

令和元年6月19日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16612

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症の新たな治療標的としてのアペリンの有用性に関する研究

研究課題名(英文) A study on apelin as a new therapeutic target for diabetic retinopathy

研究代表者

石丸 侑希 (Ishimaru, Yuki)

摂南大学・薬学部・特任助教

研究者番号：80611607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病網膜症は、失明を引き起こす眼疾患であり、その原因は、病態進行によって生じる病的網膜血管新生であることが知られている。今回、網膜症モデルであるoxygen-induced retinopathy (OIR) モデルマウスを用いた検討から、生理活性ペプチドであるアペリンの受容体が病的網膜血管を構成する内皮細胞において高発現すること、およびアペリン受容体アンタゴニストがこの病的網膜血管新生を抑制できること明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病網膜症は、成人における失明原因の上位を占めており、高齢化や食の欧米化の背景から、今後、益々患者数が増加することが予想される。現在、治療薬として血管内皮増殖因子(VEGF)中和抗体が用いられているが、奏効しない症例が存在することから、新たな治療薬の開発が求められている。今回、網膜症モデルマウスにおいて、アペリン受容体阻害剤が病的網膜血管新生に対して阻害効果を示すことを明らかにしたことから、アペリン受容体阻害剤が糖尿病網膜症による失明を阻止できる新たな治療薬となる可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Pathological retinal angiogenesis is caused by the progression of diabetic retinopathy, resulting in irreversible blindness. In the present study, we found that the receptor of apelin, a bioactive peptide, is highly expressed in the endothelial cells within the abnormal vessels, and an apelin receptor antagonist prevented pathological retinal angiogenesis in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. The results of this study suggest that drugs targeting apelin receptor may be a new candidate for preventing blindness in diabetic retinopathy.

研究分野：薬物治療学、眼科学

キーワード：糖尿病網膜症 アペリン アペリン受容体(APJ) 血管新生 神経変性 神経細胞死 神経保護

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は、成人における失明原因の上位を占めており、高齢化や食の欧米化の背景から、今後、益々患者数が増加することが予想される。糖尿病網膜症による失明の原因は、病的網膜血管新生であることが知られている。この病的血管新生を抑制する治療薬として血管内皮増殖因子 (VEGF) に対する阻害薬が用いられているが、奏効しない症例が存在すること、また、VEGF 阻害薬は病的血管のみならず正常血管の機能を破綻させることが示唆されていることから、より特異的に病的血管新生を抑制する治療薬が求められている。

これまでに我々は、網膜症モデルマウス (OIR モデルマウス) の網膜において、生理活性ペプチドであるアペリンが病的血管の形成に伴い著明に発現上昇することを明らかにした。一方、生理的血管形成が起きている網膜において、アペリン受容体は、静脈を構成する内皮細胞に発現することが報告されており、病的血管新生は静脈血管から発生することが明らかにされている。

### 2. 研究の目的

アペリン受容体阻害薬が病的網膜血管新生を抑制できるか否かについて明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 網膜症モデルマウス (OIR モデルマウス)

C57BL6/N マウスを生後 7 日目 (P7) から 5 日間、75%酸素で満たされたチャンバー内で飼育した。その後、生後 12 日目から 5 日間、通常飼育を行った。

#### 薬物投与

アペリン受容体アンタゴニスト ML221 (Sigma-Aldrich) および VEGFR2 阻害剤 SU1498 (LKT Lab.) は、滅菌 DMSO に溶解した。ML221 は 10 mg/kg、SU1498 は 9 mg/kg の用量で P12 から 5 日間、1 日 1 回マウスの腹腔内に投与した。

#### 免疫蛍光染色

網膜血管は、FITC 標識した Isolectin B4 により検出した。網膜血管の定量は、Image J software を用いて行った。また、アペリン受容体 (APJ) および VEGFR2 の検出には、一次抗体として抗 APJ 抗体 (Kasai A., et al., 2010) および抗 VEGFR2 抗体 (CST Inc.) を、二次抗体として Alexa568 標識 goat anti-rabbit IgG 抗体 (Thermo Fisher scientific) を用いた。

### 4. 研究成果

#### 病的網膜血管新生に対するアペリン受容体アンタゴニスト ML221 の効果

病的網膜血管新生に対する ML221 の効果について検討を行った。その結果、ML221 を投与した OIR モデルマウスの網膜では、無処置および DMSO を投与した OIR モデルマウスと比較して、病的血管新生が抑制されていた。また、ML221 を投与した OIR モデルマウスの網膜では、無血管領域の減少がみられた (図 1)。

