

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16915

研究課題名(和文) 網脈絡膜組織に対する網膜色素上皮由来胎盤成長因子(PlGF)の保護効果

研究課題名(英文) Cytoprotective effect of RPE-derived PlGF to the chorioretinal tissue

研究代表者

安藤 亮 (Ando, Ryo)

北海道大学・大学病院・特任助教

研究者番号：60399847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胎盤成長因子(PlGF)は血管新生や血管形成に関与する血管内皮増殖因子(VEGF)ファミリーの一員である。近年、VEGFファミリー分子の持つ組織保護作用について認識が深まりつつあるが、PlGFの生理的作用は不明であった。本研究では、網膜の恒常性維持に重要な働きをする網膜色素上皮細胞(RPE)に対するPlGFの生理的役割を解析し、PlGFが蛋白の分解系への輸送に重要な分子GSK-3の活性を抑制することでVEGF受容体(VEGFR)-2蛋白を安定化し、VEGF/VEGFR-2によるRPE細胞保護作用を支える働きを有することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PlGFはVEGFとともに糖尿病網膜症や滲出型加齢黄斑変性の病態形成に関与することが知られている。糖尿病網膜症と加齢黄斑変性は我が国の主要な失明原因であり、VEGFファミリー分子を阻害するVEGF阻害剤の臨床導入はその治療成績を大きく改善した。一方、VEGFファミリーが持つ組織保護作用についての認識が近年高まっており、その長期阻害が後眼部組織に与える影響に関する検討は臨床的にも重要な課題である。本研究により、RPEから分泌されるPlGFがVEGF受容体-2の安定化を介してRPE細胞を保護することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Placental growth factor (PlGF) belongs to vascular endothelial growth factor (VEGF) family proteins which participate in angiogenesis and vasculogenesis. In late years, the cytoprotective role of VEGF family molecules is recognized but the physiological role of PlGF was still unknown. In this study, the physiological role of PlGF in the retinal pigment epithelium (RPE) which is important for the homeostasis of retinal tissue was investigated, and it was demonstrated that PlGF protects VEGFR2 protein from proteasomal degradation through GSK3 inactivation. The current data indicate that PlGF protects RPE cells via stabilization of VEGFA/VEGFR-2 signaling.

研究分野：網膜細胞生物学

キーワード：胎盤成長因子 VEGFファミリー 網膜色素上皮細胞 細胞保護

### 1. 研究開始当初の背景

血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor A, VEGF-A) は、糖尿病網膜症や滲出型加齢黄斑変性などの後眼部疾患における病態責任分子である。同分子は血管新生や血管透過性亢進などの機能を有するが、これまでの研究によって VEGF-A とアミノ酸配列の相同性が高い分子が複数発見され、現在ではそれらの分子群を VEGF ファミリーと呼称している。哺乳類における VEGF ファミリーは VEGF-A から D および胎盤成長因子 (placental growth factor, PlGF) から構成されているが、この中で PlGF は前述の VEGF-A とともに糖尿病網膜症や滲出型加齢黄斑変性の病態形成に関わることが知られている。PlGF はホモ二量体または VEGF-A とのヘテロ二量体として存在し、細胞膜表面の VEGF 受容体 (VEGFR) -1 およびニューロピリンと呼ばれる受容体に結合する

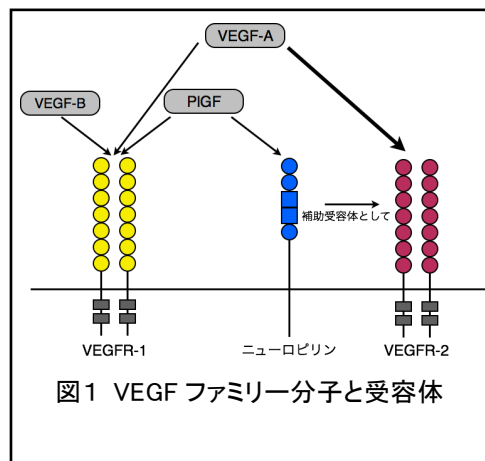


図1 VEGF ファミリー分子と受容体

(図1)。糖尿病網膜症と加齢黄斑変性は我が国の主要な失明原因であり、VEGF-A と PlGF など複数の VEGF ファミリー分子を阻害する VEGF 阻害剤の臨床導入はその治療成績を大きく改善した。

