

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 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：2015～2016

課題番号：15H06244

研究課題名(和文)カルシトニン遺伝子関連ペプチドの炎症制御機構の解明と、眼内炎症疾患への応用展開

研究課題名(英文) Pathophysiological function of calcitonin gene-related peptide in ocular inflammatory diseases.

研究代表者

鳥山 佑一 (TORIYAMA, Yuichi)

信州大学・医学部・助教(特定雇用)

研究者番号：90757759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：LPS硝子体内注射が過剰な炎症を惹起するため、足底注射による評価を試みた。足底注射では逆に軽微な炎症にとどまり、前房内炎症性細胞を認める個体は少なく、網膜血管の滲出性変化を認める個体は極めて稀であったため、LPS誘導ぶどう膜炎モデル以外での解析を検討した。糖尿病網膜症モデルマウスであるKimbaマウスにアドレノメデュリン(以下AM)を投与することで網膜血管の透過性亢進が抑制された。全身投与では網膜毛細血管脱落と異常血管形成も抑制された。網膜血管内皮細胞を用いた解析では、血管内皮増殖因子で誘導される炎症と透過性亢進がいずれもAMにより抑制された。AMの糖尿病網膜症における治療的効果が示された。

研究成果の概要(英文)：Because the LPS-induced uveitis model did not work well, we tried to explore other models. In Kimba mice, which overexpress human vascular endothelial growth factor in their retinas, the capillary dropout, vascular leakage, and vascular fragility characteristic of diabetic retinopathy were observed. Intravitreal or systemic administration of ADM to Kimba mice ameliorated both the capillary dropout and vascular leakage. Evaluation of the transendothelial electrical resistance and fluorescein isothiocyanate-dextran permeability of an endothelial cell monolayer using TR-iBRB retinal capillary endothelial cells revealed that vascular endothelial growth factor enhanced vascular permeability but that co-administration of ADM suppressed the effect, in part by enhancing tight junction formation between endothelial cells. AM could serve as a novel therapeutic agent for the treatment of diabetic retinopathy.