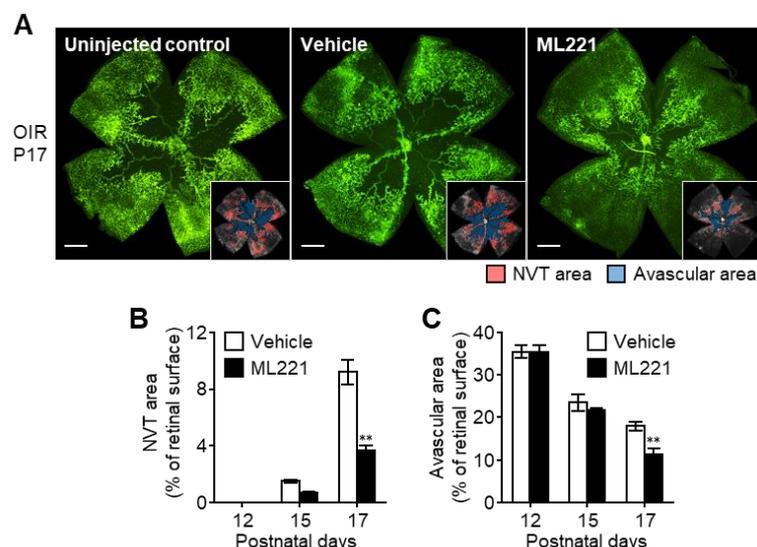


図 1 OIR モデルマウスにおける病的血管新生に対するアペリン受容体アンタゴニスト ML221 投与の影響

A, P17 の OIR モデルマウスの網膜を FITC 標識 Isolectin B4 により染色した。挿入図の赤は病的血管領域、青は無血管領域を示す。B, 病的血管領域を定量化したグラフ C, 無血管領域を定量化したグラフ Scale bars, 500  $\mu\text{m}$ . \*\* $p < 0.01$

### アペリン受容体アンタゴニスト ML221 と VEGFR2 阻害剤 SU1498 の効果の比較

OIR モデルマウスに ML221 または SU1498 を投与し、病的網膜血管新生に対する効果を比較した。その結果、図 1 と同様に ML221 を投与した OIR モデルマウスの網膜では、病的血管新生の抑制と無血管領域の減少がみられた。一方、SU1498 を投与した OIR モデルマウスの網膜では、病的血管新生の抑制はみられたが、無血管領域の減少はみられなかった (図 2)。

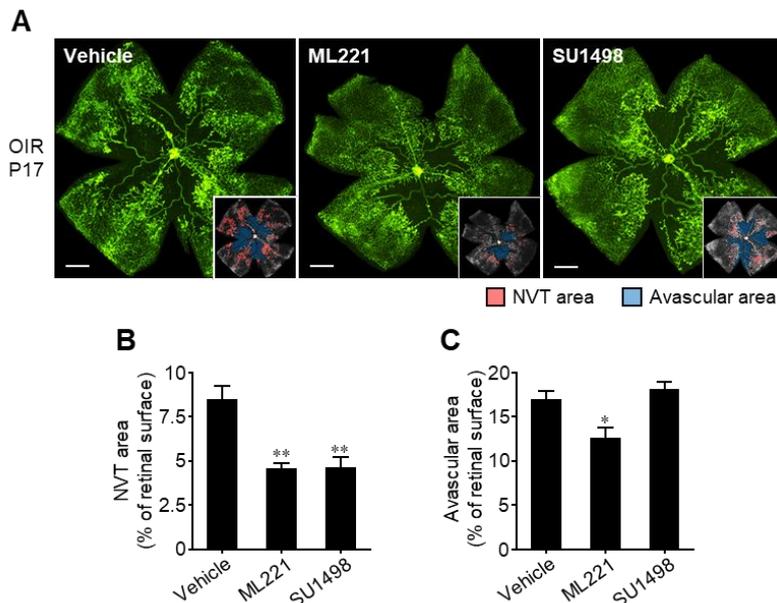


図 2 アペリン受容体アンタゴニストと VEGFR2 阻害剤の効果の比較

A, P17 の OIR モデルマウスの網膜を FITC 標識 Isolectin B4 により染色した。B, 病的血管領域を定量化したグラフ C, 無血管領域を定量化したグラフ Scale bars, 500  $\mu\text{m}$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

### OIR モデルマウスの網膜におけるアペリン受容体と VEGF 受容体の発現

ML221 と SU1498 の効果の違いを明らかにすることを目的として、P17 の OIR モデルマウスの網膜におけるアペリン受容体 (APJ) と VEGF 受容体 (VEGFR2) の発現を調べた。その結果、APJ は、病的血管を構成する内皮細胞に高発現しており、正常血管の内皮細胞にはほとんど発現がみられなかった。一方、VEGFR2 は、病的血管を構成する内皮細胞のみならず正常血管を形成する内皮細胞にも強い発現がみられた (図 3)。

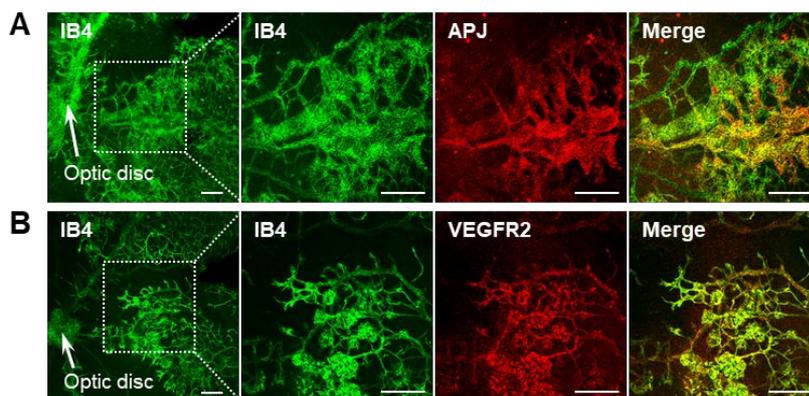


図 3 OIR モデルマウスの網膜における APJ と VEGFR2 の発現

P17 の OIR モデルマウスの網膜を IsolectinB4 (IB4) および抗 APJ 抗体 (A) または抗 VEGFR2 抗体 (B) で染色した。Scale bars, 100  $\mu\text{m}$ .

以上の結果から、アペリン受容体は、病的血管を構成する内皮細胞に高発現すること、およびアペリン受容体アンタゴニストは、VEGFR2 阻害剤と比べて、より選択的に病的網膜血管新生を抑制できる可能性が示され、アペリン受容体阻害薬は、糖尿病網膜症の失明を阻止できる新たな治療薬となる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Yuki Ishimaru, Fumiya Shibagaki, Akiko Yamamuro, Yasuhiro Yoshioka, Sadaaki Maeda. An apelin receptor antagonist prevents pathological retinal angiogenesis with ischemic retinopathy in mice. *Scientific Reports* 7, 2017, 15062 査読有 DOI:10.1038/s41598-017-15602-3

[学会発表](計 20 件)

柴垣 郁弥, 石丸 侑希, 鈴木 麻友, 山室 晶子, 吉岡 靖啓, 前田 定秋 糖尿病モデルマウスにおける網膜神経節細胞の脱落に対する APJ アゴニストの保護作用 日本薬学会第 139 年会 2019 年 3 月 20 日~23 日 千葉

石丸 侑希, 小西 寛子, 柴垣 郁弥, 山室 晶子, 吉岡 靖啓, 前田 定秋 NMDA 誘発網膜神経細胞死に対するアペリン受容体アゴニストの全身投与による保護効果 日本薬学会第 139 年会 2019 年 3 月 20 日~23 日 千葉

石丸 侑希, 小西 寛子, 柴垣 郁弥, 山室 晶子, 吉岡 靖啓, 前田 定秋 アペリン受容体アゴニストの全身投与は NMDA 誘発網膜神経節細胞死を抑制する 第 92 回日本薬理学会年会 2019 年 3 月 14 日~16 日 大阪

柴垣 郁弥, 石丸 侑希, 鈴木 麻友, 山室 晶子, 吉岡 靖啓, 前田 定秋 高脂肪食を負荷した糖尿病モデルマウスで生じる網膜神経節細胞死に対する apelin 受容体アゴニストの保護作用 第 92 回日本薬理学会年会 2019 年 3 月 14 日~16 日 大阪

石丸 侑希 アペリン受容体アゴニストによる安全かつ強力な糖尿病網膜症治療法 JST 新技術説明会 2019 年 2 月 28 日 東京

柴垣 郁弥, 石丸 侑希, 鈴木 麻友, 山室 晶子, 吉岡 靖啓, 前田 定秋 糖尿病モデルマウスで生じる網膜神経節細胞死に対する apelin の保護作用 第 134 回日本薬理学会近畿部会 2018 年 11 月 23 日 神戸

鈴木 麻友, 石丸 侑希, 柴垣 郁弥, 徳田 華奈, 千歳 ひかり, 山室 晶子, 吉岡 靖啓, 前田 定秋 糖尿病モデルマウスにおける網膜神経節細胞死に対するアペリンの保護作用 第 68 回日本薬学会近畿支部総会・大会 2018 年 10 月 13 日 姫路

徳田 華奈, 石丸 侑希, 柴垣 郁弥, 藤井 雄也, 池澤 沙南美, 山室 晶子, 吉岡 靖啓, 前田 定秋 VEGF による網膜血管透過性の亢進に対するアペリンの抑制作用 第 68 回日本薬学会近畿支部総会・大会 2018 年 10 月 13 日 姫路

小西 寛子, 石丸 侑希, 柴垣 郁弥, 山室 晶子, 吉岡 靖啓, 前田 定秋 NMDA 誘発網膜神経細胞死に対するアペリン受容体アゴニストの保護作用 第 68 回日本薬学会近畿支部総会・大会 2018 年 10 月 13 日 姫路

