

機関番号：34428

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790098

研究課題名（和文） 虚血性網膜疾患における新規創薬標的分子としての apelin の可能性

研究課題名（英文） Possibility of apelin in ischemic retinal disease as a new target for drug development

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（和文）：糖尿病網膜症などの虚血性網膜疾患では、病態進行に病的血管新生が深く関与している。これまで、研究代表者らは、虚血性網膜症のマウスモデルにおいて、内因性アペリンが網膜血管新生の促進因子であることを明らかにしてきた。今回、apelin が新たな治療標的となるか否かについて検討した。その結果、apelin siRNA の硝子体内投与により網膜 apelin 発現を約 50%抑制し、網膜血管新生および異常血管の形成を有意に抑制することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Pathological angiogenesis in patients with ischemic retinal diseases such as diabetic retinopathy results in visual loss and blindness, because the newly formed vessels are quite leaky and can cause vitreous hemorrhage. We previously reported that a dramatic upregulation of apelin expression cause exuberant endothelial cell proliferation and pathological angiogenesis in retinas of oxygen-induced retinopathy model. Here, we demonstrate that in vivo delivery of apelin siRNA to retina resulted in suppression of pathological angiogenesis in oxygen-induced retinopathy model.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：血管新生・アペリン・網膜・虚血・VEGF・siRNA・硝子体内投与・ペリサイト

## 1. 研究開始当初の背景

虚血性網膜症の一つである糖尿病網膜症は、日本における中途失明原因の第2位を占める重篤な疾患であり、糖尿病患者の増加に伴い失明人数が毎年増加しているため、治療薬の開発が望まれる疾患である。本疾患では、網膜血管の異常により血液供給が低下し、網

膜が虚血状態になり、それに伴う血管新生が病態進行および合併症の原因になることが知られている。そのため、現在の治療は、この血管新生を抑制することを目的としてレーザーによる光凝固治療が行われてきた。

最近では、虚血性網膜症で生じる血管新生を誘導する因子として血管内皮増殖因子

(VEGF)およびエリスロポエチンが同定されたことから、特に VEGF 中和抗体を用いた血管新生抑制治療が行われている。しかし、VEGF 中和抗体が効果的な治療効果を上げる一方で、効果が一過性であることや、全ての血管が反応するわけではないことが明らかになってきた。そのため、効果的な治療効果を示す新たな分子の同定が必要になっていく。

研究代表者らは、これまでに、オーファン受容体 APJ の内因性リガンドとして同定された apelin が網膜血管新生の促進因子であることを見出してきた。さらに、虚血性網膜症モデルとして汎用されている酸素誘発網膜症 (OIR) モデルを用いた研究から、動脈瘤様の異常な形態を示す新生血管が出来る時期に apelin が発現上昇すること、この発現上昇が VEGF やエリスロポエチンの発現上昇よりも大きいことを見出してきた。さらに、apelin 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いた OIR モデル (KO-OIR マウス) では、VEGF やエリスロポエチンの発現上昇があるにも関わらず、網膜血管新生がほとんど起きないことを見出してきた。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、現在までに研究代表者らが見出した内因性 apelin の網膜血管新生因子としての役割が、虚血性網膜症の治療標的となるのか否かについて明らかにすることを目的とする。具体的には、1)OIR モデルにおける apelin 受容体 APJ の発現部位を特定すること、および 2)apelin/APJ system の阻害により OIR モデルで生じる異常な形態の血管新生がどのように変化するのかについて評価を行う。

## 3. 研究の方法

### (1)OIR モデルの作製

通常大気でマウスを 1 週間飼育したのち、生後 7 日齢 (P7) から母マウスと共に 75%酸素条件下で 5 日間飼育し、その後通常大気で飼育する。網膜血管の評価は、FITC-dextran 灌流を行った網膜フラットマウントおよび眼球切片の HE 染色により評価を行った。

