

## 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25年5月27日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22689046

研究課題名（和文） 新生血管伸長方向の制御による網膜血管再生療法の開発

研究課題名（英文） Retinal Vascular Regeneration by Rectifying Angiogenic Directions

## 研究代表者

植村 明嘉（UEMURA AKIYOSHI）

神戸大学・大学院医学研究科・特命助教

研究者番号：30373278

## 研究成果の概要（和文）：

網膜新生血管の伸長方向を制御する分子機構を解明し、病的網膜新生血管を正常化する治療法の開発を試みた。発生期マウス網膜では、神経細胞から分泌される Sema3E が、内皮細胞に発現する PlexinD1 に結合して RhoJ を活性化する結果、不適切な方向に伸長する血管新生を抑制した。虚血網膜症モデルマウスにおいて Sema3E 蛋白を眼内に投与すると、異常新生血管が選択的に抑制されるのに対し、網膜内の正常血管再生には影響を及ぼさなかった。これらの成果は、虚血性網膜疾患に対する血管再生療法の開発に繋がると期待された。

## 研究成果の概要（英文）：

We attempted to develop a modality by which angiogenic directions are rectified in ischemic retinopathy. During development, binding of neuron-derived Sema3E to endothelial PlexinD1 activated RhoJ, thereby retracting disoriented angiogenesis. In a mouse model of ischemic retinopathy, intravitreal injections of Sema3E protein selectively prevented disoriented angiogenesis without affecting retinal vascular regeneration. These results present a new paradigm of vascular regeneration therapy that guides new blood vessels toward the ischemic retinas.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	11,700,000	3,510,000	15,210,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	19,800,000	5,940,000	25,740,000

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：血管新生、内皮細胞、糸状仮足、Sema3E, PlexinD1, RhoJ, Arhgef15, VEGF

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症や未熟児網膜症などの虚血性網膜疾患における血管新生に対しては、従来からのレーザー-光凝固に加えて、抗血管内皮細胞増殖因子（VEGF）薬による血管新生阻害

療法が実施されている。しかし網膜虚血の根治的改善を得るためには、新生血管を虚血網膜内に誘導し、機能的血管網を再生することが理想的である。一方、新生血管が整然と伸長する発生期網膜の研究を基に、内皮細胞が形成する糸状仮足が、網膜新生血管の伸長方

向を決定することが明らかにされていた。これらの知見から、内皮細胞の糸状仮足形成を制御するシグナル分子が、網膜血管再生療法の創薬ターゲットとなることが期待された。また、我々が行った網羅的遺伝子発現解析では、糸状仮足形成との相関が予測される複数のシグナル分子が、網膜新生血管の内皮細胞に発現することが確認されていた。

## 2. 研究の目的

本課題では、網膜新生血管内皮細胞の糸状仮足形成を制御するシグナル伝達機構を明らかにした上で、虚血網膜において新生血管の伸長方向を是正し、機能的血管網を再生する治療法を開発することを目的に、下記の研究を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス網膜における遺伝子発現解析

- ①in situ hybridization 法
- ②免疫染色法
- ③LacZ レポーター遺伝子発現マウス

### (2) 網膜血管発生における分子操作

- ①眼内薬剤投与 (Sema3E 蛋白など)
- ②遺伝子組換えマウス (タモキシフェン投与によるコンディショナル Cre-loxP 遺伝子組換えを含む)

### (3) 培養内皮細胞における機能解析

- ①遺伝子強制発現 (プラスミドベクター)
- ②遺伝子ノックダウン (siRNA)
- ③ウエスタンブロッティング法
- ④プルダウン法
- ⑤免疫沈降法
- ⑥免疫染色法および live imaging による細胞観察

## 4. 研究成果

### (1) 網膜血管発生における Sema3E, PlexinD1, RhoJ, Arhgef15 の発現

新生仔マウス網膜の新生血管では、膜貫通型受容体 PlexinD1、低分子量 G 蛋白質 RhoJ、グアニンヌクレオチド交換因子 Arhgef15 が内皮細胞に強く発現すること、また、PlexinD1 の可溶性リガンド分子である

semaphorin 3E (Sema3E) が神経節細胞から分泌されることが明らかとなった。

### (2) 内皮細胞糸状仮足形成における Sema3E-PlexinD1 シグナル

新生仔マウスの眼内に PlexinD1-Fc 蛋白質を投与して内在性リガンドを中和したところ、糸状仮足が過剰に形成された。また、同様の網膜血管異常が Sema3E-KO マウスでも認められたことから、網膜血管発生では神経節細胞由来の Sema3E が内皮細胞の PlexinD1 に結合することにより、糸状仮足の形成を阻害して新生血管の伸長方向を是正すると考えられた。