藏野 佑輔, 石丸 侑希, 赤井 喜一, 柴垣 郁弥, 山室 晶子, 吉岡 靖啓, 前田 定秋 網膜色素変性症モデルマウスにおける視細胞死に対するアペリン受容体アゴニストの保護作用 第 68 回日本薬学会近畿支部総会・大会 2018 年 10 月 13 日 姫路

永井 鷹章, 石丸 侑希, 柴垣 郁弥, 栗山 徹, 三浦 鈴奈, 山室 晶子, 吉岡 靖啓, 前田 定秋 網膜虚血再灌流による網膜神経細胞死に対するアペリン受容体アゴニストの保護作用 第 68 回日本薬学会近畿支部総会・大会 2018 年 10 月 13 日 姫路

F. Shibagaki, Y. Ishimaru, H. Konishi, M. Suzuki, Y. Fujii, A. Yamamuro, Y. Yoshioka, S. Maeda An apelin receptor antagonist inhibits pathological retinal angiogenesis in a mouse model of ischemic retinopathy WCP2018 2018 年 7 月 1 日-6 日 京都

Y. Ishimaru, A. Sumino, M. Fujimoto, F. Shibagaki, A. Yamamuro, Y. Yoshioka, S. Maeda Protective effect of an apelin receptor agonist on retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia-reperfusion injury in mice WCP2018 2018 年 7 月 1 日-6 日 京都

柴垣 郁弥, 石丸 侑希, 小西 寛子, 鈴木 麻友, 藤井 雄也, 山室 晶子, 吉岡 靖啓, 前田 定秋 虚血性網膜症モデルマウスにおける異常網膜血管新生に対する apelin 受容体アンタゴニストの阻害効果 日本薬学会第 138 年会 2018 年 3 月 25 日~28 日 金沢

柴垣 郁弥, 石丸 侑希, 金沢 裕美, 四斗 邊学, 小西 寛子, 鈴木 麻友, 藤井 雄也, 山室 晶子, 吉岡 靖啓, 前田 定秋 Apelin 受容体アンタゴニストの虚血性網膜症マウスモデルで生じる異常網膜血管新生に対する阻害効果 第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会 2017 年 10 月 14 日 神戸

石丸 侑希, 柴垣 郁弥, 金沢 裕美, 四斗 邊学, 藤井 雄也, 山室 晶子, 吉岡 靖啓, 前田 定秋 虚血性網膜症マウスモデルにおける異常網膜血管新生に対する apelin 受容体 APJ アンタゴニストの抑制作用 第 131 回日本薬理学会近畿部会 2017 年 6 月 30 日 名古屋

柴垣 郁弥, 石丸 侑希, 鳥居 久人, 金沢 裕美, 四斗 邊学, 山室 晶子, 吉岡 靖啓, 前田 定秋 虚血性網膜症モデルマウスの網膜における異常血管形成に対する BMP9 の apelin 発現抑制を介した抑制作用 日本薬学会第 137 年会 2017 年 3 月 24 日~27 日 仙台

柴垣 郁弥, 石丸 侑希, 鳥居 久人, 金沢 裕美, 四斗 邊学, 山室 晶子, 吉岡 靖啓, 前田 定秋 虚血性網膜症モデルマウスにおける BMP9 による apelin 発現抑制を介した異常網膜血管新生の抑制 第 90 回日本薬理学会年会 2017 年 3 月 15 日~17 日 長崎

柴垣 郁弥, 石丸 侑希, 鳥居 久人, 金沢 裕美, 吉岡 靖啓, 山室 晶子, 前田 定秋 虚血性網膜症モデルマウスにおける TGF- $\beta$ /Smad3 経路を介したアペリンおよび APJ の発現上昇によ

る異常網膜血管形成 生体機能と創薬シンポジウム 2016 2016年8月24日～26日 仙台  
石丸侑希、鳥居久人、金沢裕美、柴垣郁弥、山室晶子、吉岡靖啓、前田定秋 虚血性網膜  
症モデルマウスにおける TGF- 発現誘導を介したアペリンと APJ 発現上昇による異常網  
膜血管形成 129 回日本薬理学会近畿部会 2016年6月24日 広島

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：網膜神経保護作用を有するアペリン受容体アゴニストを含有する医薬組成物

発明者：石丸侑希、前田定秋、吉岡靖啓

権利者：学校法人常翔学園

種類：特許

番号：特願 2018-192861

出願年：2018

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://gyoseki.setsunan.ac.jp/html/100001117\\_ja.html](http://gyoseki.setsunan.ac.jp/html/100001117_ja.html)

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：柴垣 郁弥

ローマ字氏名：(Shibagaki, Fumiya)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。