

平成 29 年 8 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20260

研究課題名(和文) 持続性細胞内シグナル活性異常を標的とした未熟児網膜症の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Persistent Intracellular Signaling Pathway as a Promising Therapeutic Target for Retinopathy of Prematurity

研究代表者

福島 葉子 (Fukushima, Yoko)

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：未熟児網膜症は、網膜血管が未完の時期に出生した早産児にみられる失明原因疾患で、その本態は過剰VEGFによる正常血管発生の停滞とそれに続く異常血管新生である。本研究では、正常血管から異常血管の転換を明らかにする目的で、病的環境に適応した血管内皮細胞のシグナル動態と機能の解析に着目して解析を行った。その結果、過剰VEGFに曝された内皮細胞で誘導されるAktシグナルの特異な持続活性化が、異常血管への転換に寄与することが示唆された。今後、持続的なAkt活性を制御する分子を同定することで、新たな治療の開発に繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Retinopathy of prematurity (ROP) is a vision-threatening disease in the retina of premature infants with incomplete retinal vascularization. In ROP, retinal vascular development stops and subsequently disorganized, fragile and leaky blood vessels grow. It has been studied that VEGF plays a critical role in the development of ROP. However, it remains unknown how endothelial cells alter responses to identical VEGF signaling in the growth of abnormal blood vessels. Here, we focused on long-lasting VEGF stimulation to reflect pathological condition, which induced persistent phosphorylation of Akt in cultured endothelial cells. Retinal blood vessels were dilated and leaky by the activation of Akt signaling pathway with transgenic mice. Therefore, molecules regulating persistent Akt activation can be potential targets for the treatment of ROP.

研究分野：網膜血管新生

キーワード：血管新生 内皮細胞 細胞内シグナル伝達分子 網膜

## 1. 研究開始当初の背景

未熟児網膜症は小児期の主要な失明原因疾患であり、失明者は世界で5万人を超えるとされている。未熟児網膜症では、胎内から胎外への急激な環境変化により網膜血管の伸展過程が破綻し、血管伸長の停滞と異常新生血管が生じる。しかし、多くの例で血管伸長が再開し、異常血管網は自然消退する。つまり、網膜の血管発生機構は、環境変動の影響を受けても正常血管網の構築を可能にする頑健なシステムを備えていると考えられる。一方で、網膜内の血管が伸展しないまま異常血管新生に伴う出血や網膜剥離により失明に至る例が存在する。重症例では自然消退能が発揮されず、不可逆的な病態へ進展するのは未だ明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

網膜における正常血管発生だけでなく異常血管新生においても Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) が中心的役割を担うことが知られているが、特に重症未熟児網膜症では VEGF が過剰に産生されていることが報告されている。同じ VEGF 刺激であるにもかかわらず内皮細胞が正常から異常血管形成に転換する現象は、特定の外部刺激に対してシグナル伝達を保證する閾値の存在と細胞の応答変化の可能性を示唆する。本研究では、病的環境を反映するような長期 VEGF 刺激により誘導される Akt 持続活性が血管内皮細胞に及ぼす影響と網膜血管新生に与える役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究は以下の研究計画に沿って方法を実施した。

### 研究計画

(1)血管内皮細胞における Akt 持続活性の意義を明らかにする。

培養モデルを確立し、Akt シグナル伝達の強度や時間を保證する VEGF 刺激の閾値が存在するかを検証する。さらに VEGF 長期刺激による Akt シグナル伝達と細胞機能の変化を解析するとともに、持続性の Akt 活性化を誘導する分子を同定する。

(2)網膜血管新生における Akt 持続活性の役割を解明する

遺伝子改変マウスを用いて恒常活性型 Akt の発現を誘導し、網膜異常血管網の形成における Akt の持続活性化の影響を明らかにする。

## 研究方法

### 高濃度 VEGF 刺激モデル

通常、VEGF の単発刺激により MAP キナーゼおよび Akt はそれぞれ数分から数十分でリン酸化された後、急速に不活化される。病的環境を反映するような VEGF 長期刺激により細胞内シグナル伝達に影響があるかを検討する。まず、VEGF 長期刺激の細胞培養モデルを確立し、次いで VEGF 下流の MAP キナーゼおよび Akt のシグナル強度や持続時間を解析した。