### (2)In vivo における siRNA の遺伝子導入

Apelin および control siRNA は Qiagen 社から購入したものを使用した。200 pmol/0.5  $\mu$ l siRNA と 0.5  $\mu$ l InvivoFectamine Reagent (Invitrogen) と 0.167  $\mu$ l 2M glucose を室温で 30 分間混和した。マウスを麻酔後、ミドリン P で散瞳させたのち 1  $\mu$ l を硝子体内に投与した。

## 4. 研究成果

### (1)Apelin 受容体 APJ の発現

OIR モデルの網膜において、血管新生が起こる時期に内因性 apelin が劇的に発現上昇するものの、その標的細胞は明らかになっていなかった。そこで、apelin 受容体 APJ の抗体を作製し、免疫染色を行った結果、血管内皮細胞に発現していることが明らかになった (図 1)。さらに、全ての血管内皮細胞に発現しているわけではなく、新生血管を伴わない血管にある内皮細胞にはほとんど APJ の発現が認められなかった (図 1, arrowheads)。

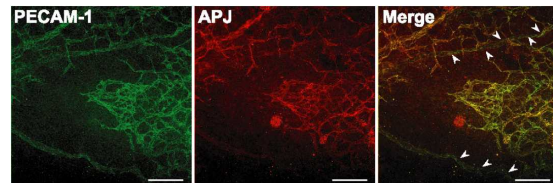


図 1. OIR モデルマウスの網膜における apelin 受容体 APJ の発現分布

### (2)網膜への遺伝子導入

現在までに apelin/APJ system の効果的な阻害剤が存在しないことから、apelin シグナルの阻害を apelin siRNA により行うことにした。硝子体内投与で siRNA が網膜表面に遺伝子導入できる実験系を確立するために、alexa-488 標識 siRNA を用いた。Alexa-488 標識 siRNA を硝子体内投与し、2 日後に網膜を単離後、蛍光顕微鏡下で遺伝子導入されているか否かを解析した。その結果、網膜フラットマウントの蛍光画像から、siRNA は、網膜表面に存在にある血管などの組織に遺伝子導入されていることが明らかになった (図 2, arrowheads)。

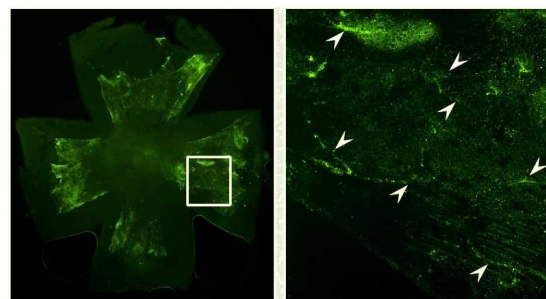


図 2. Alexa-488 標識 siRNA の硝子体内投与による網膜組織に遺伝子導入

### (3)Apelin siRNA の発現抑制作用

Apelin 遺伝子発現に対する siRNA の抑制効果について、血管内皮細胞株を用いた *in vitro* 実験系において解析した結果、apelin 発現を約 95%抑制することが明らかになった。この抑制作用は、既存の血管新生因子である VEGF には影響を与えなかった。

Apelin siRNA を OIR マウスに P12 および P14 の 2 回硝子体内投与し、P15 における apelin 遺伝子発現を解析した。その結果、control siRNA 投与群と比較して約 50%の Apelin 発現の有意な抑制を示した。また、この抑制作用は、VEGF には影響が無かった(図 3)。

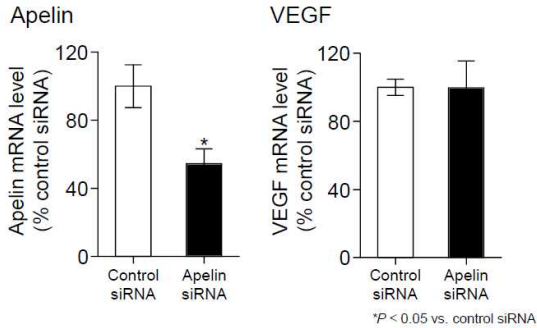


図 3. Apelin siRNA 硝子体内投与による OIR マウスの網膜における遺伝子発現変化

#### (4) Apelin siRNA による網膜血管新生抑制作用

Apelin siRNA による apelin 遺伝子発現の抑制が OIR モデルで生じる網膜血管新生にどのような効果を示すのかについて、apelin siRNA を P12 および P15 投与し、P17 で網膜血管の構造変化を解析した。

OIR モデルの P17 における網膜血管量を FITC-dextran 灌流により解析した結果、control siRNA 投与群は、無処置群と比べてほとんど変化が無く、siRNA 投与による血管新生には影響が無かった。

Control siRNA と apelin siRNA を同一個体の両眼にそれぞれ硝子体内投与した網膜を解析すると、control siRNA 投与群と比較して apelin siRNA 投与群では、明らかな網膜血管量の低下を示した(図 4)。また、網膜あたりの血管量を定量化すると、apelin siRNA により血管新生が有意に抑制されていた(図 5)。

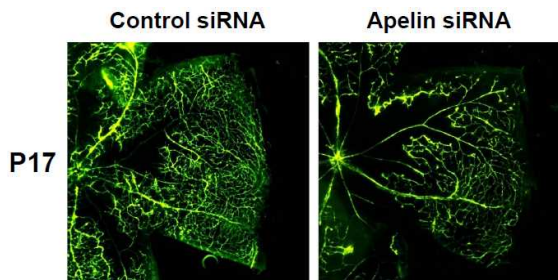


図 4. P17 の OIR モデルにおける網膜血管新生に対する apelin siRNA の効果

さらに、10  $\mu$ m 以上の瘤状構造血管を病的

血管とし、網膜血管における病的血管の割合を定量化した結果、apelin siRNA 投与群では、control siRNA 投与群より有意に低下していた(図 6,7)。

次に、眼球切片を組織染色し、網膜の構造変化を解析した。その結果、OIR モデルで生じる網膜血管新生は、網膜表面から硝子体へ突出し、瘤状構造の血管が網膜表面から硝子体へ侵入していた。さらに、control siRNA 投与群では、その硝子体へ侵入する血管量には大きな変化は認められなかったが、apelin siRNA 投与群では明らかに低下していた(図 8)。また、定量化を目的に、網膜表層に存在する神経節細胞層から硝子体側にある細胞数を測定した結果、apelin siRNA は、control siRNA 投与群に比べて、約 50%にまで抑制していた(図 9)。

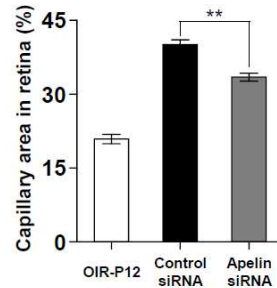


図 5. P17 の OIR モデルの網膜における血管量の割合に対する apelin siRNA の効果

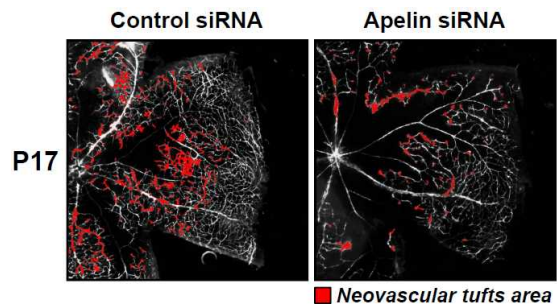


図 6. OIR モデルで生じる病的血管新生に対する apelin siRNA の効果

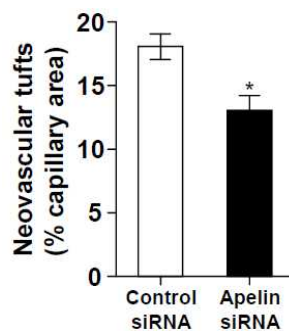


図 7. OIR モデルにおける病的血管新生に対する apelin siRNA の抑制作用



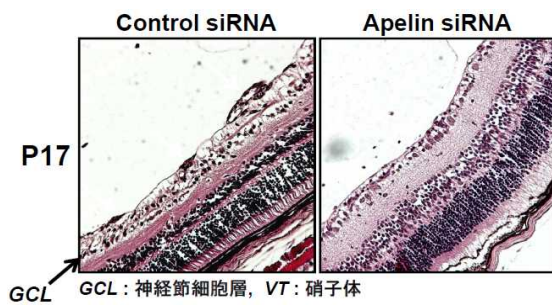


図 8. P17 の OIR モデルの網膜構造変化に対する apelin siRNA の影響

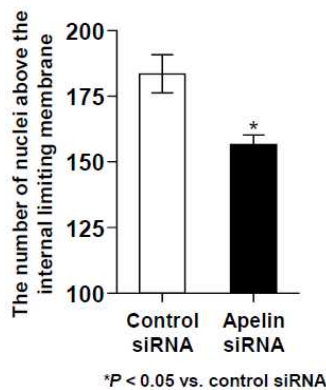


図 9. 神経節細胞層より硝子体側に存在する細胞数に対する apelin siRNA の影響

#### (5)まとめ

以上の結果により、OIR モデルで生じる病的血管新生に対して、apelin siRNA は効果的に抑制することが明らかとなった。このことから、apelin/APJ system の阻害薬が糖尿病網膜症等の虚血性網膜症に対する新たな治療薬になる可能性が考えられる。

#### 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1件)

1. Atsushi Kasai, Yuki Ishimaru, Toshihiko Kinjo, Tatsuya Satooka, Nao Matsumoto, Yasuhiro Yoshioka, Akiko Yamamuro, Fumi Gomi, Norihito Shintani, Akemichi Baba, Sadaaki Maeda "Apelin is a crucial factor for hypoxia-induced retinal angiogenesis." *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 査読有, 30, 2010;2182-2187.

[学会発表](計12件)

1. 石丸侑希 他4名, "虚血性網膜症モデルにおける網膜血管新生に対する apelin siRNA の抑制作用" 日本薬学会第131年会, 2011年3月30日, ツインメッセ静岡
2. 笠井淳司 他5名, "Suppression of pathological retinal angiogenesis by siRNA targeting apelin" 第84回日本薬理学会年会, 2011年3月22日, パシフィコ横浜
3. 笠井淳司 他7名, "Apelin is a crucial factor for hypoxia-induced retinal angiogenesis" 第18回日本血管生物医学科学術集会, 2010年12月3日, 梅田スカイビル(大阪)
4. 石丸侑希, 笠井淳司 他3名, "アペリン siRNA による虚血性網膜血管新生の抑制作用" 第118回日本薬理学会近畿部会, 2010年11月19日, 千里ライフサイエンスセンター
5. 笠井淳司 他7名, "眼内血管新生性疾患におけるアペリンの病態生理学的役割と創薬標的分子としての可能性" 第60回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2010年10月30日, 摂南大学
6. 石丸侑希, 笠井淳司 他6名, "虚血性網膜血管新生における apelin/APJ system の役割" 第60回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2010年10月30日, 摂南大学
7. 笠井淳司 他6名, "Apelin is a crucial factor for hypoxia-induced retinal angiogenesis" 16<sup>th</sup> World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR), 2010年7月21日, Bella Center Copenhagen
8. 石丸侑希, 笠井淳司 他3名, "Apelin expression is mainly regulated by HIF-1alpha in astrocytes" 16<sup>th</sup> World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR), 2010年7月21日, Bella Center Copenhagen
9. 笠井淳司 他7名, "虚血性網膜症モデルマウスにおける網膜血管新生に対するアペリンの役割" 薬学会第130年会, 2010年3月28日, 就実大学
10. 石丸侑希, 笠井淳司 他6名, "Apelin promotes endothelial cell growth during hypoxia-induced retinal angiogenesis" 第83回日本薬理学会年会, 2010年3月17日, 大阪国際会議場
11. 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" 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2009, 2009年8月24日, 慶應義塾大学
12. 笠井淳司 他6名, "虚血性網膜症における病的血管新生に対する apelin の促進作用" 第6回GPCR研究会, 2009年5月

8日, 日本科学未来館

〔図書〕(計1件)

1. 笠井淳司 (分担) “生理活性ペプチド  
アペリン” 脳 21, 金芳堂, 13,  
2010;89-93.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.setsunan.ac.jp/~p-yakuch/>

## 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