

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 9 月 27 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 年～2011 年

課題番号：21791704

研究課題名（和文） Shh-Ang-Tie2 を標的とした眼内血管新生疾患に対する新規治療戦略

研究課題名（英文） Shh-Ang-Tie2: A new therapeutic target for ocular angiogenesis.

研究代表者 宮本 武

(TAKESHI MIYAMOTO)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20336879

研究成果の概要（和文）：眼内の血管新生は創傷治癒過程や虚血性眼疾患、加齢性黄斑変性症など様々な病体によって引き起こされる。糖尿病網膜症や加齢性黄斑変性症、血管新生緑内障においては血管新生が著しい視機能の低下をもたらし、放置すると失明につながる場合がある。現在、眼内血管新生に対する治療法として、薬剤としては血管内皮成長因子（VEGF）に対する中和抗体が用いられている加齢性黄斑変性症に対してのみの適応であり、硝子体投与の副作用に関しても未だよくわかっていない。アンジオポエチン（以下 Ang と略す）は血管新生に関連する物質の一つで、VEGF とは異なり、血管内皮細胞の増殖には関わらず、血管新生の開始、終了、血管構造の安定化、余剰血管の退縮に関与する分子であると言われている。Ang は Sonic hedgehog (以下 Shh) により誘導されるとの報告もある。レーザー光凝固を用いて動物 (Brown Norway Rat) に実験的に脈絡膜新生を誘発した。レーザー照射直後に Shh の阻害剤であるシクロパミンを結膜下注射した。レーザー瘢痕部では早期にはシクロオキシゲナーゼ 2 や 誘導型 NO 合成酵素の局在と NF kappa B の活性化がみられた。またソニックヘッジホッグ (Shh) の局在もレーザー照射部周囲の神経網膜及び網膜色素上皮細胞等に免疫染色性がみられ、そのシグナル伝達に関わる Gli3 や Shh の標的遺伝子である Ptc の蛋白も検出された。これらの結果から Shh が Ang を介して脈絡膜血管新生に関与している可能性が示唆される。また Shh の阻害剤であるシクロパミンを結膜下注射することにより脈絡膜血管新生が阻害された。このことから Shh が脈絡膜血管新生に重要な役割をしており Shh のシグナル制御が脈絡膜血管新生の治療として応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Ocular neovascularization occurs in various diseases like wound healing, ischemic, age related macular degeneration, etc. Sever ocular neovascularization causes visual loss. Anti VEGF drugs are sometimes used for AMD. But in the other disease, we have no effective method to treat the ocular neovascularization. Angiopoietin is one of the angiogenic factors that are induced by Shh signals. In the laser induced choroidal neovascularization model in rat, Shh and Gli3, the Shh related signal transduction molecule, were immunohistochemically positive in the retinal pigment epithelium and retina around the laser spot. Shh may have an important role in the choroidal neovascularization via Ang expression. And conjunctival injection of cyclopamin, Shh inhibitor, suppressed the choroidal neovascularization. Shh may be an effective target to treat the ocular neovascularization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1400000	420000	1820000
2010年度	900000	270000	1170000
2011年度	900000	270000	1170000
年度			
年度			
総計	3200000	960000	4160000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床・眼科

キーワード：眼病理学

1. 研究開始当初の背景

眼内の血管新生は創傷治癒過程や虚血性眼疾患、加齢性黄斑変性症など様々な病体によって引き起こされる。糖尿病網膜症や加齢性黄斑変性症、血管新生緑内障においては血管新生が著しい視機能の低下をもたらす、放置すると失明につながる場合があり血管新生制御はこれらの疾患の治療における最大の課題である。現在、眼内血管新生に対する治療法として、薬剤としては血管内皮成長因子 (VEGF) に対する中和抗体が用いられているが、厚生労働省の認可を受けたものは加齢性黄斑変性症に対してのみの適応であり、硝子体投与の副作用に関しても未だよくわかっていない。また、加齢性黄斑変性症に関しては光線力学療法も行うことがあるが、光感受性物質を全身投与するためその副作用が問題となる。このため、抗 VEGF 中和抗体や光線力学療法よりも副作用が少なく安全な治療方法が必要である。

