

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592235

研究課題名（和文）：水チャンネル・アクアポリンの血管新生眼疾患への関与

研究課題名（英文）：Involvement of Aquaporin in neovascularization of ocular diseases

研究代表者

北岡 隆 (KITAOKA TAKASHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：80234235

研究成果の概要（和文）：水チャンネル蛋白であるアクアポリン（Aquaporin: AQP）は水の移送に関与するだけでなく、血管新生にも関与することがわかった（Saadoun S et al. Nature 2005, 434: 786）。本研究では網膜色素上皮に存在する AQP1 と網膜ミュラー細胞に存在する AQP4 が加齢黄斑変性の誘導に関与するか検討した。AQP1 が関与する可能性が示され、臨床的影響を光干渉断層計および走査レーザー検眼鏡を用いて検討するのが良いことがわかった。

研究成果の概要（英文）：It was reported that water-channel Aquaporin (AQP) was not only related to water transportation but also induced neovascularization (Saadoun S et al. Nature 2005, 434: 786). In this study, we examined that AQP1 in retinal pigment epithelium and AQP4 in retinal Muller cells may relate to neovascularization in age-related macular degeneration. It was suggested that AQP1 may relate to age-related macular degeneration and optical coherence tomography and scanning laser ophthalmoscope are useful tools for studying the influence of neovascularization in clinical examination

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：アクアポリン、血管内皮増殖因子、網膜色素上皮、硝子体注射、網膜、レーザー光凝固、走査レーザー検眼鏡、光干渉断層計

1. 研究開始当初の背景

細胞を取り囲んでいる脂質膜は、水を通させにくく、その通過は受動拡散で何とか通ることができる。しかしそれだけで十分ではなく、もっと効果的な水の透過の仕組みが想像されてきた。1992年にその水チャンネル蛋白が発見され、アクアポリンと命名された。現在 AQP0~12 まで 13 種類見つかり、生物に普遍的に存在し、全身に分布する。例えば腎臓には AQP1, 2, 3, 4, 6, 7, 11 が存在し、そのノックアウトマウスは尿崩症や嚢胞腎を発症する。眼では AQP0 が水晶体に存在し、その障害で白内障が発症する。AQP4, 5 は涙液分泌に関係し、その障害はドライアイが関係する。このように **AQP** は水輸送・分泌現象等の、生命現象の根幹に働き、病態の発現にも深く関与している。

網膜においては AQP1 と 4 が存在することが知られており、これまでわれわれは網膜光凝固後の浮腫吸収に AQP4 が関与することを示してきた (Kitaoka T, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40: S583)。このことは糖尿病網膜症の浮腫吸収にも **AQP** が関係する可能性がある。一方加齢により脈絡膜新生血管が発生するが、糖尿病ではより脈絡膜新生血管が発生しやすい傾向にある。**AQP1** が血管新生に関与するという報告があり (Saadoun S, et al. Nature 2005, 434: 786)、糖尿病網膜症の脈絡膜血管新生血管に、浮腫吸収のため発現した **AQP** が関係す

る可能性があることは想像に難くない。また加齢黄斑変性では滲出性変化により網膜浮腫および漿液性網膜剥離を生じるが、この浮腫・剥離が **AQP1** を介して、新生血管増悪に働く可能性がある。

2. 研究の目的

水チャンネル蛋白であるアクアポリン (**aquaporin, AQP**) は、生物に普遍的に存在し、網膜においては AQP1 と 4 が存在することが知られている。我々は **AQP** が網膜ミュラー細胞と色素上皮細胞に存在し (Kitaoka T, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39: S797)、網膜の光凝固により、AQP4 が誘導されることを報告してきた (Kitaoka T, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40: S583)。AQP1 はミュラー細胞には存在せず、色素上皮細胞に存在する。この色素上皮細胞の AQP1 は神経網膜の接着や網膜浮腫の吸収に関係することが予想されるが、最近この **AQP1** が血管新生に関与することがわかってきた。本研究では網膜色素上皮関係する **AQP1** が近年失明原因の重大な原因のひとつである加齢黄斑変性に関与するか検討することと、**AQP1** の発現を調節することで加齢黄斑変性の治療が可能かを探ることを目的とする。

3. 研究の方法

*in vitro*の実験として、培養網膜色素上皮細胞にアルゴンレーザー光凝固を行い、AQP1の発現が変化するかを調べた。一方網膜血管内皮細胞の培養系で、AQP1の添加によりその細胞増殖および種々の増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factorなど）の変化を調べた。*in vivo*の実験として、マウス網膜に過剰なアルゴンレーザー光凝固を行い、脈絡膜新生血管を誘発した。この時AQP1の抗体が新生血管の発生にどのように影響するか調べ、AQP1ノックアウトマウスを使い、同様の網膜レーザー光凝固による脈絡膜新生血管誘発の程度を野生型と比較した。

平成 21 年度

1. 網膜色素上皮細胞の培養系
現在最も一般的なヒト網膜色素上皮細胞の培養系である ARPE19 を使用し、それに対しアルゴンブルーによるレーザー光凝固を施行した（藤川）。200 マイクロメートル、100mW、0.2 秒でシャーレ上で 200 スポットの条件で行い、ウェスタンブロット法により AQP1 の発現を調べ（築城）、レーザー施行なしの状態と比較した。網膜血管内皮細胞の初代培養系で AQP1 を添加することにより VEGF, bFGF の発現変化をノーザンブロットで調べ（鈴間）、これにより色素上皮細胞の刺激に

