

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 12 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22791680

研究課題名(和文) 9インテグリンリガンドを標的とした脈絡膜・網膜・角膜新生血管の新しい治療法

研究課題名(英文) A new treatment for choroidal, retinal and corneal neovascularization with targeting to alfa-9 integrin ligand

研究代表者

藤田 識人 (Fujita, Norihito)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：10453177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、オステオポンチンやテネイシンCが含まれる 9インテグリンリガンドの分泌を抑えることにより、レーザー照射で発生する脈絡膜新生血管を抑制することが確認された。この効果は、血管内皮細胞に対する作用でも確認できる。以上のことから、9インテグリンリガンドを抑えることにより加齢黄斑変性症を治療できる可能性が示され、さらには中和抗体を用いた臨床的な研究の確立にもつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：This study provide evidence that endogenous alfa-9 integrin ligand including osteopontin or tenascin-C at physiological levels inhibits induced angiogenesis in laser-induced choroidal neovascularization (CNV) in vivo. Mechanism of action might include the effects of alfa-9 integrin ligand on vascular endothelial cells. Blocking alfa-9 integrin ligand activity might be a potential strategy for the prevention or treatment of CNV in an age-related macular degeneration (AMD) patient. A clinical trial by using antibody is to be set up for establishment of a new AMD treatment strategy.

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：9インテグリン 血管新生 脈絡膜 角膜 網膜

1. 研究開始当初の背景

(1) 血管新生は虚血による生理活性物質の発現や炎症組織での炎症細胞の発現するサイトカインなどの働きで誘導される。病的新生血管が原因となる脈絡膜の疾患として加齢性黄斑変性、近視性脈絡膜新生血管などがあり視機能の損傷が著しい。網膜では、血流閉塞に伴う新生血管を原因とした黄斑浮腫や、増殖組織からの牽引性網膜剥離による致命的な視力障害を生じる。角膜創傷治癒過程での角膜血管新生は角膜混濁を生じ、隅角での新生血管は難治性の血管新生緑内障に至る。眼科診療では、その部位に関わらず血管新生を制御することが重要な課題となっている。

(2) 実際の眼科診療においては血管新生成長因子(VEGF)を抑制するものとして、適応外使用されている bevacizumab や、日本でも治療薬として承認された pegaptanib、ranibizumab などがある。しかし生理的新生血管の抑制による弊害、血管閉塞性疾患の発生という合併症もあり、他の経路を介することで血管閉塞などの合併症を回避することが可能になるような治療の選択肢の多様性が求められている。

(3) $\alpha 9$ インテグリンは種々の細胞外マトリックス成分の受容体として働き、炎症細胞や血管内皮細胞の遊走・増殖に重要な働きを持つことが知られている。オステオポンチン(OPN)やテネイシンC(TN-C)は、 $\alpha 9$ インテグリンのリガンドとしても知られている。研究代表者と所属研究機関ではこれまでに、モデルマウスを用いた角膜創傷治癒過程で、角膜に発生する新生血管に対してOPNやTN-Cが促進的に作用していることを確認している。網膜新生血管や脈絡膜新生血管についても同様にOPNやTN-Cが促進的な作用を有し、それらを抑制する事により新生血管を抑

制する事が可能であると予想される。

(4) ルミカンは結合組織において糖タンパク質として発現し、角膜などではケラタン硫酸プロテオグリカンとして存在していることが知られているが、細胞外マトリックス成分として上皮間葉系移行(EMT)に影響することが認められている。晶体手術後の後発白内障組織内にOPN、TN-C、ルミカンが発現されていることが確認されており、OPN ノックアウトマウスではEMTの遅延が認められたとの報告がある。以上のことから、 $\alpha 9$ インテグリンのリガンドとしてEMTに関連するタンパクであるOPNやTN-Cと同様に、ルミカンにも血管新生に何らかの関連がある可能性が期待されるところである。

2. 研究の目的

(1) マウス角膜新生血管モデルにおいて、ルミカンの細胞外マトリックス成分が血管新生に対して促進的に働くと考えられる。またマウス脈絡膜血管新生モデルやマウス網膜血管新生モデルにおいてOPN、TN-C、ルミカンの細胞外マトリックス成分が血管新生に対して促進的に働くと考えられる。各モデルにおいて各細胞外マトリックス成分のノックアウトマウスを用いて野生種との血管新生の発現の違いを指標として創傷治癒や虚血からの血管新生に対して各細胞外マトリックス成分の促進的役割を解明し、各細胞外マトリックス成分の欠損が病的血管新生の発現を抑えることを確認する。

(2) OPNのペプチドであるSVVGLRや、TN-CのペプチドであるTNI11A2についてマウスの脈絡膜、網膜など眼組織での血管新生促進作用を確認し、SVVGLRやTNI11A2を投与することが生理的血管新生のコントロールへと応用可能かどうかを検討する。また、OPN、TN-C、ルミカンに対する中和抗体を用いることで各細胞外マトリックス成分の作用を抑

制し、脈絡膜、網膜での血管新生抑制作用を確認し、中和抗体の投与により病的血管新生を抑制することが可能かどうかを検討する。

(3) ノックアウトマウスで血管新生が抑制されていることが確認されれば、脈絡膜の血管新生形成による加齢性黄斑変性などに対して、OPN、TN-C、ルミカンに対する中和抗体を用いて各細胞外マトリックス成分の活性を抑制することにより病的血管新生を抑制して疾患を治療することが期待される。網膜血管新生モデルによって虚血伴う血管新生の抑制が確認されれば糖尿病網膜症や静脈閉塞などによる血管新生や増殖膜形成の抑制につながり、増殖硝子体網膜症や血管新生緑内障の予防及び治療に応用できることが期待される。角膜血管新生モデルによって角膜の血管新生の抑制の方法が確認されれば、線維芽細胞様変化によってもたらされる角膜の透明性の喪失によってもたらされる疾病の予防及び治療法への応用が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 血管新生に対する OPN の促進効果の確認と OPN 活性の抑制による効果の確認

培地全体に生育した皮膚線維芽細胞 (NHDF) 上に点在した正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) が増殖遊走して管腔を形成する血管新生キットを用いる。OPN 由来の SVVYGLR ペプチドを添加して実験を行い、ペプチド添加群ではペプチド非添加群と比較して間で管腔の形成が促進されているか検討する。また、NHDF と HUVEC の共培養で形成される管腔形成に対し、抗 OPN 抗体を添加して管腔形成に対して抗 OPN 抗体が抑制作用を示すかを検討する。

(2) 脈絡膜血管新生モデルにおける新生血管を指標とした OPN の役割

OPN ノックアウトマウス群および野生種マ

ウスの眼底に半導体レーザーで網膜光凝固を行い、各々の群で脈絡膜血管新生モデルを作成する。フルオレスセイン・デキストラン溶液を用いて脈絡膜新生血管を蛍光顕微鏡で観察し、発生した新生血管の面積を測定する。抗 OPN 中和抗体をマウスに投与し、同様に脈絡膜血管新生モデルを用いた実験を行い新生血管の動態を検討する。また、凍結切片を作成し、ノックアウトマウス群と野生種群での血管新生の出現について、及び各種サイトカイン、各種細胞骨格蛋白質と細胞間接着分子の発現について免疫組織化学的な比較検討等を行う。

(3) 血管新生に対する TN-C とルミカンの促進効果の確認と TN-C とルミカン活性の抑制による効果の確認

OPN と同様に培養血管新生細胞の管腔形成について検討する。TN-C の TN111A2 ペプチドを培養液に添加して新生血管を培養し、管腔長及び分岐数を測定し、ペプチドの血管新生に対する影響を確認する。TN-C と同様にルミカンを抗原としたポリクローナル抗体を作成し NHDF と HUVEC の共培養で形成される管腔形成に処理する。管腔形成について長さ及び分岐数での比較を行い、中和抗体が抑制作用を示すかを検討する。

(4) 角膜創傷治癒モデルにおける新生血管を指標としたルミカンの役割

ルミカンノックアウトマウス群と野生種 (C57Bl/6J) 群それぞれにおいて角膜創傷治癒モデルを作成する。凍結切片に対して抗 PECAM1 抗体や、抗 VEGF 抗体、あるいは抗 TGF 抗体などの各種サイトカイン抗体を反応させ、免疫組織化学的に検討する。血管新生の増殖については、角膜に伸展した新生血管の先端部の隅角からの距離を測定し、ノックアウトマウス群と野生種群との間で、血管新生の局在に差があるかを検討し、血管新生に

対するルミカンの働きについて予測する。

(5) 脈絡膜血管新生モデルにおける新生血管を指標とした TN-C、ルミカンの役割

OPNと同様にKOマウスを用いた絡膜血管新生モデルで検討する。TN-C、ルミカンそれぞれのKOマウス群および野生種群の眼底に半導体レーザー網膜光凝固を行い、各々の群で脈絡膜血管新生モデルを作成する。経時的に屠殺後に眼球を摘出し、フルオレスセイン・デキストランで新生血管の程度を蛍光顕微鏡で検討する。

(6) 網膜血管新生モデルにおける新生血管を指標とした TN-C、ルミカンの役割

OPNと同様にKOマウスを用いた網膜血管新生モデルで検討する。各細胞外マトリックス成分 KOマウス群と野生種群での網膜血管新生モデルでの動態について比較検討を行う。角膜創傷治癒モデルや脈絡膜血管新生モデルと同様に、フルオレスセイン・デキストランで新生血管の程度を蛍光顕微鏡で検討する。さらに、血管新生の出現については各種サイトカイン、各種細胞骨格蛋白質と細胞間接着分子の発現について、ウェスタンブロット法、免疫組織化学法を用いて検討し、mRNAの発現状況について RNAscope を用いた非放射性 in situ hybridization 法、RT-PCR 法によって検討する。