一般に炎症や虚血が生じると細胞は TNF・IL-1、TGF・などの炎症性サイトカインや虚血誘導因子 (HIF) などの刺激を受けた後、Nuclear Factor Kappa B (NFkB) や Smad 系など様々な細胞内シグナル伝達物質が活性化され、細胞を刺激し、炎症反応や血管新生を引き起こすことが知られている。これらの血管新生に関する細胞内シグナル伝達のカロストークは複雑で、詳細はよくわかっていない。アンジオポエチン(以下 Ang と略す) は血管新生に関連する物質の一つで、VEGF とは異なり、血管内皮細胞の増殖には関わらず、血管新生の開始、終

了、血管構造の安定化、余剰血管の退縮に関与する分子であると言われている。Ang は Sonic hedgehog(以下 Shh)により誘導されるとの報告もある。その作用は細胞表面の受容体 TIE2 を介して PI3K を介して Erk、Akt、FAK などに働き細胞死抑制や細胞伸張移動に作用するだけでなく、IKK を抑制することにより NF kappa B を抑制するとの報告もある。このため、Ang-TIE2 系を制御することにより血管新生だけでなく炎症反応も制御できる可能性がある。また、Ang には2つのサブタイプが知られている。Ang1 と Ang2 は TIE2 に対するアゴニスト、アンタゴニストの関係となっており、それらの相互作用により血管透過性、血管新生や余剰血管退縮がコントロールされているといわれている。これらを制御することにより、眼内血管新生疾患を治療することが可能であると考えられる。

2. 研究の目的

血管内皮細胞と線維芽細胞の供培養系および眼内血管新生動物モデルを用いて Ang1, 2 及び TIE2 の発現に関して検討する。眼内血管新生時の Ang1 及び Ang2 の役割を明らかにする。Ang1 及び Ang2 は NF kappa B 抑制を介し抗炎症的にも作用すると予想されるので、その効果について、マクロファージなどの炎症細胞への影響や COX2 などのアラキドン酸代謝に関わる酵素、プロスタグランジン E 2 (PGE2) の産生量などに焦点をあてて検討する。また、Shh との関係性を明らかにするために Shh の存在下での Ang1 または Ang2 ノックダウンを行い Shh と Ang1, 2-TIE2 系との関連について検討する。

3. 研究の方法

レーザー光凝固を用いて動物(Brown Norway Rat)に実験的に脈絡膜新生を誘発した。レーザー照射直後に Shh の阻害剤であるシクロパミンを結膜下注射した。一定期間後にラットを屠殺し眼球を摘出、パラフィン切片を作成した。切片は形態学的にはヘマトキシリン・エオジン染色を用いて検討した。また免疫組織化学的手法を用いて蛋白局在の検出に用いた。

4. 研究成果

レーザー瘢痕部では早期にはシクロオキシゲナーゼ2や 誘導型 NO 合成酵素の局在と NF kappa B の活性化がみられた。また、同様にモルフォゲンであるソニックヘッジホッグ(Shh)の局在もレーザー照射部周囲の神経網膜及び網膜色素上皮細胞等に免疫染色性がみられ、そのシグナル伝達に関わる Gli3 や Shh の標的遺伝子である Ptc の蛋白も検出され、しかも同部では Shh のシグナルが影響を及ぼすサイクリンD 1 も検出された。これらの蛋白は全て細胞増殖に関与するものであり血管内皮細胞の増殖サイクルに影響をあたえ、脈絡膜血管新生に間接的に関与している可能性が示唆される。また Shh の阻害剤であるシクロパミンを結膜下注射することにより脈絡膜血管新生が阻害された。このことから Shh が脈絡膜血管新生に重要な役割をしており Shh のシグナル制御が脈絡膜血管新生の治療として応用できる可能性がある。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者 宮本 武
(TAKESHI MIYAMOTO)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：20336879

(2)研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3)連携研究者 なし
()

研究者番号：

