

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591942

研究課題名（和文）眼内新生血管発生・成熟・消退メカニズムの解明—アペリンその他の分子の関与

研究課題名（英文）Involvement of Apelin/APJ system in intraocular neovascularization

研究代表者

五味 文 (GOMI FUMI)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：80335364

研究成果の概要（和文）：アペリンは網膜血管新生過程に、VEGFとは独立して関与している。脈絡膜血管新生過程においても、アペリンの関与が明らかとなり、アペリンを標的とした治療法の確立が、現在の抗 VEGF 療法の限界を補える可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Apelin induces the hypoxia-induced retinal angiogenesis independent of the VEGF/VEGF receptor 2 signaling pathway. Apelin is also involved in the development of choroidal neovascularization. Therefore, a therapy targeting of apelin possibly rescues nonresponders for anti-VEGF treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：アペリン、血管新生、網膜、脈絡膜

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症、網膜静脈閉塞症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性など、眼内で血管新生を生じる病態は珍しいものではない。生じた新生血管が出血や牽引を生じ、重篤な視力低下に直結しうるため、新生血管の制御が必要である。

近年、眼内血管新生発症のキーとなる分子は血管内皮増殖因子（VEGF）であることが解明され、現在はこの VEGF が治療の主要標的となっている。特に脈絡膜新生血管に由来す

る加齢黄斑変性の治療薬として VEGF に対するモノクローナル抗体である

bevacizumab や ranibizumab が使用されてきたが、臨床症例の蓄積により、すべての血管新生病態が抗 VEGF 薬に反応するわけではないことがわかってきた。特に加齢黄斑変性の一病型であるポリープ状脈絡膜血管症では、抗 VEGF 抗体投与後も病巣内の異常血管はほぼ縮小することなく残存しており、それが再発につながることを我々は見出し報告した(Gomi et al. Br J Ophthalmol 2008)。

このように、抗 VEGF 薬に最初から反応し難い新生血管がある一方、抗 VEGF 薬による治療途中で反応性がみられなくなる症例の存在も指摘されてきている。以上のことから、眼内の新生血管には、VEGF への依存性が少ないと考えられる異常血管も含まれていることが推測され、現行の VEGF 標的治療のみでは全ての眼内新生血管発症症例を治療し得ない例への対処として、新たな分子標的の同定が必要不可欠である。

その1つとして、我々は apelin/APJ システムに着目した。Apelin は、オーファン G タンパク質共役型受容体 APJ の内因性リガンドとして 1998 年に同定されたペプチドであり、そのアミノ酸配列はマウス、ラット、ウシ、ヒトで完全に保存されている。共同研究者の笠井、馬場らは、apelin が血管内皮細胞の増殖作用および走化作用を有していることを見出し、血管新生に深く関与することを報告した。さらに網膜血管の成長過程において apelin/APJ システムが関与していることを明らかにした (Kasai et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008)。我々は apelin と眼内血管新生との関わりに着目して研究を開始した。

2. 研究の目的

眼内、特に網膜及び脈絡膜新生血管の発生、成熟ならびに消退過程における apelin/APJ システムの関与について検討する。

3. 研究の方法

野生型及び apelin 遺伝子欠損 (apelin-KO) マウスを用いて、網膜では未熟児網膜症マウスモデルを用いて、脈絡膜ではレーザー誘発脈絡膜新生血管モデルを用いて、網膜、脈絡膜それぞれの新生血管発症過程における apelin/APJ システムの関与について検討した。

1) 生後 7 日目の野生型及び apelin KO マウスを用いて、高濃度 (75%) 酸素下で 5 日間飼育し、その後通常酸素下にもどして飼育する未熟児網膜症発症 (OIR) マウスモデルを作成し、生後 15, 17, 20 日時点で眼球摘出し、網膜から mRNA を抽出して、quantitative real-time RT-PCR を行って、

apelin, VEGF, Erythropoietin, tie-, platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) の各遺伝子の発現変化を検討した。