(1) VEGF 長期刺激として、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を高濃度のヒト組換え VEGF タンパクの存在下で5日間培養した。さらに2日間の低濃度 VEGF 存在下で培養した後、再度 VEGF を添加した。

(2)上記の条件で培養した細胞における MAP キナーゼおよび Akt のリン酸化の経時変化をウエスタンブロッティング法により定量し、リン酸化の持続期間および強度を検証した。

### VEGF 長期刺激が細胞応答に及ぼす影響

HUVEC において Akt の持続活性を誘導した上で、細胞増殖能、遊走能および透過性について解析した。細胞増殖は EdU アッセイ、細胞遊走はタイムラプスによる画像解析、透過性はトランスウェルアッセイを用いて評価した。

### VEGF 長期刺激により誘導される遺伝子発現の網羅的解析

Akt の持続活性を誘導する分子を同定する目的で、VEGF 長期刺激モデルにおいて、内皮細胞の mRNA 発現様式変化を Affymetrix Gene Array を用いて網羅的遺伝子解析を行った。得られた結果をもとに Akt のリン酸化を制御するキナーゼ、フォスファターゼなどタンパク質の翻訳後修飾に関わる酵素の発現変化を確認した。

### 遺伝子改変マウスにおける網膜血管発生

網膜血管網の形成における Akt の持続活性化の影響を明らかにするため、時期特異的に発現誘導が可能な恒常活性型 Akt トランスジェニックマウスを用いた。新生仔マウスに持続性 Akt 活性化を誘導し、網膜血管発生における血管形態を観察し、その機能について検討した。

## 4. 研究成果

### 結果

VEGF 長期刺激後の培養血管内皮細胞は、位相差観察で形態の変化はみられなかった。細胞内シグナル伝達については、VEGF 刺激が一定期間を超えると VEGF 非依存的に Akt 活性が持続すると同時に、VEGF 依存的な活性も維持されることが明らかになった。一方、MAPK 経路である ERK1/2 と p38 には持続活性は誘導されなかった。また、Akt 持続活性化がみられる内皮細胞では、細胞増殖に変化はみられなかったが、細胞の自発運動の障害と細胞間接着の脆弱による透過性亢進を示すことが明らかになった。VEGF 長期刺激下にある血管内皮細胞の遺伝子発現を経時的に比較し酵素をはじめとする Akt 活性制御に関わる分子群に発現変化はほぼ見られなかった。しかし、Akt が持続活性に転換する時期特異的に発現量が変化する複数の分子を同定することができた。

次いで、遺伝子改変マウスを用いて、Akt 持続活性が生体の血管新生に与える影響を解析した。Akt の持続活性により発生期の網膜では出血や浮腫が生じる。血管形態の解析から、血管伸長の遅延・血管径の著明な拡張・瘤状変化がみられた。また、これらの血管では透過性が亢進しており機能異常も明らかになった。さらに、Akt 持続活性マウスでは、網膜全体の VEGF の発現量の増加はなく、血管伸長の足場となるアストロサイトの形状に異常がみられないことから、Akt 持続活性の誘導により生じる血管異常は内皮細胞に起因すると考えられた。

#### 今後の展望

本研究では、未熟児網膜症をはじめとする虚血性網膜症における病的環境に適応した血管内皮細胞のシグナル動態と機能に着目し、正常血管発生から異常に転換する分子基盤の解明を試みた。一般に VEGF は一過性に Akt シグナル経路を活性化して、細胞の遊走運動を促進することが知られている。ところが、高濃度 VEGF 刺激が一定期間を超えると Akt の活性化は刺激中止後も持続すると同時に、刺激依存的な活性も維持されることを見出した。さらに、網膜血管発生の過程において、内皮細胞に Akt 持続活性を誘導すると、正常環境にあっても異常血管を自律的に形成することが明らかになった。この研究結果から、血管内皮細胞がもつシグナル伝達は閾値をこえる VEGF 長期暴露により破綻し、Akt の持続活性が誘導されることで異常血管網が形成されるものと推測される。今後、持続的な Akt 活性を制御する分子を同定することで、新たな治療標的になりうることを期待される。

#### 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4件)

Ogura S, Kurata K, Hattori Y, Takase H, Ishiguro-Oonuma T, Hwang Y, Ahn S, Park I, Ikeda W, Kusuhashi S, Fukushima Y, Nara H, Sakai H, Fujiwara T, Matsushita J, Ema M, Hirashima M, Minami T, Shibuya M, Takakura N, Kim P, Miyata T, Ogura Y, and Uemura A. Sustained inflammation after pericyte depletion induces irreversible blood-retina barrier breakdown. *JCI Insight*. 2(3):e90905, 2017. 査読あり

Liu X, Uemura A, Fukushima Y, Yoshida Y, Hirashima M. Semaphorin 3G provides a repulsive guidance cue to lymphatic endothelial cells via Neuropilin-2/PlexinD1. *Cell Rep*. 17(9):2299-2311, 2016. 査読あり

Nishida K, Sakaguchi H, Kamei M, Shiraki N, Oura Y, Wakabayashi T, Hara C, Fukushima Y, Sato T, Sayanagi K, Sato S, Fukuda M, Nishida K. Simulation of panretinal laser photocoagulation using geometric methods for calculating the photocoagulation index. *Eur J Ophthalmol*. Sep 13:0, doi: 10.5301, 2016. 査読あり

Yaguchi Y, Katagiri S, Fukushima Y, Yokoi T, Nishina S, Kondo M, Azuma N. Electroretinographic effects of retinal dragging and retinal folds in eyes with familial exudative vitreoretinopathy. *Sci. Rep*. 6, p30523, 2016. 査読あり

[学会発表](計5件)

福島葉子, 西田幸二.

「虚血性網膜症における異常血管新生を誘導する新たなシグナル伝達機構の解析」第6回 Molecular Cardiovascular Conference (福岡、2015年9月4日)

福島葉子.

「ROPにおけるVEGFの生理・生化学的役割」第69回日本臨床眼科学会 インストラクションコース 未熟児網膜症アップデート (名古屋、2015年10月22日)

福島葉子, 藤野貴啓, 初川嘉一, 西田幸二.

「Aggressive posterior ROPに対する抗VEGF薬治療」第54回日本網膜硝子体学会 一般講演 (東京、2015年12月6日)

Fukushima Y:

RhoJ defines directional motility of endothelial cells in retinal angiogenesis. 31<sup>th</sup> Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress

(台湾、2016年3月24日)

福嶋葉子

「ROPにおける VEGF の生理・生化学的役割」  
第 70 回日本臨床眼科学会 インストラクシ  
ョンコース 未熟児網膜症アップデート  
(2016年11月4日 京都)

〔図書〕(計 3 件)

福嶋葉子 .

ROP に対する抗 VEGF 療法. 眼科グラフィック  
Vol.4 No.2 メディカ出版 2015.

福嶋葉子 .

眼症状を伴う全身症候群(全身疾患から).  
小児眼科学 第一版 三輪書店 2015.

福嶋葉子 .

未熟児網膜症、第一次硝子体過形成遺残. 今  
日の眼疾患治療指針 第3版 医学書院 2016.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 網膜血管疾患の非ヒトモデル動物とそ  
の作製方法、及び、網膜血管疾患の治療又は  
予防用薬剤のスクリーニング方法

発明者: 福嶋葉子、西田幸二、仲野徹

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2017-156031

出願年月日: 平成 29 年 8 月 10 日

国内外の別: 国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

福嶋 葉子 (FUKUSHIMA YOKO)

大阪大学大学院・医学系研究科・助教

研究者番号: 70647031

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし