

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791854

研究課題名(和文) Mrp4の網膜血管新生における役割の解明

研究課題名(英文) Investigation of the roles of Mrp4 in retinal angiogenesis

研究代表者

楠原 仙太郎 (KUSUHARA, SENTARO)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40437463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、排出型トランスポーターであるMrp4が細胞内cAMP濃度の調節を介して生理的網膜血管新生に複雑に関与していることが示された。また、酸素誘発網膜症において無血管領域の形成と網膜外血管新生がMrp4ノックアウトマウスで増悪したことから、Mrp4が病的網膜血管新生に対して抑制的に働いていると考えられた。これらの結果から、Mrp4が網膜血管増殖疾患の治療ターゲットとなる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：This study showed Mrp4, an efflux transporter, is intricately associated with physiological retinal angiogenesis by regulating intracellular cAMP level. Additionally, as both the formation of avascular area and extraretinal neovascularization were exacerbated in Mrp4 knockout mice in an oxygen-induced retinopathy model, Mrp4 seems to have a suppressive role in pathological retinal angiogenesis. These results suggest that Mrp4 is a promising therapeutic target for neovascular retinal diseases.

研究分野：医師薬学

キーワード：Mrp4 ABCトランスポーター 網膜 血管新生 酸素誘発網膜症モデル

1. 研究開始当初の背景

Multidrug resistance protein 4 (MRP4, ABCC4)は、ATP-binding cassette(ABC)トランスポーターのCサブファミリーに属し、内因性分子、生理物質、薬剤などの細胞外排泄を介して各組織の保護に働いている。網膜においては、Mrp4は網膜血管特異的に発現しており、我々の先行研究では、培養ヒト網膜血管内皮細胞を用いた実験では、MRP4が細胞の遊走抑制とアポトーシス促進を介して血管新生に抑制的に働いていることが示唆された。

2. 研究の目的

網膜血管新生におけるMrp4の役割につき、生理的・病的網膜血管新生マウスモデルを用いて評価し、治療ターゲットとしての可能性を検討すること。

3. 研究の方法

Mrp4ノックアウトマウスの新生仔にMrp4の主要基質であるcAMPの細胞内産生を促進させるフォルスコリン(FSK)を腹腔内投与し、網膜伸展標本にて生理的網膜血管新生に与える影響を評価した。次に、Mrp4ノックアウトマウスの新生仔マウスを高酸素下で一定期間飼育することにより酸素誘発網膜症(oxygen induced retinopathy, OIR)を作成し、病的網膜血管新生の状態を網膜伸展標本で評価した。

4. 研究成果

新生仔マウスの網膜血管形成を免疫染色で調べたところ、Mrp4ノックアウトマウスは正常な網膜血管形成を示したが、FSK腹腔内注射後では、Mrp4^{-/-}マウス網膜における総血管長、血管分岐数、血管密度、は野生型(WT)マウスと比較して有意に減少していた(図1)。

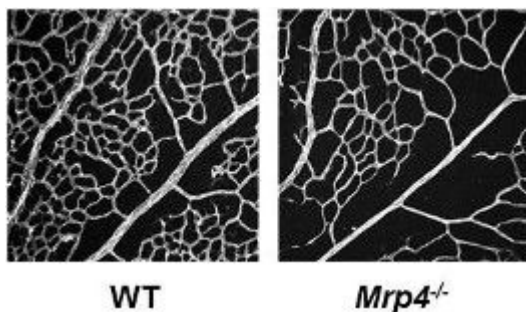


図1 FSK腹腔内注射後のMrp4ノックアウトマウスにおける網膜血管の変化(P6網膜伸展標本(CD31染色))

また、FSK投与後のMrp4^{-/-}マウスでは、WTマウスと比較して、cleaved caspase3陽性血管内皮細胞数は中心網膜で有意に増加して

おり、周皮細胞の被覆率低下と血管退縮の指標であるempty sleeve数の増加が共に認められた。(図2-4)