2) apelin の標的細胞の同定のため、OIR マウスにおいて、apelin リセプターである APJ の発現細胞を、網膜フラットマウント及び網膜切片を作成して免疫染色で検討した。

3) OIR マウスで、蛍光色素である FITC デキストランを還流させて、野生型ならびに apelin KO マウスで網膜血管の変化の有無を観察した。

4) apelin/APJ システムと VEGF との関連を確認するために、培養血管内皮細胞に apelin siRNA を添加することで VEGF の発現変化を検討した。

5) マウス網膜にレーザー光凝固術を行い、脈絡膜新生血管を発症させ、2, 4, 7 日後に眼球摘出して、網膜-網膜色素上皮-脈絡膜から apelin, APJ, VEGF-A, VEGF receptor 2 (VEGFR2), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Mm00443258), intercellular adhesion molecule (ICAM) の遺伝子発現の経時変化を検討した。

6) レーザー光凝固術施行 4 日目のマウスの眼球から網膜フラットマウントを作成し、PECAM-1 と APJ の免疫染色を行った。

7) レーザー施行後 7 日目のマウス眼球から網膜色素上皮-脈絡膜のフラットマウントを作成し、蛍光色素を注入して脈絡膜新生血管を描出させ、サイズの経時変化を確認した。

8) レーザー施行後のマウス網脈絡膜組織を用いてフローサイトメトリーを行い、脈暗く膜新生血管へのマクロファージの集積率の違いが、野生型マウス・KO マウスで差があるかどうかを調べた。

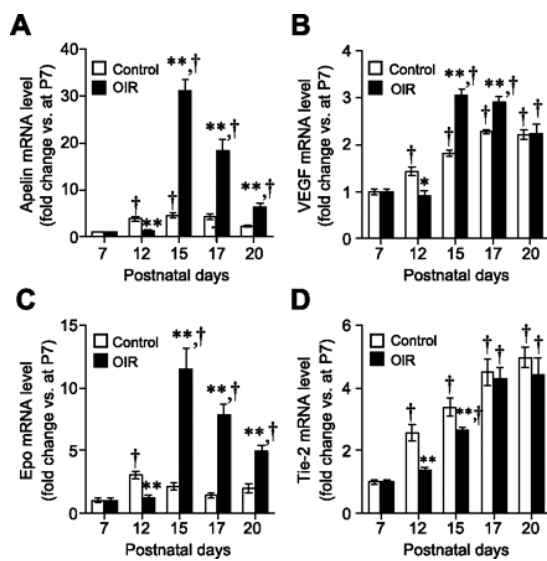
9) 血管内皮細胞である HUVEC、網膜色素上皮細胞、マクロファージ細胞を用いて、apelin、VEGF の発現を apelin、VEGF ならびに LPS 刺激で変化するかどうか検討した。

4. 研究成果

1) 通常飼育下では apelin mRNA は生後 7-15 日で上昇する。OIR モデルにおいては、

apelin mRNA の発現は高酸素下で有意に減少し、通常酸素下にもどすと有意に上昇した (図 1A)。この上昇率は、VEGF (図 1B) や Epo (図 1C) よりも有意に高かった。apelin のリセプターである APJ の発現は、高酸素下において変化はなかったが、通常酸素下で上昇した。血管内皮細胞のマーカーである tie-2 mRNA は、高酸素下で有意に減少し、通常酸素下で上昇 (図 1D)、他の血管内皮細胞マーカーである PECAM-1 も tie-2 と同様の挙動を示した。

図 1)



2) 網膜伸展標本において、apelin のリセプターである APJ の発現は、網膜血管の血管内皮細胞の増殖がさかんな部位である vascular plexus に見られ、PECAM-1 の発現部位と一致していた。OIR マウスにおいて、APJ の発現は網膜神経節細胞層、内顆粒層と、硝子体内血管に見られた。

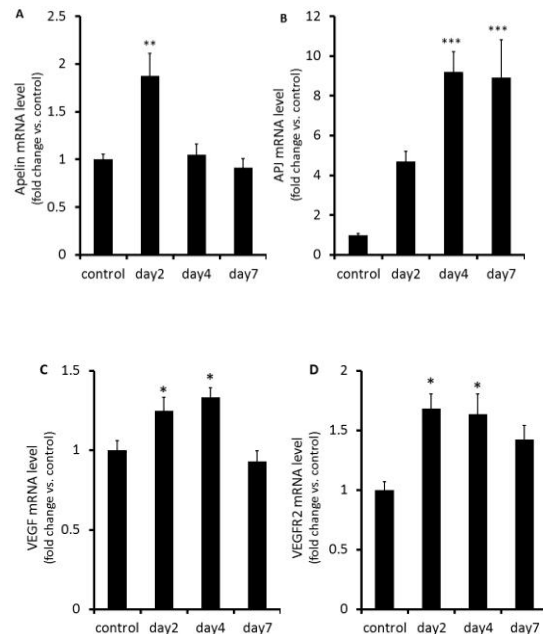
3) 蛍光色素還流 OIR マウス網膜血管において、高濃度酸素下では野生型、apelin-KO マウスのいずれでも網膜血管減少がみられた。通常酸素にもどすと、野生型では血管瘤様の異常な網膜血管が生じ、血管密度は上昇したが、apelin KO マウスではそのような異常血管はみられなかった。生後 17 日の時点で、血管内皮細胞のマーカーである tie-2 の発現は、apelin-KO マウスでは野生型と比較し有

意に減少していた。

4) 野生型と apelin-KO マウスにおける血管密度の違いは VEGF や Epo に依存しているのかどうかを確認するために、関連する分子の発現を検討したところ、VEGFR1,2 の発現は、高酸素下、通常飼育下で特に変化なく、Epo リセプターも同様に特に差はみられなかった。Apelin と VEGF の相互作用の有無を見るため、apelin の siRNA を用いて apelin 経路を止めて、血管内皮の viability や増殖能を確認したところ、apelin、VEGF の抑制は相加的に、血管内皮細胞の増殖を抑えることがわかった。すなわち、apelin/APJ システムは単独でも網膜血管の発達・維持に役立っていることがわかる。

5) 脈絡膜新生血管形成過程において、apelin はレーザー 2 日後に一過性に発現上昇したが、徐々に正常レベルに戻った。apelin 発現の上昇を受けて、APJ の発現レベルは、4 日後にピークをみた。この上昇は VEGF や VEGFR 2 より顕著であった。

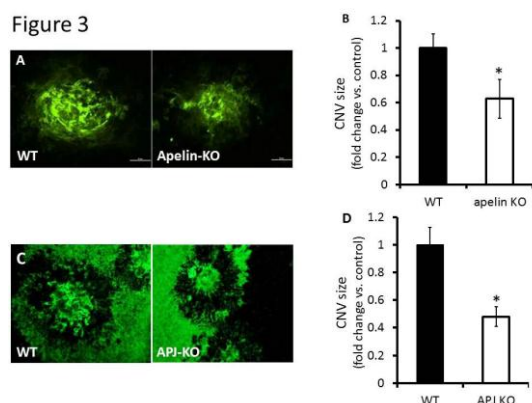
図 2)



6) レーザー照射後に生じた脈絡膜新生血管の免疫染色では、APJは血管内皮マーカーである platelet endothelial cell adhesion molecule-1 と共染色された。

7) apelin-KO マウスと APJ-KO マウスでは、野生型マウスと比較して脈絡膜新生血管サイズは有意に縮小していた (図3)

図3)



8) フローサイトメトリーで確認した、脈絡膜新生血管への集積マクロファージ量、VEGF、VEGF 受容体および炎症性因子の遺伝子発現量は野生型、apelin-KO マウスで同程度であった。

9) ヒト臍帯静脈血管内皮細胞において、VEGF 刺激で apelin、APJ 発現は上昇を認めた。増殖性試験では、VEGF 阻害下でさらに apelin 発現抑制を行うことで増殖はさらに阻害され、VEGF 刺激下でも apelin 発現抑制にて一部増殖が抑制された。すなわち、脈絡膜新生血管発症過程において、apelin は VEGF と一部独立して関与していることが明らかとなった。

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 23 件)

- ① Hara C, Kasai A, Gomi F, Satooka T, Sakimoto S, Nakai K, Yoshioka Y, Yamamuro A, Maeda S, Nishida K. Laser-Induced Choroidal Neovascularization in Mice Attenuated by Deficiency in the Apelin-APJ System.

Investigative Ophthalmology & Visual Science. in press. 査読有

- ② Miyagi H, Kanemoto S, Saito A, Asada R, Iwamoto H, Izumi S, Kido M, Gomi F, Nishida K, Kiuchi Y, Imaizumi K. Transcriptional regulation of VEGFA by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS in ARPE-19 cells. PLoS One. 2013;8(1):e55155. doi: 10.1371/journal.pone.0055155. 査読有
- ③ Fukushima Y, Okada M, Kataoka H, Hirashima M, Yoshida Y, Mann F, Gomi F, Nishida K, Nishikawa S, Uemura A. Sema3E-PlexinD1 signaling selectively suppresses disoriented angiogenesis in ischemic retinopathy in mice. J Clin Invest. 2011 May;121(5):1974-85. doi: 10.1172/JCI44900. 査読有
- ④ Wakabayashi T, Gomi F, Sawa M, Tsujikawa M, Nishida K. Intravitreal bevacizumab for exudative branching vascular networks in polypoidal choroidal vasculopathy. Br J Ophthalmol. 2012;96(3):394-9. doi: 10.1136/bjo.2011.204123. 査読有
- ⑤ Ueno C, Gomi F, Sawa M, Nishida K. Correlation of indocyanine green angiography and optical coherence tomography findings after intravitreal ranibizumab for polypoidal choroidal vasculopathy. Retina. 2012;32(10):2006-13. doi: 10.1097/IAE.0b013e31825c1c31. 査読有
- ⑥ Sawa M, Iwata E, Ishikawa K, Gomi F, Nishida K, Terasaki H. Comparison of different treatment intervals between bevacizumab injection and photodynamic therapy in combined therapy for age-related macular degeneration. Jpn J Ophthalmol. 2012;56(5):470-5. doi: 10.1007/s10384-012-0154-3. 査読有
- ⑦ Gomi F, Sawa M, Tsujikawa M, Nishida K. Topical bromfenac as an adjunctive treatment with intravitreal ranibizumab for exudative age-related macular degeneration. Retina. 2012;32(9):1804-10. 査読有
- ⑧ Ikuno Y, Sawa M, Tsujikawa M, Gomi F, Maeda N, Nishida K. Effectiveness of topical levofloxacin against conjunctival flora in intravitreal injection. Jpn J Ophthalmol. 2012;56(5):497-501. doi: 10.1007/s10384-012-0160-5. 査読有

- ⑨ Goto S, Gomi F, Ueno C, Nishida K. Reduced-fluence photodynamic therapy for subfoveal serous pigment epithelial detachment with choroidal vascular hyperpermeability. *Am J Ophthalmol*. 2012;154(5):865-871.e1. doi: 10.1016/j.ajo.2012.05.001. 査読有
- ⑩ Nakai K, Gomi F, Ikuno Y, Yasuno Y, Nouchi T, Ohguro N, Nishida K. Choroidal observations in Vogt-Koyanagi-Harada disease using high-penetration optical coherence tomography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2012;250(7):1089-95. doi:10.1007/s00417-011-1910-7. 査読有
- ⑪ Nakao T, Tsujikawa M, Sawa M, Gomi F, Nishida K. Foveal sparing in patients with Japanese Stargardt's disease and good visual acuity. *Jpn J Ophthalmol*. 2012;56(6):584-8. doi: 10.1007/s10384-012-0172-1. 査読有
- ⑫ Ueda T, Gomi F, Suzuki M, Sakaguchi H, Sawa M, Kamei M, Nishida K. Usefulness of indocyanine green angiography to depict the distant retinal vascular anomalies associated with branch retinal vein occlusion causing serous macular detachment. *Retina* 2012;32(2):308-13. doi:10.1097/IAE.0b013e31821c40a9. 査読有
- ⑬ Sasamoto Y, Gomi F, Sawa M, Sakaguchi H, Tsujikawa M, Nishida K. Effect of cataract in evaluation of macular pigment optical density by autofluorescence spectrometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(2):927-32. doi: 10.1167/iovs.10-5664. 査読有
- ⑭ Wakabayashi T, Ikuno Y, Gomi F. Different dosing of intravitreal bevacizumab for choroidal neovascularization because of pathologic myopia. *Retina*. 2011;31(5):880-6. doi: 10.1097/IAE.0b013e3181f2a293. 査読有
- ⑮ Gomi F, Matsuda Y, Futamura H, Nishida K. Disposable eyelid speculum designed for intravitreal injection. *Retina*. 2011;31(9):1972-3. doi: 10.1097/IAE.0b013e31822f570c. 査読有
- ⑯ Sasamoto Y, Gomi F, Sawa M, Tsujikawa M, Nishida K. Effect of 1-year lutein supplementation on macular pigment optical density and visual function. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011;249(12):1847-54. doi: 10.1007/s00417-011-1780-z. 査読有
- ⑰ Kasai A, Ishimaru Y, Kinjo T, Satooka T, Matsumoto N, Yoshioka Y, Yamamuro A, Gomi F, Shintani N, Baba A, Maeda S. Apelin Is a Crucial Factor for Hypoxia-Induced Retinal Angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(11):2182-7. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.209775. 査読有
- ⑱ Gomi F, Sawa M, Wakabayashi T, Sasamoto Y, Suzuki M, Tsujikawa M. Efficacy of intravitreal bevacizumab combined with photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy. *Am J Ophthalmol*. 2010;150(1):48-54. doi: 10.1016/j.ajo.2010.02.008. 査読有
- ⑲ Wakabayashi T, Sawa M, Gomi F, Tsujikawa M. Correlation of fundus autofluorescence with photoreceptor morphology and functional changes in eyes with retinitis pigmentosa. *Acta Ophthalmol*. 2010;88(5):e177-83. doi: 10.1111/j.1755-3768.2010.01926.x. 査読有
- ⑳ Sasamoto Y, Gomi F, Sawa M, Tsujikawa M, Hamasaki T. Macular Pigment Optical Density in Central Serous Chorioretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(10):5219-25. doi: 10.1167/iovs.09-4881. 査読有
- ㉑ Suzuki M, Gomi F, Sawa M, Tsujikawa M, Sakaguchi H. Bevacizumab treatment for choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration in Japanese patients. *Jpn J Ophthalmol*. 2010;54(2):124-8. doi: 10.1007/s10384-009-0775-3. 査読有
- ㉒ Inoue R, Sawa M, Tsujikawa M, Gomi F. Association between the efficacy of photodynamic therapy and indocyanine green angiography findings for central serous chorioretinopathy. *Am J Ophthalmol*. 2010;149(3):441-6. doi: 10.1016/j.ajo.2009.10.011. 査読有
- ㉓ Ikuno Y, Nagai Y, Matsuda S, Arisawa A, Sho K, Oshita T, Takahashi K, Uchihori Y, Gomi F. Two-year visual results for older Asian women treated with photodynamic therapy or bevacizumab for myopic choroidal neovascularization. *Am J Ophthalmol*. 2010;149(1):140-6. doi: 10.1016/j.ajo.2009.08.008. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ① 上野千佳子、笠井淳司、五味文、里岡達哉、中井慶、吉岡靖啓、山室晶子、前田定秋、西田幸二「脈絡膜新生血管発生における

apelin/APJ シグナルの関与]

第 116 回日本眼科学会総会、東京

②C. Ueno, A. Kasai, F. Gomi, T. Satooka, K. Nakai, Y. Yoshioka, A. Yamamuro, S.

Maeda. Involvement of apelin/APJ system in laser-induced choroidal

neovascularization. ARVO (The association of research in vision and ophthalmology) 2012

Fort Lauderdale, Florida, USA

③Ueno C, Gomi F, Sawa

M, Tsujikawa M, Nishida K. Efficacy of Intravitreal Ranibizumab in Eyes with a History of Intravitreal Bevacizumab Treatment for Age-Related Macular Degeneration. 第 26 回 APAO(シドニー 2011/3/20-24)

④五味 文、沢 美喜、辻川 元一、西田 幸二；加齢黄斑変性に対するラニビズマブ治療におけるプロムフェナク点眼併用の有用性 第 115 回日本眼科学会総会 (2011/4/15-18；名古屋)

⑤上野 千佳子，五味 文，沢 美喜，辻川 元一，西田 幸二；ポリープ状脈絡膜血管症(PCV)のラニビズマブ治療後の OCT 所見. 第 115 回日本眼科学会総会 (2011 年名古屋)

⑥浅尾和伸、五味 文、上野千佳子、鈴木三保子、沢美喜、辻川元一、西田幸二；加齢黄斑変性患者における網膜色素上皮裂孔を生じた症例の視力ならびに眼底所見の変化. 第 65 回日本臨床眼科学会 (2011 年東京)

⑦佐柳 香織、五味 文、生野 恭司、城 友香里、秋葉 正博、西田 幸二。加齢黄斑変性の深部病変の観察における高侵達光干渉断層計と従来機の比較. 第 65 回日本臨床眼科学会 (2011 年東京)

⑧鈴木 三保子、五味 文、沢 美喜、西田 幸二。浸出型加齢黄斑変性に対するラニビズマブ硝子体内投与による治療反応. 第 65 回日本臨床眼科学会 (2011 年東京)

⑨沢 美喜、五味 文、西田 幸二。網膜色素線条に合併する脈絡膜新生血管にかかわる因子の検討. 第 65 回日本臨床眼科学会 (2011 年東京)

⑩五味 文。抗血管新生療法 第 33 回日本眼科手術学会教育セミナー(2010 年 東京)

⑪五味 文。抗 VEGF 療法の長期管理. 第 114 回日本眼科学会総会 (2010 年名古屋)

⑫鈴木三保子、五味 文。スペクトラルドメイン光干渉断層計による ranibizumab 投与後の加齢黄斑変性病巣の観察. 第 114 回日本眼

科学会総会 (2010 年名古屋)

⑬佐柳 香織、五味 文、沢 美喜、坂口 裕和、辻川 元一。抗 VEGF 療法の 1 年間の施行回数に影響を与える spectral-domain OCT 所見. 第 114 回日本眼科学会総会 (2010 年名古屋)

⑮Fumi Gomi, Miki Sawa, Taku Wakabayashi, Yuzuru Sasamoto, Mihoko Suzuki, Motokazu Tsujikawa. Efficacy of Intravitreal Bevacizumab Combined with Photodynamic Therapy for Polypoidal Choroidal Vasculopathy. WOC (2010 年 Berlin)

〔図書〕(計 1 件)

大路 正人、五味 文。これだけは知っておきたいポイント加齢黄斑変性. 医薬ジャーナル 2010 年 3 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五味 文 (GOMI FUMI)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：80335364

(2) 研究分担者

大島 佑介 (OSHIMA YUSUKE)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20362717

鈴木三保子 (SUZUKI MIHOKO)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20362717

(H23 から研究分担者)

生野 恭司 (IKUNO YASUSHI)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号 50294096

沢 美喜 (SAWA MIKI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号 50403043

馬場 明道 (BABA AKEMICHII)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号 70107100

笠井 淳司 (KASAI ATUSHI)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号 40454649

(H23→H24 連携研究者)