

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16879

研究課題名（和文）スフィンゴシン・1・リン酸3シグナルの脈絡膜新生血管と線維化における役割の解明

研究課題名（英文）Role of sphingosine 1-phosphate 3 signaling in choroidal neovascularization and fibrosis.

研究代表者

岩西 宏樹（IWANISH, HIROKI）

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40784319

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：S1P3欠失マウスにおいてレーザー誘発脈絡膜新生血管（CNV）は有意に抑制され、レーザー照射組織におけるTGFβ1を含む炎症性サイトカインの発現が低下していた。S1P3欠失マウスと野生型マウス間での相互骨髄移植後のレーザー誘発CNVは有意差がなかった。S1P3欠失マウスのレーザー誘発CNV組織におけるS1P2の発現亢進を認めた。S1P3欠失マウスへのS1P2選択的阻害薬の全身投与で新生血管抑制が増強されなかった。In vitro tube formation assayでもS1P3選択的阻害薬による管腔形成抑制に対して、S1P2選択的阻害剤の追加による管腔形成抑制追加効果はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢黄斑変性は先進国中途失明原因の上位疾患である。滲出型加齢黄斑変性に対して臨床的に抗VEGF抗体の硝子体内注射が有効であるが、一度退縮した新生血管の再燃による繰り返し投与とそれに伴う高額な医療費、治療中の線維瘢痕化に伴う不可逆的視力障害などの課題がある。

本研究で、マウスモデルで滲出型加齢黄斑変性における新生血管へのS1P受容体レベルでの関与を証明した。S1P3シグナル抑制によるTGFβシグナルの抑制も認めた。シグナル補完に関しては、血管新生抑制に関してS1P2とS1P3同時阻害による追加作用はなかった。S1P3シグナル単独抑制が滲出型加齢黄斑変性の新たな治療ターゲットになり得ると結論付けた。

研究成果の概要（英文）：Laser-induced choroidal neovascularization (CNV) was significantly suppressed in S1P3-deficient mice, and the expression of inflammatory cytokines, including TGFβ, was decreased in laser-irradiated tissues. There was no significant difference in laser-induced CNV after reciprocal bone marrow transplantation between S1P3-deficient and wild-type mice. Immunostaining showed increased expression of S1P2 in laser-induced CNV tissue from S1P3-deficient mice.

Systemic administration of an S1P2 selective inhibitor to S1P3-deficient mice did not enhance neovascular suppression. In vitro tube formation assays also showed no additional effect of S1P2 inhibition on lumen formation in response to S1P3 inhibition.

研究分野：眼創傷治療

キーワード：スフィンゴシン-1-リン酸 レーザー誘発脈絡膜新生血管 TGFβ 創傷治療 滲出型加齢黄斑変性

1．研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は、本邦における中途失明原因の第4位、米国では第1位の疾患である。滲出型と萎縮型に分類される。滲出型の特徴は黄斑部網膜下の脈絡膜新生血管（choroidal neovascularization：以下 CNV）で、その血管未熟性に起因する滲出液の貯留や黄斑浮腫、網膜下出血などを引き起こし重篤な視力障害を引き起こす。光線力学的療法による CNV の退縮（破壊、閉塞）や抗血管内皮細胞成長因子（vascular endothelial growth factor：以下 VEGF）療法による進行予防や CNV の退縮など、極めて有効な治療法が臨床で使用されている一方で、無効例、治療中の線維瘢痕化による不可逆的視力障害、一度抑制された CNV の再燃、継続的な治療の必要性和それに伴う高額な医療費、全身合併症としての血管閉塞イベント発生リスクなど克服されるべき課題は多い。

その動物モデルである実験的アルゴンレーザー誘発 CNV モデルを用いた病態解析、血管新生抑制やその誘因となる炎症の抑制のための研究が活発に行われている。実験的 CNV 増生病態の研究は(1)血管血管内皮細胞そのもの、(2)炎症抑制による新生血管抑制、(3)線維瘢痕化抑制に分類される。臨床現場では CNV 退縮目的で抗 VEGF 抗体治療が一般化しているが、病態には他の成長因子も関与している。例えば、本代表研究者の研究でトランスフォーミング成長因子 β （transforming growth factor β ：以下 TGF β ）のシグナル伝達因子である Smad の欠失マウスではレーザー誘発 CNV が炎症軽減とともに抑制された。薬剤（SIS3）による Smad3 阻害はヒト臍帯静脈内皮細胞の管腔形成（血管新生）作用を増強した。従って in vivo ではレーザー誘発 CNV が Smad3 欠失マウスで抑制されたことは、血管内皮細胞自体の血管形成抑制作用ではなく局所炎症の抑制がマウス CNV 治療効果の原因と考察した（Iwanishi H et al. Lab Invest 2016）。さらに、サイトカインによる CNV 病態の制御は、極めて複雑と考えている。炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor：以下 TNF）欠失マウスでは、予想に反し、レーザー誘発 CNV は抑制されず、新生血管のアポトーシス抑制により CNV が遷延することを報告した（Iwanishi et al. J Cell Mol Med 2022）。

所属研究室では、スフィンゴシン・1-リン酸(S1P)シグナルの血管新生制御に関する研究をおこなってきた。S1P 受容体は S1PR1-5 の5種が知られている。S1P の生体における主な機能は、血管の発生と機能の調節、白血球の体内動態の調節、神経系の発生の大きく三つにまとめられる。S1PR 受容体サブタイプの中では S1PR1-3 が広く各組織、細胞に発現し、S1PR4 は血液の系の細胞、S1PR5 は神経系と発現分布が限局している。S1P は細胞内でスフィンゴシンキナーゼの作用により産生されたのち、細胞の外へ輸送され、各 S1PR を介しシグナルを伝達する。所属研究室では安田慎吾助教が S1PR3 受容体シグナルを介してマウス角膜で血管新生に関与していることを S1PR3 受容体欠失マウスを用いて解明した。S1PR3 欠失は(1)角膜実質での TGF β 1を含む炎症抑制につながり、(2)培養血管内皮細胞を用いた血管新生アッセイで S1PR3 阻害による血管新生（管腔形成）抑制作用も併せ持っていた（Yasuda S, et al. Lab Invest.2021）。代表研究者も共同著者として本研究に参画した。

血管内皮細胞及び血管平滑筋細胞には S1PR2 および S1PR3 が検出される。S1PR1 欠失マウスは血管発育異常が原因で胎生致死に至るが、S1PR2 欠失マウス、および S1PR3 欠失マウスは胎生致死には至らず表現型の異常が観察されない。S1PR2 欠失マウスの解析により S1PR2 は、生後の生理

の網膜血管新生を抑制するが、未熟児網膜症モデルの検討では病的なマウス 網膜血管新生をむしろ促進したと報告された。S1PR1/S1PR2 のダブルおよび S1PR1/S1PR2/S1PR3 のトリプル欠失マウスは、S1PR1 欠失マウスよりも重篤な血管発育異常により胎生致死に至る (Kono M et al. J Biol Chem. 2014)。このことは S1PR1、R2 および R3 は胎生期の血管新生に協調的に働くことを示唆する。

国外研究施設から抗 S1P 抗体によるマウスレーザー誘発 CNV 抑制が報告された (Xie B, et al. J Cell Physiol. 2009)。しかし S1P 受容体 1 型 (S1PR1) シグナルは、網膜神経節 (ガングリオン) 細胞の維持に必須であり (Blanco R, et al. Exp Eye Res. 2017) 抗体で S1P リガンドを除去する治療戦略はレーザー誘発 CNV の増生の抑制と同時に網膜機能を障害する可能性が高い。すなわち S1P シグナル阻害は炎症、血管新生、組織線維化に關与するシグナルを下流に持つ特異的受容体レベルで行われなければならないと考えた。

所属の安田講師が、S1PR3 欠損による角膜血管新生抑制作用を証明した (上述)。この角膜血管新生での研究を受け、CNV 発生にも類似の機序が根底にあると想定した。マウスレーザー誘発 CNV 発育が低分子 S1PR2 阻害薬の硝子体内投与で抑制されたと他施設から報告された (Terao et al. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2019)。しかし in vivo 病的新生血管において S1PR2 と S1PR3 のシグナル協調や補完という観点での研究はなされていない。この解決には S1PR2 と S1PR3 のそれぞれの遺伝子欠失マウスによる解析が不可欠であると考えた。

予備的研究でレーザー誘発 CNV モデル (Iwanishi H et al. Lab Invest. 2016) を野生型マウスおよび S1PR3 欠失マウスに作製し、S1PR3 欠失マウスでは野生型マウスに比べ CNV 面積が有意に小さい結果を得た。レーザー照射組織における各種細胞成分マーカー、炎症性サイトカインの mRNA 発現を real time RT-PCR で検討し、S1PR3 欠失マウスのレーザー照射組織では TGFβ1 を含む炎症性サイトカインの発現が有意に抑制されていたが、VEGF-A の発現は野生型マウスと比べ有意差はなかった。

2. 研究の目的

S1PR3 由来シグナルの制御が実験的マウスレーザー誘発 CNV 抑制での治療標的になりうるか、S1PR2 シグナルによる補完、協調があるかを解明することが「核心をなす問い」であり、本研究では、S1P の受容体レベル (受容体 R2 型と R3 型) での阻害が TGFβシグナルとのクロストークを介して、血管新生ならびに眼炎症・線維化 (癍痕) 疾患に治療効果を発揮するという仮説の検証とその分子メカニズムの解明、さらにそれに基づいた新規治療戦略の提唱を目的とした。

3. 研究の方法

(1) In vivo レーザー誘発 CNV モデルを用いた研究

野生型マウスの眼底にアルゴンレーザー照射により CNV を誘発し、S1PR2 及び S1PR3 の発現を免疫染色で同定した。S1PR3 欠失マウスでの CNV 抑制効果は予備的に確認しているので S1PR3 選択的阻害薬 (CAY10444) を腹腔内投与し、PBS 投与群 (コントロール群) と CNV の抑制効果を検討した。

レーザー誘発 CNV モデルを S1PR3 欠失マウスに作製し (抑制効果は確認済み) S1PR2 の発現を免疫組織学的手法で評価した。

レーザー誘発 CNV モデルで併発する網膜色素上皮層の上皮-間葉移行や脈絡膜間葉系細胞の線維癍痕を、野生型及び S1PR3 欠失マウスで α 平滑筋アクチン (αSMA、筋線維芽細胞) 型コラーゲンについて免疫組織学的に比較検討した。

S1PR3欠失マウスと野生型マウスで相互骨髄移植し、S1PR3欠失マウスにおけるレーザー誘発 CNVモデルの表現型の責任細胞が組織細胞と骨髄由来細胞のどちらであるか明らかにした。

S1PR3欠失マウスにレーザー誘発CNVを作成し、S1PR2選択的阻害薬 (JTE013) を14日間毎日全身 (腹腔内) 投与をおこないS1PR2選択的阻害薬 (JTE013) の追加投与によるCNV増生抑制効果を検討した。

(2) ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC を用いて血管新生アッセイでの S1PR2 選択的阻害薬および S1PR3 選択的阻害薬の同時併用効果の検討

所属の安田助教は、マウス網膜微小血管内皮細胞を用いて S1PR3 選択的阻害薬 (CAY10444) による新生血管 (管腔形成) 抑制と、S1PR3 欠失マクロファージで VEGF-A mRNA 発現が有意に低い事を報告した (Yasuda S, et al. Lab Invest, 2021)。

本研究では、In vitro tube formation assay を用いて S1PR3 阻害による管腔形成抑制が S1PR2 阻害追加により影響するかを評価した。HUVEC を用いた in vitro tube formation assay キット (CBA-200、CBL) を使用した。HUVEC を細胞 ($5 \times 10^4/150 \mu\text{L}$) をプレートの各ウェルに播種した。JTE013 (選択的 S1PR2 阻害薬)、CAY10444 (選択的 S1PR3 阻害薬) の 2 つの異なる試薬を組み合わせた以下の 4 つの実験的培養条件を準備した。(1) コントロール培養群 (n=3)、(2) 100uM の JTE013 投与群 (n=4)、(3) 100uM の CAY10444 投与群 (n=4)、(4) 100uM の JTE013 と 100uM の CAY10444 同時投与群 (n=4)。24 時間の培養後、フルオレセインで染色した培養液を顕微鏡 (BX-X810、キーエンス) で撮影した。写真は WinROOF (MITANI Corp, Japan) を用いて検査し、無細胞ハニカム構造における無細胞面積を決定した。Student-t 検定を用いて統計学的有意性を決定した。

4. 研究成果

(1) In vivo レーザー誘発 CNV モデルを用いた研究

野生型マウス眼底へのアルゴンレーザー照射により誘発された CNV 領域に S1PR2 の発現を免疫組織学的に認めたが、明らかな S1PR3 の発現は認めなかった。野生型マウスに対する S1PR3 選択的阻害薬 (CAY10444) の全身 (腹腔内) 投与後の CNV は、PBS 投与群 (コントロール群) と比べて有意差はなかった。硝子体内投与で追加検討する必要があると考えた。

S1PR3欠失マウスにおいてレーザー誘発CNV部位で免疫組織学的にS1PR2の発現亢進を認めた。

レーザー誘発CNVモデルにおいてレーザー照射35日後で野生型及びS1PR3欠失マウスで α 平滑筋アクチン (α SMA、筋線維芽細胞) 型コラーゲンを免疫組織学的に比較検討し、両群間に明らかな差は認めなかった。

S1PR3欠失マウスと野生型マウスで相互骨髄移植後にレーザー誘発CNVモデルを作成しCNVの面積を評価した結果、両群間に有意差はなく、表現型の責任細胞は組織細胞と骨髄由来細胞の両方であると考察した。

S1PR3欠失マウスにレーザー誘発CNVを作成し、S1PR2選択的阻害薬 (JTE013) の全身 (腹腔内) 投与では追加抑制効果はなかった。

(2) ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC を用いた血管新生アッセイでの S1PR2 選択的阻害薬および S1PR3 選択的阻害薬の同時併用効果の検討

コントロール群と比較し S1PR3 選択的阻害薬 (CAY10444) 投与群で統計学的に有意に管腔形成

が抑制された ($p < 0.05$)。S1PR2 選択的阻害薬 (JTE013) と CAY10444 の同時投与群では、CAY10444 投与群に対する管腔形成抑制の追加効果はなかった。

まとめ；S1PR2 の阻害により S1P3 阻害による血管新生抑制追加効果は *in vivo* 同様 *in vitro* でも認めなかったことから、S1PR3 単独阻害は滲出型加齢黄斑変性を含む脈絡膜新生血管関連疾患に対し有望な治療戦略であると結論付けた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 Hiroki Iwanishi; Takayoshi Sumioka; Shingo Yasuda; Kousuke Nishi; Kana Ichikawa; Masayasu Miyajima; Yuka Okada; Shizuya Saika
2 . 発表標題 Suppression of the growth of lase-induced CNV by lacking S1Pr3 is not exaggerated by pharmacological inhibition of S1Pr2 in mice.
3 . 学会等名 ARVO Annual Meeting 2023（国際学会）
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 岩西宏樹、住岡孝吉、西晃佑、安田慎吾、市川加奈、宮嶋正康、雑賀司珠也
2 . 発表標題 S1P受容体3型欠損マウスでの実験的レーザー誘発脈絡膜新生血管の抑制
3 . 学会等名 第127回日本眼科学会総会
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 岩西宏樹、住岡孝吉、安田慎吾、西晃佑、市川加奈、宮嶋正康、岡田由香、雑賀司珠也
2 . 発表標題 S1Pr3欠損によるレーザー誘発CNVの抑制はS1Pr2阻害薬の全身投与によって増強されない
3 . 学会等名 第55回日本結合組織学会学術大会
4 . 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------