(7) 骨髄移植による炎症反応の由来の検討

骨髄移植を用いて作成されたキメラマウスを用いて、角膜創傷治癒モデル、脈絡膜創傷治癒モデル、網膜創傷治癒モデルを作成する。OPN、TN-C、ルミカンそれぞれについて、KOマウスと野生種マウスとの比較で得られた結果が、キメラマウスではどのような変化をするのかを検討する。それにより炎症反応の由来が骨髄系細胞かどうかを検証する。

4. 研究成果

(1) OPNノックアウト用いた脈絡膜新生血管モデルマウス実験によると、OPNがノックアウトされることにより脈絡膜新生血管が抑制される事が明らかになった。また、OPN中和抗体を投与したマウスの実験においては、ノックアウトと同様に中和抗体を投与することによっても脈絡膜新生血管が抑制されることが明らかとなった。また、骨髄移植を利用したOPNの作用を確認する実験においては、OPNの作用は骨髄系細胞が由来となる可能性が示唆された。

(2) 同様の実験を、TN-Cノックアウトマウスを用いて行ったところ、OPNと同様にTN-Cを抑制することにより角膜の新生血管抑制作用および、脈絡膜新生血管の抑制作用が得られることが確認された。

(3) これらのことから、加齢黄斑変性症などの脈絡膜新生血管を病因とする疾患の治療として抗VEGF抗体が用いられているが、抗OPN抗体が新しい治療薬となりうる可能性が示唆された。

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2件)

Fujita N, Fujita S, Ogata N, Matsuoka M, Okada Y, Kon S, Ueda T, Saika S. Endogenous osteopontin involvement in laser-induced choroidal neovascularization in mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Dec 2;52(13):9310-5. 査読有

Sumioka T, Fujita N, Kitano A, Okada Y, Saika S. Impaired angiogenic response in the cornea of mice lacking tenascin C. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Apr 16;52(5):2462-7.

[学会発表](計11件)

藤田識人、岡田由香、雑賀司珠也 : NOS2

欠損マウスにおける脈絡膜神経血管の
遺伝子発現 .第 116 回日本眼科学会総会,
2012.4 . 東京

住岡孝吉、田中才一、泉谷愛、藤田識人、
岡田由香、雑賀司珠也：テネイシン C
欠損マウスにおける角膜創傷治癒の障
害 . テネイシンフォーラム、2011.11

Fujita N, Sumioka T, Okada Y, Saika S : The role
of Extracellular Matrix Components in Corneal
Neovascularization : Osteopontin and Tenascin
C. 2011 Korea-Japan Joint Cornea Conference,
2011.10. Seoul

Sumioka S, Fujita N, Kitano A, Okada Y, Saika
S: Impaired Angiogenic Response and Wound
Healing in the Cornea of Mice Lacking Tenascin
C.第10回オステオポンチン研究会. 2011.6.札幌
Fujita N, Nishimoto S, Miyamoto T, Okada Y,
Saika S: Loss of nitric oxide synthase type II
inhibits formation of corneal

neovascularization and Argon laser-induced
choroidal neovascularization in mice. ARVO
2011.5 Florida, USA

藤田識人、岡田由香、雑賀司珠也：NOS2
欠損マウスにおける脈絡膜神経血管の
動態 . 第 115 回日本眼科学会総会、
2011.5.東京

Sumioka T, Kitano A, Fujita N, Okada Y, Saika
S : Impaired angiogenic response in cornea by
lacking tenascin C in mice. ARVO, 2010.5
Florida, USA

Fujita N, Okada Y, Ueda T, Matsuoka M, Ogata
N, Miyajima M, Saika S: Roles of osteopontin
in development of choroidal
neovascularization in mice. ARVO, 2010.5
Florida, USA

住岡孝吉、岡田由香、藤田識人、北野愛、
雑賀司珠也：角膜創傷治癒過程での角膜
血管新生におけるテネイシン C の役割 .
第 114 回日本眼科学会総会、2010.4 . 名
古屋

藤田識人、岡田由香、上出利光、松岡雅
人、緒方奈保子、雑賀司珠也：脈絡膜血
管新生に対するオステオポンチンの作
用の検討 . 第 114 回日本眼科学会総会、
2010.4 . 名古屋

藤田識人、岡田由香、上出利光、松岡雅
人、緒方奈保子、雑賀司珠也：細胞外マ
トリックスによる血管新生制御：角膜と
脈絡膜 . 第 12 回ボーダレス眼科臨床研
究会、2010.4. 大阪

〔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
藤田 識人 (FUJITA Norihito)
和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：
10453177

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

