

令和 3 年 4 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17859

研究課題名(和文) Akt持続活性による重症未熟児網膜症の進展機構

研究課題名(英文) Mechanisms of disease progression triggered by persistent Akt activation in retinopathy of prematurity

研究代表者

福島 葉子 (Yoko, Fukushima)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70647031

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)：重症未熟児網膜症では、眼内に過剰なVEGFが産生され異常血管新生が急激に進行する。病的環境を反映する高濃度VEGFに内皮細胞を長期暴露すると、細胞内シグナル伝達分子Aktの持続活性が誘導される。Akt持続活性を誘導した内皮細胞は細胞運動障害や血管透過性亢進を示す。また、網膜血管の内皮細胞でAktを活性化させると、正常環境でも未熟児網膜症に類似する異常血管が形成される。さらに、VEGF長期暴露により発現が誘導される新規ノンコーディングRNAがAktに結合し、Aktを持続活性化させることが明らかになった。これらの知見から新規ノンコーディングRNAが未熟児網膜症の重症化因子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未熟児網膜症でみられる異常新生血管は軽症例では自然消退する一方、重症例では異常血管はさらに増悪して網膜剥離を経て失明に至る。本研究では、重症化因子として内皮細胞のAktシグナルに着目した。病的環境において内皮細胞に誘導されるAkt持続活性という特異な現象を見出し、その活性調節機構を解明した。本研究の成果は、小児の主要な失明疾患である未熟児網膜症の病態解明と治療法開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：In retinopathy of prematurity(ROP), abnormal retinal angiogenesis results from excessively produced VEGF. For mimicking the pathological condition in ROP, endothelial cells (ECs) were stimulated continuously with high concentrated VEGF. Long exposure of VEGF unexpectedly induced persistent phosphorylation of Akt in ECs. Also, the persistent phosphorylation of Akt disrupted cellular motility and augmented permeability even without VEGF stimulation. Forced activation of Akt in retinal ECs in mice caused human ROP-like vessel dilation and tortuosity. We have identified novel non-coding RNAs of which expression increase in ECs after long VEGF exposure. The ncRNA can associate Akt and consequently sustain Akt phosphorylation. The findings suggested the novel ncRNA is one of the exacerbation factors in ROP.

研究分野：眼科学

キーワード：未熟児網膜症 血管新生 内皮細胞 Aktシグナル ノンコーディングRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

未熟児網膜症の本態は網膜血管発生の停滞とそれに続く異常血管新生である。多くの例では正常な血管伸長が再開し、異常血管網は自然消退する。一方、異常血管が退縮することなく眼内出血や網膜剥離に至る例が存在する。重症例のみ不可逆的な病態に進展するのかが明らかにされていない。正常および異常血管新生のいずれにおいても血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) が中心的役割を果たすが、特に重症未熟児網膜症では VEGF が過剰に産生される。過剰量の VEGF によって内皮細胞は正常から異常血管形成に転換する。異常血管新生に転換する機構を理解することで、不可逆な病態に陥ることを阻止できる可能性がある。そこで、我々は病的環境に適応した内皮細胞のシグナル動態と機能に着目して、正常血管が異常に転換する分子基盤の解明を試みている。これまでの予備検討において、高濃度 VEGF に長期暴露された内皮細胞においては、Akt シグナル活性が持続することを初めて見出した。さらに、Akt 持続活性を誘導したマウス網膜血管ではヒト未熟児網膜症に類似する異常血管を自律的に形成することを突きとめた。

2. 研究の目的

病的環境において、内皮細胞はどのように Akt 活性を持続させるのかは全く不明である。これまでに我々が行なった VEGF 長期刺激後の内皮細胞の網羅的遺伝子発現解析では、リン酸化酵素などの既知の Akt 活性制御に関わる分子群に変化は見られなかった。一方、Akt 持続活性が誘導される時期特異的に発現が上昇する長鎖ノンコーディング RNA (endothelial long non-coding RNA; e-lncRNA) の同定に成功した。近年、タンパク質のリン酸化を調節する長鎖ノンコーディング RNA の存在が報告されており、Akt の活性調節においても長鎖ノンコーディング RNA の関与が予想される。本研究では新たに同定した e-lncRNA の Akt 活性修飾機構および異常血管新生における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

【血管内皮細胞における e-lncRNA の Akt 活性調節機構の解明】

1) e-lncRNA が Akt 活性に及ぼす影響の評価

培養臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) において、e-lncRNA を過剰発現させてウエスタンブロットティング法で Akt の活性変化を評価した。また、無処置の HUVEC に LNA 修飾 Gapmer アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) を導入して e-lncRNA 発現を抑制した上で、Akt リン酸化を測定した。

