

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	小 嶋 洋 史
論文題目	Granulocyte colony-stimulating factor attenuates oxidative stress-induced apoptosis in vascular endothelial cells and exhibits functional and morphological protective effect in oxygen-induced retinopathy （顆粒球コロニー刺激因子は血管内皮細胞の酸化ストレスによるアポトーシスを抑制し高酸素虚血性網膜症の機能的、形態的に保護する作用を有する）		
（論文内容の要旨） 糖尿病網膜症は失明原因の重要な原因疾患であり、近年においても増加傾向にある。しかし、詳細なメカニズムはいまだ明らかにされておらず、現在広く行われている治療では十分とはいえない。糖尿病網膜症の病理は網膜血管の脱落による神経網膜の虚血とそれに続く網膜血管新生・増殖性変化である。これらの変化により不可逆的機能低下をきたす。一連の始まりである網膜血管の脱落は高血糖負荷などによる酸化ストレスが血管内皮細胞にアポトーシスを引き起こすことが主因であると考えられている。そのため、酸化ストレスによる血管障害を防ぐことは大きな効果を得られる治療となりうると考えられる。 この研究は顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）に着目し、酸化ストレスによる血管内皮細胞傷害に対し防御機能を有するか否か、糖尿病網膜症の治療候補足りうるかを調べるものである。G-CSF は既に骨髓移植などで使用されている、顆粒球の産生や好中球の機能促進作用を持つサイトカインである。近年の研究でこれら造血系細胞に対する作用以外の効果が確認されつつあり、過去に網膜神経細胞に対する直接的保護作用を既に報告している。本研究では培養網膜血管内皮細胞（HREC）に対し過酸化水素水を加えることにより酸化ストレス誘導アポトーシスをおこし、G-CSF がそれを阻害できるか確認した。まず、G-CSF receptor が HREC に存在することを western blot 法にて確認した。過酸化水素水添加により HREC の G-CSF と G-CSF 受容体 (G-CSFR)の発現（mRNA）が明らかに増加することを示した。これは G-CSF・G-CSFR システムが酸化ストレスに反応する HREC 内在性システムの一つであることを示唆する。次に、アポトーシス抑制効果を FACS を使った方法により定量した。今回の実験系では 100ng/ml の G-CSF が過酸化水素水誘導 HREC アポトーシスを 61.7%から 41.4%に有意に減少させることを確認した。G-CSF を加えることで HREC 内の Akt がリン酸化され、PI3K inhibitor である LY294002 を加えることでアポトーシスが有意に増加したことから、G-CSF は HREC に直接働き、PI3K-Akt 系を介してアポトーシス抑制効果を発揮することが分かった。また、同効果は HREC だけでなく臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)でも認められ、網膜の血管だけでなく他の血管内皮細胞にも備わる防御機能である可能性が示唆された。 次に動物モデルを使い、治療薬としての可能性を検討した。マウス高酸素負荷網膜症モデルは高酸素負荷による網膜血管のアポトーシスとその後の相対的低酸素による網膜新生血管を観察することができる新生血管研究の重要なモデルであり、その病理は糖尿病網膜症に類似する。6 日齢から連続 5 日間、			

50μg/kg の G-CSF 腹腔内注射は高酸素による網膜血管アポトーシスを有意に減少させ、それに引き続く網膜血管新生も抑制させた。G-CSF 硝子体注射でも同様の効果が得られ、G-CSF が直接網膜に働いている可能性が示唆された。このモデルは血管だけでなく神経機能も低下することが知られているが、G-CSF は神経網膜の機能・形態ともに変性に対する保護効果を示した。 これらの結果により、G-CSF は直接的な血管内皮細胞保護効果を持ち、その投与により糖尿病網膜症など虚血性網膜疾患の早期治療を実現させる可能性を持つことを明らかにした。神経組織である網膜にとってその早期治療は神経保護の観点からもこれまでにない新しい治療となりえる。 (論文審査の結果の要旨) この論文は培養網膜血管内皮細胞を使用し、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）が過酸化水素を用いた酸化ストレスによるアポトーシスを抑制する作用を有することを annexin V 陽性細胞を定量することにより示し、G-CSF が血管内皮細胞の G-CSF receptor を介し直接作用することを western blot 法、PCR 法にて確認した。また動物モデルとして高酸素負荷網膜症モデルを用い、G-CSF の腹腔内注射が高酸素負荷による網膜血管のアポトーシスである血管退縮を抑制する作用、それに続く血管新生を抑制する作用を示した。同じく硝子体注射でも血管退縮を抑制する効果を認め、G-CSF が骨髓細胞を介しての間接作用というよりも網膜血管に対する直接効果の可能性がより強く考えられた。また同モデルにおいて網膜神経保護作用を有することも示し、網膜の不可逆的な形態的、機能的障害を防ぐ可能性を示唆した。 また、G-CSF・G-CSFR が酸化ストレスにより変化することをリアルタイム PCR にて確認し、このシステムは内在性の生体防御機能として反応している可能性があることを示した。以上の研究は G-CSF の新しい応用方法の開発と糖尿病網膜症の新たな治療法に向けた研究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 3 年 2 月 2 8 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。
