

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462734

研究課題名(和文) 加齢黄斑変性の病態におけるAngptl2の意義の解析

研究課題名(英文) Investigation of ANGPTL2 involvement in pathogenesis of age-related macular degeneration.

研究代表者

平沢 学 (HIRASAWA, MANABU)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：80365345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ANGPTL2はマウスレーザー脈絡膜新生血管(CNV)病変部に局在し、ANGPTL2欠損マウスではCNV容積と炎症性メディエーター発現の抑制を認め、ANGPTL2のCNV病態への関与が示唆された。骨髄移植モデルでは、網膜組織ならびにマクロファージ双方由来のANGPTL2がCNV形成に関与していた。培養マクロファージでは、ANGPTL2添加でERK1/2とNF- $\kappa$ Bのリン酸化、炎症性メディエーターの発現亢進、およびマクロファージ遊走促進を認め、それらはインテグリン  $\alpha$ 4および  $\beta$ 2中和交代によって抑制された。ANGPTL2はCNV治療の新たなターゲットとして期待される。

研究成果の概要(英文)：ANGPTL2 was localized at lesion of laser-induced choroidal neovascularization in mice, and reduction of CNV volume and CNV-induced pro-inflammatory mediators were observed at ANGPTL2 deficient mice, indicating involvement of ANGPTL2 in CNV pathogenesis. In bone marrow transplantation model, both ANGPTL2 from retinal tissue and macrophage participated CNV development. In vitro study, phosphorylation of NF- $\kappa$ B and ERK1/2, acceleration of pro-inflammatory mediators, and macrophage migration were driven by recombinant ANGPTL2; suppressed by integrin  $\alpha$ 4 and/or  $\beta$ 2 neutralizing antibody. ANGPTL2 and its signal induction might be new therapeutic target against age-related macular degeneration.

研究分野：眼科学

キーワード：アンジオポイエチン様タンパク 加齢黄斑変性 脈絡膜新生血管 マクロファージ

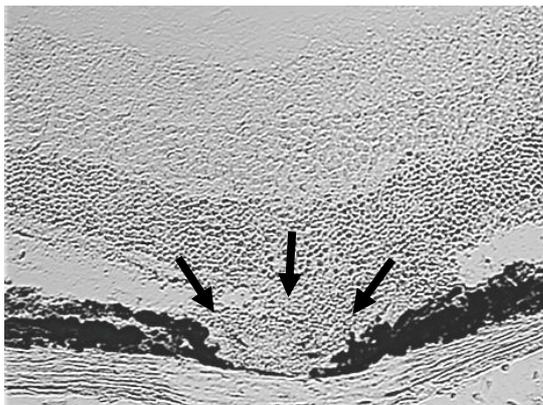
1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性(AMD)は脈絡膜新生血管(Choroidal neovascularization: CNV)を本態とする、中途失明原因の上位を占める疾患である。我が国でも食の欧米化に伴い増加したと考えられており、その原因究明および発症予防・早期治療が急務となっている。血管内皮増殖因子(VEGF)を分子指標とした治療によって、AMDの予後は改善したものの、抗VEGF剤に対する反応不良例もあり、予後不良例は依然として存在する。さらなるAMDの病態解明と新しい治療法の開発が求められている。

2. 研究の目的

脂肪細胞から分泌されるアディポカインの一つであるアンジオポイエチン様タンパク2(Angiopoietin-like protein 2: 以下Angptl2)は、マクロファージ遊走能を持ち、肥満病態を悪化させると共に、血管新生促進因子としても知られる。近年の研究では様々な加齢性疾患の発症、進展に関与することが報告されている。そこで、今回申請者らは、Angptl2に着目し、AMDの病態に関与する可能性を解析し、将来的に、新規治療法の開発に役立つ研究を計画した。

