

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791670

研究課題名(和文) 角膜血管新生、リンパ管新生におけるアンジオポエチン様因子の役割

研究課題名(英文) Roles of angiotensin-like protein in corneal neovascularization

研究代表者

臼井 智彦 (USUI TOMOHIKO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80282557

研究成果の概要(和文)：

角膜は眼球最表層に位置する無血管、無リンパ管の透明組織である。しかし炎症を起点として角膜に血管やリンパ管が侵入すると、その透明性が失われ視機能を著しく損なう結果となる。しかし角膜血管新生やリンパ管新生のメカニズムは未だ不明な点が多い。本研究では慢性炎症や腫瘍において、炎症や血管新生に関与するアンジオポエチン様因子(angiotensin-like protein, Angptl)の中でAngptl2に着目し、角膜血管新生、リンパ管新生における関与と役割を検討した。まずマウス角膜血管新生モデルにおいてangptl2の発現を検討したところ、mRNAレベルでその発現が無処置マウスと比較して上昇した。また免疫染色を行うと、角膜血管新生を誘導したマウスではangptl2の角膜での発現が顕著となった。さらに角膜血管新生モデルにおけるangptl2の役割を検討するため、トランスジェニックマウス、ノックアウトマウスでそれぞれ検討したところ、トランスジェニックマウスでは野生型マウスと比較して角膜血管新生、リンパ管新生ともに亢進し、マクロファージの浸潤も亢進していた。一方ノックアウトマウスでは野生型のマウスと比較して角膜血管新生、リンパ管新生ともに減弱し、マクロファージの浸潤も減弱した。以上より、angptl2はマクロファージの浸潤を介して角膜血管新生、リンパ管新生を促進させることが明らかとなった。このことからangptl2は角膜血管新生、リンパ管新生に対して治療のターゲット分子になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Cornea is transparent, avascular, and alymphatic tissue, which form outer shell of eyeball. Neovascularization of the cornea disturbs its transparency and vision secondary to a variety of corneal insults, including inflammatory corneal diseases. However, the mechanisms of corneal hemangiogenesis and lymphangiogenesis have not been fully understood yet. Recently, several reports revealed that angiotensin-like protein 2 (Angptl2) play important roles in angiogenesis of chronic inflammatory diseases and tumor. Therefore, this study focused on the roles of Angptl2 in corneal hemangiogenesis and lymphangiogenesis. The expressions of Angptl2 in normal and vascularized cornea were evaluated by RT-PCR and immunohistochemistry. Angptl2 gene expression was weakly detected in the normal mice cornea, however, the gene expression was significantly increased in vascularized corneas. *In situ* expression of Angptl2 was apparent in vascularized corneas. To investigate the roles of Angptl2 in inflammatory corneal neovascularization, we analyzed K14-Angptl2 transgenic mice and angptl2 knockout mice. Compared with wild type mice, K14-Angptl2 transgenic mice increased inflammation (macrophage infiltration), hemangiogenesis and lymphangiogenesis, otherwise, Angptl2 knockout mice decreased inflammation (macrophage infiltration), hemangiogenesis and lymphangiogenesis in mice corneal neovascularization models. Taken together, angptl2 is proinflammatory and proangiogenic factor in corneal neovascularization. We concluded that Angptl2 blockade could be a potent strategy to inhibit inflammatory corneal hemangiogenesis and lymphangiogenesis in corneal inflammatory diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
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：角膜、血管新生、炎症、リンパ管新生

1. 研究開始当初の背景

角膜は眼球最表層に位置する無血管透明組織であり、健全な視機能を得るためには、角膜に血管侵入がなく透明であることが必須条件である。しかしアルカリ被爆などの化学外傷、熱傷、Stevens-Johnson 症候群や眼類天疱瘡などの炎症性疾患、角膜ヘルペスや感染性角膜潰瘍などの感染性疾患、先天無虹彩症などの輪部機能不全疾患、角膜移植後の縫合糸に対する炎症反応、コンタクトレンズ装用など、さまざまな刺激や侵襲によって角膜の透明性は脅かされ、病的な血管が角膜内へ侵入してしまうことがある。角膜内に侵入した血管は脆弱であり、透過性が亢進していることから新生血管から漏出した成分により角膜混濁を招き、角膜の透明性維持が困難となり、重篤な視機能低下を残してしまう。また角膜は従来リンパ管も存在しない組織であるが、血管侵入角膜では同時にリンパ管新生も生じていることが明らかになってきた。

このような角膜血管新生による角膜混濁の患者様は本邦において約100万人以上存在するのではないかと考えられており、眼科における大きな問題の一つとなっている。現在血管侵入を生じた角膜混濁を改善する唯一の治療法は角膜移植であるが、血管侵入角膜では、免疫的バランスが崩壊していることが問題である。すなわち、新生したリンパ管を介して抗原提示細胞が容易に所属リンパ節へ遊走しやすく、かつ侵入血管を介してリンパ球が容易に角膜へ遊走しやすくなる。そのため血管侵入角膜に対する角膜移植術の拒絶反応の発症率は高く、術後成績は極めて不良である。また本邦ではドナー角膜の供給が不十分であり、現時点での唯一の治療法である角膜移植ですら十分行うことができず、多くの患者が視機能低下に苦しんでいる。このような背景

