

平成 21 年 3 月 19 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890247

研究課題名（和文） 虚血性網膜血管新生による眼疾患における  
新規 GPCR リガンド apelin の役割研究課題名（英文） Involvement of apelin, an endogenous ligand for GPCR APJ,  
in the development of ischemic retinopathy.

研究代表者

笠井 淳司 (Kasai Atsushi)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：40454649

研究成果の概要：糖尿病網膜症などの虚血性網膜症の病態進行に病的な血管新生が深く関与していることが知られている。今回、新規生理活性物質 apelin が、虚血性血管新生に関与するの  
か否かを検討した。その結果、マウス虚血性網膜症（ROP）モデルの網膜において、apelin 発  
現が劇的に上昇していることを明らかにした。また、apelin 遺伝子欠損マウスを用いた ROP モ  
デルにおいて、野生型マウスと比較して有意に網膜血管量が低下していた。これらの結果から、  
内因性 apelin は、病的な虚血性血管新生に対し、促進的に作用する因子であることを明らか  
にした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,320,000	0	1,320,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：医歯薬学・生物系薬学

キーワード：血管新生・網膜症・アペリン

## 1. 研究開始当初の背景

現在臨床応用されている医薬品の約半数は G 蛋白共役型受容体 (GPCR) であり、GPCR リガンド研究は、創薬標的を探索する上で極めて重要であると考えられている。

Apelin (APJ endogenous ligand) はオープン GPCR の一つ APJ の内因性リガンドとして、1998 年に我が国の武田薬品工業株式会社のグループにより同定された内因性ペプチドであり、その配列はマウス、ラット、ウシ、

ヒトで完全に保存されている。これまでの投与実験から、apelin は、中枢神経系での飲水調節機能、血管収縮作用、心筋調節作用を有することが示唆されている。しかし、特異的な拮抗薬が開発されていないため、内因性 apelin の生理的役割の詳細は、ほとんど明らかになっていなかった。

申請者は apelin/APJ system の機能解明を目的に、これまで中枢神経系、血管系での検討を加え、サル網膜血管内皮細胞を用い



た *in vitro* 実験系での検討から、apelin が血管新生に深く関与することを世界で初めて明らかにした。また、申請者は、apelin 遺伝子欠損マウス (apelin-KO) を用いた個体レベルでの検討から以下の知見を明らかにしている。

- 1) 生後早期の網膜血管形成が遅延していること。
- 2) 網膜血管形成に関わるアストロサイトや血管内皮増殖因子 (VEGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) およびそれらの受容体の発現に変化がないこと。
- 3) 角膜ポケット法により、VEGF および bFGF 誘発血管新生が減弱していること。
- 4) この減弱は、apelin の処置により部分的に回復すること。
- 5) apelin が bFGF 誘発血管新生を増強させること。
- 6) apelin-KO の特徴的な表現型が硝子体動脈遺残を伴う片眼性白濁奇形を高頻度に発症すること。
- 7) 本表現型が網膜血管形成不全と関連が示唆されているヒト先天性眼疾患の第一次硝子体過形成遺残 (PHPV) と類似していること。

以上の研究成果により、apelin が VEGF や bFGF と共に機能する生理的な網膜血管形成の促進的因子であることを明らかにした。さらに、申請者はヒトおよびマウス apelin 遺伝子の転写開始点の 5' 上流に虚血状態に応答する低酸素応答配列 (HRE) が共通して存在すること、サル網膜血管内皮細胞を用いた *in vitro* 実験系において、虚血モデル (低酸素誘導因子を過剰に蓄積させるデフェロキサミン処置) 時に apelin mRNA が発現誘導されることを明らかにしている。

ごく最近、低酸素により apelin mRNA の発現上昇と分泌が促進されることが報告された。さらに、網膜での虚血性血管新生が起因となる未熟児網膜症 (ROP) モデルでは、新生血管に apelin 受容体 APJ の発現上昇が確認されたことから、虚血性網膜血管新生が起因となる未熟児網膜症や糖尿病網膜症に本シグナルが関与する可能性が考えられる。

一方、糖尿病網膜症は、日本における中途失明の最大原因となっており、その発症機序の全容解明および治療標的の開拓が求められている。糖尿病網膜症で生じる病的な血管新生に VEGF およびエリスロポエチンが深く関与することが知られているが、それらの拮抗薬でも、病的な血管新生を完全に抑制できないこと、および病的な血管新生を伴わない糖尿病網膜症患者でも VEGF の発現が上昇している症例が報告されていることから、これら以外にもキーとなる因子の存在が示唆されている。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、現在までに申請者が生理的な網膜血管形成促進因子として同定した apelin が、病的血管新生にも関与するの可否かを明らかにすることを目的とする。具体的には、1) マウス ROP モデルの作製および評価系の確立、2) ROP モデルにおける病的な血管新生が発生している時期の網膜における遺伝子発現解析、および 3) apelin-KO を用いた ROP モデルの作製および評価を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) ROP モデルの作製および評価系の確立

Apelin/APJ system の関与が予想される ROP モデルの作製を野生型マウスで行う。通常大気でマウスを1週間飼育したのち、生後7日齢 (P7) から母マウスとともに75%酸素条件下で5日間飼育し、その後再度通常大気で数日間飼育する。網膜血管の発生評価は FITC-dextran 灌流により得られる蛍光画像および網膜における各種遺伝子発現解析により行った。

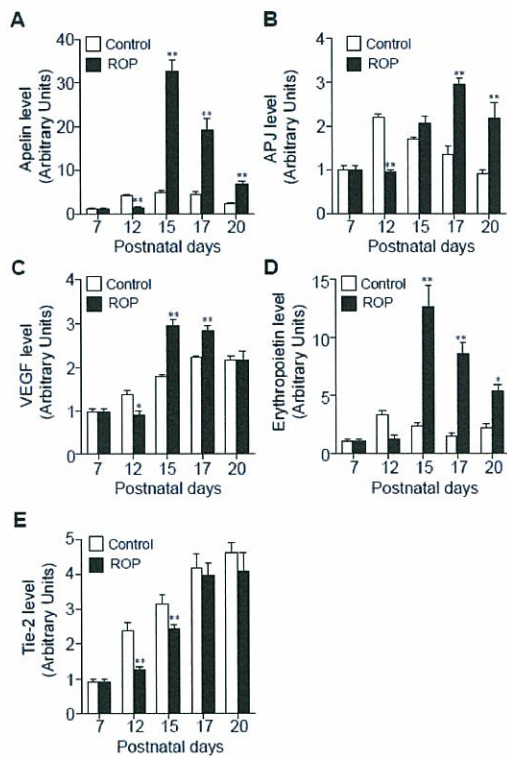
また、apelin/APJ system の特異的な作用薬が未だ存在しないことから、apelin-KO マウスを用いて ROP モデルを作製することで病的な血管新生がどのように変化するのかについて野生型マウスと比較した。

## 4. 研究成果

### (1) 野生型マウスを用いた ROP モデルの網膜における各種遺伝子の発現変化

血管内皮細胞のマーカーとして用いた tie-2 mRNA 発現は、P7 と P12 で同程度であり、高酸素条件下でマウスを飼育することにより、血管形成が抑制されていることが示唆された。また、P12 から通常大気で飼育すると時間依存的に発現が上昇していき、P17 までに血管が形成されていることが示唆された。受容体 APJ は新生血管の先端部分に存在する血管内皮細胞に発現していることが知られている。また、血管内皮細胞に発現すると考えられている APJ の発現も、tie-2 の発現と同様に、P7 と P12 ではほぼ同程度だった。その後、APJ の発現は病的血管新生が起きている P17 をピークに上昇し、P20 では低下し始めていた。一方、apelin mRNA は、P7 の発現レベルに対して、P15 で30倍以上の劇的な発現上昇を示し、その後徐々に発現低下していた。また、虚血性網膜症における病的血管新生を誘導する主な因子として知られる VEGF およびエリスロポエチンも P15 をピークにそれぞれ3倍、13倍程度の発現上昇していた。その後、徐々に低下した。



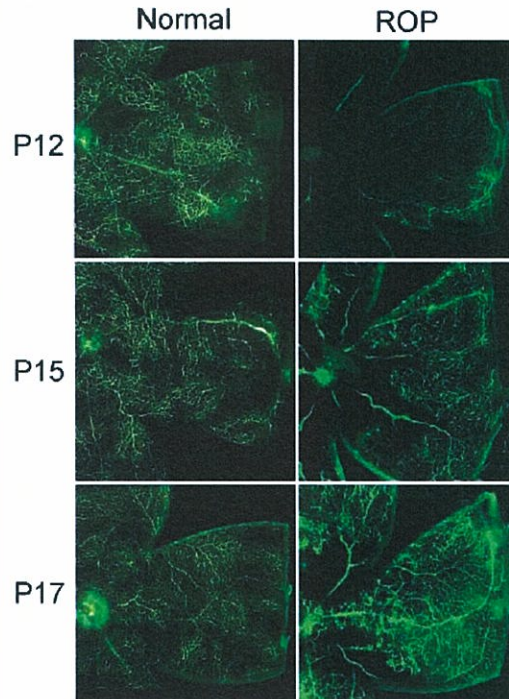


(2) 野生型マウスを用いた ROP モデルの網膜における病的血管新生

生理的なマウス網膜血管形成は生後 1 週間で網膜表面血管が、その後の 1 週間で立体的な深部血管網が構築される。ROP モデルでは、生後 1 週間、高酸素条件下でマウスを 5 日間飼育することにより、網膜表面血管が形成された状態で、以降の深部血管網の構築が抑えられていた。その後通常大気で飼育することにより、網膜中心部分に出来た無血管領域に向けて血管新生が急激に発生していることが明らかになった。また、この時の網膜血管は、正常な網膜血管と比較して明らかに蛇行し、異常な血管走行を示した。さらに動脈瘤のような異常血管が多数観察された。

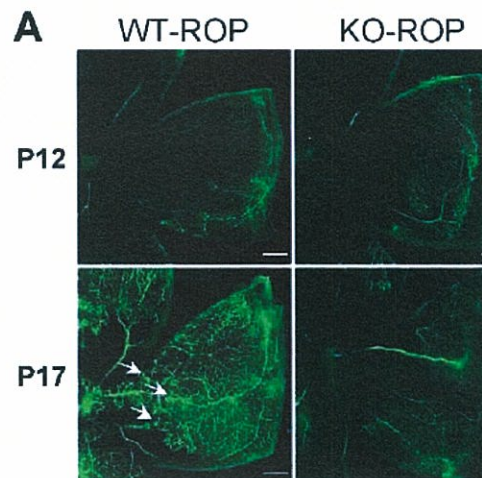
(3) Apelin-KOマウスを用いた ROP モデルの作製

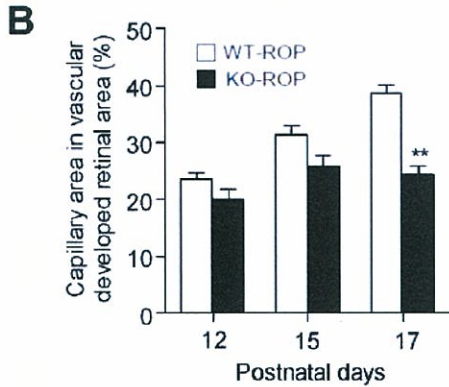
現在、apelin/APJ system の阻害薬は存在しない。そのため、ROP モデルで既存の因子以上に劇的に発現上昇した apelin の機能解析を行うため、apelin-KO マウスを用いた ROP モデルの作製を行った。野生型マウスと apelin-KO マウスの P12 における網膜血管密度は、ほとんど同程度であった。しかし、P15 および P17 の網膜血管密度は apelin-KO マウスで有意に低下していた。また、P17 での野生型マウスの網膜でみられた病的な血管走行および異常血管は、apelin-KO マウスではほとんど発生していなかった。この結果と一



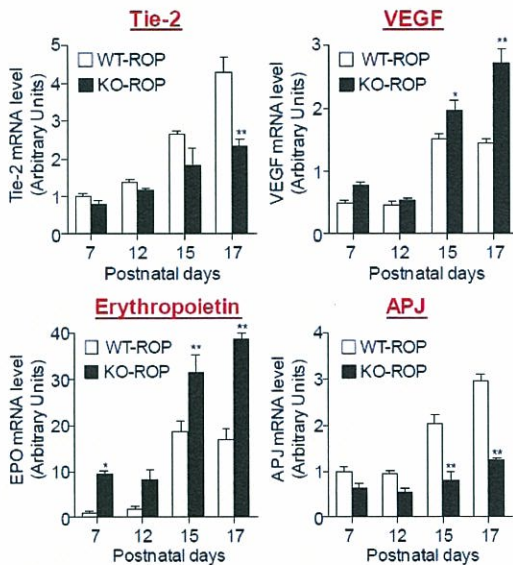
致して、網膜 tie-2 発現が apelin-KO マウスで有意に低下していた。Apelin-KO マウスでの病的血管新生の低下に VEGF やエリスロポエチンの発現が関与しているのかを明らかにするために、apelin-KO マウスの網膜における遺伝子発現を解析したが、野生型マウスと同様に、VEGF やエリスロポエチンの発現上昇がみられ、特に P15 以降では野生型マウスよりも有意に発現が上昇していた。これらのことから、VEGF やエリスロポエチンが発現しているにもかかわらず、apelin-KO マウスでの病的血管新生が抑制されていることが明らかになった。

これまでの研究から apelin/APJ system は VEGF と共に作用し、血管内皮細胞の増殖、管腔形成を促進させることが明らかになって





いる。本研究課題により明らかになった結果から、VEGFだけでなくエリスロポエチンが誘導する病的血管新生にも内因性 apelin の発現上昇が重要であり、これまでに明らかにしてきた生理的な網膜血管形成のみならず、虚血性網膜症の病態を進行させる病的血管新生に対しても促進因子として apelin が機能していることを示唆した。今後は、apelin/APJ system を阻害することで病的血管新生を抑制することが可能か否かについて評価を行うこと、およびROPモデルにおける病的血管新生からの血漿成分の漏出に伴う網膜浮腫などについて組織学的解析を行うことで新規創薬標的分子としての apelin/APJ system の可能性について検討する必要がある。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 笠井 淳司 他 7 名, 「Apelin is required for the development of oxygen-induced retinopathy.」, 第 82 回日本薬理学会年会, 2009 年 3 月 17 日, パシフィコ横浜.
- ② 笠井 淳司 他 7 名, 「虚血性網膜症の病態進行における apelin の役割」, 第 38 回日本心脈管作動物質学会, 2009 年 2 月 6 日, 岡山大学創立五十周年記念館.
- ③ 笠井 淳司 他 8 名, 「虚血性疾患治療を目指した最新トランスレーショナルリサーチ」, 生体機能と創薬シンポジウム 2008, 2008 年 9 月 5 日, 星薬科大学キャンパス内.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笠井 淳司 (Kasai Atsushi)  
 摂南大学・薬学部・助教  
 研究者番号: 40454649

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し