### (3) RhoJ による内皮細胞の収縮

培養内皮細胞では、

- ①RhoJ 過剰発現により細胞が収縮する
- ②RhoJ ノックダウンにより、Sema3E による細胞収縮が抑制される
- ③RhoJ は VEGF により不活化されるが、Sema3E により活性化されることが観察された。また、内皮細胞特異的に RhoJ を過剰発現するトランスジェニックマウスでも、網膜新生血管の内皮細胞が収縮することから、RhoJ は Sema3E-PlexinD1 シグナルの下流で細胞収縮を誘導するシグナル伝達分子であることが明らかとなった。

### (4) Arhgef15 による RhoJ の不活化

培養内皮細胞では、

- ①Arhgef15 過剰発現により細胞内アクチン重合および細胞遊走が促進される
- ②Arhgef15 ノックダウンにより、細胞が収縮する
- ③Arhgef15 ノックダウンにより、VEGF による Cdc42 活性化が阻害される

ことが明らかとなった。さらに、RhoJ を発現する培養 293T 細胞に Arhgef15 を過剰発現させると RhoJ が不活化されること、および Arhgef15-KO マウスでは網膜血管発生が遅滞することから、Arhgef15 が VEGF シグナルの下流で Cdc42 を活性化するとともに RhoJ を不活化することにより、内皮細胞の糸状仮足形成を促進すると考えられた (図)。

### (5) 虚血網膜における血管再生

- ①Oxygen-Induced Retinopathy (OIR) モデル

ルでは Sema3E が神経節細胞に発現するのに  
対して、PlexinD1 および RhoJ は網膜外に逸  
脱する異常新生血管の内皮細胞に強く発現  
する。

②OIR モデルにおける異常新生血管は、  
PlexinD1 遺伝子の欠失で増加するのに対し  
て、RhoJ 遺伝子の過剰発現では減少する。

これらの結果から、虚血網膜では神経節細胞  
由来の Sema3E が、網膜外に逸脱した内皮細  
胞の PlexinD1 に結合して RhoJ を活性化する  
ことにより、異常血管新生を抑制すると考え  
られた。この作用を増強するため、OIR モデ  
ルの眼内に Sema3E 合成蛋白質を投与したと  
ころ、網膜外に逸脱する異常新生血管が選択  
的に抑制されるのに対して、網膜内の血管再  
生は影響を受けなかった。

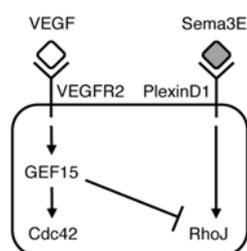


図. 血管内皮細胞におけるシグナル伝達

#### (6) 研究成果の意義と今後の展望

本研究で示した、異常血管新生の選択的阻害  
に基づく網膜血管再生療法は、失明の主要原  
因である虚血性網膜疾患群に対する新たな  
治療コンセプトを呈示したものであると同  
時に、加齢黄斑変性や癌に対する血管新生阻  
害療法にも応用されることが期待される。

#### 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 16 件)

- ① Katsuta H, Fukushima Y, Maruyama K, Hirashima M, Nishida K, Nishikawa S, Uemura A. EphrinB2-EphB4 signals regulate formation and maintenance of funnel-shaped valves in corneal lymphatic capillaries. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. In press. 査読有
- ② Kusuhara S, Fukushima Y, Fukuhara A, Jakt LM, Okada M, Shimizu Y, Hata M, Nishida K, Negi A, Hirashima M,

Mochizuki N, Nishikawa S, Uemura A. Arhgef15 promotes retinal angiogenesis by mediating VEGF-induced Cdc42 activation and potentiating RhoJ inactivation in endothelial cells. *PLoS ONE*. 7:e45858, 2012.

doi: 10.1371/journal.pone.0045858.  
査読有

- ③ Felcht M, Luck R, Schering A, Seidel P, Srivastava K, Hu J, Bartol A, Kienast Y, Vettel C, Loos EK, Kutschera S, Bartels S, Appak S, Besemfelder E, Terhardt D, Chavakis E, Wieland T, Klein C, Thomas M, Uemura A, Goerdts S, Augustin HG. Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through Tie2 and integrin signaling. *J Clin Invest*. 122:1991-2005, 2012. 査読有
- ④ Toyofuku T, Nojima S, Ishikawa T, Takamatsu H, Tsujimura T, Uemura A, Matsuda J, Seki T, Kumanogoh A. Endosomal sorting by Semaphorin 4A in retinal pigment epithelium supports photoreceptor survival. *Genes Dev*. 26:816-829, 2012. 査読有
- ⑤ Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, Sunden Y, Arai Y, Moriwaki K, Ishida J, Uemura A, Kiyonari H, Abe T, Fukamizu A, Hirashima M, Sawa H, Aoki J, Ishii M, Mochizuki N. The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *J Clin Invest*. 122:1416-1426, 2012. 査読有
- ⑥ Kurogane Y, Miyata M, Kubo Y, Nagamatsu Y, Kundu RK, Uemura A, Ishida T, Quertermous T, Hirata K, Rikitake Y. FGD5 mediates pro-angiogenic action of vascular endothelial growth factor in human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 32:988-996, 2012. 査読有

