

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2010 年 ~ 2011 年
 課題番号：22791654
 研究課題名 (和文)
 タイムラプス観察を用いた網膜血管新生のダイナミズムを制御する新規分子機構の解明
 研究課題名 (英文)
 To investigate molecular mechanisms for dynamics of retinal angiogenesis using time-lapse imaging
 研究代表者
 村上 智昭 (MURAKAMI TOMOAKI)
 京都大学・医学研究科・助教 研究者番号：50549095

研究成果の概要 (和文)：網膜器官培養を用いた網膜血管新生をタイムラプス観察し、その定量的解析方法を確立し、血管新生には活動性の高い相と静的な相が存在していた。また、その系を用いて、VEGF が惹起する網膜血管新生において、SDF-1, GSK-3β が、血管内皮細胞の運動性を制御していることを明らかにした。それらの変化は、in vivo, in vitro の血管新生系でも再現され、その分子機構も解明した。

研究成果の概要 (英文)：We established a novel time-lapse imaging for retinal angiogenesis in retinal explants. The quantification elucidated both dynamic and static phases in angiogenic sprouting. Further, we demonstrated a novel finding that SDF-1 and GSK-3β regulate the motility of vascular endothelial cells in retinal angiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
平成 23 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：眼生化学・分子生物学

1. 研究開始当初の背景

A. 網膜血管の病理と生理

糖尿病網膜症や加齢黄斑変性症などの眼内血管新生疾患は常に失明原因の上位を占め、その病態解明と抜本的な治療法の確立が急務である。それらの疾患に共通する本質的変化は網膜血管新生及び血管透過性亢進であ

り、我々はアンジオポエチン、エリスロポエチンなどの増殖因子やサイトカインの血管新生効果、特に細胞内シグナル伝達の観点から明らかにしてきた(Murakami et al. J Biol Chem 2005; Watanabe et al. N Engl J Med 2005)。また、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor:VEGF)が非常に強力な血管新生

因子として働くのみならず、血液網膜関門の破綻をきたす分子機構を世界に先駆けて発見した(Murakami et al. J Biol Chem 2009)。これらの分子生物学的研究の結果、その阻害療法が臨床応用されるに至り、一定の効果を挙げたのは記憶に新しい(Gragoudas et al. N Engl J Med. 2004)。しかし、VEGF は血管生理にも重要であることが近年発見され(Lee et al. Cell 2007)、また、臨床的にも抗 VEGF 療法が生理的な網膜血管への悪影響を及ぼす可能性が報告され(Lee et al. J Ocul Pharmacol Ther. 2009)、諸刃の剣であることが明らかにされつつある。つまり、網膜新生血管に対する次世代の治療標的を探索するにあたり、正常血管へ影響せず病的変化に選択的な薬剤であることが重要と考えられる。

網膜血管はその生理的状態においては、血液網膜関門を有し血管透過性を制御するのみならず、一生涯においてその形態はほとんど変化することがない静的な構造である。しかし、糖尿病網膜症などにおける網膜新生血管は急速に発生、進行する非常に動的な現象であり、その点が網膜血管における病理と生理の最大の相違点であり、そのダイナミズムを決定する分子機構を同定することで、病的血管新生に特異的な治療法への道が開かれると考えた。

B. 網膜血管新生のタイムラプス観察

そこで我々は、網膜血管のダイナミクスを検討するべく、器官培養を用いた網膜新生血管モデルを新たに開発し、その新生血管をタイムラプス観察することに世界に先駆けて成功した (Murakami et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006)。血管内皮細胞特異的に green fluorescence protein (GFP) を発現する Tie2-GFP マウスの網膜を VEGF を添加し培養しながら、成熟網膜血管からの新生血管を 15 分毎に 24 時間撮影した。その動態を観察す

ると、ほとんど変化のない生理的な親血管と比べ、新生血管では非常に活発な運動性を示しながら、進展していく姿を捉えることができた。そして、病的新生血管の最も初期の変化は、単一の血管内皮細胞が先端端(leading edges)を伸ばすところからはじまり、leading edges は頻繁に進展と後退を繰り返しながら、細胞体が遊走するという一連の病的変化を発見した。近年ゼブラフィッシュの生理的な血管発生をタイムラプス観察しその管腔形成過程のメカニズムが明らかにされインパクトを与えたが(Kamei et al. Nature 2006)、生理的発生のように元来動的な血管から動的変化が続発する過程と違い、病的変化では静的な血管から動的な血管新生へとスイッチが変わる相転移と言うべき現象であり、全く異なる分子機構、細胞動態が予測され、実際この二つの実験系でそのダイナミクスにいくつかの差異が観察された。

また、従来の網膜新生血管モデルは、新生児期の網膜血管発生や未熟児網膜症モデルといった未熟な網膜血管における新生血管であり(Smith et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994)、一旦成熟した網膜からの新生血管を再現性よく評価できる実験系はいままで存在しなかった。しかし、この実験系は成熟したマウス網膜血管からの病的新生血管を評価可能にした世界ではじめての実験系でもあり、従来モデルのような新生児期では評価のできない糖尿病や加齢性変化による網膜血管新生への影響を検討でき、さらには網膜血管の生理と病理を同一標本内で評価可能であり、その有用性は計り知れない。

2. 研究の目的

網膜血管の病理と生理の最大の差異はそのダイナミズムにある。すなわち、網膜における生理的血管は非常に静的であり一生涯その形態はほぼ維持されるが、糖尿病網膜症や

加齢黄斑変性症などにおける病的新生血管は急速に発生、進行する非常に動的な生命現象である。本研究は我々が独自に開発した器官培養を用いた網膜新生血管のタイムラプス観察により、そのダイナミズムを制御する分子機構を明らかにし、眼内血管新生疾患における新規の治療標的となりうる分子の発見につなげる。