一方で、長期間におよぶ VEGF ファミリー分子の阻害が網膜組織にどのような影響を与えるかは明らかとなっていない。網膜色素上皮細胞 (retinal pigment epithelium, RPE) は網膜の最外層に位置し、脈絡膜からの物質通過を制御するバリア機能や視細胞外節を食食する作用などを有し、後眼部の恒常性維持に重要な役割を演じている。RPE は VEGF-A や PlGF などを産生することが知られているが、培養 RPE に対して VEGF-A 阻害をおこなうと酸化ストレス増加に対して脆弱となることが報告されている [Byeon SH et al, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010]。また、RPE 特異的に VEGF-A 発現を欠失させたマウスにおいては脈絡膜毛細血管板が萎縮すること [Kurihara T et al, J Clin Invest 2012] も示されており、これらの知見は RPE が分泌する VEGF-A は RPE 自身および隣接する脈絡膜毛細血管板の維持に重要であることを示している。RPE-脈絡膜毛細血管板複合体の障害は萎縮型加齢黄斑変性の病態基盤でもあることから、滲出型加齢黄斑変性における VEGF-A の長期阻害は視力低下の原因と成り得ることが示唆される。一方、PlGF については低酸素刺激などによる網膜神経節細胞死を抑制する保護作用の報告 [Inoue Y et al, J Neurosci Res 2014] はあるが、VEGF-A と同様な RPE や脈絡膜毛細血管板を含む周囲組織への保護的役割の有無については明らかとならなかった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、RPE およびその周囲組織である脈絡膜毛細血管板における PlGF の生理的役割、特に保護作用を調べることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) PlGF 抑制 RPE 細胞を用いた *in vitro* 実験

RPE における PlGF の役割を解析するために、ヒト RPE 細胞株 hTERT-RPE1 へのレトロウイルスベクターを用いた shRNA 導入によって作製した PlGF 抑制 RPE 細胞を用いて、以下の *in vitro* 実験をおこなった。

##### ① PlGF の細胞保護作用の検討

予備検討において、PlGF 抑制 RPE 細胞では血清除去によって細胞死が亢進することが明らかとなっている。同条件下に PlGF を添加することで細胞死を抑制できるかを、時間依存性 (3, 6, 24 時間) および容量依存性 (0.1, 1, 10ng/ml) について、TUNEL 法および Caspase 3/7 活性の測定により検討した。

##### ② PlGF による VEGFR-2 蛋白安定化の機序の検討

予備検討においては PlGF 抑制 RPE 細胞における VEGFR-2 の蛋白レベルでの減少が確認されている (図2)。mRNA 発現量は変化しないことが確認できており、分解の促進など蛋白の安定性に関連する変化であると考えられ、以下のように機序を解析した。

- A) 分解系: プロテアソーム阻害剤 (MG132)、リソソーム阻害剤 (バフィロマイシン A1) による分解系阻害が VEGFR-2 発現に及ぼす影響の解析。
- B) 蛋白輸送系: 分解系への蛋白の輸送制御に関わる分子の発現や活性が VEGFR-2 の安定性に及ぼす影響の解析。

#### (2) RPE 細胞特異的 PlGF 欠損マウスの作製

上記の *in vitro* 実験と並行して、RPE 細胞特異的 P1GF 欠損マウスの作製をおこなった。C57BL/6J マウスにおいて *PIGF* 遺伝子の Exon3-6 を挟んで *LoxP* 配列を導入した *PIGF-flox* マウスと RPE 特異的プロモーターである Bestrophin1 遺伝子 (*BEST1*) プロモーターの下流に *Cre* 遺伝子を導入した遺伝子改変マウスである *BEST1-Cre* マウスを交配し、RPE 細胞特異的 P1GF 欠損マウスを作製した。RPE 細胞特異的 P1GF 欠損マウスの眼球切片を作製し、HE 染色により網脈絡膜組織の形態評価をおこなった。

#### 4. 研究成果

##### (1) P1GF の細胞保護作用

ヒト RPE 細胞株 hTERT-RPE1 において P1GF 発現を抑制すると、血清除去時の TUNEL 陽性細胞数および Caspase 3/7 活性が亢進し、アポトーシスが増加していた。この P1GF 抑制 RPE 細胞に組換え P1GF 蛋白を外的に添加するとアポトーシスが抑制された (図 2)。親株 hTERT-RPE1 細胞では、血清除去時に組換え VEGF-A 蛋白を添

