

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592547

研究課題名(和文) 脈絡膜血管新生におけるRNA結合蛋白リン酸化酵素SRPKの役割

研究課題名(英文) Role of serine/arginine-rich protein kinase in the formation of choroidal neovascularization

研究代表者

齋藤 航 (Saito, Wataru)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：00339160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性(AMD)は先進国における中途失明の主要な原因となっている疾患である。近年の研究は血管内皮細胞増殖因子(VEGF)がAMDにおける脈絡膜血管新生(CNV)に重要であることを示している。VEGF mRNA前駆体における選択的スプライシングはserine/arginine-rich (SR) proteinによって制御されること、また同蛋白はSR protein kinase (SRPK) によって活性化されることが知られている。本検討において、我々はレーザー誘導CNVモデルにおけるSRPKの特異的阻害剤SRPIN340のCNV抑制効果を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Age-related macular degeneration (AMD) is a primary cause of visual loss in developed countries. Recent studies have provided strong evidence that growth factors and cytokines, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), play a pivotal role in the process of pathological angiogenesis, choroidal neovascularization (CNV) in AMD. The alternative splicing of VEGF pre-mRNA is regulated by splicing regulatory factors including various serine/arginine-rich (SR) proteins, which are activated by SR protein kinase (SRPK). In this study, we elucidated that a specific inhibitor for SRPK, SRPIN340, attenuates CNV formation in laser-induced CNV model.

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：眼細胞生物学 滲出型加齢黄斑病変 脈絡膜血管新生 血管内皮増殖因子 SR蛋白質リン酸化酵素

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 加齢黄斑変性について

滲出型加齢黄斑変性 (wet age-related macular degeneration, wet AMD) は、脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) を生じて網膜下あるいは網膜内で出血と吸収を繰り返しながら、徐々に視力低下をきたす疾患である。wet AMD は、欧米先進諸国における高齢者の主要な失明原因の一つとなっており、我が国においても高齢化の進行とともに中途失明の大きな割合を占めるようになりつつある。そのため、この急増する失明疾患 wet AMD の病態、すなわち CNV の発症メカニズムを解明し、有効で確実な治療法を確立することは眼科学における急務である。

CNV 形成は種々のサイトカイン、代謝、遺伝、環境などの複数の因子が関与している。近年の基礎研究および臨床研究により、CNV 形成に関与する種々のサイトカインの中で血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) が CNV の病態形成および進展における中心的な役割を演じていることが明らかとなった。そして、その VEGF を標的とする複数の抗 VEGF 製剤の臨床応用によって wet AMD の視力予後は改善するようになり、その治療は現在大きく変化しつつある。

### (2) 血管新生抑制型 VEGF について

しかしながら、血管新生の病態メカニズムにおける VEGF の関与はそれほど単純ではないことを示唆する知見が近年相次いで報告されている。VEGF pre mRNA は 8 個のエクソンから構成されており、転写の選択的スプライシングにより各種アイソフォームが産生されることはすでに知られていたが、2002 年に血管新生を促進すると考えられていた従来の VEGF アイソフォームとは異なり、血管新生を抑制する VEGF アイソフォーム、VEGF165b の存在が報告された。それ以降も続々と血管新生抑制型アイソフォームが発見され、現在では VEGF は VEGF165 に代表される血管新生促進型 VEGF と、VEGF165b に代表される血管新生抑制型 VEGF が存在すると一部のグループから提唱されている。

これらのことは、wet AMD など血管新生をその病態に有する眼疾患において VEGF がより複雑に関与していることを示唆している。この VEGF165b は C 末端の 6 個のアミノ酸が VEGF165 と異なるが、VEGF165 と同様に 165 個のアミノ酸から構成されており、VEGF レセプターに対して VEGF165 と同等の親和性を持っていること、VEGF165 を競合阻害することによって血管新生抑制、白血球遊走阻害をおこなうことなどが報告されている。事実、VEGF165b を投与することにより腫瘍血管新生および腫瘍の進展が抑制されたことも報告されており、また眼科領域においても VEGF165b が網膜血管新生を阻害することが

in vivo および in vitro 系実験で確認されている。さらに、リコンビナント VEGF165b を用いたマウス CNV モデルでも、CNV に対する抑制効果が確認された。これらの知見は、血管新生抑制型 VEGF と血管新生促進型 VEGF のバランス調整が CNV 形成を阻害する新たな治療アプローチとなりうることを示している。

### (3) VEGF pre mRNA 選択的スプライシングの制御機構について

VEGF165b と VEGF165 は同一の VEGF 遺伝子より転写された pre mRNA が選択的スプライシングを経た翻訳産物である。VEGF mRNA は 8 個のエクソンから構成されており、8 番目のエクソンがさらに 8a と 8b に分かれ、それぞれに proximal splicing site (PSS) および distal splicing site (DSS) が存在する。PSS に相当する 8a エクソンにおいて選択的スプライシングがおこなわれる場合は VEGF165 mRNA 発現が亢進する結果、病的血管新生が亢進するとされる。一方、DSS に相当する 8b エクソンにおいて選択的スプライシングがおこなわれる場合は、VEGF165b mRNA 発現が亢進すると同時に VEGF165 産生が抑制されるため、病的血管新生が抑制されるとされる。すなわち、wet AMD における CNV でも、虚血や炎症などによってこの VEGF165/VEGF165b 産生のバランスが崩れ、血管新生促進型の VEGF165 が優位に産生されることがその病態メカニズムの根底にある可能性が考えられる。

この選択的スプライシングは、種々の生理的、病理性条件による異なるシグナル経路で活性化され、さらに serine/arginine-rich (SR) proteins (SR 蛋白質) と呼ばれる一群の蛋白質およびそれらをリン酸化する SR protein kinase (SRPK) により複雑に制御されている。2006 年に SRPK に対する特異的阻害剤 SR protein phosphorylation inhibitor (SRPIN) 340 が発見された。さらに、SRPIN340 は血管新生抑制型 VEGF (VEGF165b) 産生を促進して oxygen-induced Retinopathy (OIR) model mouse において網膜血管新生を抑えることが明らかとなっている。OIR 同様に VEGF165 が血管新生の中心的な役割を果たす CNV においても、SRPIN340 が CNV に対する抑制効果を有する可能性は高い。

## 2. 研究の目的

以上の研究背景より、本研究の目的は SRPIN340 が眼内血管新生である CNV 形成に対する抑制効果を有するかを検討することとした。

## 3. 研究の方法

### (1) レーザー誘導 CNV モデル作製

本研究は、C57Bl/6J マウス (♂、8 週齢) を使用し、北海道大学動物実験に関する規定に従って実施した。マウスをペントバルビタール (0.05mg/g) 腹腔内注射により麻酔し、5%ト

ロピカミドフェニレフリン塩酸塩で散瞳した後、角膜にカバーガラスを置き、スリットランプで眼底を確認しながら視神経乳頭を中心にその周囲にレーザーを4発照射（レーザー条件：532nm、200mW power、0.1秒、75mm spot size）し、CNVを誘導した。

## (2) SRPIN340 硝子体内投与

マウス眼球にレーザー照射後、速やかに角膜輪部より33ゲージ針を用いてSRPIN340投与群に各濃度のSRPIN340、コントロール群に基剤である0.1%DMSOをそれぞれ1μL硝子体内注射した。

## (3) CNV 面積測定

レーザー照射7日後に、5%ペントバルビタールを2mL腹腔内注射することによりマウスを麻酔し、左心室より2.5mLの0.5%fluorescein-isothiocyanate-labeled dextranを灌流した。灌流後に眼球を摘出し、2%パラホルムアルデヒドで30分固定した後、前眼部、水晶体、網膜を取り除き、スライドガラスの上で網膜色素上皮-脈絡膜と強膜を、視神経乳頭を中心に4~6箇所切開を入れてflat mountとして展開した。Flat mountは蛍光顕微鏡で観察し、CNVの最大面積を測定した。これによりSRPIN340によるCNV抑制効果を確認するとともに、最適投与量を決定した。

## (4) SRPIN340によるVEGF発現変化

レーザー照射および硝子体注射3日後に眼球を摘出し、脈絡膜-網膜色素上皮よりRNAおよび蛋白を回収した。その上で、血管新生促進型VEGF、抑制型VEGFおよび全VEGFアイソフォームについてreal-time PCR法およびELISA法を用いて定量した。

## (5) マクロファージ浸潤に関する検討

AMD (CNV) の病態形成におけるマクロファージの関与は以前から報告されており、CNVモデルマウスにおいてもその関連が証明されている。CNVへのマクロファージ浸潤を評価するために、上記の他に、マウスマクロファージの特異的マーカーであるF4/80に対するreal-time PCRおよび免疫染色をおこない、マクロファージの遊走に対するSRPIN340の阻害効果を検証した。また、単球走化因子monocyte chemoattractant protein (MCP)-1および白血球接着分子intercellular adhesion molecule (ICAM)-1の蛋白濃度もELISA法で測定した。

## 4. 研究成果

### (結果)

#### (1) SRPK阻害によるCNV形成抑制

SRPK抑制によるCNV形成抑制効果を検討した。基剤投与群(30,737±3758mm<sup>2</sup>, n=31)に比較して、2mM SRPIN340投与群は有意にCNV形成が抑制された(19,870±1935mm<sup>2</sup>, n=33,

p<0.05)。20mM SRPIN340投与群はさらに顕著なCNV形成抑制効果がみられた(15,649±1803mm<sup>2</sup>, n=23, p<0.01)。一方0.2mM SRPIN340投与群は特にCNV形成抑制効果がみられなかった(21,741±3695mm<sup>2</sup>, n=17, p=0.10)。

これらの結果はSRPIN340によるSRPK抑制は用量依存性にCNV形成を阻害することを示している。これ以降の実験はSRPIN340投与量を20mMとした。

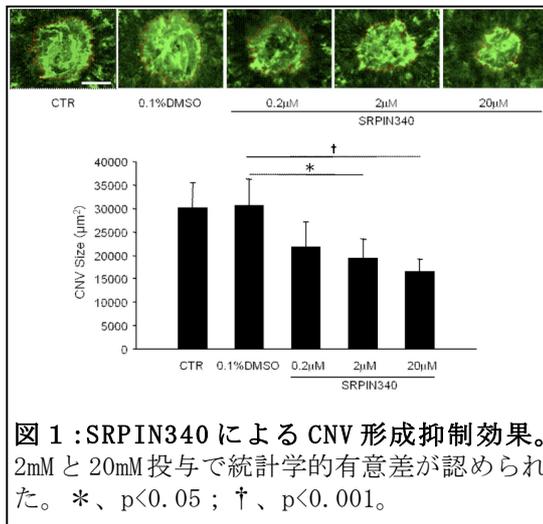


図1: SRPIN340によるCNV形成抑制効果。2mMと20mM投与で統計学的有意差が認められた。\*、p<0.05；†、p<0.001。

## (2) 血管新生抑制型 VEGF (VEGF164b) の検出

SRPIN340が血管新生促進型VEGFの産生を抑制し、その一方で血管新生抑制型VEGFの産生を誘導することでCNV形成を抑制するという仮説を証明するために、マウスから血管新生抑制型VEGF (VEGF164b)の検出を試みた。しかしながら、マウス脈絡膜-網膜色素上皮細胞、網膜、肝臓、心臓、腎臓および肺組織においては抑制型VEGFを検出することができなかった。

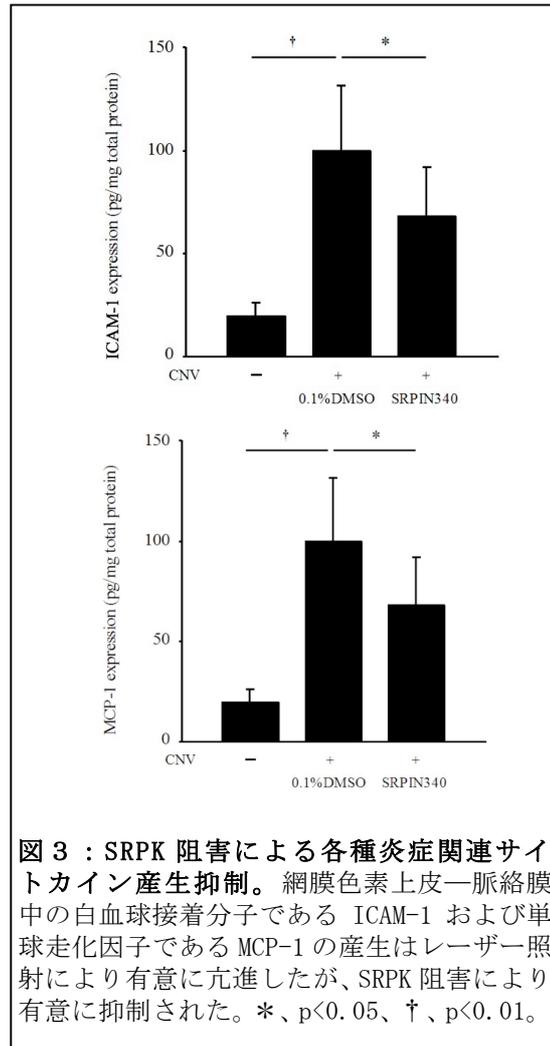
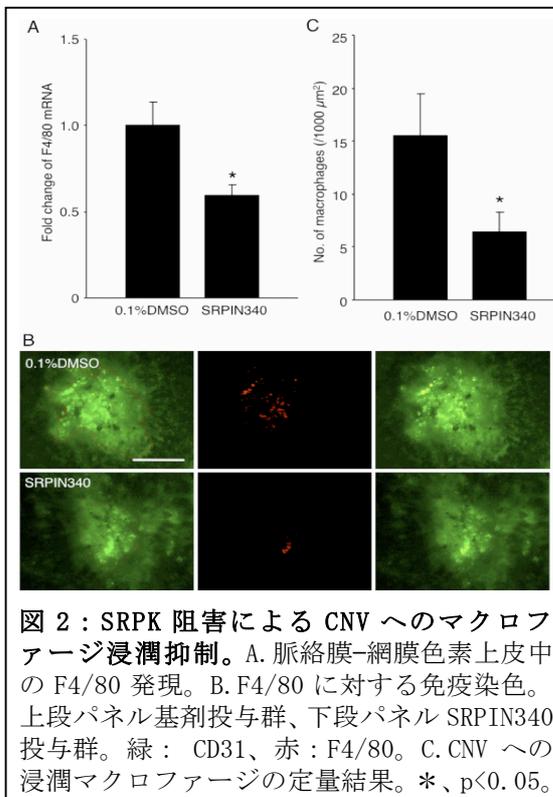
## (3) SRPK阻害によるVEGF産生抑制

SRPIN340によるVEGF各種アイソフォーム発現への影響を調べるため、レーザー照射およびSRPIN340または基剤投与3日後に、眼球を摘出して脈絡膜-網膜色素上皮よりRNAを回収して、全VEGFアイソフォーム、血管新生促進型VEGFのmRNAの発現をreal-time PCRで調べた。基剤投与群(n=8)に比較して、20mM SRPIN340投与群(n=6)では、全VEGFアイソフォームの発現が56%低下し(p<0.05)、同様に血管新生促進型VEGFも57%に低下した(p<0.05)。さらに脈絡膜-網膜色素上皮中のVEGF蛋白質濃度も基剤投与群(274.2±17.9pg/mg, n=10)に比較して、SRPIN340投与群は有意に低かった(209.2±10.9pg/mg, n=8)。これらの結果はSRPIN340によるSRPK抑制は全VEGFアイソフォームの産生をmRNAレベルで抑制していることを示していた。

#### (4) SRPK 阻害によるマクロファージ浸潤および各種炎症関連分子産生抑制

SRPIN340 による SRPK 抑制が CNV 形成を抑制する機序をさらに調べるために、CNV へのマクロファージ浸潤に対する SRPIN340 の抑制効果を検討した。基剤投与群 (n=8) に比較して、20mM SRPIN340 投与群 (n=6) では F4/80 の発現が 41%低下した (p<0.05, 図 2A)。さらに抗 F4/80 抗体を用いてマクロファージに対する免疫染色でも同様で、基剤投与群より 20 mM SRPIN340 投与群のほうがマクロファージの浸潤を著明に抑制された (p<0.05, 図 2 BC)。これらの結果は SRPIN340 による SRPK 阻害が CNV へのマクロファージ浸潤を抑制することを示していた。