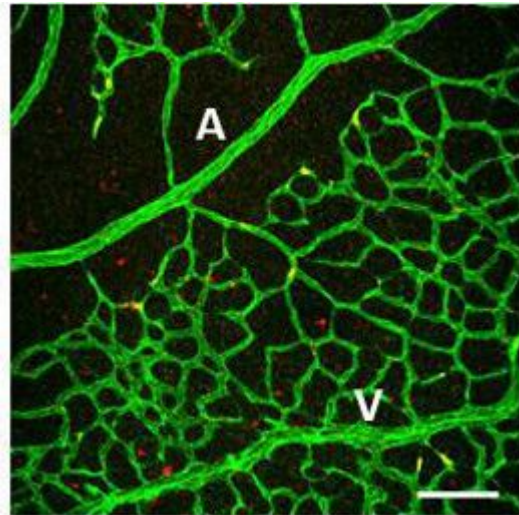


図2 FSK腹腔内注射後のMrp4ノックアウトマウスにおける網膜血管内皮細胞アポトーシスの増加
赤 = cleaved caspase3、緑 = CD31、A = 動脈、V = 静脈、スケールバー = 100 μm

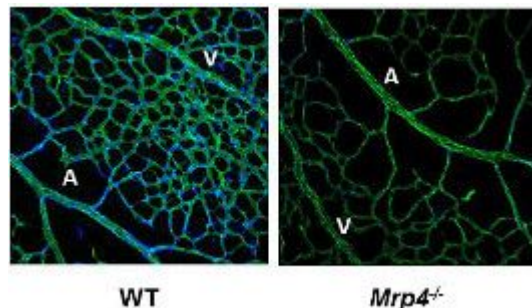


図3 FSK腹腔内注射後のMrp4ノックアウトマウスにおける網膜血管周皮細胞の減少
Mrp4^{-/-}マウスではWTマウスに比べてFSK腹腔内注射後に周皮細胞の血管内皮細胞被覆率が著しく低下している。青 = NG2、緑 = CD31、A = 動脈、V = 静脈

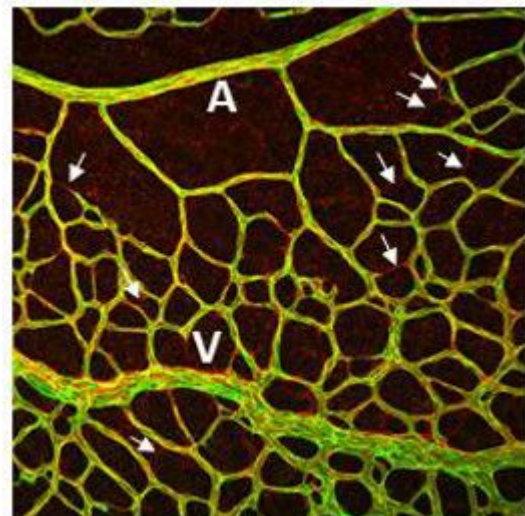


図4 FSK腹腔内注射後の *Mrp4* ノックアウトマウスにおける網膜血管の退縮

FSK 腹腔内注射後の *Mrp4*^{-/-}マウスでは CD31 陰性 / 4 型コラーゲン陽性の empty sleeve の数が増加している。赤 = 4 型コラーゲン、緑 = CD31、A = 動脈、V = 静脈、矢印 = empty sleeve

さらに、FSK 投与後の *Mrp4*^{-/-}マウスでは、網膜動脈のマーカーである α -SMA が動脈周囲と静脈周囲の両方に発現していることが確認された (図5)。

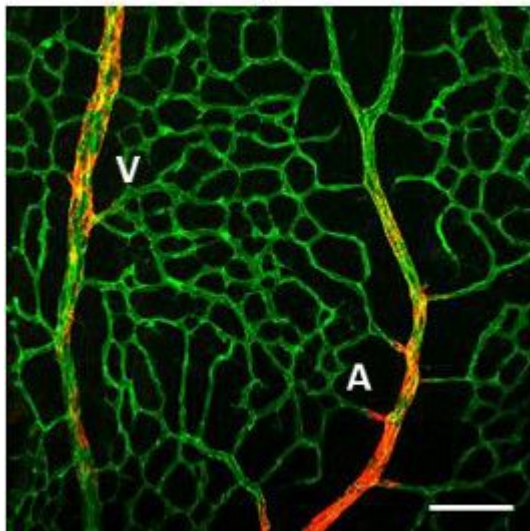


図5 FSK腹腔内注射後の *Mrp4* ノックアウトマウスにおける α -SMA 発現の変化

FSK 腹腔内注射後の *Mrp4*^{-/-}マウスでは静脈周囲にも α -SMA 陽性細胞が確認できる。赤 = α -SMA、緑 = CD31、A = 動脈、V = 静脈、スケールバー = 100 μ m

これらの結果から、*Mrp4* は細胞内 cAMP 濃度上昇に伴う網膜血管の増殖・アポトーシス、不安定化、動脈化を制御することにより生理的な網膜血管新生に関与していると推測された。

次に、*Mrp4* の病的網膜血管新生における役割を調べるために *Mrp4* ノックアウトマウスを高酸素化で飼育し room air に戻すことにより OIR モデルを作成した。*Mrp4* ノックアウトマウスでは野生型マウスに比較して無血管領域が有意に拡大していた。また、Retinopathy Scoring System (Higgins RD, et al. 1999)を用いた評価では、Blood vessel tufts と Central vasoconstriction のスコアが *Mrp4* ノックアウトマウスで有意に高かった (図6、表1)。

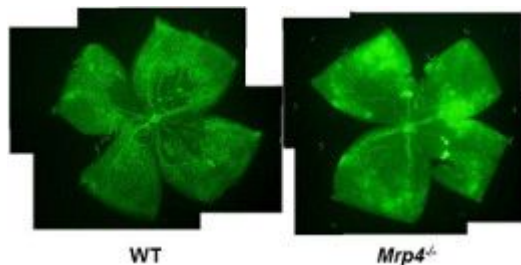


図6 *Mrp4* ノックアウトマウスにおける酸素誘発網膜症の悪化
網膜伸展標本(P17)、CD31 染色

	WT	<i>Mrp4</i> ^{-/-}	P 値
Blood vessel growth	0.0 ± 0.0	0.8 ± 0.5	0.062
Blood vessel tufts	2.3 ± 0.5	3.8 ± 0.5	0.028
Extra retinal neovascularization	2.3 ± 0.5	3.0 ± 0.0	0.063
Central Vasoconstriction	1.3 ± 0.5	3.0 ± 0.0	0.017
Retinal hemorrhage	0.5 ± 0.6	1.0 ± 0.0	0.186
Blood vessel tortuosity	2.0 ± 0.8	3.0 ± 0.0	0.065
Total	8.3 ± 1.3	14.5 ± 1.0	0.020

表1 Retinopathy Score

Mrp4^{-/-}マウスで酸素誘発網膜症が重症化したことから *Mrp4* は病的網膜血管新生に対して抑制的に働いていると推測される。

本研究の結果から *Mrp4* がマウスの生理的・病的網膜血管新生に抑制的に関わっていることが明らかになった。増殖糖尿病網膜症をはじめとする病的網膜血管新生の治療については、国内外を問わず血管内皮増殖因子などの液性因子がターゲットと考えられている。その意味では、*Mrp4* というトランスポーターが治療ターゲットとして有望であるという本研究の成果は斬新であり、異なる治療アプローチとして将来臨床応用される可能性がある。今後は、糖尿病網膜症などの眼疾患モデルにおける *Mrp4* の役割を調べることが将来の臨床応用に必要なステップであると考えられる。

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)

Matsumiya W, Kusuhara S (corresponding author), Hayashibe K, Maruyama K, Kusuhara H, Tagami M, Schuetz JD, Negi A, Forskolin modifies retinal vascular development in *Mrp4*-knockout mice. Invest Ophthalmol Vis Sci, 査読有, 53, 2012, pp. 8029-8035.

〔学会発表〕(計 4 件)

Sentarō Kusuhara, Wataru Matsumiya, Makoto Nakamura, The role of Mrp4 in pathological angiogenesis of the mouse retina, 2015 ARVO Annual Meeting, May 7, 2015, デンバー (アメリカ)

楠原仙太郎、松宮 亘、根木 昭、病的網膜血管新生における Mrp4 の役割、第 118 回日本眼科学会、2015 年 4 月 16 日、札幌

松宮 亘、楠原仙太郎、林部 恵子、丸山 和一、根木 昭、フォルスコリンは Mrp4KO マウスにおける網膜血管形成を修飾する、第 117 回日本眼科学会総会、2013 年 4 月 4 日、東京

松宮 亘、楠原仙太郎、根木 昭、フォルスコリンは Mrp4 ノックアウトマウスにおける網膜血管形成を修飾する、第 17 回眼科分子生物学研究会、2013 年 2 月 23 日～24 日、箱根

〔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：
出願年月日：
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

楠原 仙太郎 (KUSUHARA SENTARO)
神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：40437463

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：