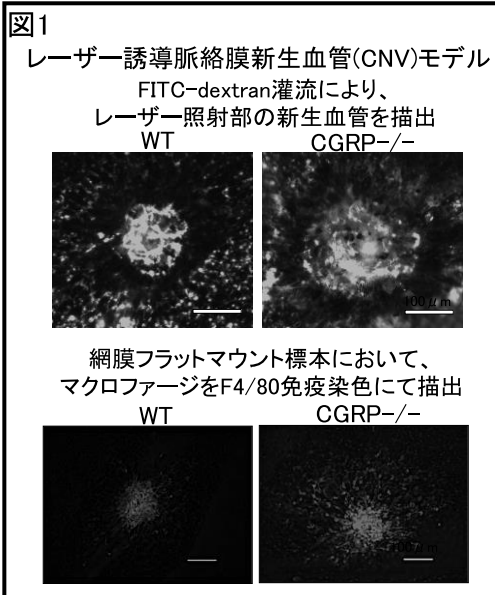
研究分野：眼科学

キーワード：カルシトニン遺伝子関連ペプチド アドレノメデュリン 網膜

1. 研究開始当初の背景

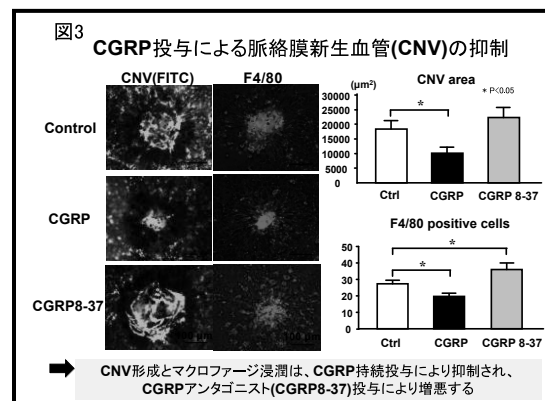
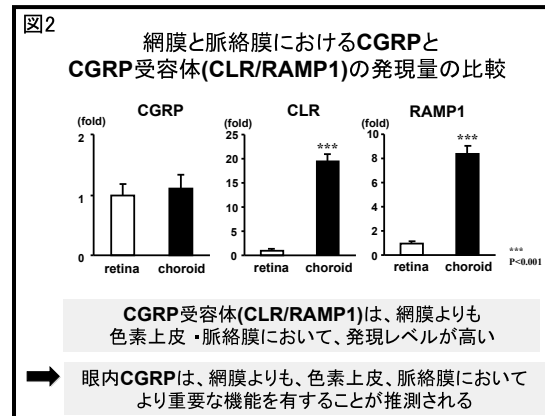
① カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)は、カルシトニン遺伝子の alternative splicing によって作られる37個のアミノ酸残基からなるペプチドであり、神経系をはじめ、消化器系、血管系など、全身に広く分布している。CGRPは血管拡張作用やカプサイシン感受性神経の神経伝達物質としての役割のほか、炎症性サイトカイン産生制御や抗アポトーシス作用など多彩な生理活性を有している。CGRPは眼内にも広く分布しているが、特に神経線維に多く存在し、脈絡膜組織内では視細胞が集中する黄斑部領域の脈絡膜神経線維に最も豊富に存在することが確認されている。これまで、角膜知覚神経における神経伝達物質としての役割などが報告されているが、後眼部の網膜および脈絡膜組織におけるCGRPの病態生理学的意義は不明であった。

② 研究代表者らは、カルシトニン-CGRP遺伝子配列のうち、CGRPに特異的なエクソン5のみを欠損させることで、カルシトニンは正常に保たれ、CGRPのみを特異的に欠損するノックアウトマウス(CGRP^{-/-})を樹立し、これを用いることで内因性CGRPの病態生理学的意義の検討を行ってきた(Oh-hash Y, Circ Res. 89: 983-990, 2001, Aoki-Nagase T, Am J Physiol. 283: L963-970, 2002, Kamiyoshi A, Liver Int 29: 642-649, 2009)。



③ 眼内における内因性CGRPの意義を検討す

るため、研究代表者はこれまでに、CGRP^{-/-}における網膜の生理的血管新生や、酸素誘導網膜症モデル、レーザー誘導脈絡膜血管新生(CNV)モデルを検討した。CGRP^{-/-}は、網膜血管の発達段階である生後12-17日において、生理的網膜血管新生および酸素誘導網膜症モデルにおける血管新生に変化は認められなかった。一方で、レーザー誘導脈絡膜血管新生(CNV)モデルにおいて、CGRP^{-/-}では、野生型マウスに比較して、レーザー照射部の脈絡膜血管新生領域の拡大とマクロファージの浸潤の増加を認め(図1)、さらにCGRP^{-/-}では、脈絡膜においてTNF- α などの炎症性サイトカインの発現亢進が特徴的に認められた。



④ 眼組織内におけるCGRP濃度は、網膜よりも脈絡膜の方が高いことが報告されており(Esuaed S, Invest OphthalmolVisSci. 46: 268-274, 2005)、研究代表者の検討でも、CGRP受容体であるCLRおよびRAMP1の遺伝子発現は、網膜よりも色素上皮・脈絡膜に強く認められた(図2)。さらに最近、研究代表者は、

CGRP の持続投与により、レーザー誘導脈絡膜血管新生モデルにおいてマクロファージ浸潤と脈絡膜血管新生が抑制され、逆に CGRP のアンタゴニスト投与によりこれらの所見が増強することを発見した(図 3)(Toriyama Y, Am J Pathol. 187(5):999-1015. 2017)。

⑤ レーザー誘導脈絡膜新生血管(CNV)モデルは、ヒトの加齢黄斑変性の病態を反映するとされており、これらの研究代表者の結果は、CGRP が炎症を背景に異常な血管新生を生じる加齢黄斑変性において重要な病態生理学的意義を有することを示している。研究代表者は、ぶどう膜炎などの炎症そのものが病態の首座となる多くの眼疾患や、炎症が病態の背景にあると考えられる糖尿病網膜症においても、CGRP が重要な病態生理学的意義を有し、これらの疾病の新たな治療標的因子となる可能性を考えた。