3. 研究の方法

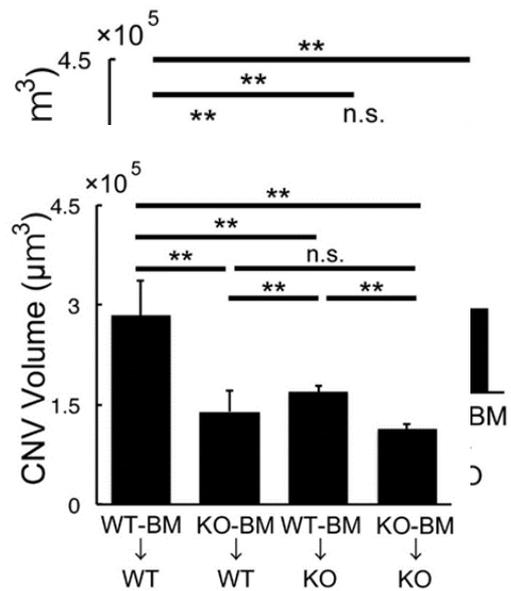


レーザーCNVモデル(上図 矢印はレーザー照射部位から出現するCNV)を用いて、マウス眼球からの脈絡膜新生血管および集積マクロファージの解析と、網膜色素上皮脈絡膜組織から抽出したRNAを用いて定量PCR解析を行った。野生型マウスおよびAngptl2ノックアウトマウスを用いて表現型の差異につき検討した。ついで骨髄移植モデルを用い、野生型およびAngptl2ノックアウトマウス骨髄由来細胞を移植し、CNV容積および集積するマクロファージを検討した。更に、マウス腹腔刺激誘導マクロファージおよびマウスマクロファージの培養細胞種であるRAW264.7 cellを用いてANGPTL2添加による炎症性メディエーターの発現変動とそのシグナルについて解析した。

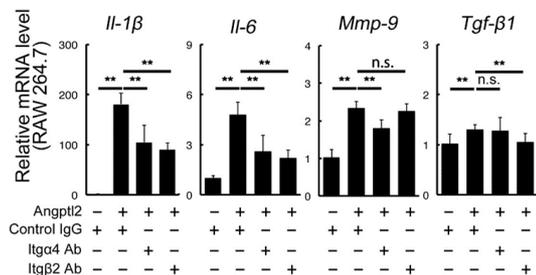
4. 研究成果

研究の主な成果

レーザーCNVモデルにおいて、Angptl2はレーザー照射部位周囲およびマクロファージとの共染色像を認め、mRNAはレーザー照射後二峰性の発現上昇を認めた。また、Angptl2ノックアウトマウスではCNVの容積およびマクロファージ集積の抑制を認めたことから、Angptl2はレーザーCNVモデルにおいてpro-inflammatory/pro-angiogenicに働いている可能性が示唆された。CNV形成には網膜組織とマクロファージ双方が関与していることから、どちらのAngptl2



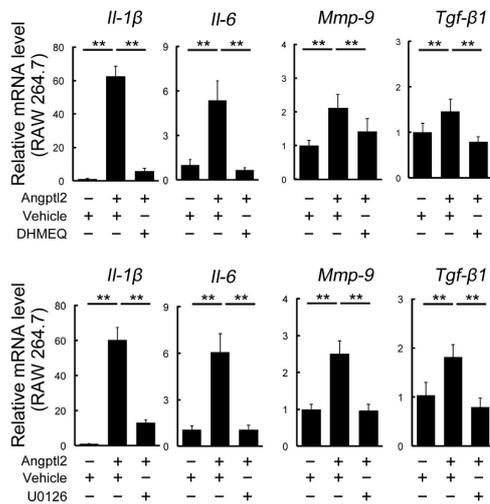
上図に示されるように、野生型マウスの骨髄由来細胞を移植した例と比較して、ノックアウトマウスで骨髄由来細胞を移植した例ではCNV容積が有意に減少していた。また、この実験に先立ちCNVレーザーモデルに関与している骨髄由来細胞につき検討したところ、マクロファージが主に働いていることを確認しており、マクロファージからのAngptl2が優位にCNV形成に関与していることが示唆された。そこで、次にマクロファージに着目して更なる解析を行った。



Angptl2はインテグリンシグナルを介して組織炎症に関与していることが報告されて

いる。RAW264.7 cell に Angpt12 を添加したところ、CNV 形成に深く関与していることが明らかとなっている炎症性メディエーター IL-1 , IL-6, Mmp-9, Tgf- 1 の発現が亢進しており、それらはインテグリン 4 および 2 の中和抗体によって抑制されていた。

また、ウェスタンブロットングを用いて Angpt12 添加による p65 NF- B および ERK1/2 のリン酸化を認めており、これらはインテグリン 4 および 2 の中和抗体によって抑制されることから、インテグリンシグナルを介して NF- B および ERK1/2 のリン酸化を通じ、炎症性メディエーターの発現に関与していることが予想された。更に、NF- B の核内移行を阻害する DHMEQ および ERK1/2 をリン酸化活性化させる酵素である、MEK1 および MEK2 の高選択的阻害剤 U0126 を用いた検討を実施した。

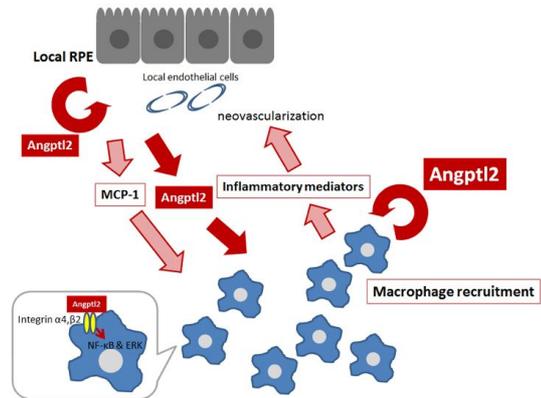


上図に示されるように、Angpt12 によって発現が亢進している炎症性メディエーターは DHMEQ および U0126 によって抑制されており、NF- B、ERK を介したシグナルであることを確認した。

更に、マクロファージの病変部への遊走に Angpt12 が関与しているかを検討するために、Transwell を用いた Migration Assay を実施した。Transwell の上部リザーバーに培養マクロファージを入れ、下部チャンバーに Angpt12 を添加溶液およびコントロールを入れ、24 時間後に小孔を通して下部へ遊走するマクロファージを、カルセイン-AM を用いて染色、比色定量を行った。その結果、マクロファージの遊走能は Angpt12 添加によって亢進しており、それらは DHMEQ および U0126 によって抑制されており、siRNA による NF- B/ERK のノックダウンによっても同様の結果が得られた。このことから、Angpt12 は NF- B、ERK1/2 を介して遊走能を亢進させているものと考えられた。

以上の結果から、Angpt12 は CNV モデルにおいて、病変部へのマクロファージ誘導およびマクロファージからの炎症性メディエ

ター発現亢進を介して CNV 形成促進に働きかけていると考えられた。本研究を通じて得られた結果から考えられる、Angpt12 を介した CNV 病態のメカニズム仮説を下図に示す。



## 今後の展望

現在行われている AMD 治療は新生血管が標的であり、その前段階であるマクロファージの病変部集積に関与する ANGPTL2 を抑えることで、多段階に CNV 発生を抑制できる可能性が期待された。

また、インテグリンを分子指標とした AMD 治験計画が海外より報告されているが、それらは全て血管内皮をターゲットとしており、マクロファージに着目したものは殆どない。今回得られた研究成果から、インテグリン 4、2 も新たなターゲットとなりうる可能性が示唆され、今後の臨床への応用が期待された。

## 5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計3件)

1. Hirasawa M, Takubo K, Osada H, Miyake S, Toda E, Endo M, Umezawa K, Tsubota K, Oike Y, and Ozawa Y. Angiotensin-like Protein 2 is a Multistep Regulator of Inflammatory Neovascularization in a Murine Model of Age-related Macular Degeneration. *The Journal of Biological Chemistry*. 査読有 . 291(14), 2016, 7373-7385. DOI: 10.1074/jbc.M115.710186

2. Narimatsu T, Negishi K, Miyake S, Hirasawa M, Kurihara T, Tsubota K, Ozawa Y. Blue light-induced inflammatory marker expression in the retinal pigment epithelium-choroid of mice and the protective effect of a yellow intraocular lens material in vivo. *Experimental Eye Research*. 査読有. 132, 2015, 48-51. doi: 10.1016/j.exer.2015.01.003.

3. Narimatsu T, Ozawa Y, Miyake S, Kubota

S, Hirasawa M, Nagai N, Shimmura S, Tsubota K. Disruption of cell-cell junctions and induction of pathological cytokines in the retinal pigment epithelium of light-exposed mice. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 査読有. 54(7), 2013, 4555-4562. doi: 10.1167/iovs.12-11572.

なし

〔学会発表〕(計3件)

1. 小沢洋子.平沢学 他 マウス脈絡膜新生血管モデルにおける Angiopoietin-like protein 2 の役割 第14回日本抗加齢学会総会 2014/6/6-8 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

2. Hirasawa M, Endo M, Kamoshita M, Miyake S, Narimatsu T, Nagai N, Tsubota K, Ozawa Y.

Involvement of Angiopoietin-like protein 2 in Laser-induced Choroidal Neovascularization. The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting 2013/5/5-9 シアトル(アメリカ)

3. Narimatsu T, Miyake S, Kubota S, Hirasawa M, Nagai N, Tsubota K, Ozawa Y. Disruption of cell-cell junctions and induction of pathological cytokines in the retinal pigment epithelium of light-exposed mice. The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting 2013/5/5-9 シアトル(アメリカ)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平沢 学 (HIRASAWA MANABU)  
慶應義塾大学・医学部・共同研究員  
研究者番号: 80365345

### (2) 研究分担者

小沢 洋子 (OZAWA YOKO)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号: 90265885

### (3) 連携研究者