2) e-lncRNA による細胞機能に対する効果の検証

VEGF 長期刺激により誘導される Akt 持続活性が内皮細胞の細胞間接着を低下させる結果、透過性が亢進する。そこで、内皮細胞において e-lncRNA を過剰発現させ Akt 持続活性と同様の透過性に対する効果があるかトランスウェルを用いて評価した。

3) e-lncRNA と Akt の相互作用

細胞質に存在する lncRNA が、キナーゼとの相互作用を通じて酵素活性を調節することが相次いで報告されている。本研究では内皮細胞における e-lncRNA とセリン・スレオニンキナーゼである Akt の結合様式をプルダウンアッセイにより同定した。また、Akt のキナーゼドメインを含むアミノ酸を欠失させた変異タンパク質を作成し、Akt との結合部位を同定した。

【網膜血管新生における e-lncRNA の役割の解明】

1) e-lncRNA の組織特異性

多くの長鎖ノンコーディング RNA は組織特異的な発現を示すことが知られている。そこで、種々のヒト組織由来トータル RNA における e-lncRNA の発現を定量 PCR 法で解析した。また、VEGF 発現との相関を評価した。

2) e-lncRNA 阻害による網膜異常血管の抑制効果の検証

時期特異的に誘導可能な恒常活性型 Akt トランスジェニックマウスにおいて e-lncRNA を抑制する。e-lncRNA 発現抑制が Akt 活性によって誘導される異常血管に与える変化を観察するため、新生仔マウスの浅側頭静脈または眼内に ASO を投与して内皮細胞に in vivo で導入することを試みた。

3) e-lncRNA 過剰発現マウスの作製

e-lncRNA が Akt 持続活性と類似する異常血管形成を誘導するか検証するため、内皮細胞特異的に e-lncRNA を発現するマウスを作製した。

4. 研究成果

【血管内皮細胞における e-lncRNA の Akt 活性調節機構の解明】

1) e-lncRNA を過剰発現させた HUVEC では Akt 活性が強く誘導された。一方で、ASO を用いて e-lncRNA の発現を抑制すると Akt 活性はコントロールと比べて低下した。e-lncRNA が Akt 活性

を制御することが明らかになった。

2) e-lncRNA を過剰発現させた細胞では、透過性の亢進がみられた。e-lncRNA 発現により Akt 持続活性が維持され、透過性亢進をきたすことが示唆された。

3) e-lncRNA は Akt リコンビナントタンパク質および細胞内在性タンパク質のいずれにも結合した。e-lncRNA 結合に Akt のリン酸化状態は依存しなかった。また、e-lncRNA は Akt のキナーゼドメインに結合することが明らかになった。

【網膜血管新生における e-lncRNA の役割の解明】

1) ヒト組織において e-lncRNA は肝臓や腎臓に多く発現していた。また VEGF と e-lncRNA の遺伝子発現は正の相関が見られた。VEGF 依存的に e-lncRNA の発現上昇が誘導される可能性を示した。

2) 異なる時期で新生仔マウスの浅側頭静脈へ ASO を投与するも、*in vivo* で内皮細胞へ導入されなかった。*in vivo* で有効な ASO の開発が進んでいることから、ひきつづきデザインの異なる ASO を用いて検討する予定である。

3) Akt タンパク質のアミノ酸配列が種を超えて保存されるのに対して、ncRNA は生物種における保存性が低いことが知られている。実際に、ヒト培養内皮細胞から単離した e-lncRNA は、マウス塩基配列に対して相同性に乏しいことが確認された。たとえばヒト糖尿病網膜症は高血糖を背景に毛細血管の脱落から異常血管新生がみられるが、糖尿病モデルマウスでは高血糖による網膜症が誘導されないことは良く知られている。こうした疾患発症の生物種間の違いは lncRNA に由来する可能性を考慮し、ヒト e-lncRNA を内皮細胞特異的に過剰発現させる遺伝子組換えマウスの作製が望ましい。そこで、ゲノム編集技術を用いて、ヒト e-lncRNA を発現するコンディショナルトランスジェニックマウスの作製を完了した。今後は、血管内皮特異的 e-lncRNA 過剰発現マウスの血管形態と機能評価を行なう予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Imanishi Yousuke, Hirata Katsuya, Nozaki Masatoshi, Mochizuki Narutaka, Hirano Shinya, Fukushima Yoko, Hatsukawa Yoshikazu, Wada Kazuko	4. 巻 40
2. 論文標題 Effect of fluctuation of oxygenation on the development of severe retinopathy of prematurity in extremely preterm infants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Perinatology	6. 最初と最後の頁 515 ~ 521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41372-019-0571-y	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukushima Yoko, Kawasaki Ryo, Sakaguchi Hirokazu, Winegarner Andrew, Ineyama Hiromi, Imanishi Yousuke, Hirano Shinya, Wada Kazuko, Hatsukawa Yoshikazu, Nishida Kohji	4. 巻 4
2. 論文標題 Characterization of the Progression Pattern in Retinopathy of Prematurity Subtypes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ophthalmology Retina	6. 最初と最後の頁 231 ~ 237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oret.2019.11.015	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukushima Yoko, Tomimatsu Takuji, Nishida Kohji	4. 巻 126
2. 論文標題 Fetal Ultrasound Image in Persistent Fetal Vasculature	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 988 ~ 988
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.opthta.2019.04.004	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Omori Keisuke, Nagata Nanae, Kurata Kaori, Fukushima Yoko, Sekihachi Erika, Fujii Nobutaka, Namba-Hamano Tomoko, Takabatake Yoshitsugu, Fruttiger Marcus, Nagasawa Takashi, Uemura Akiyoshi, Murata Takahisa	4. 巻 3
2. 論文標題 Inhibition of stromal cell derived factor-1 /CXCR4 signaling restores the blood-retina barrier in pericyte-deficient mouse retinas	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.120706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Shiraki Akihiko, Fukushima Yoko, Kawasaki Ryo, Sakaguchi Hirokazu, Mitsuhashi Miwa, Ineyama Hiromi, Hatsukawa Yoshikazu, Nishida Kohji	4. 巻 205
2. 論文標題 Retrospective Validation of the Postnatal Growth and Retinopathy of Prematurity (G-ROP) Criteria in a Japanese Cohort	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 50 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajo.2019.03.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukushima Yoko, Fujino Takahiro, Kusaka Shunji, Hatsukawa Yoshikazu, Nishida Kohji	4. 巻 11
2. 論文標題 Favorable outcomes of adequate laser photocoagulation and salvage bevacizumab treatment for aggressive posterior retinopathy of prematurity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology Case Reports	6. 最初と最後の頁 66 ~ 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoc.2018.05.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsuda J, Namba T, Takabatake Y, Kimura T, Takahashi A, Yamamoto T, Minami S, Sakai S, Fujimura R, Kaimori JY, Matsui I, Hamano T, Fukushima Y, Matsui K, Soga T, Isaka Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 Antioxidant role of autophagy in maintaining the integrity of glomerular capillaries.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 53-65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2017.1391428.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Winegarner A, Wakabayashi T, Hara-Ueno C, Sato T, Busch C, Fukushima Y, Sayanagi K, Nishida K, Sakaguchi H, Nishida K.	4. 巻 -
2. 論文標題 RETINAL MICROVASCULATURE AND VISUAL ACUITY AFTER INTRAVITREAL AFLIBERCEPT IN EYES WITH CENTRAL RETINAL VEIN OCCLUSION: An Optical Coherence Tomography Angiography Study.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Retina	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IAE.0000000000001828.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wakabayashi T, Sato T, Hara-Ueno C, Fukushima Y, Sayanagi K, Shiraki N, Sawa M, Ikuno Y, Sakaguchi H, Nishida K.	4. 巻 58
2. 論文標題 Retinal Microvasculature and Visual Acuity in Eyes With Branch Retinal Vein Occlusion: Imaging Analysis by Optical Coherence Tomography Angiography.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci	6. 最初と最後の頁 2087-2094
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.16-21208.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 福島葉子
2. 発表標題 網膜血管疾患の慢性化を制御する分子機構
3. 学会等名 第5回血管生物若手研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島葉子
2. 発表標題 G-ROP studyによる未熟児網膜症スクリーニング検査法の日本人における有用性
3. 学会等名 第123回 日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島葉子
2. 発表標題 未熟児網膜症の病態生理と臨床との関連
3. 学会等名 第73回 臨床眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島葉子
2. 発表標題 未熟児網膜症の病態遷移に基づく治療の最適化
3. 学会等名 第73回 臨床眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島葉子
2. 発表標題 網膜血管疾患の慢性化と血管内皮細胞における持続性シグナル活性異常
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoko Fukushima, Koichi Nishiyama, Hiroshi Kataoka, Marcus Fruttiger, Shigetomo Fukuhara, Kohji Nishida, Naoki Mochizuki, Hiroki Kurihara, Shin Ichi Nishikawa, Akiyoshi Uemura
2. 発表標題 RhoJ integrates attractive and repulsive cues in directional migration of endothelial cells
3. 学会等名 第27回 日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島葉子
2. 発表標題 未熟児網膜症アップデート
3. 学会等名 第72回臨床眼科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoko Fukushima
2. 発表標題 Characterization of progression pattern in retinopathy of prematurity subtypes
3. 学会等名 The Association for Research in Vision and Ophthalmology
4. 発表年 2018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
---------	---------