よる AQP の発現変化と、その変化によって血管新生が影響されるかの基礎データとすることができた。

2. マウス眼球を用いた実験系

8週齢のBalb/cマウスを使用し、アルゴンレーザーで、網膜に100マイクロメートル、200mW、0.2秒の条件で過剰光凝固を行った（藤川）。レーザー前の処置として、2日前に、眼内に抗AQP1抗体を注入した（築城）。3日、7日、14日、28日後に眼球を摘出し、以前の報告と同様の手技で（Kuroki AM, Kitaoka T, et al. *Ophthalmic Res* 2003, 35: 137）、通常の透過形電子顕微鏡観察と、網膜血管鋳型標本を作製し走査形電子顕微鏡観察を行った（限上）。

平成 22 年度

マウス眼球を用いた実験系

1. 8週齢のBalb/cマウスを使用し、アルゴンレーザーで、網膜に100 マイクロメートル、200mW、0.2 秒の条件で過剰光凝固を行った（藤川）。レーザー前の処置として、2日前に、眼内に抗AQP1抗体を注入した（築城）。ここまでは同じ実験方法であるが、これに手術的に強膜側より人工房水を網膜下に注入する群を追加し（築城）、漿液性剥離吸収にAQP1が関係しているか調べた。上記の実験と同じく、3日、7日、14日、28日後に眼球を摘出し、通常の透過形電子顕微鏡観察と、網膜血管鋳型標本を作製し走査形電子顕微鏡観察を行った（限上）。

2. 上記1の実験に加え、抗AQP1抗体だけでなく抗VEGF抗体を注入する群に加え、①抗AQP1抗体注入+抗VEGF抗体注入群②抗AQP1抗体注入のみ群③抗VEGF抗体注入のみ群④生食注入群の4群を比較した（鈴間・北岡）。
3. もう一つの系として①人工的剥離作成+抗AQP1抗体注入+抗VEGF抗体注入群②抗AQP1抗体注入+抗VEGF抗体注入の群③人工的剥離作成+抗VEGF抗体注入+生食注入群④人工的剥離作成+生食注入群⑤生食注入群の5群を比較した（鈴間・北岡）。

平成 23 年度

1. ここまでの2年間で進行状況がおそい平成22年度分の2および3について引き続き実験を継続を行った（鈴間・北岡）。

4. 研究成果

現在最も一般的なヒト網膜色素上皮細胞の培養系であるARPE19を使用し、アルゴンレーザーによるレーザー光凝固を施行し、AQP1の発現をノーザンブロットで調べたところ、軽度の上昇を見たが、はっきりとした有意とはいえなかった。次に8週齢のBalb/cマウスを使用し、アルゴンレーザーで、網膜に100マイクロメートル、200mW、0.2秒の条件で過剰光凝固をおこない、ノーザンブロットとin situ hybridization法でVEGFとAQP1の発現を調べた。両者とも上昇を認めた。AQPが血管新生因子としては働くかどうか、は不明であるが、VEGF値と平行して動く可能性が示唆され、血管新生におけるAQPの関与を示唆した。次に、ARPE19を低酸素状態で培養し、その前後でのAQP1とVEGFの発

現をメッセージレベルと蛋白レベルで検討したところ、AQP1とVEGFの両者ともにメッセージ/蛋白の両者で上昇を認めた。アルゴンレーザーでは過剰に凝固を行うと新生血管を生じる場合があるが、レーザーにより生じた網膜の浮腫状態が、浮腫吸収の過程で発現したAQP1により新生血管発生へ向かう可能性が示唆された。この過程を防ぐ方法の一つとしてAQP1の抗体による治療の可能性があるが、その予備実験としてIgGの硝子体内注射の動態を研究し、網膜に移行することが確認された。次に前述の条件で網膜にレーザーの過剰光凝固を行い、新生血管を発現させた。

この新生血管は蛍光眼底撮影で観察され、その網膜を伸展標本とし、AQP1, 4の抗体で染色し、色素上皮細胞に染色が認められた。

また様々な疾患を治療する場合に手術侵襲により逆に炎症が助長され新

生血管を発生してしまう場合があり、その対策として結膜切開を行わない治療法を開発し、その結果を報告した。さらに新生血管が発生した場合の検出方法として走査レーザー検眼鏡が有効であることを見いだした。また新生血管および網膜浮腫を検知する場合にその検査器機である光干渉断層計の機器ごとの違いを明らかにし、評価方法の確立を図った。

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 3 件)

Miura Y, Uematsu M, Teshima M, Suzuma K, Kumagami T, Sasaki H, Kitaoka T: Injection Site and Pharmacokinetics after Intravitreal Injection of Immunoglobulin G J Ocul Pharmacol Th 27: 2 35-41, 2011

Matsumoto M, Suzuma K, Miyamura N, Tsuiki E, Kitaoka T: Transcorneal Three-port Vitrectomy Without Conjunctival Incision. Retina-J Ret Vit Dis, 31, 181-183, 2011

Suzuma K, Tsuiki E, Matsumoto M, Fujikawa A, Kitaoka T: Retro-mode imaging of fibrovascular membrane in proliferative diabetic retinopathy after intravitreal bevacizumab injection Clinical Ophthalmology, 55, 620-624, 2011

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北岡 隆 (KITAOKA TAKASHI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究
科・教授
研究者番号：80234235

(2) 研究分担者

隈上 武志 (KUMAGAMI TAKESHI)
長崎大学・病院・准教授
研究者番号：70294329

鈴間 潔 (SUZUMA KIYOSHI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究
科・准教授
研究者番号：80335265

藤川 亜月茶 (FUJIKAWA AZUSA)
長崎大学・病院・講師
研究者番号：60363503

築城 英子 (TUIKI EIKO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究
科・助教
研究者番号：30363493

(3) 連携研究者

なし