加すると濃度依存的にアポトーシスが抑制されたが、VEGFR-2 を siRNA で抑制すると VEGF-A によるアポトーシスからの保護効果は失われた。同様に、VEGFR-2 発現が減少している P1GF 抑制 RPE 細胞においても、VEGF-A 添加によるアポトーシスの抑制は失われていた。これらの結果により、P1GF が VEGFR-2 蛋白を安定化することで VEGF-A による RPE 細胞保護効果を支える機序の存在が示唆された。

##### (2) P1GF による VEGFR-2 蛋白安定化

P1GF 抑制 RPE 細胞に P1GF を添加すると、VEGFR-2 蛋白が回復した (図 3)。VEGFR-2 の mRNA 発現は変化しなかった。これらのことから、P1GF に VEGFR-2 蛋白を安定化する作用があることが示された。P1GF を抑制した RPE 細胞では、分解系への蛋白輸送に重要なユビキチン化を制御する glycogen synthase kinase 3 (GSK3) の活性を負に制御する ser21/9 のリン酸化が減少し、GSK3 活性が亢進することが明らかになった。一方、同細胞に P1GF を添加すると GSK3 のリン酸化が増加し、GSK3 の活性抑制が認められた。さらに、P1GF 抑制 RPE 細胞に GSK3 阻害剤である CHIR99021 を添加すると VEGFR-2 蛋白量は増加し、親株 RPE 細胞において GSK3 をアクティベーターである sodium nitroprusside (SNP) で活性化すると VEGFR-2 蛋白量が減少した。これらの結果により、P1GF による VEGFR-2 の安定化には GSK3 が関与することが示された。

続いて、P1GF による GSK3 活性抑制の機序についてさらに検討をおこなった。P1GF 抑制 RPE 細胞に P1GF を添加すると AKT のリン酸化が亢進して活性化し、AKT 阻害剤である LY294002 を添加すると、P1GF による GSK3 活性の抑制がみられなくなる結果が得られた。これらのことより、P1GF による VEGFR-2 安定化には AKT の活性化を介した GSK3 活性の抑制が関与することが明らかになり、P1GF による VEGFR-2 安定化を介した RPE 細胞保護の分子メカニズムが示された (図 4)。

