

京都大学	博士（医学）	氏 名	鵜 木 則 之
論文題目	SDF-1/CXCR4 contributes to the activation of tip cells and microglia in retinal angiogenesis (SDF-1/CXCR4 は網膜血管新生において血管先端端細胞とマイクログリアの活性化に寄与する)		
(論文内容の要旨)			
Stromal cell derived factor-1 (SDF-1) が網膜の血管新生に関与することは報告されているが、血管が正に発芽する段階における役割については未だよく知られていない。そこで、本研究では SDF-1 と、その受容体である CXCR4 の役割について調べることにした。方法としては、抗 SDF-1 抗体および CXCR4 の阻害薬である AMD3100 を用い、生後間もないマウスの網膜血管発生に与える影響、および成体マウスの網膜器官培養による VEGF 誘導網膜血管新生モデルでの影響を検討した。また、血管先端端細胞での発現が多い遺伝子の変化をリアルタイム PCR にて計測した。更に、新生血管および間接的に血管新生に関与すると報告されているマイクログリアの運動性を観察するために、Tie2-GFP 遺伝子改変マウスの培養網膜による血管新生の様子を共焦点蛍光顕微鏡にてタイムラプス撮影し、SDF-1/CXCR4 の抑制による、それらの運動性や形態の変化についても解析を行った。まず、<i>in vivo</i> 網膜血管発生において、SDF-1/CXCR4 を阻害することにより、視神経乳頭より延びる網膜血管網の半径は短縮し、また血管先端端細胞から出現する樹状突起フィロポディアも減少および短縮、更には単位面積当たりの血管分岐点や増殖能をもつ血管内皮細胞数も減少していた。網膜から抽出した mRNA を cDNA に逆転写させ、測定したリアルタイム PCR の結果では、VEGF やその受容体である KDR、Flt-1 の減少に加え、血管先端端細胞での発現が多い PDGFB や UNC5B の発現も抑制されていた。次に、成体マウスを器官培養した <i>ex vivo</i> VEGF 誘導網膜血管新生モデルにおいては、リアルタイム PCR により、VEGF 刺激で SDF-1 の発現が亢進しているのが確認され、更には抗 SDF-1 抗体、及び AMD3100 を添加することで、濃度依存性に血管新生の発生数が減少することが確認された。また、タイムラプス撮影した動画の解析により、血管先端端細胞及びマイクログリアの運動性をも抑制していることが確認できた。形態学的には、アメーバ状が多数であったマイクログリアが、SDF-1/CXCR4 阻害により減少し、かつ円形のものの割合が多くなる傾向があった。続いて、組織内のマイクログリアを根絶させるために、クロドロネート含有リポソームを用いた実験においては、マイクログリアの根絶そのもので、血管新生数は減少したが、更に SDF-1/CXCR4 抑制を加えることで、血管新生数は更に減少するという結果が得られた。以上、これらの結果を踏まえ、SDF-1/CXCR4 は血管先端端細胞の活性を促進することにより直接的に血管新生に関与し、更にはマイクログリアを活性化させることで間接的にも血管新生を促進するということが示唆された。			

（論文審査の結果の要旨） 眼内血管新生により視覚障害をきたす糖尿病網膜症や加齢黄斑変性は中途失明原因の上位を占め、その治療法の確立は急務である。本研究では、近年その細胞遊走における役割が注目を浴びているケモカイン stromal cell derived factor-1 (SDF-1)とその受容体である CXCR4 の網膜血管新生への影響を検討した。<i>in vivo</i> マウス網膜血管発生モデルにおいて、SDF-1/CXCR4 系が先端端細胞のフィロポディア形成と先端端細胞特異的遺伝子発現を誘導していることを免疫染色、リアルタイム PCR を用いて示し、この系が血管新生の先端端細胞の活性化を介して血管新生を促進することを明らかにした。また、<i>ex vivo</i> マウス網膜血管新生モデルでのタイムラプスイメージングを用いて、網膜血管新生のダイナミクスを詳細に検討し、SDF-1/CXCR4 系が血管細胞の運動性を司ることを証明した。更に、マイクログリアの網膜血管新生への影響も検討し、SDF-1/CXCR4 系の血管内皮細胞への直接効果とマイクログリアを介した間接効果の両者を明らかにした。 以上の研究は、眼内血管新生のダイナミクスに着目した新たなアプローチを用いて SDF-1/CXCR4 系が網膜血管新生を制御する分子機構の解明に貢献し、今後更に進展するであろう分子生物学的手法を用いた眼内血管新生研究の新たな展開とそれに基づく治療法開発に寄与するところが多い。 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 2 2 年 6 月 1 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。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			