

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16012

研究課題名(和文)病的網膜血管特異的な増殖・生存シグナル分子の可視化による抗血管新生薬の評価系構築

研究課題名(英文) Establishment of an evaluation system for anti-angiogenic drugs by visualization of pathological retinal neovascularization-specific proliferation and survival signaling molecules

研究代表者

森田 茜 (Morita, Akane)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：00828072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、網膜の新生血管においてVEGF受容体(VEGFR)の下流シグナル経路の活性化状態を可視化することを目的とした。そして、4日齢のマウス網膜の血管内皮細胞と非血管内皮細胞において、1) VEGFRの下流シグナル分子であるERKのリン酸化が亢進していること、2) MEK阻害薬及びVEGFR阻害薬投与1時間後に血管内皮細胞において認められるリン酸化ERKが消失すること、及び3) VEGF受容体阻害薬投与6時間後に血管の退縮が生じることを可視化できた。これらの結果から網膜の新生血管においてVEGFR阻害後にERKのリン酸化が血管内皮細胞死に先行して抑制されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新生仔マウス網膜の新生血管においてERKが活性化している様子をin vivoにおいて可視化し、各種阻害薬によりそのダイナミクスを解析することが可能となった。網膜の新生血管におけるERKのリン酸化を可視化することはVEGF/VEGFRシグナル経路に作用する網膜血管新生抑制薬の効率的なスクリーニングに有用である。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to visualize the status of the vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor (VEGFR) system in proliferating endothelial cells. In 4-day-old mice, immunoreactivity for phosphorylated ERK (pERK) was detected in both vascular and non-vascular cells in the retina. The pERK immunoreactivity was markedly diminished in endothelial cells one hour after injection of the MEK inhibitor or the VEGFR tyrosine kinase inhibitor. Capillary regression occurred six hours after injection of the VEGFR inhibitor. These results suggest that reduction in pERK occurs in endothelial cells before the cell death after inhibition of VEGFR.

研究分野：医歯薬学

キーワード：血管内皮細胞 血管生物学

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病三大合併症の一つである糖尿病網膜症では、血管内皮成長因子 (VEGF) の過剰産生により病的な血管新生が誘導され、著しい視覚障害や失明を招く原因となる。現在、糖尿病網膜症の治療に抗 VEGF 薬が用いられており劇的な治療効果を示す反面、正常な血管に対して悪影響を及ぼす可能性も指摘されている。そこで、病的血管新生のみを選択的に抑制する抗血管新生薬の開発が求められている。そのような治療薬を創生するためには、病的網膜血管において特徴的に活性化される細胞内シグナル分子の動き (ダイナミクス) をより詳細に解明する必要がある。

申請者らは、マウス網膜の病的な新生血管において特徴的に mTOR 経路が VEGF 依存的に活性化されていることを見出している。そこで、細胞増殖・生存に関わる分子群の中で S6 タンパク質などのように、病的な血管においてのみ特徴的に活性化している分子を *in vivo* において可視化し、その分子のダイナミクスを解析することができるようになれば、正常な血管には影響を及ぼさない病的な血管に対してのみ抑制作用を示す治療薬を開発するために有用であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、新生仔期のマウスを用いて網膜の新生血管における VEGF 受容体 (VEGFR) の下流シグナル経路分子の活性化状態を可視化することを目的として検討を行った。

## 3. 研究の方法

4 日齢のマウスに、MEK 阻害薬である U0126 (100 mg/kg)、VEGFR 阻害薬である KRN633 (10 mg/kg) 又は溶媒を投与し、投与 1 から 24 時間後において眼球を摘出した。網膜を単離後に蛍光免疫染色を行い、血管内皮細胞及びリン酸化 ERK について検討を行った。

## 4. 研究成果

### 1. 正常マウスにおけるリン酸化 ERK の分布

4 日齢のマウス網膜において、ERK が強くリン酸化されている細胞は血管と実質に存在していた。血管網の中央部と比較して先端部に存在する血管内皮細胞において ERK のリン酸化が亢進していた。中央部では毛細血管の血管内皮細胞においてのみ ERK のリン酸化が認められ、動脈や静脈においては認められなかった。血管内皮細胞とリン酸化 ERK の共局在領域は、血管網中央部よりも先端部でその割合は大きく、先端部の血管内皮細胞でより ERK のリン酸化が亢進していることが示された。

### 2. MEK 阻害薬が血管網の先端部における ERK のリン酸化に及ぼす影響

観察されたリン酸化 ERK が MEK/ERK 経路の活性化状態を反映しているか否かを明らかにするために、ERK のリン酸化がより亢進していた血管網の先端部における MEK 阻害薬 U0126 投与 1 時間後の ERK のリン酸化について検討した。溶媒投与群では、血管内皮細胞と網膜実質の細胞において ERK のリン酸化が亢進していた。U0126 投与 1 時間後には、血管内皮細胞と網膜実質細胞の両方において ERK のリン酸化が抑制されていたが、抑制の程度は血管内皮細胞においてより大きかった。一方、血管のネットワーク構造には影響が認められなかった。

### 3. VEGFR 阻害薬が血管網の先端部における ERK のリン酸化に及ぼす影響

溶媒投与群において、血管及び血管内皮細胞におけるリン酸化 ERK は、投与前と比較して差は認められなかった。KRN633 投与 24 時間後までに、血管網の先端部における血管のネットワーク構造は大きく変化しなかったが、わずかに毛細血管の退縮が観察された。一方、血管内皮細胞におけるリン酸化 ERK は、KRN633 投与 1 時間後から減少し、6 時間後以降ほとんど認められなくなった。また、KRN633 投与後に血管未形成領域のリン酸化 ERK に変化は認められなかった。

本研究により、マウス網膜において ERK のリン酸化を指標とすることで、血管内皮細胞内応答を簡便に可視化できることが示された。本手法は、VEGF とその受容体シグナル経路に作用する抗血管新生薬のスクリーニングに有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 森田 茜, 宮永香純, 浅野大樹, 有馬志保, 森 麻美, 坂本謙司, 長光 亨, 中原 努	4. 巻 35
2. 論文標題 新生仔マウス網膜の血管新生部における ERK 活性の可視化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 眼薬理	6. 最初と最後の頁 35 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森田 茜, 菅原志央史, 入田孟大, 柏原俊英, 森 麻美, 坂本謙司, 中原 努
2. 発表標題 新生仔マウスにおけるVEGF受容体阻害薬を用いた新規網膜異常血管新生モデル
3. 学会等名 第41回日本眼薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田 茜, 浅野大樹, 柏原俊英, 中原 努
2. 発表標題 網膜血管新生におけるmTOR 経路の意義と治療標的としての可能性
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田 茜, 宮永香純, 浅野大樹, 森 麻美, 坂本謙司, 中原 努
2. 発表標題 新生仔マウスにおけるVEGF 受容体下流シグナル分子活性の可視化
3. 学会等名 第40回日本眼薬理学会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------