

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10909

研究課題名(和文) アクアポリン4の黄斑浮腫への関与と、その制御による治療

研究課題名(英文) Involvement of aquaporin 4 in macular edema and its possible treatment

研究代表者

喜田 照代 (Kida, Teruyo)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：90610105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病黄斑浮腫は抗VEGF療法が有効であるが反復投与が必要で網膜浮腫にVEGF以外の関与が予想される。水チャンネルのアクアポリン(AQP)4は網膜ミュラー細胞に発現する。そこでミュラー細胞の容積変化にVEGFとAQP4が関与するか検討した。糖尿病ラット網膜においてVEGFの発現は網膜内層に強くAQP4も増強した。AQP4の発現はGFAPと共染色した。VEGFの蛋白レベルは糖尿病ラットで有意に増加した。また、VEGFに暴露したミュラー細胞の細胞容積は増大し、TGN-020により抑制された。網膜におけるAQP4の制御が糖尿病黄斑浮腫治療の一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Aquaporin 4 (AQP4), a water channel protein, is known to be expressed in retinal Muller cells. The purpose of this study was to determine the effects of VEGF and AQP4 channels on the volumetric changes in Muller cells, presence or absence of VEGF and TGN-020, a selective AQP4 inhibitor. In the diabetic rat retina, VEGF immunoreactivity was concentrated in the internal retinal layers, and AQP4 immunoreactivity was higher than controls. The expressions of AQP4 were colocalized with GFAP. Protein levels of VEGF in the hyperglycemic rat retina were significantly higher than controls. FACS analyses showed that exposure to VEGF enlarged Muller cells, while exposure to TGN-020 suppressed the enlargement. Intracellular levels of NO were increased after exposure to VEGF, which was suppressed following the addition of TGN-020. The observed Muller cell swelling is mediated by VEGF and AQP4.

研究分野：眼科

キーワード：アクアポリン4 糖尿病 黄斑浮腫 ミュラー細胞 VEGF TGN-020 一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症と網膜静脈閉塞症は病態が異なるが、これらの黄斑浮腫の治療として、抗 VEGF 薬の硝子体注射が施行される。しかしながら、抗 VEGF 療法 1 回の治療で黄斑浮腫が治癒することは残念ながら少ないのが現状であり、新たな治療法の開発が望まれる。抗 VEGF 薬投与前後で眼底血流をレーザースペックルフローグラフィ (LSFG) で測定すると、治療後、網脈絡膜血流は低下する。治療後の網脈絡膜血流の低下は一過性と思われるが、長期にわたる抗 VEGF 薬の反復投与により過度に血流が低下すれば網膜の機能低下や菲薄化を引き起こす可能性も危惧される。

アクアポリン (AQP) は水チャネルとして発見され、さらにバリア機能維持などの機能についても関心がもたれている。AQP4 は、中枢神経系に発現する主要な水チャネルで、視神経や網膜にも発現している。脳ではアストロサイトの足突起に主に発現しているが、毛細血管内皮細胞にも発現している。近年、AQP が脳浮腫の発症やその治療過程に関与することが明らかになった。また、脳の AQP4 と一酸化窒素 (NO) の関連も示唆され、AQP4 は浮腫だけでなく血流への関与も考えられる。

AQP4 発現の分子機構は不明であるが、視神経由来の培養アストロサイトを用いた実験系では、NO 供与体である S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP) が用量依存的に AQP4 の発現を増加させ、NO が protein kinase G (PKG) を介して、AQP4 発現機構に関与している可能性が考えられた。また脳のアストロサイトにおいて、protein kinase C (PKC) の活性化により AQP4 の発現が抑制され、PKC を介した調節機構の存在も示唆されている。

NO が血管透過性を亢進させることはよく知られているが、虚血網膜では NO 発生と AQP4 の発現亢進が認められ、AQP4 が新たな治療のターゲットになる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

黄斑浮腫は、糖尿病や網膜静脈閉塞症といった網膜血管病変でみられ、視力低下を引き起こす主要な原因である。抗 VEGF 療法が治療の主流となっているが、複数回投与が必要で、黄斑浮腫が改善しても網脈絡膜血流は低下することが多い。水チャネルであるアクアポリン (AQP) は脳浮腫の発症や治療に関与し、AQP4 発現の調節に一酸化窒素 (NO) や protein kinase C (PKC) の関与が示唆されている。AQP4 は網膜ミュラー細胞や網膜血管でも発現しており、その発現機構の解明および眼血流への影響、エコファーマを視野に入れた研究は、網膜疾患のさらなる治療法につながると思われる。

本研究では、網膜ミュラー細胞の容

積変化に VEGF と AQP4 が関与するか検討した。また、AQP4 を制御して生じる網脈絡膜血流・バリア機能の変化を検討し、NO や PKC を介した AQP4 発現の変化を明らかにできればと考えた。

