

## 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 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012

課題番号：24890117

研究課題名（和文） アペリンによる網膜血管障害疾患の新規治療

研究課題名（英文） Novel therapeutic approach using apelin signal for retinal vascular diseases.

研究代表者 崎元 晋 (SAKIMOTO SUSUMU)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60633047

研究成果の概要（和文）：受容体をノックアウトした APJKO マウスの血管発生期（P5）において、FITC dextran(4.4 kDa, 50 mg/mL, 50 mg/kg)を胎仔心臓から注入したところ、同齢野生型においてフラットマウント免疫染色において網膜血管からの蛍光漏出を認めた。そのため、網膜血管においてもアペリン/APJ 系は血管の透過性制御に関わっていることが示された。また 8 週齢 APJ ノックアウトマウスにレーザーによる実験的脈絡膜新生血管（CNV）モデルを作成したところ、CNV は野生型に比較し APJ ノックアウトマウスで有意に小さく（ $p < 0.001$ ）、アペリン/APJ 系が加齢黄斑変性症にも関与していることが示された。一方、網膜における生理的な血管新生において、アペリン/APJ 系は未熟なグリア細胞を成熟化させ、血管新生を抑制する働きを既に報告しているが (Sakimoto et al. 2012)、CNV モデルにおいては、GFAP 陰性 PDGFR $\alpha$  陽性の未熟なグリア細胞は認められず、本経路とは別のメカニズムで CNV に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Using FITC dextran and anti-PECAM-1 antibody in flatmount immunohistochemistry, we checked the role of apelin/APJ signal for barrier function in retinal vessels. After injection of FITC dextran from heart, leakage of dye from developing retinal vessel was observed in APJ knockout (APJ KO) mice compared to wildtype at postnatal day 5. In laser-induced choroidal neovascularization (CNV) model, the size of CNV lesion was significantly decreased in APJ KO mice. Otherwise, an immature glial cell, namely, PDGFR $\alpha$  positive and GFAP negative cell was not found in both wild-type and APJ KO mice. These data suggests that the formation of CNV might be involved in immature glial cells-independent mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,200,000	360,000	1,560,000

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：アペリン APJ 血管新生 グリア細胞

### 1. 研究開始当初の背景

7回膜貫通型受容体である APJ は G タンパク共役型受容体で、そのリガンドとして生理活性物質 apelin が同定され、apelin は血管の安定化に働くアンジオポエチン 1/Tie2 シグナルの下流因子に位置する。本シグナルは未熟な血管を成熟化・安定化することが報告されており、apelin は VEGF 阻害のみにターゲットを絞った現行の眼科治療を大きく変える可能性がある。

### 2. 研究の目的

アペリンシグナルの網膜血管障害における役割を明らかにすること。また、グリア細胞が血管新生に関わるメカニズムを明らかにするため、血管新生時にグリア細胞に発現する因子を探索することとした。

### 3. 研究の方法

網膜血管の透過性の判定のため、野生型マウスおよび APJ ノックアウト (APJ KO) マウスの生後 5 日のマウス新生仔に FITC デキストラン (4.4 kDa, 50 mg/mL, 50 mg/kg) を心臓から注入し、抗 PECAM-1 抗体を用いて、フラットマウント免疫染色法により漏出の程度を判定する。

またレーザー誘導型脈絡膜新生血管 (CNV) モデルにおいて、アペリン/APJ シグナルの関与を明らかにするため、8 週齢の野生型マウスおよび APJ KO マウスにレーザーを照射 (50 $\mu$ m $\times$ 0.01sec $\times$ 100mW) し、1 週間後眼球摘出し、抗 PECAM-1 抗体を用いて脈絡膜フラットマウント免疫染色法に CNV の大きさを判定する。加えて抗 PDGFR $\alpha$  抗体および抗 GFAP 抗体を用いて、免疫染色を行う。

加えて、グリア細胞の血管新生に関わる因子を検討した。網膜血管発生期におけるアストロサイトは血管新生に密接に関与しているといわれているが、網膜内層において旺盛に血管新生が起こる時期と血管新生が終了した時期にグリア細胞に発現する遺伝子をマイクロアレイ法にて網羅的に探索することとした。具体的には生後 3 日と生後 9 日の野生型マウス仔の網膜に対して酵素処理を行い、PDGFR $\alpha$  陽性細胞をフローサイトメトリーにて単離し、mRNA を抽出、マイクロアレイにて発現遺伝子を網羅的に探索した。

### 4. 研究成果

デキストランを用いた血管透過性に関する研究では、APJ KO マウスでは、発生期の網膜血管から色素の漏出がみられ、APJ 欠失による透過性の亢進が考えられた (図 1)。また、血管障害疾患の病態としては、上述のように透過性亢進による網膜浮腫だけでなく、血管新生による病態も中心的な役割を果

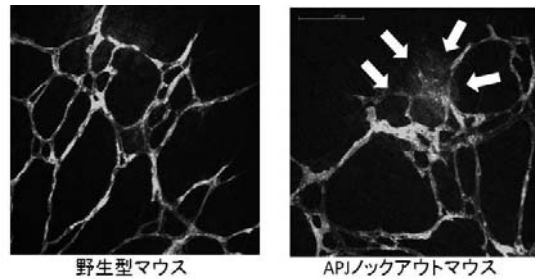


図1 FITCデキストランによる透過性の検討(フラットマウント法)  
APJノックアウトマウスでは網膜血管から色素の漏出が見られる(矢印)

たす。眼内血管新生モデルとしては、高圧酸素モデルによる未熟児網膜症モデルとレーザー照射による脈絡膜血管新生 (CNV) モデルが頻用されるが、本研究ではレーザー誘導型 CNV を用いた。8 週齢の APJ KO マウスにレーザー誘導 CNV を作成したところ、野生型に比較し 50%程度その大きさは減少していた (図 2)。

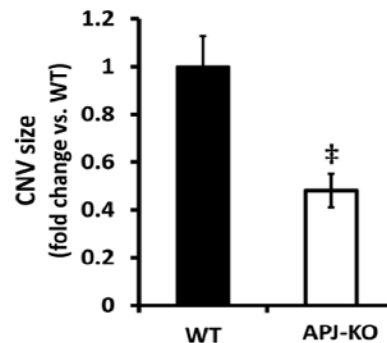
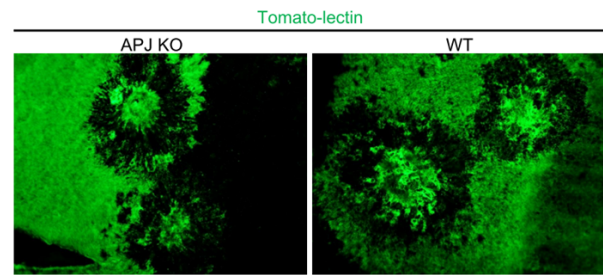


図2 レーザー誘導CNVの比較  
APJ KO (APJノックアウト) マウスでは CNV サイズが優位に小さい。

我々は、網膜血管新生における未分化なアストロサイトが血管新生に関わることを示し、それらが血管成熟化因子であるアペリンによって調節されることを示した (Sakimoto S et al. 2012.)。CNV モデルにおいても未分化なグリア細胞が血管新生の病態に関与するかは不明である。上記を検討する目的で、野生型マウスおよび APJ 欠損マウスにおける未分化グリア細胞を検討した。野生型 CNV 眼では PDGFR $\alpha$  陽性 GFAP 陰性細胞であるいわゆる未熟なグリア細胞は存在しておらず (図 3)、CNV におけるグリア細胞の関与は低いものと考えられた。同様に APJ 欠損マ

ウスでも未分化なグリア細胞の検出は免疫染色法においては、認めなかった。

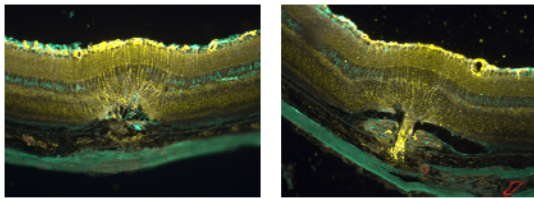


図3 レーザー誘導CNVにおけるグリア細胞の比較  
免疫染色 黄:GFAP陽性グリア細胞 緑:PDGFRα陽性グリア細胞  
APJ KO(APJノックアウト)マウス(左)および野生型マウス(右)では  
グリア細胞には大きな違いを認めない

さらに、ヒト増殖糖尿病患者より切除された線維血管増殖膜におけるアペリン/APJ系の発現を確認するべく、現在附属病院倫理委員会への臨床研究計画作成中である。

血管新生期に発現する因子の探索については、マイクロアレイ法によって様々な候補遺伝子が検出された。発現強度、特異性、遺伝子情報などから、遺伝子の絞込みを行い、さらに血管新生期、血管新生終了期のアストロサイトより抽出したcDNAより定量的PCRで候補遺伝子を検出したところ、アドレノメデュリンが挙げられた。アドレノメデュリンの受容体はGタンパク共役型でありカルシトニン受容体様受容体に二つの受容体活性調節蛋白が作用することによって形成される。また、生体内の機能としては、降圧作用、血管新生作用、血管成熟化作用が報告されており、アペリン/APJシグナルとの類似点も多いと考えられた。ただし、眼科領域、特に血管障害モデルでのアドレノメデュリンの機能解析は未解明の部分が多く、今後の研究ではアドレノメデュリンの疾患における役割を明らかにする研究も進行させる予定である。

#### まとめ

本研究機関において、アペリンシグナルの血管障害における役割を明らかにした。具体的には、網膜血管透過性における役割をAPJノックアウトマウスの血管発生期において検討し、血管新生における役割について同様にノックアウトマウスを用いて、レーザー誘導CNVモデルで検討した。透過性亢進および血管新生のいずれにもアペリンシグナルが関与していることが示されたが、血管透過性については、他にも実験モデルが存在するため、眼内VEGF投与モデルなどでの検討が必要と思われる。またCNVモデルではAPJノックアウトマウスでは血管新生が抑制されており、アペリンシグナルは疾患モデルにおいては負の作用をもたらすと考えられたが、既報のような未分化グリア細胞の血管新生に対する関与が低いと考えられた。この点においては、CNVは網膜細胞より色素上皮細胞や

単球由来細胞の関与が大きいものによるものと考えられた。今後はよりグリア細胞の影響によると思われる糖尿病網膜症の増殖膜モデルにおける役割を明らかにすることにより、血管新生に対する影響を検討することが次年度以降の課題となると思われる。

#### 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2件)

1. Sakimoto S, Kamei M, Suzuki M, Yano S, Matsumura N, Sakaguchi H, Gomi F, Nishida K. Relationship between grades of macular perfusion and foveal thickness in branch retinal vein occlusion. *Clin Ophthalmol.* 2013; 7: 39-45.
2. Muramatsu F, Kidoya H, Naito H, Sakimoto S, Takakura N. microRNA-125b inhibits tube formation of blood vessels through translational suppression of VE-cadherin. *Oncogene.* 2013; 32: 414-21.
3. 崎元晋、瓶井資弘 「網膜静脈閉塞症」『Retina Medicine』、先端医学社、1号、pp30-34、2012
4. 崎元晋、坂口裕和 「網膜下液排液」『眼科グラフィック』、メディカ出版、2号、pp58-62、2012
5. 崎元晋、瓶井資弘 「網膜静脈閉塞症」『眼科診療クオリファイ』、中山書店、15号、pp287-291、2012

[学会発表] (計3件)

- 1) 崎元晋 招待講演シンポジウム「硝子体注射時代におけるBRVOに対する血管標的レーザー」『第51回網膜硝子体学会総会』、山梨、2012年12月
- 2) Sakimoto S. 「A role for endothelial cells in promoting maturation of astrocytes through the apelin/APJ system in mice」『The 8<sup>th</sup> International Symposium of Ophthalmology』, Hong Kong, Dec 15<sup>th</sup>, 2012

3) Sakimoto S. 「A role for endothelial cells in promoting maturation of astrocytes through the apelin/APJ system in mice」 『The 28<sup>th</sup> Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress』, Hyderabad, India, Jan 18<sup>th</sup>, 2013

〔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

崎元 晋 (SAKIMOTO SUSUMU)  
大阪大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：60633047

(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：