3. 研究の方法

まず、網膜血管新生のダイナミクス、特に *leading edges* の後退の定量化を行い、そのパターンの同定および細胞動態のプロファイリングにより、複数存在すると考えられる分子機構へのアプローチとする。さらに、血管退縮の一形態であるアポトーシスのタイムラプス観察を行うことでその詳細を明らかにしつつ、新生血管と親血管との差異、すなわち、血管新生特異的な分子機構を同定するための実験系を洗練させる。次にこれらのより充実した解析系を用いた具体的な第一歩として、細胞遊走で重要な役割を果たすアクチン・ミオシン系を制御する分子群 (small G 蛋白) やアクチン重合に直接作用する WASP ファミリー蛋白が網膜血管新生の動的変化にどう影響するかを検討する。それらのうち重要な役割を果たすものと相互作用を及ぼす網膜血管新生に特異的な分子機構を探求し、その機能を動物実験にて確認する。

4. 研究成果

我々は、網膜器官培養を用いて、VEGF により誘導される網膜新生血管のダイナミクスの定量化を行った。つまり、新生血管の先端の動きを 15 分ごとにその変位量を測定したところ、興味深いことに、前進と後退を著しく繰り返しながら、進行していくことが示された。また、観察から約 12 時間ごろに

血管新生が一時的に停滞する時間帯が見られた。それを制御している分子として、新たに SDF-1 を同定した。つまり、SDF-1 の中和抗体、もしくは、その受容体の阻害剤を投与すると、血管新生の伸張が緩やかになり、また、先端端の前進、後退の両者が抑制された。それはすなわち、SDF-1 が血管内皮細胞の運動性を制御することを証明する新たな知見であった (Unoki et al. IOVS 2010)。また、糖代謝に関わる分子である *glycogen synthase kinase (GSK)-3 β* は、糖尿病において重要な役割を果たすが、その血管新生への影響はほとんどわかっていない。我々は、網膜器官培養を用いて、その阻害剤である AR-A014418 と SB-216763 の効果を検討したところ、網膜血管新生は用量依存性に抑制された。タイムラプス観察を行うと、新生血管の運動性が低下しており、今後詳細な定量化を行う予定である。in vivo の研究でも、血管新生を抑制することが再現された。更に培養血管内皮細胞を用いて、タイムラプス観察を用いた実験で、GSK-3 β 特異的阻害剤によりアクチンのストレスファイバーが増加し、血管内皮細胞の細胞膜が *retraction* を起こしていることが分かった。また、VEGF により生じる MTOC (microtubule organizing center) が、GSK-3 β 阻害剤により抑制される。近年、微小管とアクチンの相互作用が注目されており、その解明に努める予定である。更には、糖代謝、すなわち、糖尿病が、如何に網膜症を惹起するのか、その分子機構を明らかにしていく予定である。

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 2 件）

1. Unoki N, Murakami T, Nishijima K, Ogino K, van Rooijen N, Yoshimura N. **SDF-1/CXCR4 contributes to the activation of tip cells and microglia in retinal angiogenesis.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 Jul;51(7):3362-71. (査読あり; DOI 10.1167/iovs.09-4978)

Unoki N, Murakami T, Ogino K, Nukada M, Yoshimura N. **Time-lapse imaging of retinal angiogenesis reveals decreased development and progression of neovascular sprouting by anecortave desacetate.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 May;51(5):2347-55. (査読あり; DOI 10.1167/iovs.09-4158)

〔学会発表〕（計 5 件）

1. Masayuki Nukada, Tomoaki Murakami, Satoshi Morooka, Ken Ogino, Nagahisa Yoshimura. **Annexin V Suppresses Pathological Retinal Angiogenesis And Disrupts Blood-retinal Barrier** Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) annual meeting; May 3, 2011; Fort Lauderdale; abstract#A277.

2. Satoshi Morooka, Ken Ogino, Masayuki Nukada, Tomoaki Murakami, Nagahisa Yoshimura. **Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors Reduce Vegf-induced Neovascular Sprouts In Retinal Explants** Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) annual meeting; May 4, 2011; Fort Lauderdale; abstract#A82.

3. 諸岡諭(京都大学), 額田正之, 荻野顕, 村上智昭, 吉村長久
Annexin V による網膜血管新生と血管透過性に対する効果の検討

第 115 回日本眼科学会総会. 2011 5/13. 東京.

4. Unoki N, Murakami T, Nishijima K, Yoshimura N. **Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1)/CXCR4 Promotes the Activation of Tip Cells and Microglia in Retinal Angiogenesis.** Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) annual meeting; May 2, 2010; Fort Lauderdale; abstract#50.

5. Nukada M, Unoki N, Ogino K, Murakami T, Yoshimura N. **Time-Lapse Imaging of Retinal Angiogenesis Demonstrates That Anecortave Desacetate Attenuates Both the Development and Progression of Neovascular Sprouting.** Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) annual meeting; May 2, 2010; Fort Lauderdale; abstract# 47.

〔産業財産権〕
○取得状況（計 1 件）

名称：網膜新生血管に対する薬物効果の新規評価システム
発明者：村上智昭、吉村長久
権利者：村上智昭、吉村長久
種類：特許
番号：特願 2005-360983
取得年月日：平成 24 年 2 月 21 日（特許査定）
国内外の別：国内

6. 研究組織
(1)研究代表者
村上 智昭 (MURAKAMI TOMOAKI)
京都大学医学研究科・助教
研究者番号：50549095