から角膜血管新生、リンパ管新生のメカニズム解明が望まれているが、これらの分子メカニズムはほとんど理解されていないと同時に有効な治療法は現状ではほとんど存在しない。

そのため我々はこれまでに多くの角膜血管新生の研究を進めてきた。過去にマウス角膜血管新生モデルにおいて、単球、マクロファージをはじめとする炎症細胞が血管新生部位へ浸潤し、それらの炎症細胞がVascular endothelial growth factor (VEGF) などの血管新生促進因子を放出し血管新生を促進することを明らかにした。また近年他グループからも角膜血管新生の過程における単球、マクロファージなどの細胞が血管新生に対して促進的に機能していること報告し、我々の考え方を支持した。またそのような病的状態にある角膜では浸潤した炎症細胞のみならず、活性化した角膜上皮細胞や角膜実質細胞も様々な血管新生促進因子や炎症性サイトカインを放出し、角膜血管新生の病態を修飾していることが示唆された。さらに角膜炎症時に骨髄から動員されたマクロファージが角膜リンパ管新生の形成に関与することも報告され、角膜血管新生、リンパ管新生のメカニズム解明には角膜炎症の病態を理解することが重要であると考えられる。

そこで申請者はアンジオポエチン関連成長因子(angiotensin related growth factor; AGF)ファミリーの一つであるangiotensin like protein-2(Angptl2)という分子に着目した。Angptlsは構造上N末端のCoiled-coil domainとC末端のfibrinogen-like domainをangiotensinと共有し、現在までに7つのvariant (Angptl1-7)が同定されている。中でもAngptl2の機能は未だ不明な点が多いが、in vitroで血管内皮の発芽に促進的な作用を持つ

ことが報告されていた。またサイトケラチン14プロモーター下にAngpt12を強制発現するトランスジェニックマウス (K14-Angpt12 mice) では皮下に多くの炎症細胞浸潤を伴った血管新生を認めた。また慢性関節リュウマチや腫瘍の血管新生過程でも促進的な役割を果たすことが指摘されてきた。よってAngpt12は角膜炎症、血管新生に関与する可能性があるが、現在までに角膜におけるAngpt12の発現や機能解析は行われていない。またAngpt12のリンパ管新生への関与もほとんど理解されていなかった。

2. 研究の目的

以上の様な背景から、本研究では角膜血管新生、リンパ管新生における Angpt12 の関与とその機能について検討し、現時点ではほとんど存在しないこれらに対する薬物療法の開発や角膜炎症、角膜移植拒絶反応抑制を可能にする新たな治療法の実現につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

実験動物にはマウスを用いた。マウス角膜に10-0ナイロン糸を通すことにより、角膜血管新生、リンパ管新生を誘導した。このモデルにおける Angpt12 の発現を分子レベル (RT-PCR)、組織レベル (免疫染色) で検討した。次に K14-angpt12 mice や angpt12 ノックアウトマウスを用いて同様にナイロン糸をかけることにより角膜血管新生、リンパ管新生を誘導し、コントロールマウスとの比較を行い、角膜血管新生過程における angpt12 の役割を検討した。血管新生の描出には血管内皮のマーカーである CD31 の免疫染色で、リンパ管新生の描出はリンパ管内皮のマーカーである LYVE-1 の免疫染色を行い、角膜ホルマウントを蛍光顕微鏡で観察した。またそれらマウスにおけるマクロファージの浸潤をマクロファージマーカーである F4/80 に対する RT=PCR で検討した。

4. 研究成果

まずマウス角膜血管新生モデルにおける angpt12 の発現を検討したところ、mRNA レベルでその発現が無処置マウスと比較して有意に上昇した。また免疫染色を行うと、角膜血管新生を誘導したマウスでは angpt12 の角膜での発現が顕著となった。さらに角膜血管新生モデルにおける angpt12 の機能を検討するため、トランスジェニックマウス、ノックアウトマウスでそれぞれ検討したところ、K14-angpt12 mice では野生型マウスと比較して角膜血管新生、リンパ管新生ともに亢進し、マクロファージの浸潤も亢進していた。一方ノックアウトマウスでは野生型のマウスと

比較して角膜血管新生、リンパ管新生ともに減弱し、マクロファージの浸潤も減弱した。以上の検討により、Angpt12 はマクロファージの浸潤を介して角膜血管新生、リンパ管新生を促進させることを明らかにした。今後 Angpt12 は角膜炎症に対する創薬の標的分子になりうる可能性があると考えられた。

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0件)

〔学会発表〕 (計3件)

1. 豊野哲也、臼井智彦ほか。角膜血管新生、リンパ管新生における angpt12 の役割。2011/5/12 第115回日本眼科学会 東京

2. Usui T et al. Roles of angiopoietin like protein 2 in corneal neovascularization. 2011/5/6 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, USA

3. 臼井智彦ほか。角膜血管新生における Angpt12 の機能。2010/4/15 第114回日本眼科学会 名古屋

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼井 智彦 (USUI TOMOHIKO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80282557

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：