

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09803

研究課題名(和文) AM-RAMP2系、AM2-RAMP2系を標的とした、眼内病的血管制御法の開発

研究課題名(英文) Developing a method to regulate intraocular pathological blood vessels by targeting AM-RAMP2 and AM2-RAMP2 systems.

研究代表者

新藤 優佳 (Shindo, Yuka)

信州大学・医学部・研究員

研究者番号：50507506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生理活性ペプチド、アドレノメデュリン(AM)と、AMのファミリーとして同定されたアドレノメデュリン2(AM2)、および両者が部分的に共有する受容体活性調節タンパクRAMP2の滲出型加齢黄斑変性における病態生理学的意義を解明するため、各々のノックアウトマウスを用いて、レーザー誘導脈絡膜新生血管(LI-CNV)モデルを作成し、検討を行った。

AM、AM2、RAMP2ノックアウトマウスいずれにおいても、病的血管新生は拡大し、炎症や線維化が増悪したが、AMあるいはAM2の外因性投与は網膜色素上皮細胞の上皮間葉転換(EMT)を抑制することで、網膜下線維化を改善することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

滲出型加齢黄斑変性では、脈絡膜から網膜に向かって病的な脈絡膜新生血管が発生する。滲出型加齢黄斑変性における病的新生血管は構造が脆弱であり、血管透過性が高く、浮腫や出血を生じやすい。さらに血管外滲出物貯留は慢性炎症の原因となり、過剰な創傷治癒反応の結果として網膜下の線維化を生じ、これらが黄斑部に及ぶと重篤な視力障害の原因となる。

今回の研究において、AMやAM2の外因性の投与により、LI-CNVの病態が改善されたことから、両者は新たな血管制御因子として、滲出型加齢黄斑変性に対する治療標的となることが期待される。

研究成果の概要(英文)： In this study, to elucidate the pathophysiological significance of the bioactive peptides adrenomedullin (AM), adrenomedullin 2 (AM2), a member of the AM family, and their partially shared receptor activity-modifying protein, RAMP2, in neovascular age-related macular degeneration, we generated laser-induced choroidal neovascularization (LI-CNV) model using knockout mice of each.

In AM, AM2, and RAMP2 knockout mice, pathological angiogenesis was expanded and inflammation and fibrosis were exacerbated, whereas exogenous administration of AM or AM2 suppressed subretinal fibrosis by suppressing epithelial-mesenchymal transition (EMT) of retinal pigment epithelial cells.

研究分野：眼科学

キーワード：滲出型加齢黄斑変性 アドレノメデュリン アドレノメデュリン2 RAMP2

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国における高齢者の失明においては、糖尿病網膜症、滲出型加齢黄斑変性といった、眼内病的血管新生病がその原因の上位を占めている。糖尿病網膜症では、高血糖による微小血管障害への代償機転として、網膜において病的な血管新生を生じる。一方、滲出型加齢黄斑変性では、脈絡膜から網膜に向かって病的な脈絡膜新生血管が発生する。両者における病的な新生血管は構造が脆弱であり、血管透過性が高く、浮腫や出血を生じやすい。さらに血管外滲出物貯留は慢性炎症の原因となり、過剰な創傷治癒反応の結果として網膜下の線維化を生じ、これらが黄斑部に及ぶと重篤な視力障害の原因となる。

現在、これらの病的血管の制御のため、抗 VEGF 製剤が臨床で用いられている。しかし、抗 VEGF 製剤が奏効しない症例や、繰り返し投与による治療抵抗性、VEGF を長期抑制することによって生じる視細胞萎縮などが指摘されている。また病的血管新生が制御されたとしても、線維化により組織障害が残り、視力の改善が制限される場合もある。こうした現状から、我々は、眼内病的血管新生病のさらなる病態解明と、VEGF 以外の新たな血管制御分子に着目した研究アプローチが極めて重要であると考えた。

2. 研究の目的

我々は、生理活性ペプチド、アドレノメデュリン(AM)と、その受容体活性調節タンパクである 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。一方、AM のファミリーとして新たに同定されたインターメディンは、アドレノメデュリン 2 (AM2) とも呼ばれ、AM に類似した構造を有し、眼内にも存在するがその機能は不明である。

本研究では、AM および AM2 の眼内における病態生理学的意義、特に抗炎症作用、抗線維化作用とそのメカニズムに注目し、網膜下線維化に対する新たな治療法に展開することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) AM あるいは RAMP2 ホモノックアウトマウスは血管の発達異常により胎生致死となる。このため本研究では、9-12 週齢雄の野生型(WT)マウス、AM ヘテロノックアウト (AM+/-)マウス、RAMP2 ヘテロノックアウト (RAMP2+/-)マウス、AM2 ホモノックアウト (AM2-/-)マウスを用いた。

浸出型加齢黄斑変性(neovascular age-related macular degeneration : nAMD)の生体モデルであるレーザー誘導脈絡膜新生血管(laser-induced choroidal neovascularization : LI-CNV)をマウス眼へ誘導し、7 日後に眼球を摘出して脈絡膜展開標本を作成した。免疫染色を行い、LI-CNV や線維化の面積、マクロファージ浸潤を評価した。さらに qPCR 法により各種遺伝子発現を評価した。

(2) LI-CNV 誘導 WT マウスに対して、PBS, AM, AM2 のいずれかを外因性に投与し、(1)と同様に評価を行った。

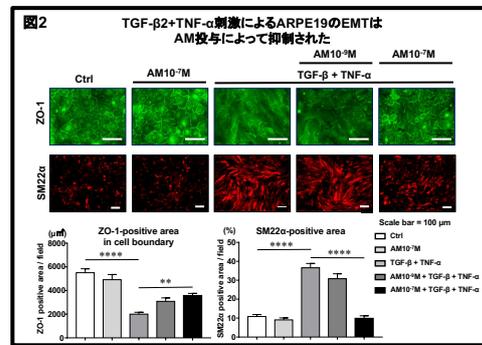
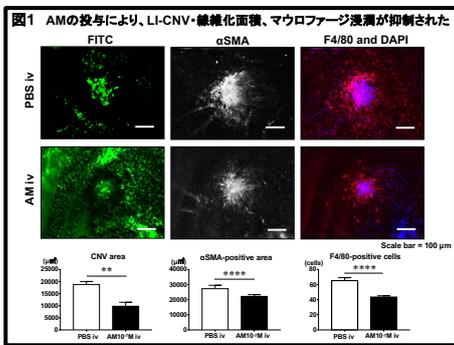
(3) ヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE19) に対して、TGF- β 2+TNF- α の 48 時間刺激を行い、上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition : EMT)を誘導した。AM あるいは AM2 投与の有無による EMT への影響を、上皮系マーカー(ZO-1)や間葉系マーカー(SM22 α)を指標にし、免疫染色および qPCR 法にて検討した。

(4) LI-CNV サンプルを用いてトランスクリプトーム解析を行った。AM あるいは AM2 の標的として候補に挙げられた因子について、阻害剤投与や siRNA によるノックダウンによる検証実験を行った。

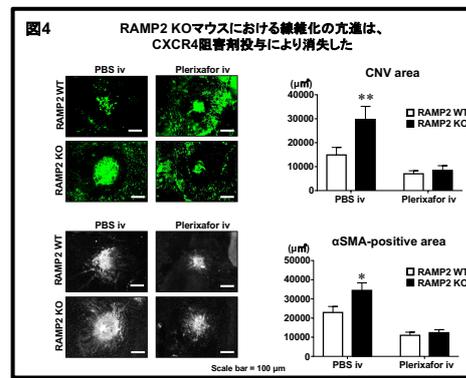
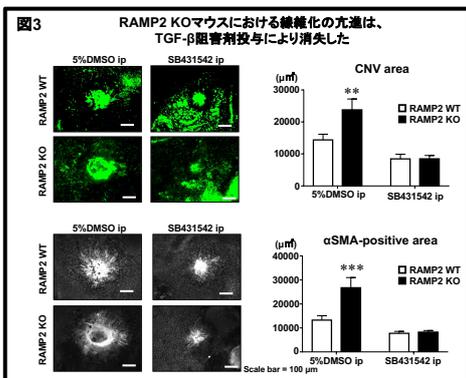
4. 研究成果

(1) AM⁺/⁻マウス、RAMP2⁺/⁻マウスでは、WT マウスと比較して LI-CNV は拡大し、網膜下線維化、マクロファージ浸潤の亢進を認めた。反対に、LI-CNV を誘導したマウスに AM を外因性に投与したところ、LI-CNV の縮小、網膜下線維化の縮小、マクロファージ浸潤の減少を認めた (図 1)。LI-CNV を誘導した脈絡膜では、TGF- β 、CXCR4、CTGF、THBS1 などの遺伝子発現が上昇したが、AM 投与により低下した。

(2) TGF- β 2+TNF- α 刺激は、ARPE19 において EMT を誘導し、上皮系マーカーの発現減少と間葉系マーカーの発現亢進をもたらしたが、AM の投与によりそれらは抑制された (図 2)。また、AM の投与は、EMT を誘導した ARPE19 において、TGF- β 、RhoA、ROCK1、CXCR4 などの遺伝子発現を抑制した。



(3) LI-CNV モデルにおいて、TGF- β 阻害剤である SB431542、あるいは CXCR4 阻害剤である Plerixafor の投与によって、WT マウスと RAMP2⁺/⁻マウスの間でみられた LI-CNV と網膜下面積の差は消失した (図 3、4)。RAMP2⁺/⁻マウスでは、LI-CNV モデルにおいて、脈絡膜の RhoA、ROCK1 の発現亢進を認めた。SB431542、あるいは ROCK1 阻害剤 (Y27632) を投与すると、脈絡膜における RhoA、ROCK1 の遺伝子発現は低下した。



(4) AM2⁻/⁻マウスについても、WT マウスと比較して LI-CNV は拡大し、網膜下線維化、マクロファージ浸潤の亢進を認めた。反対に、LI-CNV を誘導したマウスに AM2 を外因性に投与したところ、LI-CNV の縮小、網膜下線維化の縮小、マクロファージ浸潤の減少を認めた (図 5)。

(5) TGF- β 2+TNF- α 刺激は、ARPE19 において EMT を誘導し、上皮系マーカーの発現減少と間葉

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Shindo T, Tanaka M, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Sakurai T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Receptor activity modifying protein RAMP sub-isoforms and their functional differentiation, which regulates functional diversity of adrenomedullin.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 788
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biology11050788	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Wei Y, Tanaka M, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Cui N, Kakihara S, Zhao Y, Aruga K, Sanjo H, Shindo T.	4. 巻 162
2. 論文標題 Adrenomedullin-RAMP2 system ameliorates pulmonary fibrosis by regulating TGF-β-Smads pathway and differentiation of myofibroblasts.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology.	6. 最初と最後の頁 1-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endo/bqab090	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 Cui N, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Tanaka M, Wei Y, Kakihara S, Zhao Y, Aruga K, Kawagishi H, Nakada T, Yamada M, Shindo T.	4. 巻 162
2. 論文標題 Adrenomedullin-RAMP2 and -RAMP3 systems regulate cardiac homeostasis during cardiovascular stress.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endo/bqab001	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 Tanaka M, Kakihara S, Hirabayashi K, Imai A, Toriyama Y, Iesato Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Cui N, Wei Y, Zhao Y, Aruga K, Yamauchi A, Murata M, Shindo T.	4. 巻 191
2. 論文標題 Adrenomedullin-RAMP2 system ameliorates subretinal fibrosis by suppressing epithelial-mesenchymal transition in age-related macular degeneration.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 age-related macular degeneration. Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 652-668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2020.12.012.	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 Dai K, Tanaka M, Kamiyoshi A, Sakurai T, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Cui N, Wei Y, Tanaka M, Kakiyara S, Matsui S, Shindo T.	4. 巻 39
2. 論文標題 Deficiency of the adrenomedullin-RAMP3 system suppresses metastasis through the modification of cancer-associated fibroblasts.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene.	6. 最初と最後の頁 1914-1930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-019-1112-z	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 柿原伸次、田中正明、平林一貴、今井章、鳥山佑一、家里康弘、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、河手久香、田中愛、村田敏規、新藤隆行
2. 発表標題 加齢黄斑変性および未熟児網膜症におけるアドレノメデュリン2の病態生理学的意義
3. 学会等名 第125回日本眼科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kakiyara S, Tanaka M, Hirabayash K, Imai A, Toriyama Y, Iesato Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Ichikawa-Shindo Y, Tanaka M, Murata T, Shindo T.
2. 発表標題 Pathophysiological roles of adrenomedullin-2 in mouse model of ocular neovascularization.
3. 学会等名 The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柿原伸次、田中正明、平林一貴、今井章、鳥山佑一、家里康弘、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、河手久香、田中愛、崔南奇、Wei Yangxuan, Zhao Yunlu、有賀公亮、笠原智貴、村田敏規、新藤隆行
2. 発表標題 眼内血管新生病におけるアドレノメデュリン2の病態生理学的意義
3. 学会等名 第50回日本心脈管作動物質学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tanaka M, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Cui N, Wei Y, Tanaka M, Kakihara S, Zhao Y, Kasahara T, Aruga K, Shindo T.
2. 発表標題 Adrenomedullin-RAMP2 system regulates vascular endothelial homeostasis, which suppresses hematogenous and lymphogenous metastasis.
3. 学会等名 第85回日本循環器学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Cui N, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Wei Y, Tanaka M, Kakihara S, Zhao Y, Kasahara T, Aruga K, Shindo T.
2. 発表標題 Adrenomedullin-RAMP2 and -RAMP3 systems regulate cardiac homeostasis during cardiovascular stress.
3. 学会等名 第85回日本循環器学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

信州大学医学部 循環病態学教室 http://www7a.biglobe.ne.jp/~shindo/
--

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
---------	---------