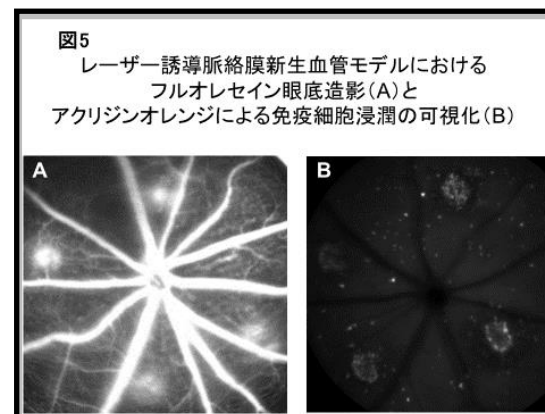
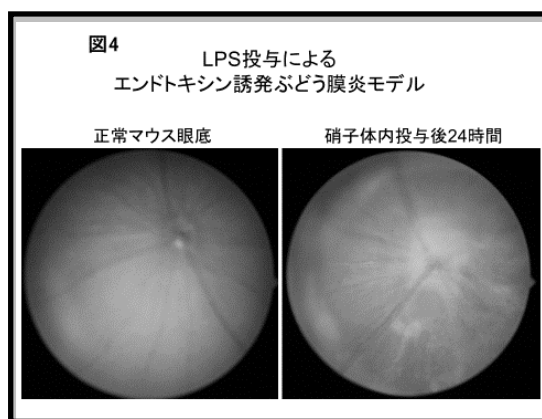
2. 研究の目的

前項の研究成果を背景に本研究では、CGRP による炎症制御機構に着目し、眼内炎症における CGRP の病態生理学的意義とそのメカニズムを解明し、炎症を病態の基盤とする眼疾患に対する、新たな治療法開発に展開することを目的とする。

3. 研究の方法

1. 眼内炎症モデルの確立

(1) **ぶどう膜炎モデル:** エンドトキシン誘発ぶどう膜炎モデルを眼内炎症モデルとして確立する。8 ~ 10 週齢の雄マウスの片眼に lipopolysaccharide(LPS)の硝子体内注射を行い、継時的な細隙灯顕微鏡および眼底カメラ撮影(図4)による観察を行い、注射後の炎症進展の時間的推移と投与濃度による炎症の重症度を検討する。



細隙灯顕微鏡では毛様充血と前房内細胞浸潤、フィブリン析出の程度を判定し、眼底写真からは網膜血管炎の有無と程度を、滲出性変化、網膜血管の拡張蛇行、視神経腫脹などによって評価する。LPS 硝子体内投与により眼内の炎症が過剰に誘発され、CGRP 欠損や治療実験による効果が評価困難と判断された場合、LPS 投与方法を皮下注射として同様に評価を行う。さらに、一連の実験に用いる LPS は同じロット番号の試薬を分注・凍結保存して使用し、試薬による炎症の程度の差異を除外する。

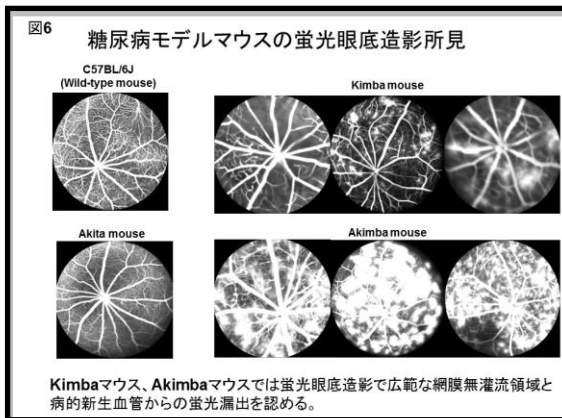
眼内炎症モデルが安定して確立されたことを確認後、下記手法により、病変の定量的評価を進める。

