

## 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 2 月 28 日現在

機関番号： 14501

研究種目： 若手研究（B）

研究期間： 2010～2011

課題番号： 22791660

研究課題名（和文） ABCトランスポーターの網膜血管新生における役割の解明

研究課題名（英文） The elucidation of the role of ABC transporters in retinal angiogenesis

研究代表者

楠原 仙太郎（KUSUHARA SENTARO）

神戸大学大学院・医学研究科・助教

研究者番号： 40437463

研究成果の概要（和文）：Multidrug resistance protein 4 (MRP4)はABCトランスポーターファミリーに属する膜蛋白である。ヒト網膜毛細血管内皮細胞を用いた細胞培養実験では、MRP4ノックダウンによって細胞遊走増加、アポトーシス抑制、異常凝集形態、が認められた。ノックアウトマウスを用いた実験ではMrp4の基質であるcAMPの細胞内濃度を上昇させる薬剤であるフォルスコリンの腹腔内注射によって網膜毛細血管の異常増生が認められた。これらの結果からMRP4が網膜血管新生に対して抑制的に働いていると推測される。

研究成果の概要（英文）：Multidrug resistance protein 4 (MRP4) is a membrane protein that belongs to ABC transporter superfamily. In vitro analysis using human retinal microvascular endothelial cells (HRECs) showed that MRP4 knockdown enhanced cell migration, suppressed apoptosis. Moreover, MRP4 knockdown HRECs assembled and aggregated into a massive tube-like structure in a Matrigel-based tube formation assay. Functional analysis using *Mrp4* knockout mice demonstrated abnormal increase in capillary density in developing retina after intraperitoneal injections of forskolin which increase the intracellular level of cAMP, an important substrate for Mrp4. These results suggest that MRP4 has anti-angiogenic properties in retinal angiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,010,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：ABCトランスポーター、MRP4、血管新生、網膜血管内皮細胞、RNA干渉、ノックアウトマウス、フォルスコリン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 網膜新生血管は糖尿病網膜症をはじめとして我が国の失明原因疾患に共通するイベントの一つである。我々はフローサイトメトリーと DNA マイクロアレイを用いた実験において、いくつかの ABC トランスポーター遺伝子が網膜血管特異的に発現していることを発見し、ABC トランスポーターと網膜血管新生との関わりに興味をもつにいたった。

(2) 我々の先行研究では ABC トランスポーターに属する P-glycoprotein (P-gp) / Abcb1、Mrp4 / Abcc4、Bcrp / Abcg2 の蛋白発現がマウス網膜血管で確認された。マウス高酸素網膜症モデルを用いて病的網膜血管での蛋白発現を調べたところ、Mrp4 については病的血管部位で発現が低下していることが分かった (Tagami M, Kusahara S, et al. Brain Res, 2009)。

これらの研究結果を基に、引き続いて病的網膜血管新生における ABC トランスポーターの機能解析につき MRP4 に注目して実験を進めることとした。

## 2. 研究の目的

網膜血管新生における ABC トランスポーターの機能解析を行うこと。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト網膜毛細血管内皮細胞 (Human retinal vascular endothelial cells (HURECs)) を用いた培養実験を行った。HREC における P-gp、MRP4、BCRP の mRNA および蛋白の発現量が MRP4 で多かったことと Mrp4 が病的血管部位で発現が低下しているという予備実験の結果から MRP4 に絞って研究を行った。

①外因性 vascular endothelial growth factor (VEGF) が MRP4 発現に及ぼす影響については real-time RT-PCR 法と Western blotting 法を用いて行った。HREC を 0.1% ウシ胎児血清含有  $\alpha$  MEM で 16 時間培養した後、異なる濃度 (0, 0.1, 1.0, 2.0 nM) となるように VEGF を添加し培養を継続した。6 時間後、24 時間後に細胞ライセートを回収し MRP4 mRNA と MRP4 蛋白の定量を行った。

②RNA 干渉による loss of function 実験を行うためにノックダウン効率を調べる実験を行った。MRP4 siRNA およびコントロール siRNA を HREC にトランスフェクションし、24 時間

後での MRP4 mRNA 量を real-time RT-PCR 法で計測した。MRP4 蛋白量については、トランスフェクションの 48 時間後、72 時間後の細胞ライセートを用いた Western blotting 法で計測した。

次に、siRNA による MRP4 ノックダウンが HREC に及ぼす影響について以下の実験を行った (いずれの実験も siRNA 導入後 24 時間で開始した)。

③5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) の取り込みを指標とした細胞増殖アッセイ

④transwell chamber を用いた細胞遊走アッセイ

⑤マトリゲルを用いたチューブ形成アッセイ

⑥血清除去によるアポトーシス誘導下での抗 cleaved-caspase3 抗体を用いた免疫染色で

⑦細胞間接着の変化につき、抗 VE-cadherin 抗体を用いた免疫染色

(2) 培養実験の結果を受けてノックアウトマウスを用いた動物実験を行った。網膜血管新生の評価には生後の生理的網膜血管新生を使用した。今回の研究で注目した ABC トランスポーターは MRP4 であり、内因性分子、生理物質、薬剤などの細胞外排泄を介して各組織の保護に働いているという特徴を持っていることから、トランスポーターの基質である生理物質の細胞内レベルを増加させる薬剤の腹腔内投与を行い網膜血管新生に対する影響を調べた。

## 4. 研究成果

(1) HREC を用いた培養実験

①VEGF 刺激後の MRP4 mRNA の発現は刺激後 24 時間では濃度依存的に減少していた。2nM 濃度の VEGF 刺激では 0nM 刺激と比較して 51% の mRNA 量減少を示した ( $P = 0.030$ )。

②MRP4 ノックダウン実験では、MRP4 siRNA 導入の 24 時間後ではコントロール siRNA に対して 84% の mRNA 減少が確認され、MRP4 蛋白は siRNA 導入後 48 時間、72 時間のいずれの時点においても明らかな減少を呈しており、MRP4 ノックダウン効率に問題のないことが確認された。

③ 細胞増殖アッセイでは、5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU)の取り込みは MRP4 ノックダウン細胞とコントロール細胞で同等であった( $P = 0.320$ )。

④ 遊走アッセイでは、MRP4 ノックダウン細胞はコントロール細胞に対して 31%の遊走増加を示した( $P = 0.048$ )。

⑤ MRP4 ノックダウン後のアポトーシスについては、MRP4 ノックダウン細胞ではコントロールと比較して、血清除去後 12 時間では 54% ( $P < 0.001$ )、24 時間では 27% ( $P = 0.004$ )、と cleaved-caspase3 陽性細胞は有意に減少していた。

⑥ チューブ形成アッセイでは、MRP4 ノックダウン細胞は集簇してチューブに沿った異常凝集形態を呈した。チューブ長については MRP4 ノックダウン細胞でコントロールに比べて 53%長いという結果であったが有意差は認められなかった( $P = 0.411$ )。

⑦ MRP4 ノックダウン細胞における異常凝集について VE-cadherin を介した細胞間接着の関与を疑ったが、免疫染色ではアクチンフィラメントの重合や細胞間接着部位への VE-cadherin の動員は認められなかった。

(2) ノックアウトマウスを用いた MRP4 の機能解析については以下の結果が得られた。

①  $Mrp4^{+/+}$ ,  $Mrp4^{+/-}$ ,  $Mrp4^{-/-}$ マウスにおいて、生後 3 日、7 日、14 日時点における網膜のフラットマウントを作成し血管内皮細胞のマーカーである CD31 による免疫染色を行ったところ、いずれのマウスのいずれの時点においても網膜血管の形態に明らかな差は認められなかった。

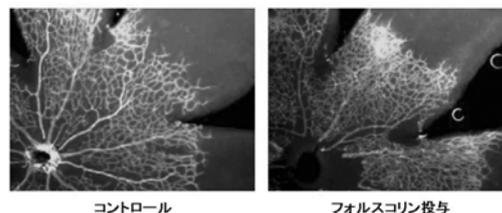
② ①の結果から MRP4 の重要な基質の一つである cAMP に注目し細胞内 cAMP 濃度を上昇させる薬剤であるフォルスコリンの腹腔内注射を  $Mrp4^{+/+}$ マウスに行ったところ dose-dependent に網膜血管の異常(網膜毛細血管の異常増生)が認められた。

③ フォルスコリン腹腔内注射の網膜血管に対する影響を  $Mrp4^{+/+}$ ,  $Mrp4^{+/-}$ ,  $Mrp4^{-/-}$ マウスで比較するために最適な dose と評価時期の決定についての実験を行ったところ、生後 4, 5 日にフォルスコリン連続投与し生後 6 日での評価が最適であることがわかった。

④ ③の方法で  $Mrp4^{+/+}$ ,  $Mrp4^{+/-}$ ,  $Mrp4^{-/-}$ マウス

での網膜血管の形態を免疫染色で評価したところ、 $Mrp4^{-/-}$ マウスでは  $Mrp4^{+/+}$ ,  $Mrp4^{+/-}$ に比べて網膜毛細血管の異常増生が著しいことが判明した。

Mrp4<sup>-/-</sup>マウス\_P4\_PECAM-1染色



(3) 本研究は、cAMP を細胞外に排出する機能をもつ MRP4 が網膜血管新生において特異な形で抑制的に働いているというエビデンスを in vitro と in vivo の両方で初めて示した点で斬新である。本研究データと「MRP4 が病的網膜新生血管でのみ低下している」という過去の我々のデータと併せて考えると、MRP4 が糖尿病網膜症をはじめとする網膜血管新生疾患において抑制的に働いている可能性が高く、網膜血管における MRP4 機能評価や MRP4 保護薬の開発を通じて将来の臨床応用への大きな足がかりになると思われる。

#### 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 1 件)

① Tagami M, Kusuhara S, Imai H, Uemura A, Honda S, Tsukahara Y, Negi A. MRP4 knockdown enhances migration, suppresses apoptosis, and produces aggregated morphology in human retinal vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Vol. 400, 2010, 593-598.

[学会発表] (計 2 件)

① 田上瑞記、楠原仙太郎、今井尚徳、根木 昭、ABC トランスポーターと網膜血管新生、第 15 回眼科分子生物学研究会、2011 年 1 月 22 日、宮崎県ワールドコンベンションセンター

② Mizuki Tagami, Sentarō Kusuhara, Hisanori Imai, Shigeru Honda, Yasutomo Tsukahara, Akira Negi. Knockdown of Multidrug Resistance-Associated Protein 4 by siRNA Enhances Cell Migration and Tube Formation in Human Retinal Endothelial Cells. ARVO 2010 annual meeting、2010 年 5 月 2 日、Fort Lauderdale、米国

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠原 仙太郎 (KUSUHARA SENTARO)  
神戸大学大学院・医学研究科・助教  
研究者番号：40437463

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし