

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590131

研究課題名(和文) 虚血性網膜症の治療標的分子としてのアペリンに関する研究 遺伝子改変動物を用いて

研究課題名(英文) Research on the apelin as a therapeutic target molecule in ischemic retinopathy using genetically modified animals

研究代表者

前田 定秋 (Maeda, Sadaaki)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：00135732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：増殖性糖尿病網膜症などの虚血性網膜症を発症すると、網膜に脆弱な血管が形成され、それらが破綻することにより失明に至る。したがって、脆弱な血管を強固な血管に誘導すること、すなわち血管成熟化を誘導する機構を明らかにすることが本疾患の治療の開発に重要である。本研究において、虚血性網膜症モデルマウスの網膜のアペリン発現を抑制することで、血管成熟化を誘導できる可能性を見出した。またその機構は、血管壁細胞遊走因子であるMCP-1の発現誘導を介したものであることを培養血管内皮細胞を用いた実験により明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Ischemic retinopathy such as proliferative diabetic retinopathy causes blindness through the hemorrhage in immature vessels formed by the progression of the diseases. Therefore, there is a need to identify mechanisms of vascular maturation, which is the stage of mural cell adhesion to endothelial cells for stabilization of blood vessels, for the treatment of ischemic retinopathy. In this study, we revealed that inhibition of apelin expression induced the vessel maturation in the retina of an ischemic retinopathy model mouse. Moreover, we demonstrated that apelin blockade in cultured-endothelial cells led to increase of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) which is a mural cell recruitment factor.

研究分野：神経薬理学、血管薬理学

キーワード：アペリン 虚血性網膜症 網膜血管新生 血管成熟化 MCP-1 血管壁細胞

### 1. 研究開始当初の背景

増殖性糖尿病網膜症をはじめとする虚血性網膜症を発症すると、網膜に虚血領域が生じ、この領域に血液を補填することを目的として、既存の血管から新たな血管が形成される。しかしながら、この新生血管は虚血領域を補填することなく硝子体内に逸脱・伸長し、弱い物理的衝撃により破綻し、硝子体出血をもたらすことが知られている。これらのことから、従来、この血管新生を抑制することを主眼として、網膜虚血領域を光凝固することにより血液の需要を減らすレーザー光凝固治療や、血管新生の主要な因子として報告されている血管内皮増殖因子 (VEGF) のシグナルを抑制する中和抗体の硝子体内投与による治療が行われてきた。しかしながら、これらの治療は血管新生を抑制するため網膜虚血を根本的に解消できないことから、治療後に血管新生が再燃することが懸念されている。したがって、血管新生を抑制する治療法以外の治療法の開発が求められている。

血管は、内腔の血管内皮細胞とそれを外側から裏打ちする血管壁細胞から構成されている。血管新生の過程は、まず、既存の血管から壁細胞が離脱し、その露出した部位から、血管新生のガイド役として機能する血管内皮細胞の tip cell が派生し、それを先頭として増殖性の血管内皮細胞である stalk cell が後続し、血管内皮細胞のみからなる管腔が形成される。その後、再び血管壁細胞が裏打ちされ、成熟血管となり、血管新生は終息する。虚血性網膜症では、血管内皮細胞の過増殖が起こるため血管成熟化の過程が進まず、壁細胞が欠落した脆弱な血管が形成されることが知られている。したがって、虚血性網膜症の病態において血管成熟化を誘導する機構を明らかにすることができれば、新たな治療法の開発に繋がることが考えられる。

これまでの報告から、G タンパク質共役型受容体 APJ が stalk cell に発現することおよび、そのリガンドである apelin が tip cell に発現することが明らかにされている。研究代表者らは、これまでに虚血性網膜症モデルマウスの網膜において異常な血管の形成に伴い apelin の発現が著明に上昇することおよび、apelin 遺伝子欠損マウスを用いた虚血性網膜症モデルでは、異常血管がほとんど生じないことを明らかにしている。これらのことから、虚血性網膜症の網膜では、tip cell で過剰に産生された apelin が stalk cell の APJ に結合して血管内皮細胞の過増殖を誘導することにより、脆弱な血管の形成を引き起こしている可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、培養血管内皮細胞株および虚血性網膜症モデルマウスを用いて apelin 発現の阻害が血管内皮細胞の過増殖の抑制、続いて血管成熟化を誘導できるかどうかを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) *In vitro* 実験系

培養血管内皮細胞には、マウス血管内皮細胞株 b.End3 細胞を用いた。細胞増殖は、BrdU 取り込み能を指標に評価した。Apelin 発現の抑制には siRNA を用いた。細胞への siRNA (100 pmol) の導入には、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いた。

また、血管壁細胞の遊走能は、血管平滑筋細胞株 p53LMAC01 細胞を用いたスクラッチアッセイ法により検討した。p53LMAC01 細胞を播種し、細胞層に 1 mm の間隙を作製し、その間隙に向かう細胞の遊走距離を定量化した。

#### (2) *In vivo* 実験系

虚血性網膜症モデルには、oxygen-induced retinopathy (OIR) model を用いた。OIR モデルは、生後 7 日目 (P7) のマウスを 5 日間 75%酸素濃度下で 5 日間飼育し、続いて P12 から 5 日間通常酸素濃度下で飼育することにより作製した。網膜への siRNA (200 pmol) の導入には、Invivolectamine (Invitrogen) を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) Apelin siRNA の血管内皮細胞の増殖抑制作用

b.End3 細胞の増殖能に対する apelin siRNA の影響について検討した。Apelin 発現に対する apelin siRNA の抑制効果について検討した結果、apelin siRNA を導入した b.End3 細胞では、control siRNA を導入した細胞と比較して apelin mRNA が約 95%抑制されていた。この条件において BrdU の取り込み細胞をカウントした結果、apelin siRNA を導入した b.End3 細胞では、control siRNA を導入した細胞と比較して BrdU の取り込み細胞数が有意に減少していた (図 1)。

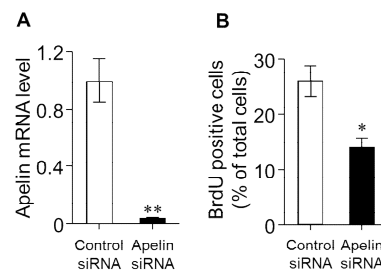


図 1 血管内皮細胞の apelin 発現および増殖に対する apelin siRNA の影響

#### (2) Apelin siRNA を導入した血管内皮細胞における血管壁細胞遊走因子の発現変化

Apelin siRNA が血管内皮細胞における血管壁細胞遊走因子の発現に影響を与えるかどうかを検討した。その結果、apelin siRNA は、血管壁細胞遊走因子の一つとして知られる単球走化性因子-1 (MCP-1) の mRNA 発現を増

加させた。また、この発現増加は、タンパク質レベルでもみられた (図 2)。

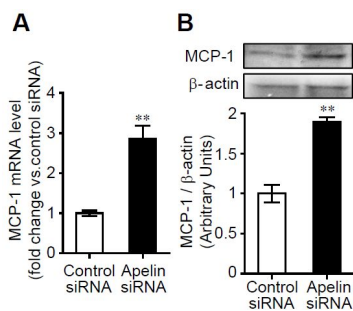


図 2 血管内皮細胞における apelin siRNA による MCP-1 の発現誘導

(3) 血管内皮最簿における apelin siRNA による MCP-1 発現誘導機構

Apelin siRNA による MCP-1 の発現誘導機構について明らかにするため、MCP-1 の転写因子である Smad3 について解析した結果、apelin siRNA を導入した b.End3 細胞では、Smad3 の活性化がみられた。また、apelin siRNA による MCP-1 の発現誘導は、Smad3 阻害剤である SIS3 の存在下で抑制された (図 3)。

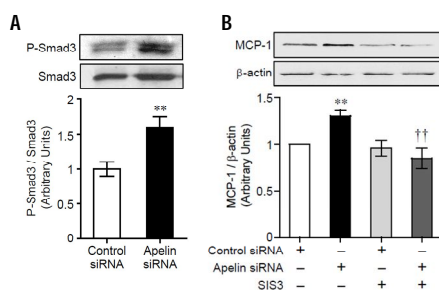


図 3 Apelin siRNA による Smad3 を介した MCP-1 の発現誘導

Smad3 の活性化は、PI3 kinase-Akt シグナルの活性化により抑制されることが報告されている。また、apelin は PI3 kinase-Akt シグナルの活性化を誘導することが報告されている。これらのことから、apelin siRNA を導入した b.End3 細胞では、Akt の活性化低下により Smad3 の活性化が起きている可能性が考えられる。Apelin siRNA を導入した b.End3 細胞における Akt の活性化レベルを解析した結果、apelin siRNA の導入により Akt の活性化レベルが有意に低下した。また、PI3 kinase 阻害剤である LY294002 を処置した b.End3 細胞では、Akt の活性化レベルの低下と Smad3 の活性化がみられた (図 4)。

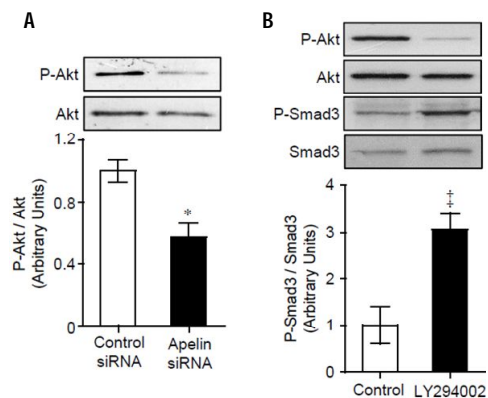


図 4 Apelin siRNA による Akt の活性化レベルの低下による Smad3 の活性化

(4) Apelin siRNA を導入した血管内皮細胞の培養上清による血管壁細胞の遊走能の促進

次に、apelin siRNA の導入により発現誘導された血管内皮細胞の MCP-1 が血管壁細胞の遊走能を促進するかどうかを明らかにするため、スクラッチアッセイを行った。間隙を作製した p53LMAC01 細胞の細胞層に apelin siRNA を導入した b.End3 細胞の培養上清を曝露した結果、apelin siRNA を導入した b.End3 細胞の培養上清には、p53LMAC01 細胞の遊走促進作用があることが明らかになった。また、この遊走促進作用は、MCP-1 受容体 CCR2 のアンタゴニストである RS109825 により完全に阻害された (図 5)。

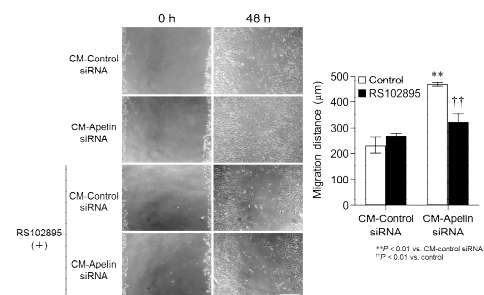


図 5 Apelin siRNA を導入した血管内皮細胞の培養上清による血管壁細胞の遊走の促進

(5) 虚血性網膜症モデルマウスの網膜における apelin siRNA による血管成熟化の促進

次に、虚血性網膜症モデルマウスの網膜においても培養細胞と同様の現象がみられるかどうか明らかにするため、P12 の OIR モデルマウスの硝子体内に apelin siRNA を投与することにより検討を行った。虚血により誘導される網膜の apelin 発現は、apelin siRNA を投与することにより抑制された。また、このときの MCP-1 発現を解析した結果、apelin siRNA を投与することにより、MCP-1 が発現上昇することが明らかになった (図 6)。

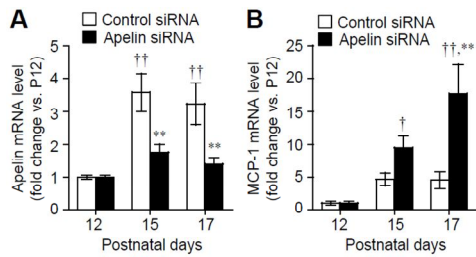


図 6 虚血性網膜症モデルマウスの網膜における apelin および MCP-1 の発現に対する apelin siRNA の影響

網膜の血管壁細胞に MCP-1 受容体の CCR2 が発現しているかどうか確かめるため、抗 CCR2 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。その結果、CCR2 は血管内皮細胞マーカーであるイソレクチン B4 (IB4) の陽性細胞ではなく、血管壁細胞マーカーである NG-2 の陽性細胞に発現することが明らかになった (図 7)。

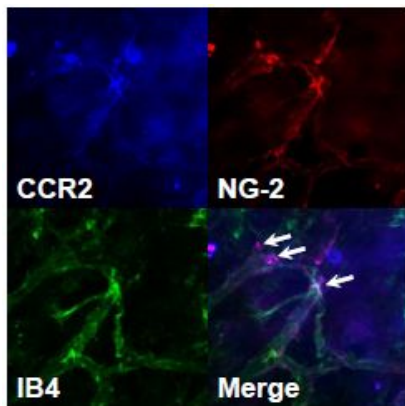


図 7 網膜における MCP-1 受容体 CCR2 の発現

Apelin siRNA の投与により、虚血性網膜症モデルマウスの網膜において血管成熟化が誘導されるかどうかを明らかにするため、血管内皮細胞に対する血管壁細胞による被覆度の解析を行った。その結果、apelin siRNA を投与した OIR モデルマウスの網膜では、control siRNA を投与した網膜と比較して、IB4 陽性の血管内皮細胞に対する NG2 陽性の血管壁細胞による被覆度が增加することが明らかになった (図 8)。

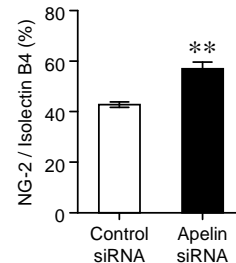
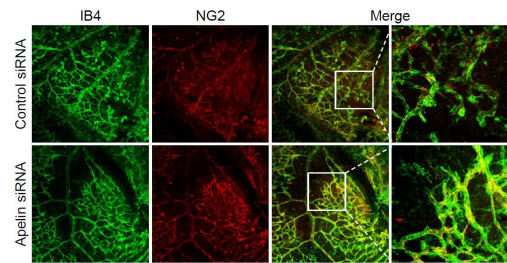


図 8 Apelin siRNA による網膜血管成熟化の促進

#### (6) まとめ

以上の結果より、血管内皮細胞の apelin 発現を抑制すると、Akt の活性レベルの低下が起き Smad3 が活性化され、血管壁細胞遊走因子である MCP-1 が発現誘導されること、および虚血性網膜症のモデルマウスの網膜の apelin 発現を抑制することで MCP-1 の発現上昇を介した血管成熟化を誘導できる可能性が示唆された。これらの結果から、apelin は、脆弱な血管の形成・破綻により重篤な視力障害が生じる増殖性糖尿病網膜症などの虚血性網膜症の新たな治療標的分子になり得る可能性が示唆された。

#### 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)

Atsushi Kasai, Yuki Ishimaru, Kosuke Higashino, Kohei Kobayashi, Akiko Yamamuro, Yasuhiro Yoshioka, Sadaaki Maeda Inhibition of apelin expression switches endothelial cells from proliferative to mature state in pathological retinal angiogenesis. *Angiogenesis*. 査読有, 2013 16(3):723-734 DOI 10.1007/s10456-013-9349-6

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 石丸侑希、他 5 名 TGF- $\beta$  1 による血管内皮細胞の apelin 及び APJ 受容体の発現誘導 第 127 回日本薬理学会近畿部会 2015 年 6 月 26 日 (発表確定) 長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市)
2. 藤原秀規、石丸侑希、他 4 名 網膜血管形成に伴う fibronectin の発現上昇に対する apelin 欠損の影響 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会 2014 年 10 月 11 日 京都薬科大学 (京都府・京都市)

3. 石丸侑希、他7名 虚血性網膜症モデルマウスの網膜における異常血管形成に伴う fibronectin の発現上昇に対する apelin 遺伝子欠損の影響 日本薬学会第134年会 2014年3月29日 熊本大学(熊本県・熊本市)
4. 石丸侑希、他7名 虚血性網膜症モデルマウスにおけるフィブロネクチンの発現上昇に対するアペリン欠損の影響 第87回日本薬理学会年会 2014年3月19日 仙台国際センター(宮城県・仙台市)
5. 笠井淳司、石丸侑希、前田定秋 Inhibition of the apelin-APJ system signal switches endothelial cells from proliferative to mature state in pathological retinal angiogenesis 第21回日本血管生物医学会 2013年9月28日 千里阪急ホテル(大阪府・豊中市)
6. 石丸侑希、他10名 虚血性網膜症モデルマウスにおける apelin siRNA による MCP-1 発現上昇を介した網膜血管成熟化の誘導 日本薬学会第133年会 2013年3月28日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
7. 石丸侑希、他5名 Apelin siRNA は MCP-1 の発現上昇を介して網膜新生血管のペリサイトによる被覆を増加させる 第86回日本薬理学会年会 2013年3月23日 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
8. 石丸侑希、他8名 Apelin siRNA による PI3K/Akt シグナル抑制を介した血管壁細胞遊走因子 MCP-1 の発現誘導 第122回日本薬理学会近畿部会 2012年11月16日 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・吹田市)
9. 東野功典、石丸侑希、他5名 Apelin siRNA による MCP-1 発現誘導を介した血管成熟化の促進 第62回日本薬学会近畿支部総会・大会 2012年10月20日 武庫川女子大学(兵庫県・西宮市)
10. 石丸侑希、他8名 Apelin シグナル抑制による MCP-1 発現誘導を介した血管成熟化の促進 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2012 2012年9月1日 神戸学院大学(兵庫県・神戸市)

〔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

前田 定秋 (MAEDA SADA AKI)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：00135732

##### (2) 研究分担者

吉岡 靖啓 (YOSHIOKA YASUHIRO)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：40330360

山室 晶子 (YAMAMURO AKIKO)

摂南大学・薬学部・助手

研究者番号：20340862

石丸 侑希 (ISHIMARU YUKI)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：80611607