

氏名	こ やま しん じ 小 山 真 治
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	論 医 博 第 1816 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	[網膜血管新生阻害効果をもつ薬剤の作用機序の解明] に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 清野 裕 教授 西川 伸一 教授 本田 孔士

論 文 内 容 の 要 旨

増殖糖尿病網膜症 (PDR) や滲出型加齢黄斑変性 (AMD) のような血管新生を伴う眼内増殖性疾患において、血管内皮増殖因子 (VEGF) の果たす役割は大きい。一方、抗アレルギー薬 tranilast および抗リウマチ薬 bucillamine が VEGF 関与による血管新生を抑制することが知られているものの、その作用機序は解明されていない。本研究では、VEGF への作用を視点に、これら薬剤の作用機序を解明することを目的とした。

Tranilast

最初に、VEGF 刺激によるウシ網膜微小血管内皮細胞 (BREC) の増殖、遊走および管腔形成が、tranilast により有意に抑制されることを確認した後、以下の検討を行った。

- 1) ^{125}I 標識された VEGF を用いた *in vitro* 受容体結合実験において、tranilast は VEGF-VEGF 受容体間の結合活性に影響を及ぼさなかった。
- 2) Tranilast は、VEGF 受容体のチロシンリン酸化およびそれに続く phospholipase $\text{C}\gamma$ のチロシンリン酸化に対して関与を示さなかった。
- 3) Tranilast は、phorbol myristate acetate (PMA) による直接的な protein kinase C (PKC) 活性化を抑制した。
- 4) PMA を添加された BREC において、tranilast は細胞接着や遊走に関与する細胞外マトリックス受容体 integrin αv や細胞増殖に関与する転写因子 c-fos の mRNA 発現を抑制した。

従って、tranilast は PKC を介したシグナル伝達を阻害することにより、血管新生阻害作用を示すことが示唆された。

Bucillamine

最初に、BREC において低酸素誘導 VEGF mRNA およびタンパク発現が、bucillamine により有意に抑制されることを確認した後、以下の検討を行った。

- 1) Actinomycin D を用い mRNA 安定性に対する bucillamine の効果を検討したところ、bucillamine は低酸素培養により延長した VEGF mRNA の半減期に対して何ら影響を及ぼさなかった。
- 2) VEGF 遺伝子プロモーター領域に結合する 4 つの転写因子 HIF-1, Sp1, AP1 および AP2 に着目し、各転写因子のオリゴヌクレオチドを用いたゲルシフトアッセイ法および VEGF 遺伝子プロモーター領域遺伝子配列と luciferase 遺伝子配列を含むプラスミドを用いたレポーター遺伝子解析法により検討したところ、bucillamine は HIF-1 および Sp1 の結合活性を抑制した。
- 3) ノーザンブロット法において、bucillamine は HIF-1 を構成するサブユニットの一つ HIF-1 α の mRNA 発現を有意に抑制した。

従って、bucillamine は転写因子 HIF-1 の遺伝子発現を抑制し、さらに HIF-1 および Sp1 の VEGF 遺伝子への結合を抑制することにより、VEGF 発現を抑制することが示唆された。

以上二系の実験結果から、tranilast は VEGF の PKC を介したシグナル伝達の抑制により、一方、bucillamine は転写因

子 HIF-1 および Sp1 を介した VEGF 発現の抑制により、血管新生を抑制することが示された。眼内血管新生において VEGF の果たす役割は極めて大きいことから、これらの薬剤は PDR や AMD の治療薬として有用であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

増殖糖尿病網膜症（PDR）や滲出型加齢黄斑変性（AMD）のような血管新生を伴う眼内増殖性疾患において、血管内皮増殖因子（VEGF）の果たす役割は大きい。本論文では、VEGF 関与による血管新生を抑制することが知られている抗アレルギー薬 tranilast および抗リウマチ薬 bucillamine の作用機序の解明を目的とした。

最初に、tranilast が VEGF 刺激による *in vitro* 血管新生を抑制することを示した。さらにウェスタンブロット解析により、tranilast が VEGF 刺激による細胞内シグナル伝達のうち種々のチロシンリン酸化に対しては関与せず、PKC 活性化を介したシグナル伝達を阻害することにより、血管新生阻害作用を示すことを示した。

次に、bucillamine がウシ網膜血管内皮細胞からの VEGF 産生を抑制することを示した。さらに VEGF 遺伝子プロモーター領域に結合する転写因子に着目し、ゲルシフト解析により bucillamine が HIF-1 および Sp1 の結合活性を抑制することを、さらにノーザンブロット解析により HIF-1 α の mRNA 発現を抑制することを証明した。

以上の研究は、tranilast および bucillamine の作用機序の解明に貢献し、薬剤に新たな性質を特徴づけ、さらに臨床的にも、これらの薬剤が PDR や AMD の治療薬として有用であることを示唆した。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成15年2月17日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。