- ① フルオレセイン蛍光眼底造影検査により、血管の形態と血管外漏出を評価する(図5A)。
- ② アクリジンオレンジ眼底撮影により、炎症細胞の網膜血管外への浸潤と集簇を評価する(図5B)。
- ③ 前房水を採取し、トリパンプルー染色後に房水内の炎症細胞数を計測する。
- ④ 摘出眼球から網膜・脈絡膜のフラットマ

ウント標本を作製し、抗 Isolectin 抗体による血管の描出、低酸素プローブを用いた網膜低酸素領域の描出、抗 F4/80 抗体を用いたマクロファージの描出などにより、血管の形態的評価と炎症細胞の組織浸潤の評価を行う。

⑤ 眼球の切片標本において、各眼組織における細胞浸潤と組織障害の評価を行い、Evans Blue の漏出や抗 Albumin 抗体を用いた免疫染色により、血管外漏出の評価を行う。

(2) **糖尿病網膜症モデル**: 網膜特異的に VEGF を過剰発現させた Kimba マウスや、自然発症糖尿病モデルである Akita マウスと Kimba マウスを交配した Akimba マウスを用いて、網膜血管新生および炎症細胞浸潤を経時的に観察する(図6)。(1)と同様に、フルオレセイン蛍光眼底造影による血管の形態、血管透過性の評価、網膜および脈絡膜フラットマウントによる形態的变化、炎症細胞浸潤などの評価を進める。

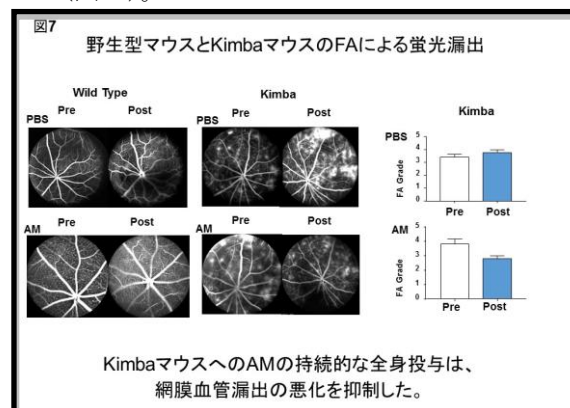


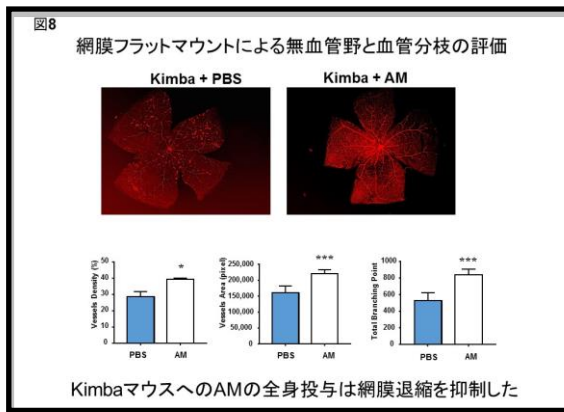
2. 遺伝子改変マウスと野生型マウスにおける各病変の比較検討

実験モデルと評価法の確立が得られたのち、CGRP^{-/-}マウスと野生型マウスにおける眼内炎症を上記手法にて評価・比較する。また CGRP のファミリーペプチドであるアドレノメデュリンとその受容体調節タンパク (RAMP2/RAMP3) の遺伝子改変マウスも樹立しており、CGRP ノックアウトマウスにおける眼内炎症モデルで明確な差異が確認できなかった際には、これらの遺伝子改変マウスを用いた解析も検討する。

