

氏名（本籍）	田崎 邦治（茨城県）		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第	9659	号
学位授与年月	令和 2 年 8 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	網膜色素上皮細胞の性質変化検討のための増殖硝子体網膜症モデルマウスの開発		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	家田 真樹
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	和田 哲郎
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	水野 聖哉
副査	筑波大学講師	博士（医学）	後藤 行延

## 論文の内容の要旨

田崎邦治氏の博士学位論文は、裂孔原性網膜剥離の病態に近い新たな増殖硝子体網膜症モデルマウスを開発するとともに、網膜再生の鍵と考えられる Pax6 や未分化な神経前駆細胞に発現する nestin の発現を、増殖硝子体網膜症モデルマウス眼球を用いて検討したものである。

その要旨は以下のとおりである。

### （目的）

人の網膜神経細胞はいったん損傷を受けるとほぼ回復しないため、裂孔原性網膜剥離患者では早期に治療できなければ恒常性の視力低下を生じる。また一部の裂孔原性網膜剥離患者では、網膜色素上皮細胞が上皮間葉転換を起こし、形成された線維性組織が網膜を牽引する増殖硝子体網膜症という病態へと至る。増殖硝子体網膜症は長期罹患患者や手術後の再剥離例に多く認められるが、治療が難しく有効な予防策も確立されていない。

一方、アカハライモリでは網膜剥離後に再生がみられ、その過程では Pax6 遺伝子が重要な役割を果たすと考えられている。Pax6 の発現を抑制したアカハライモリでは網膜色素上皮細胞の遊離と脱分化は起こるが、神経細胞でなく間葉系の細胞へ分化し、人の増殖硝子体網膜症と同様に線維性組織の増生が見られる。人とアカハライモリの相違として、網膜剥離の修復過程における Pax6 の働きに違いがあると考えられているが、これまで適切なモデル動物を用いた網膜色素上皮細胞の性質変化に関する報告はない。またマウスを用いた網膜剥離や増殖硝子体網膜症モデル作成に関する過去の報告では、網膜色素上皮の遊離や凝集が阻害され動物モデルとして不十分な可能性がある。そこで著者は、網膜を一部切開し、裂孔原性網膜剥離を作成し、新しい増殖硝子体網膜症モデルマウスの開発を目指すこととした。さらに網膜再生の鍵と考えられる Pax6 や、未分化な神経前駆細胞に発現する nestin について免疫組織学的に解析を行なうこととした。

### （対象と方法）

(1) 増殖硝子体網膜症モデルマウスの作成

日本チャールス・リバー (Kanagawa, Japan) から購入した 8~32 週齢の C57BL/6 マウスに散瞳と鎮痛、鎮静が十分に得られてから 18 G 針にて角膜中央を穿刺し、トロピカミド (5 mg/ml) ・フェニレフリン塩酸塩 (5 mg/ml) 点眼液を前房内に注入した。さらに前房を粘弾性物質 (精製ヒアロン酸ナトリウム 1%) で置換してから、スプリングハンドル式剪刀にて角膜中央の切開部を切り上げ、角膜径の 2/3 程度まで拡大した。眼球全体を圧迫して水晶体を圧出し、1 ml シリンジにて硝子体を吸引した。自発的に網膜剥離が起こるのを待って、浮遊した網膜の一部を縫合針にて切開した。粘弾性物質 (精製ヒアロン酸ナトリウム 1%) を硝子体腔に充填し、角膜切開層を 10-0 ナイロンにて 2 針縫合し閉創した。感染予防のためレボフロキサシン点眼液 1.5 % を点眼したのち、オフロキサシン眼軟膏 0.3 % を眼表面と眼周囲に塗布した。手術はすべて右眼に施行した。

## (2) 組織学的検査

著者は、手術をして 1、3、5、10、30、60 日後にケタミン・キシラジン混合液を腹腔内過量投与しマウスに安楽死処置を施し眼球を摘出した。摘出した眼球を迅速固定液にて固定し、段階的にアルコール脱水した後、パラフィン包埋を行った。5  $\mu$ m の厚さで切片を作成し、脱パラフィン後にヘマトキシリン・エオジン染色を行い光学顕微鏡で観察した。

## (3) 免疫組織学的検査

著者は、摘出眼球をザンボニー固定液にて固定したのち、PBS にて眼球を洗浄しスクロース処理を行った。凍結包埋し 20  $\mu$ m の厚さで切片作成し免疫染色を行った。PBS に 15 分、0.2 % Triton-X100 in PBS に 15 分、再び PBS に 15 分浸漬し切片を洗浄した。2 % BSA in 0.2 % Triton-X100 溶液を滴下し非特異的吸着のブロッキングを行い (室温、2 時間)、2 % BSA 溶液で希釈した一次抗体 (Pax6、RPE65、nestin に対する抗体) を滴下し一晩反応させた (4  $^{\circ}$ C)。前述の手順で再び切片を洗浄し、2 % BSA 溶液で希釈した二次抗体を滴下し反応させた (室温、4 時間)。前述の手順で再び洗浄したのち、0.5  $\mu$ g/ml DAPI in PBS に一晩浸漬し (4  $^{\circ}$ C) 対比染色を行った。Pax6 は核に、RPE65 と nestin は細胞質に存在するため、蛍光の存在する場所が異なるものや三重に蛍光が認められるものは非特異的反応と考え除外した。また二次抗体のみと反応させた検体をネガティブコントロールとして使用し、抗原特異性の確認を行なった。共焦点レーザー顕微鏡 FV10i (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて観察を行った。

## (結果)

### (1) 増殖硝子体網膜症モデルマウスの作成

手術を行なった全例で、広範囲にわたり網膜が剥離を観察した。手術後 5 日以降経過した 21 例中 10 例で剥離した網膜下に線維性組織の増生を認め、増殖硝子体網膜症モデルの作成に成功した。

### (2) 組織学的検査

すべての検体に硝子体腔に浮遊する色素細胞を認め、術後 3 日目以降の検体の全てに、鋸状縁から虹彩の背側にかけて線維性組織の増生がみられた。網膜下の線維性組織の増生は術後 5 日目の検体の 66.7% に認められた。

### (3) 免疫組織化学染色検査

術後摘出した眼球の一部に Pax6 や nestin 陽性の細胞を認め、術後 5 日目の検体では GFAP 陽性の増殖組織が形成を観察した。nestin は術後早期に発現を認めたが、術後 3 日以降では認められなかった。Pax6 は術後早期にも認められるが、術後 5 日目には Pax6 陽性の細胞の集簇を認め、割合が増加していた。

## (考察)

本研究により、著者は、裂孔原性網膜剥離の病態に近い新たな増殖硝子体網膜症モデルマウスを作成した。免疫染色では nestin 陽性の細胞が先に出現し、Pax6 陽性の細胞が後で発現することより、網膜色素上皮細胞の性質変化は発生過程を踏襲している可能性がある。著者は、イモリとマウスの網膜色素上皮細胞の修復過程の違いを明らかにすることができれば、哺乳類での網膜再生阻害の機序同定と将来の再生医療実現に有益な知見が得られると展望している。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

裂孔原性網膜剥離に引き続き起こる増殖硝子体網膜症は、治療が難しく有効な予防策も確立されていない。著者は、裂孔原性網膜剥離の病態に近い新しい増殖硝子体網膜症モデルマウスを開発し、さらに同モデルを用いて網膜色素上皮細胞の性質が変化する過程を解析した。本研究成果は、増殖硝子体網膜症の病態解明と新しい網膜再生治療の実現に有益な知見をもたらすものである。

令和2年7月2日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。