

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K24028

研究課題名（和文）AM-RAMP2系を標的とした、網膜静脈閉塞症の新規治療法開発

研究課題名（英文）Development of a new treatment for retinal vein occlusion by targeting the AM-RAMP2 system

研究代表者

平林 一貴（Hirabayashi, Kazutaka）

信州大学・医学部・助教（特定雇用）

研究者番号：10845671

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では生理活性ペプチドであるアドレノメデュリン（AM）と受容体活性調節タンパクであるRAMP2から構成されるAM-RAMP2系に着目し、網膜静脈閉塞症に対する治療薬としての可能性を検討した。AMおよびRAMP2ノックアウトマウスでは網膜静脈閉塞処置による病態が野生型と比較し悪化した。反対にAM投与により病態改善する結果が得られ、治療標的としてAM-RAMP2系が有望であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜静脈閉塞症（RVO）は糖尿病網膜症に次いで多い網膜血管疾患であり、網膜毛細血管の脱落、虚血、および黄斑浮腫が生じると重度の視力障害をもたらす。現状では抗血管内皮成長因子阻害薬による治療が用いられているが、網膜浮腫を改善する効果はあるものの根治療法ではない。そのため異なるアプローチによる治療法が求められている。本研究者はAM-RAMP2系を標的とすることで、RVOに対する新しいより根治的な治療法開発ができる可能性を切り開いた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the AM-RAMP2 system, which consists of the bioactive peptide adrenomedullin (AM) and its receptor activity modulator protein RAMP2, and investigated its potential as a therapeutic agent for retinal vein occlusion. In AM and RAMP2 knockout mice, treatment of retinal vein occlusion aggravated the disease compared to wild-type mice. In contrast, treatment with AM improved the disease, indicating that the AM-RAMP2 system is a promising therapeutic target.

研究分野：眼科学

キーワード：Adrenomedullin RAMP2 網膜静脈閉塞症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

網膜静脈閉塞症 (RVO) は糖尿病網膜症に次いで多い網膜血管疾患であり、網膜毛細血管の脱落、虚血、および黄斑浮腫が生じると重度の視力障害をもたらす。申請者らは、AM と RAMP2 のノックアウトマウスが、共に血管形成異常と浮腫のため胎生致死となることから、AM-RAMP2 系が血管の正常な発生に必須であること、さらに AM-RAMP2 系が生後の網膜血管の発達にも関連していることを明らかとしてきた。また、本研究者は最近、新規の網膜中心静脈閉塞症 (CRVO) モデルマウスを開発した(図 1)。

### 2. 研究の目的

本研究では生理活性ペプチドであるアドレノメデュリン (AM) と AM の受容体活性調節タンパクである RAMP2 から構成される AM-RAMP2 システムに着目し、網膜血管疾患である網膜静脈閉塞症に対する治療薬としての可能性を検討することを目的とした。本研究者らによって作成された網膜中心静脈閉塞症モデルマウスを応用して、AM-RAMP2 系の網膜静脈閉塞症における病態生理学的意義、特に網膜血管透過性の維持、抗炎症作用、血管保護作用とそのメカニズムを解明し、黄斑浮腫や血管脱落による視力障害に対する新たな治療標的とすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 「CRVO における AM-RAMP2 系の病態生理学的意義の解明」 術後 1 日目、3 日目、7 日目に CRVO モデルの網膜サンプルを回収し、AM とその受容体 CLR、受容体活性調節タンパク RAMP1, 2, 3 の遺伝子発現の変動を検討することで、CRVO モデルにおける AM とそのシグナル系の関与を考察した。次に AM および RAMP2 ノックアウトマウスを用いて CRVO モデルを作成し、血管の再灌流や網膜浮腫のレベルを野生型マウスと比較することで、内因性の AM-RAMP2 系が、CRVO において網膜保護的に作用しているのか検証した。

(2) 「AM の外因性投与による CRVO の改善効果の検討」 CRVO モデルに対し、AM リコンビナントタンパクの全身投与を行い、外因性の AM が CRVO の病態改善に有効であるか検証した。

(3) 「AM の網膜血管内皮細胞保護メカニズムの解明」 AM の網膜血管への直接の作用を検討するため、網膜血管内皮細胞 Cell line である TRiBRB 細胞を用いて、TNF- $\alpha$  添加によって細胞傷害を誘導した上で、AM の追加添加の効果を検討する。遺伝子発現に及ぼす影響を検討し、AM の網膜血管内皮細胞保護メカニズムを検討した。

### 4. 研究成果

AM および RAMP2 ヘテロノックアウトマウスに対して CRVO 処置を行った場合、野生型マウスと比較し蛍光眼底造影検査やフルオレセインイソチオシアネート (FITC) デキストランによる血管灌流検査において、有意に網膜血管密度が低下することが明らかとなった(図 2)。また AM ヘテロノックアウトマウスでは CRVO 処置後の凝固因子 PAI-1、炎症性サイトカイン CD68、白血球接着分子 Vcam-1、酸化ストレスマーカー p67phox の発現が野生型と比較し有意に上昇していることが明らかとなった(図 3)。また AM 投与により血管密度の低下が抑制され、炎症性サイトカイン、白血球接着分子、凝固因子や酸化ストレス遺伝子発現などの CRVO の病態が改善することが判明した(図 4, 5)。またマイクロパルスレーザーの網膜照射により AM の遺伝子発現が低下することが判明し、眼循環を改善する効果があることが予想された。

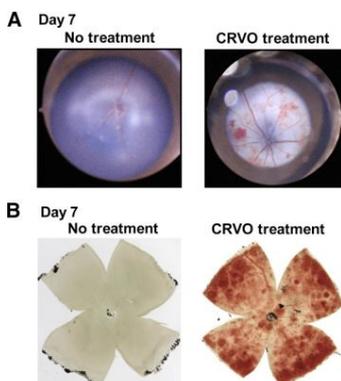


図 1. 網膜中心静脈閉塞症 (CRVO) モデルにおける網膜出血の評価。

A: 未処置マウスおよび CRVO 処置マウスの眼底を示す局所内視鏡眼底撮影 (7 日目)。CRVO 投与マウスでは、臨床的な CRVO に類似した網膜出血と蛇行を伴う静脈の拡張を認める。B: 未処置マウスと CRVO 処置マウスの網膜フラットマウント像 (7 日目)。CRVO 投与マウスでは網膜出血が顕著である。

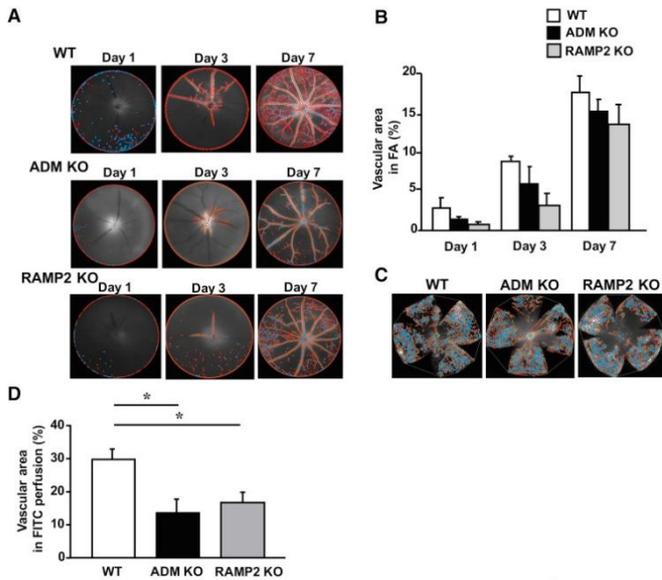


図 2. AM および RAMP2 ヘテロノックアウトマウスに対してCRVO処置を行った場合、野生型マウスと比較し蛍光眼底造影検査やフルオレセインイソチオサイアネート (FITC) デキストランによる血管灌流検査において、有意に網膜血管密度が低下する。

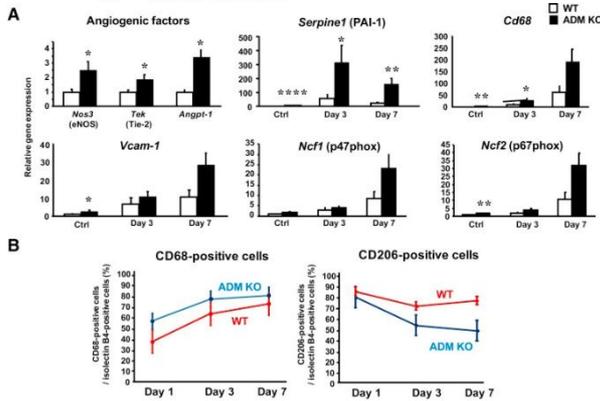


図 3. AM ヘテロノックアウトマウスでは CRVO 処置後の凝固因子 PAI-1、炎症性サイトカイン CD68、白血球接着分子 Vcam-1、酸化ストレスマーカー p67phox の発現が野生型と比較し有意に上昇する。

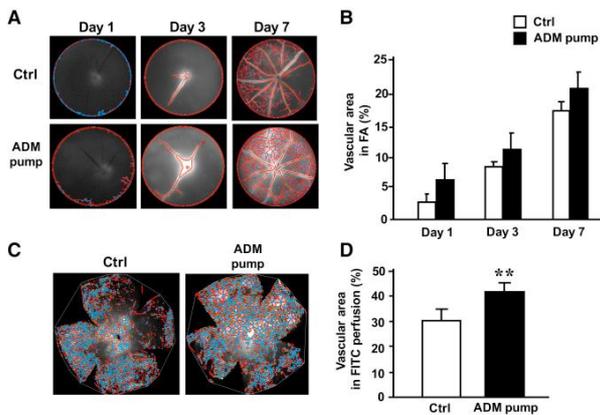


図 4. AM 投与により血管密度の低下が抑制される。

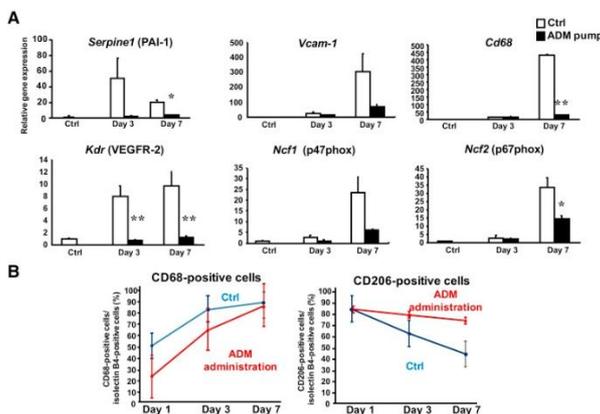


図 5. AM 投与により炎症性サイトカイン、白血球接着分子、凝固因子や酸化ストレス遺伝子発現などの CRVO の病態が改善する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kazutaka Hirabayashi, Ken Hoshiyama, Akira Imai, Yasuhiro Iesato, Takao Hirano, Toshinori Murata	4. 巻 14
2. 論文標題 Relationship between central retinal sensitivity, thickness, perfusion density and visual acuity in patients with branch retinal vein occlusion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Ophthalmologica	6. 最初と最後の頁 e610, e611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/aos.14841	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 Kazutaka Hirabayashi, Shinji Kakihara, Masaaki Tanaka, Takayuki Shindo, Toshinori Murata	4. 巻 258
2. 論文標題 Investigation of the therapeutic mechanism of subthreshold micropulse laser irradiation in retina	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1039, 1047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00417-020-04638-3	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0件

〔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
---------	---------