionが重要な役割を果たしていることが報告された。さらにこの活性はプロレニンの "handle" region の配列を有するペプチドにより阻害されることが判明した。</p> <p>そこで本研究では、網膜血管新生を発症する未熟児網膜症マウスに、上述の "handle" region 有するペプチドを作製し、投与した。その際に血管新生を定量し、血管新生促進因子の変化を検討し、プロレニンが網膜血管新生に関与しているか否かを検討した。</p>			

## 材 料

### ペプチドの作成

マウスプロレニン（以下プロレニン）の "handle" region を含むペプチド (handle region peptide, HRP) を合成した。

## 方 法

### 1. HRPのプロレニンに対する特異性の証明

HRP以外に "handle" region を含まない2種類のペプチド {TFER および MTRLSAE} を合成し、HRPを含めた3種類のペプチドを用いた。プロレニンとマウスレニン（以下レニン）をSDS-PAGE電気泳動後、PVDF膜に転写した。転写された膜を(1) 抗HRP抗体+HRP, (2) 抗 HRP 抗体+TFER, (3) 抗 HRP 抗体+MTRLSAE, (4) 抗 HRP 抗体+ペプチド (-) の4方法で免疫反応を観察した。またプロレニンとレニンの転写された膜に対し家兎抗マウスレニン抗血清（以下抗レニン抗血清）+ペプチド(-) とレニン抗体+HRP の2通りの方法での免疫反応を観察した。

### 2. HRPの網膜血管新生抑制作用の検討

#### 未熟児網膜症マウスの作製

生後7日のC57BL6 マウスを5日間 75%酸素に曝露した後、5日間（生後12～17日）通常室内環境下に置いて未熟児網膜症マウスを作製した。酸素曝露終了5日後の未熟児網膜症マウスと同日齢の正常マウスを対象とした。

#### 投与する薬剤

生後12日から17日までの相対的低酸素状態にある期間に、未熟児網膜症マウスに対して、カプトプリル (10 mg/kg/day)、HRP (1.0 mg/kg/day) と (0.1 mg/kg/day)、生理食塩水を頸部皮下に投与した。正常マウスをコントロールとし、生理食塩水、カプトプリル、HRP (1.0 mg/kg/day)、(0.1 mg/kg/day) の5群に分け以下の検討を行った。

#### 1) 血管新生の定量

##### (1) フォールマウント網膜による定量

蛍光顕微鏡で観察し、血管新生の生じている個所を数え、それぞれの群で平均値を算出した。

##### (2) 眼球切片による定量

内境界膜より硝子体腔側にある血管を構成する細胞（主に内皮細胞）を数え、それぞれの群の平均値を算出した。

#### 2) 血管新生促進因子の定量

網膜を摘出し、total RNAを抽出して以下の検討を行った。

##### (1) 血管内皮増殖因子 (VEGF)の半定量

VEGFと受容体のFlt-1 (VEGFR1)と Flk-1 (VEGFR2)、さらにFlt-1に特異的に結合する placental growth factor (PIGF) を RT-PCR法を用いて定量した。

##### (2) アンジオポエチン2の半定量

アンジオポエチン2とその受容体であるTie2をRT-PCR法を用いて定量した。

### 3) 統計学的処理

統計処理は分散分析を、各群の比較にはScheffeの多重比較法を用い、危険率5%未満を有意とした。

## 成績

### 1. HRPのプロレニンに対する特異性

プロレニンと抗HRP抗体との結合は、HRPにより阻害された。"handle" regionを含まない他のペプチド (TFER および MTRLSAE) の存在下において、プロレニンと抗HRP抗体の結合は阻害されなかった。またレニンと抗レニン抗血清の結合は、HRP存在下においても、阻害されなかった。

### 2. HRPの網膜血管新生抑制作用の検討

#### 1) 血管新生の定量

##### (1) フォールマウント網膜による定量

正常群では網膜血管新生を認めなかった。未熟児網膜症マウスにおいて、生理食塩水投与群では  $9.3 \pm 3.1$  個 ( $n=4$ )、カプトプリル投与群では  $3.3 \pm 1.3$  個 ( $n=4$ )、HRP (0.1 mg/kg/day) 投与群では  $8.5 \pm 1.3$  個 ( $n=4$ )、HRP (1.0 mg/kg/day) 投与群では  $4.3 \pm 2.2$  個 ( $n=7$ ) となっていた。生理食塩水投与群と比べて、カプトプリル投与群とHRP (1.0 mg/kg/day) 投与群では有意に血管新生が抑制されていた ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ )。HRP (0.1 mg/kg/day) 投与群では、血管新生は抑制されなかった。

##### (2) 眼球切片による定量

正常群では網膜血管新生を認めなかった。未熟児網膜症マウスにおける網膜血管新生を調べると、生理食塩水投与群 ( $n=6$ )、カプトプリル投与群 ( $n=6$ )、HRP (0.1 mg/kg/day) 投与群 ( $n=6$ )、HRP (1.0 mg/kg/day) 投与群 ( $n=6$ ) ではそれぞれ  $37.2 \pm 8.6$ 、 $7.7 \pm 3.4$ 、 $39.5 \pm 7.3$ 、 $6.5 \pm 2.7$  個であった。カプトプリル投与群とHRP (1.0 mg/kg/day) 投与群では、網膜血管新生の有意な抑制を認めた ( $P < 0.01$ )。

#### 2) 血管新生促進因子の定量

##### (1) VEGF、Flt-1、Flk-1、PlGFのmRNAの定量

いずれの因子も生理食塩水投与群で、正常群と比べて発現が亢進していた。カプトプリル投与群とHRP (1.0 mg/kg/day) 投与群で、PlGFとFlk-1の発現亢進が抑制された。

##### (2) アンジオポエチン2、Tie2のmRNAの半定量

アンジオポエチン2の発現は生理食塩水投与群で、正常群と比べて亢進していた。カプトプリル投与群とHRP (1.0 mg/kg/day) 投与群でアンジオポエチン2の発現亢進が抑制された。アンジオポエチン2のレセプターであるTie2の発現に明らかな差を認めなかった。

## 考 按

網膜血管新生モデルとして、未熟児網膜症マウスを作製し "handle" regionを含むペプチドであるHRPを投与して、網膜血管新生とプロレニンの関連を検討した。

HRPはプロレニンと抗HRP抗体との結合を阻害し、"handle" regionを含まないペプチドでは同様な阻害作用を発揮しなかった。このことよりHRPはプロレニンの蛋白結合能を特異的に阻害していることが判明した。またHRPはレニンの抗レニン抗血清への結合に対して影響を有しないことから、HRPはレニンに反応することなく、プロレニンにのみ作用していることが判明した。

HRPを未熟児網膜症マウスに投与したところ、HRPはカプトプリルと同様に血管新生を抑制した。HRPはプロレニンを阻害することにより血管新生を抑制したと考えられる。またこのことから、プロレニンが網膜のレニン-アンジオテンシン系を活性化している可能性が初めて示唆された。

またHRPの網膜血管新生に対する抑制作用はPIGF、Flt-1、アンジオポエチン2の発現亢進の抑制を介していることが判明した。特にアンジオポエチン2はアンジオテンシンIIによりその発現が亢進することが報告されており、プロレニンの網膜血管新生促進作用は局所におけるアンジオテンシンII産生、すなわちレニン-アンジオテンシン系の活性化を介している可能性が初めて示唆された。

今回の研究で、HRPが網膜血管新生を抑制することを初めて証明した。増殖糖尿病網膜症や未熟児網膜症の発症にレニン-アンジオテンシン系が関与しているので、HRPは増殖網膜症の発症や進行の抑制薬になりうることが推測された。

## 結 論

1. handle regionを含むペプチドであるHRPは、プロレニンの蛋白結合能を阻害し、レニンへの影響を有しなかった。
2. HRPの網膜血管新生抑制作用から、プロレニンが網膜血管新生に深く関与していることが示唆された。
3. HRPは、PIGF、Flt-1、アンジオポエチン2の発現亢進を抑制することにより、網膜血管新生を抑制することが推測された。
4. HRPは糖尿病網膜症や未熟児網膜症の発症や進行を阻止する可能性が示唆され、今後これらの治療薬になりうることを推測された。

## 引用文献

1. Suzuki F, Hayakawa M, Nakagawa T, Nasir UM, Ebihara A, Iwasawa A, Ishida Y, Nakamura Y, Murakami K. Human prorenin has "gate and handle" regions for its non-proteolytic activation. *J Biol Chem* 278:22217-22222, 2003.
2. Ichihara A, Hayashi M, Kaneshiro Y, Suzuki F, Nakagawa T, Tada Y, Koura Y, Nishiyama A, Okada H, Uddin MN, Nabi AH, Ishida Y, Inagami T, Saruta T. Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin. *J Clin Invest* 114:1128-1135, 2002
3. Moravski CJ, Kelly DJ, Cooper ME, Gilbert RE, Bertman JF, Shahinfar S, Skinner SL, Wilkinson-Berka JL. Retinal neovascularization is prevented by blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 36:1099-1104, 2000.

## 参考論文

1. Mori F, Yokota H, Nagaoka T, Konno S, Kagokawa H, Hikichi T, Yoshida A. Pulsatile ocular blood flow is unaffected in type 2 diabetes mellitus. *Jpn J Ophthalmol* 47: 621-622, 2003.
2. Nagaoka T, Kitaya N, Sugawara R, Yokota H, Mori F, Hikichi T, Fujio N, Yoshida A. Alteration of choroidal circulation in the foveal region in patients with type 2 diabetes. *Br J Ophthalmol* 88: 1060-1063, 2004.
3. Yokota H, Mori F, Nagaoka T, Sugawara R, Yoshida A. Pulsatile Ocular Blood Flow Study: Changes in Eyes Associated with Scleral Buckling Procedures. *Jpn J Ophthalmol* (in press).

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	横田 陽匡
<p>審査委員長 鈴木 裕 ㊟</p> <p>審査委員 高井 章 ㊟</p> <p>審査委員 伊藤 喜久 ㊟</p> <p>審査委員 吉田 晃敏 ㊟</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p><b>Role of prorenin in the pathogenesis of retinal neovascularization</b> (網膜血管新生におけるプロレニンの関与)</p>			
<p>増殖糖尿病網膜症は、我が国の中途失明原因の第一位であり、未熟児網膜症は、極低出生体重児や超低出生体重児の生命予後の向上により増加傾向にある。これら 2 つの疾患は網膜血管新生という共通の特徴を有し、難治性で既存の光凝固術や硝子体手術には限界があり、血管新生そのものの抑制が究極の目標である。増殖網膜症にはレニン-アンジオテンシン系が関与することが指摘されてきたが、増殖糖尿病網膜症では、血中および組織中のレニンの濃度が低下しレニンの前駆体プロレニンの濃度が上昇することが報告され、レニンによる増殖網膜症の発症機序の妥当性が疑われる状況にある。他方、最近、プロレニンが、生体内で非分解的に活性化されレニン様活性を発揮すること、この活性化にプロレニン分子のプロセグメント内の“handle” region が重要な役割を果たしていること、そしてこの活性化はプロレニンの“handle” region の配列を有するペプチドにより阻害されることが報告された。そこで本論文では、プロレニンが網膜血管新生に関与しているか否かを検討するため、“handle” region の配列を有するペプチド (HRP) を作成し、網膜血管新生を発症する未熟児網膜症マウスに投与し、血管新生および血管新生促進因子の変化を解析した。そして、以下の結果を得た。</p> <p>1) HRP はプロレニンと HRP 抗体との結合を阻害したが、レニンとレニン抗体の結合は阻害しなかった。従って HRP はレニンに反応することなく、プロレニンの関与するシステムにのみ作用するであろうことがわかった。</p>			

- 2) 未熟児網膜症マウスでは、生理食塩水投与群と比べて、アンジオテンシン変換酵素阻害薬カプトプリルの投与群と HRP (1.0 mg/kg/day) 投与群では有意に網膜血管新生が抑制された。
- 3) 血管新生促進因子である血管内皮成長因子 VEGF、その受容体 Flt-1 および Flk-1、そして胎盤性成長因子 PlGF の mRNA を定量した結果、いずれの因子も未熟児網膜症マウス生理食塩水投与群で、正常マウス群と比べて発現が亢進していた。そして未熟児網膜症マウスのカプトプリル投与群と HRP (1.0 mg/kg/day) 投与群では、PlGF と Flk-1 の発現亢進が抑制された。
- 4) アンジオテンシン II により促進されるアンジオポエチン 2 の mRNA 発現は、未熟児網膜症マウス生理食塩水投与群では、正常マウス群と比べて亢進していた。未熟児網膜症マウスのカプトプリル投与群と HRP (1.0 mg/kg/day) 投与群では、この発現亢進が抑制された。

以上から、網膜血管新生は HRP により抑制されることが初めて明らかとなり、この抑制は HRP がプロレニンの非分解性の活性化を阻害し、PlGF、Flt-1、アンジオポエチン 2 の発現亢進を抑制することによるものであると結論された。

本論文はこのように、プロレニンがアンジオテンシン II 産生を介して網膜血管新生を促進することを初めて示唆したものであり、増殖糖尿病網膜症や未熟児網膜症の発症機序の理解に大きく貢献した。また、HRP はこれら病態発症の抑制薬になりうることが示唆され、治療の観点からもきわめて重要な新知見を与えている。

論文内容と関連領域についての各審査委員による試問に対しても適切な回答が得られ、論文提出者はこの領域において十分な知識を有することが示された。

以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値するものであると判定した。