さらに、CNV 形成に関与する炎症性サイトカインである MCP-1 と ICAM-1 の濃度も測定した。ICAM-1 濃度は正常マウス (199.6 ± 15.5ng/mg, n=8) に比較して、基剤投与群では有意に (265.4 ± 12.3ng/mg, n=10, p<0.01) 増加したが、20mM SRPIN340 投与群では有意 (192.9 ± 11.6ng/mg, n=8, p<0.01, 図 3A) に低下した。同様に MCP-1 濃度も正常マウス (19.5 ± 0.9pg/mg, n=8) に比較して、基剤投与群では有意に (99.9 ± 8.6ng/mg, n=10, p<0.001) 増加したが、20mM SRPIN340 投与群では有意 (67.8 ± 10.2ng/mg, n=8, p<0.05, 図 3B) に低下した。これらの結果は、SRPIN340 による SRPK 阻害で炎症性サイトカインである MCP-1 と ICAM-1 の産生も抑制されることを示していた



#### (考察)

本検討では、SRPIN340 による SRPK 阻害が全 VEGF アイソフォームおよびエクソン 8a を含む血管新生促進型 VEGF を抑制することを確認した。さらに、SRPK 阻害は ICAM-1、MCP-1 の産生およびマクロファージ浸潤を抑制することを明らかとし、これらの機序を一因として CNV 形成が抑制されることを確認した。しかしながらその一方で、血管新生抑制型 VEGF の存在は確認することができず、「SRPK 阻害が血管新生促進型 VEGF の産生を抑制し、その一方で血管新生抑制型 VEGF の産生を誘導することで CNV 形成を抑制する」という仮説を証明するには至らなかった。

血管新生抑制型 VEGF の存在に関しては、本実験でマウスにおいて証明できなかったが、近年否定的な報告も散見され、今後さらに検討を重ねる必要があると考える

SRPK は通常熱ショック蛋白である HSP70 などと複合体を形成して細胞質内に存在しているが、種々の刺激やストレスにより放出され、SR 蛋白質のリン酸化など多様な生理作用を発揮するようになる。pre mRNA のスプライシングにおいて SRPK は SR 蛋白質をリン酸化し、サイトセレクションに関与するのみならず

ず、スプライソソームそのものの形成にも関与することが知られている。転写と mRNA スプライシングにおける SR 蛋白質や SRPK の関与はまだ解明されていない部分が数多くあるが、これらの報告を考えると、今回の検討で観察された SRPK 阻害による VEGF の産生低下はスプライシング制御の結果だけではなく、スプライソソーム形成そのものが阻害された結果でもあると推測され、それが CNV 形成の抑制につながった可能性がある。今後、眼組織における SRPK の局在、選択的スプライシングにおける SR 蛋白質と SRPK の関与、および SRPK 阻害による生体内の効果等を調べることで、SRPK 阻害による血管新生抑制のメカニズムをさらに検討する必要があると考えられた。

#### 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 1 件)

- ① Dong Z, Noda K, Kanda A, Fukuhara J, Ando R, Murata M, Saito W, Hagiwara M, Ishida S. Specific inhibition of serine/arginine-rich protein kinase attenuates choroidal neovascularization. Mol Vis, 査読有, Vol. 19 2013, 536-546

[学会発表] (計 2 件)

- ① Dong Z, Noda K, Kanda A, Fukuhara J, Ando R, Murata M, Saito W, Hagiwara M, Ishida S, Serine/arginine-rich protein Kinase Blockade attenuates choroidal neovascularization, ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting, Washinton State Convention Center, Seattle, USA, 2013/5/5-9
- ② 董 震宇、野田航介、齋藤 航、木下哲志、福原淳一、安藤 亮、村田美幸、神田敦宏、萩原正敏、石田 晋、SRPK 阻害薬による脈絡膜血管新生の抑制効果、第 117 回 日本眼科学会総会、東京、東京国際フォーラム、東京都千代田区、2013/4/4-7

[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

齋藤 航 (SAITO, Wataru)

北海道大学・大学院医学研究科・特任准教授

研究者番号：23592547

(2) 研究分担者

野田 航介 (NODA, Kousuke)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：90296666

(3) 連携研究者

なし