- ⑦ Fukushima Y, Okada M, Kataoka H, Hirashima M, Yoshida Y, Mann F, Gomi F, Nishida K, Nishikawa S, Uemura A. Sema3E-PlexinD1 signaling selectively suppresses disoriented angiogenesis in ischemic retinopathy in mice. *J Clin Invest*. 121:1974-1985, 2011. 査読有
- ⑧ Moriya J, Minamino T, Tateno K, Okada S, Uemura A, Shimizu I, Yokoyama M, Nojima A, Okada M, Koga H, Komuro I. Inhibition of semaphorin as a novel strategy for therapeutic angiogenesis. *Circ Res*. 106:391-398, 2010. 査読有
- ⑨ 植村明嘉. 網膜血管新生におけるガイドランス分子の役割. *日本臨床* 68:349-353, 2010. 査読無
- ⑩ 植村明嘉. 網膜における生理的血管発生と病的血管新生. *実験医学* 28:2825-2830, 2010. 査読無

[学会発表] (計25件)

- ① Uemura A:  
Mouse retinal angiogenesis as a model system of diabetic retinopathy. 2012 *International Conference on Diabetes and Metabolism* (韓国、2012年11月8日)
- ② 植村明嘉  
「網膜症における血管新生」第27回日本糖尿病合併症学会シンポジウム (福岡、2012年11月2日)
- ③ Uemura A:  
Arhgef15 promotes angiogenesis by mediating VEGF-induced Cdc42 activation and potentiating RhoJ inactivation in endothelial cells. 17<sup>th</sup> *International Vascular Biology Meeting* (ドイツ、2012年9月17日)
- ④ Uemura A: RhoJ regulates endocytic trafficking of VEGFR2 and PlexinD1 in endothelial cells. 7<sup>th</sup> *International Kloster Seeon Angiogenesis Meeting* (ドイツ、2012年6月4日)

- ⑤ 植村明嘉「眼内血管新生病の治療における新規創薬標的分子の同定」第89回日本生理学会大会シンポジウム (松本、2012年3月30日)

- ⑥ Uemura A:  
RhoJ mediates Sema3E-induced contraction of endothelial cells. *Keystone Symposia. Angiogenesis: Advances in Basic Science and Therapeutic Applications* (米国、2012年1月17日)

- ⑦ 植村明嘉  
「Identification of G protein-related genes in angiogenic endothelial cells」第19回日本血管生物医学会シンポジウム (東京、2011年12月9日)

- ⑧ 植村明嘉  
「網膜血管の再生」第50回日本網膜硝子体学会総会シンポジウム (東京、2011年12月4日)

- ⑨ Uemura A:  
The small GTPase RhoJ mediates Sema3E-induced contraction of endothelial cells. 2<sup>nd</sup> *Pacific Society of Vascular Biology* (韓国、2011年10月31日)

- ⑩ Uemura A:  
Sema3E-PlexinD1 signaling selectively suppresses disoriented angiogenesis in ischemic retinopathy in mice. 9<sup>th</sup> *Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology* (韓国、2011年8月26日)

- ⑪ Uemura A:  
How to promote regeneration of functional capillaries in the ischemic retina. *World Ophthalmology Congress* (ドイツ、2010年6月7日)

[図書] (計6件)

- ① Uemura A.  
Stability and functional integrity of new blood vessels. *Encyclopedia of the Eye*, Vol4. Oxford: Academic Press. 204-211, 2010.

- ② 植村明嘉.  
Semaphorin-Plexin.  
血管新生研究の最先端 医薬ジャーナル社  
112-118, 2013.
- ③ 植村明嘉.  
網膜血管の発生. 血管生物医学事典 朝倉書店  
183-184, 2011.
- ④ 植村明嘉.  
Semaphorin. 血管生物医学事典 朝倉書店  
263-265, 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

①名称：新規な血管新生調節因子の利用  
発明者：植村明嘉、福島葉子、福原茂朋、望月直樹、西川伸一  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 2011-238012  
出願年月日：23 年 10 月 28 日  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

植村 明嘉 (UEMURA AKIYOSHI)  
神戸大学・大学院医学研究科・特命助教  
研究者番号：30373278

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

福島 葉子 (FUKUSHIMA YOKO)  
神戸大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号：70647031