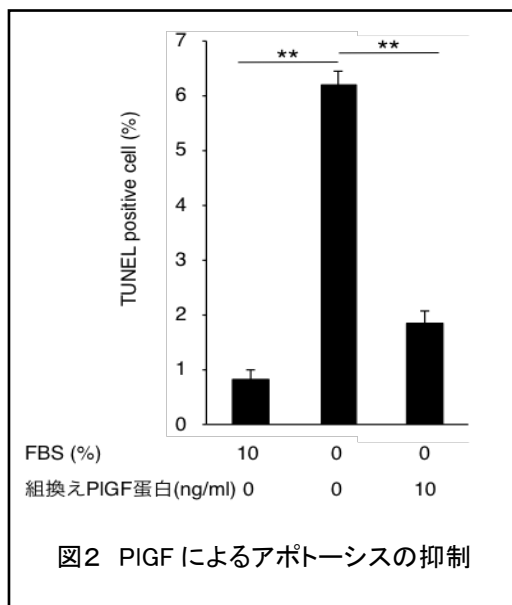


図2 P1GF によるアポトーシスの抑制

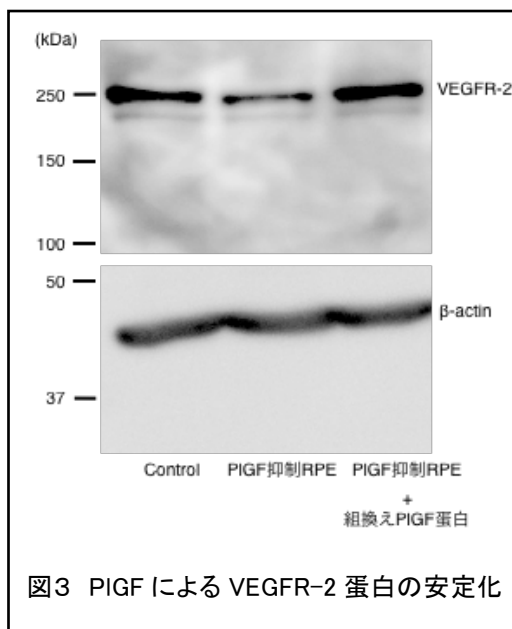


図3 P1GF による VEGFR-2 蛋白の安定化

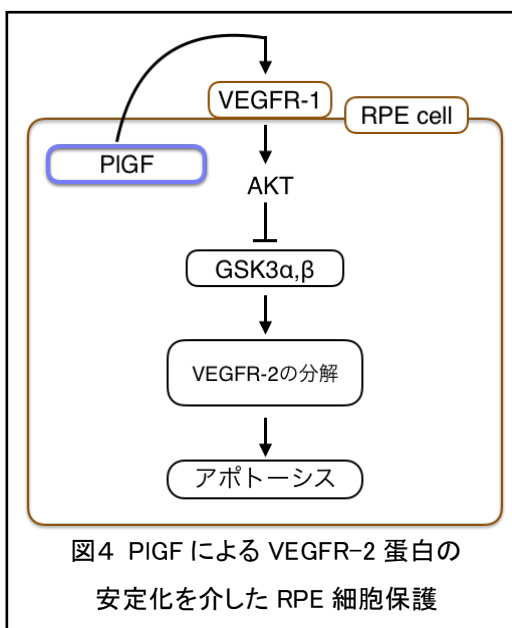


図4 P1GF による VEGFR-2 蛋白の安定化を介した RPE 細胞保護

### (3) RPE 細胞特異的 P1GF 欠損マウスの網脈絡膜組織の形態学的検討

RPE 細胞特異的 P1GF 欠損マウスの眼球切片を作製し、HE 染色にて形態評価をおこなったところ、野生型の C57BL/6J マウスと比較し形態学的に明らかな変化は認められなかった。これは、VEGF-A など他の VEGF ファミリー分子が代償的に作用している、あるいは脈絡膜血流からの P1GF の供給があることなどが原因ではないかと推測している。今後、RPE 細胞特異的 P1GF 欠損マウスに P1GF や VEGF-A などの中和抗体を硝子体注射した際の網脈絡膜組織の形態学的評価、および網膜電図の測定による機能的評価をおこない、更に検討を進めて行く予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Ando R, Saito W, Kanda A, Kase S, Fujinami K, Sugahara M, Nakamura Y, Eguchi S, Mori S, Noda K, Shinoda K, Ishida S.                   | 4. 巻<br>196             |
| 2. 論文標題<br>Clinical Features of Japanese Patients With Anti- -enolase Antibody-Positive Autoimmune Retinopathy: Novel Subtype of Multiple Drusen | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>American Journal of Ophthalmology  | 6. 最初と最後の頁<br>181 ~ 196 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.ajo.2018.08.044   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ando R, Saito W, Kanda A, Kase S, Fujinami K, Noda K, Shinoda K, Ishida S. |
| 2. 発表標題<br>Anti-enolase drusen: a novel subtype of autoimmune retinopathy             |
| 3. 学会等名<br>The 4th Japan-Taiwan Vitreoretinal Joint Meeting (国際学会)                    |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ando R.  |
| 2. 発表標題<br>Anti-enolase drusen: A new subtype of autoimmune retinopathy |
| 3. 学会等名<br>Sapporo Novel Ophthalmology Workshop (SNOW) (国際学会)           |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>安藤 亮、齋藤 航、平形寿彬、藤波 芳、角田和繁、加瀬 諭、野田航介、神田敦宏、石田 晋 |
| 2. 発表標題<br>抗carbonic anhydrase II 抗体陽性自己免疫性網膜症の臨床像      |
| 3. 学会等名<br>第58回日本網膜硝子体学会                                |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ando R.   |
| 2. 発表標題<br>Clinical features of Japanese patients with anti- -enolase antibody-positive autoimmune retinopathy: novel subtype of multiple drusen |
| 3. 学会等名<br>13th Japan-Korea International Symposium in Ophthalmology (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>安藤 亮、野田航介、廣岡季里子、柴田有紀子、橋本勇希、鈴木智浩、清水啓史、藤谷顕雄、董 震宇、加瀬 諭、吉澤史子、齋藤 航、石田 晋. |
| 2. 発表標題<br>ポリ-ブ状脈絡膜血管症に対する光線力学的療法トリプル療法の5年成績                                   |
| 3. 学会等名<br>第57回日本網膜硝子体学会、京都  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>安藤 亮、齋藤 航、神田敦宏、加瀬 諭、藤波 芳、菅原道孝、中村洋介、江口秀一郎、野田航介、篠田 啓、石田 晋. |
| 2. 発表標題<br>抗 -enolase抗体陽性自己免疫性網膜症の網膜電図所見                            |
| 3. 学会等名<br>第66回日本臨床視覚電気生理学会、浜松                                      |
| 4. 発表年<br>2018年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|