3. 研究の方法

ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットを作成し、また、培養網膜ミュラー細胞を用いた。糖尿病ラットおよび健常ラットに VEGF あるいは PBS を硝子体注射し、灌流固定後眼球を摘出し、網膜切片を作成した。網膜切片は GFAP、VEGF、AQP4 の免疫組織染色を行い、また、VEGF のウエスタンブロット解析も施行した。一方、培養ミュラー細胞は、フローサイトメーター (FACS) を用いて VEGF や TGN-020 (AQP4 阻害剤) の存在下で細胞容積や一酸化窒素 (NO) の細胞内産生の変化について解析した。さらに、細胞容積の変化における VEGF を介した NO の関与を検討するため、NO 合成酵素阻害剤である N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 1 mM) を前投与した場合についても FACS 解析を行った。

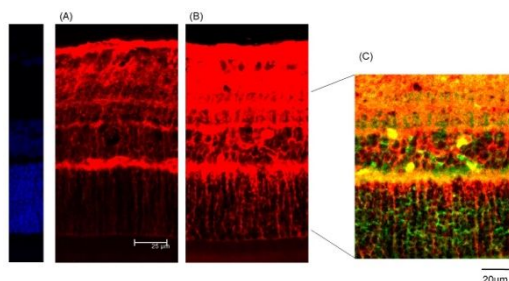
また、AQP4 の発現に PKC の活性化が関与しているという報告があるため、ラット網膜の培養ペリサイトおよび血管内皮細胞を、PKC 賦活剤である PMA (phorbol myristate acetate) に暴露し、PMA の各濃度で生細胞数を吸光度で測定することにより、PMA に対する反応として両細胞における細胞死について検討した。

4. 研究成果

糖尿病ラット網膜において、VEGF の免疫反応は網膜内層に強く、また AQP4 も健常ラットより増強した。そして、AQP4 の発現は GFAP と共染色した (図 1)。VEGF の蛋白レベルは糖尿病ラットで健常ラットより 31.5% 有意に増加した。FACS 解析では VEGF に暴露したミュラー細胞の細胞容積は増大し、TGN-020 によりその増大は抑制された。また、細胞内 NO は VEGF 暴露により増加し、TGN-020 により抑制された。また、VEGF によるミュラー細胞の細胞容積増大は、L-NAME 投与により抑制された。以上より、VEGF および AQP4 がミュラー細胞の膨化を引き起こす可能性が考えられた。また、VEGF によるミュラー細胞の細胞容積増大は、NO を介した変化であることがわかった。

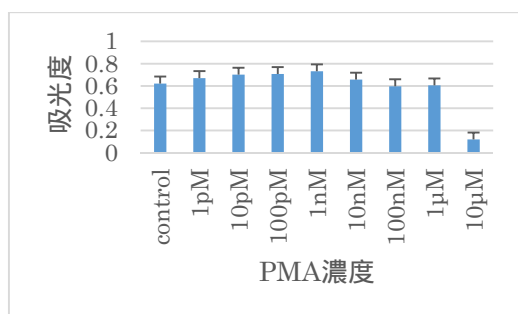
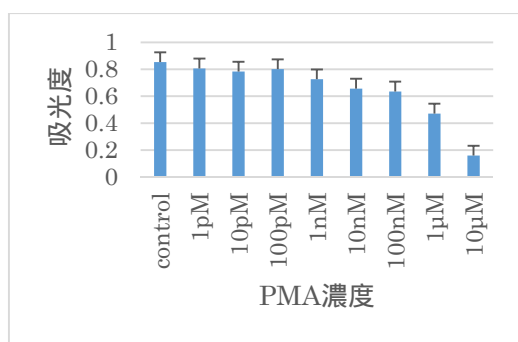
また、培養網膜血管細胞を用いた PKC に関する検討では、PMA 暴露は、1nM でペリサイトは細胞死が生じたが、血管内皮細胞は逆に増殖した (図 2)。すなわち、網膜血管の内皮細胞と周皮細胞で PKC に対する反応に違いがみられた。

図 1 ラット網膜切片の免疫組織化学染色 (AQP4(赤)、GFAP(緑))



(A)control (B) STZ
(C) STZ (AQP4 and GFAP)

図 2 ラット網膜のペリサイト(上段)および血管内皮細胞(下段)における PMA 用量と生細胞数の変化



糖尿病網膜症における初期の病理組織学的変化として、網膜血管周皮細胞の消失(pericyte loss)と血管内皮細胞の増殖が挙げられる。高血糖により PKC の活性化が生じることがよく知られた事実であるが、これらの実験結果は、糖尿病網膜症の病態に PKC の関与を強く示唆し、網膜血管における AQP4 の変化と PKC の関連も今後も重要な研究課題であると考えられた。網膜における AQP4 の制御が糖尿病黄斑浮腫治療の一助となる可能性がある。

[引用文献]

1) Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr*

Nephrol 2007; 22: 778-784.

2) Igarashi H, Tsujita M, Suzuki Y, et al. Inhibition of aquaporin-4 significantly increases regional cerebral blood flow. *NeuroReport* 2013; 24: 324-328.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

1) Kida T, Oku H, Horie T, Fukumoto M, Okuda Y, Morishita S, Ikeda T. Implication of VEGF and AQP4 mediating Muller cell swelling to diabetic retinal edema. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 255:1149-1157, 2017. DOI 10.1007/s00417-017-3631-z 査読あり

2) Kida T, Oku H, Horie T, Matsuo J, Kobayashi T, Fukumoto M, and Ikeda T. NADPH oxidase-mediated ROS production determines insulin's action on the retinal microvasculature. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56:6754-6761, 2015. doi:10.1167/iovs.15-17534 査読あり

3) Kida T, Tsujikawa A, Muraoka Y, Harino S, Osaka R, Murakami T, Ooto S, Suzuma K, Morishita S, Fukumoto M, Suzuki H, Ikeda T. Cotton Wool Spots after Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy for Macular Edema Associated with Central Retinal Vein Occlusion. *Ophthalmologica* 235:106-113, 2016. doi: 10.1159/000443622. 査読あり

4) Kida T, Flammer J, Oku H, Morishita S, Fukumoto M, Suzuki H, Konieczka K, Ikeda T. Suppressed endothelin-1 by anti-VEGF therapy is important for patients with BRVO-related macular edema to improve their vision. *EPMA J* 7(1):18, 2016. doi: 10.1186/s13167-016-0066-2. 査読あり

5) Oku H, Morishita S, Horie T, Nishikawa Y, Kida T, Mimura M, Kojima S, Ikeda T. Protective effect of P7C3 on retinal ganglion cells from optic nerve injury. *Jpn J Ophthalmol* 61:195-203, 2017. doi: 10.1007/s10384-016-0493-6. 査読あり

6) Nishikawa Y, Morishita S, Horie T, Fukumoto M, Sato T, Kida T, Oku H, Sugawara J, Ikeda T, Nakamura K. A comparison of sex steroid concentration levels in the vitreous and serum of patients with vitreoretinal diseases. *PLoS One* 2017;12(7):e0180933. 査読あり

7) Nishikawa Y, Oku H, Morishita S, Horie T, Kida T, Mimura M, Fukumoto

M, Kojima S, Ikeda T. Negative impact of AQP-4 channel inhibition on survival of retinal ganglion cells and glutamate metabolism after crushing optic nerve. *Exp Eye Res* 146:118-27, 2016. doi: 10.1016/j.exer.2015.12.012. 査読あり

- 8) Oku H, Morishita S, Horie T, Kida T, Mimura M, Fukumoto M, Kojima S, Ikeda T. Nitric Oxide Increases the Expression of Aquaporin-4 Protein in Rat Optic Nerve Astrocytes through the Cyclic Guanosine Monophosphate/Protein Kinase G Pathway. *Ophthalmic Res* 54:212-21, 2015. doi: 10.1159/000440846. 査読あり
- 9) Hosoki A, Oku H, Horie T, Kida T, Sugiyama T, Nakamura K, Ikeda T. Changes in Expression of Nestin, CD44, Vascular Endothelial Growth Factor, and Glutamine Synthetase by Mature Müller Cells After Dedifferentiation. *J Ocul Pharmacol Ther* 31:476-81, 2015. doi: 10.1089/jop.2014.0117. 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

Kida T, Oku H, Fukumoto M, Okuda Y, Morishita S, Horie T, Suzuki H, Ikeda T. Possible involvement of aquaporin 4 and nitric oxide in the high glucose-induced swelling of Muller cells in rat retina. ARVO Annual Meeting, U.S.A. 2016 年

喜田照代. シンポジウム 3 動物モデルから糖尿病網膜症の病態に迫る: 網膜の細胞からみた Neurovascular Unit 機能異常. 第 120 回日本眼科学会総会 2016 年

喜田照代. シンポジウム 17 糖尿病網膜症の病態に迫る: インスリンによる網膜毛細血管の一酸化窒素(NO)合成と糖尿病黄斑浮腫に及ぼす影響. 第 119 回日本眼科学会総会 2015 年

喜田照代 他. 網膜静脈分枝閉塞症における抗 VEGF 薬治療前後の血管内皮由来調節因子の変化. 第 119 回日本眼科学会総会 2015 年

喜田照代. 一酸化窒素NOと眼循環. 第 121 回京都眼科学会 2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

喜田 照代(KIDA, Teruyo)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号: 90610105

(2)研究分担者

奥 英弘(OKU, Hidehiro)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 90177163

(3)研究協力者

堀江 妙子(HORIE, Taeko)
大阪医科大学・医学部・研究助手