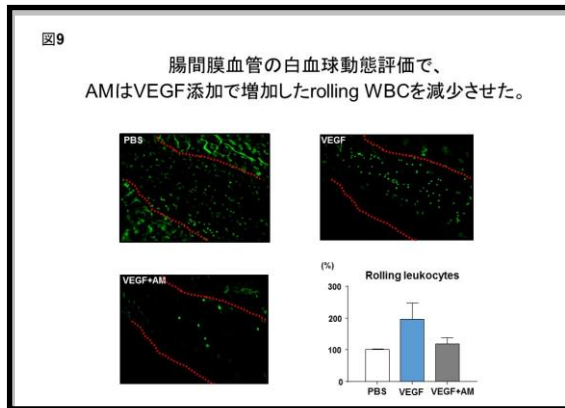
4. 研究成果

リポポリサッカライド (以下 LPS) の硝子体内注射による炎症誘導が過剰な炎症を惹起し評価が困難であったため、足底注射による炎症誘導による評価を試みた。足底注射では硝子体内注射とは逆に炎症の所見はごく軽微な炎症にとどまり、結膜毛様充血を軽度認めるものの、前房内の炎症性細胞を認める個体は少なく、眼底観察による網膜血管の滲透性変化を認める個体は極めて稀であった。LPS 投与量を増量して再検を行っても全個体の網膜血管病変の誘導は得られなかったため、LPS 誘導ぶどう膜炎モデル以外での解析を検討した。カルシトニン遺伝子関連ペプチド (以下 CGRP) ノックアウトマウス (以下 CGRP^{-/-}) を用いた解析として、塞栓系による中大脳動脈塞栓術を用いた急性脳虚血モデルによる解析では、CGRP^{-/-}で脳虚血後の再灌流遅延を認め、病理所見では虚血後の神経細胞の減少とアポトーシスの亢進が WT と比較し強く認めた。また CGRP^{-/-}では脳虚血後の大脳皮質と海馬でのサイトカイン発現も WT に比べ亢進していた。この結果から CGRP の虚血時における神経保護作用が示された。また CGRP のファミリーペプチドであるアドレノメデュリン (以下 AM) とその受容体蛋白における解析では、糖尿病網膜症モデルマウスである Kimba マウスに AM を投与することで、網膜血管の透過性亢進が抑制された (図7)。さらに全身投与では網膜毛細血管の脱落と異常血管形成も抑制された (図8)。





網膜血管内皮細胞を用いた解析では、血管内皮増殖因子（以下 VEGF）により誘導される炎症と透過性亢進がいずれも AM 投与により抑制された。マウスの腸間膜動脈を用いた白血球動態の評価では、AM 投与により VEGF 添加により増加する管内回転白血球の数を減少させた（図 9）。



これらの結果から、AM が網膜における VEGF により誘導される炎症や血管透過性亢進、無血管野と異常血管の形成を抑制することが確認され、糖尿病網膜症をはじめとした VEGF に起因する眼血管疾患にたいする有力な治療候補となる可能性が示された。

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 1 件）

- ① Imai A, Toriyama Y, Iesato Y, Hirabayashi K, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Liu T, Xian X, Zhai L, Dai K, Tanimura K, Liu T, Cui N, Yamauchi A, Murata T, Shindo T
Adrenomedullin suppresses vascular

endothelial growth factor-induced vascular hyperpermeability and Inflammation in retinopathy.

Am J Phthol. 187(5):999-1015. 2017 査読有

〔学会発表〕（計 1 件）

- ①今井 章、鳥山 佑一、平林 一貴、村田 敏規、新藤 隆行ほか, Adrenomedullin Suppresses VEGF-induced Vascular heperpermeability and Inflammation in Retinopathy. 第 81 回日本循環器学会学術集会, 2017.3.19, 金沢

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥山 佑一 (TORIYAMA, Yuichi)
信州大学・医学部・助教（特定雇用）
研究者番号：90757759

(2) 研究協力者

新藤 隆行 (SHINDO, Takayuki)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号：90345215

村田 敏規 (MURATA, Toshinori)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号：50253406

今井 章 (IMAI, Akira)
信州大学・大学院医学系研究科・大学院生

平林 一貴 (HIRABAYASHI, Kazutaka)
信州大学・大学院医学系研究科・大学院生