

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670732

研究課題名(和文) 糖尿病黄斑浮腫に対するAng2阻害療法の開発

研究課題名(英文) Development of anti-Ang2 therapy for the treatment of diabetic macular edema

研究代表者

植村 明嘉 (Uemura, Akiyoshi)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30373278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病黄斑浮腫に対してはVEGF阻害剤を用いた薬物療法が普及しているが、治療効果が不十分なため、新たな創薬開発が待望されている。本研究では、網膜血管のペリサイトを消失させて網膜浮腫を再現した糖尿病網膜症モデルマウスにおいて、血管内皮細胞のAngiopoietin-2 (Ang2) 発現が上昇していることを確認した。さらに抗Ang2阻害抗体の眼内投与により、ペリサイト消失網膜の浮腫が抑制されることを確認した。すでに複数のAng2阻害薬が開発されていることから、糖尿病黄斑浮腫に対するAng2阻害療法の実現が期待される。

研究成果の概要(英文)：Anti-VEGF therapy has globally become the major modality for the treatment of diabetic macular edema (DME). However, because of its insufficient efficacy, development of new drugs for DME is desired. Here, by utilizing a mouse model of diabetic retinopathy which reproduces retinal edema resulting from loss of pericytes, we observed up-regulation of Angiopoietin-2 (Ang2) in endothelial cells of pericyte-free retinal vessels. Furthermore, intraocular injections of anti-Ang2 blocking antibody suppressed retinal edema even in the absence of pericytes. Given that several pharmaceutical companies have developed a series of anti-Ang2 drugs, anti-Ang2 therapy is expectably feasible for the treatment of DME.

研究分野：眼科学

キーワード：糖尿病黄斑浮腫 網膜 ペリサイト Ang2

1. 研究開始当初の背景

糖尿病黄斑浮腫に対しては従来からのレーザー光凝固に加えて、ステロイド剤や血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) 阻害剤を用いた薬物療法が広く普及している。しかし治療に不応性の患者も多いことに加え、治療効果が得られた場合でも黄斑浮腫が高頻度に再発するため、新たな創薬開発が待望されている。

糖尿病黄斑浮腫は、網膜毛細血管壁におけるペリサイト (周皮細胞) が変性・脱落して血管透過性が亢進することにより発症すると考えられている。しかしマウスやラットを用いた糖尿病モデル動物では網膜血管壁のペリサイト脱落を再現できないことが、糖尿病黄斑浮腫の病態解明や治療法開発を進める上で大きな障壁となっている。

我々は新生仔マウスの腹腔内に抗血小板由来増殖因子受容体 β (Platelet-Derived Growth Factor Receptor β , PDGFR β) 阻害抗体を投与することにより、網膜血管のペリサイトを消失させ、浮腫を再現することに成功している (Uemura et al. *J Clin Invest* 2002)。さらに網羅遺伝子発現解析により、ペリサイトを消失した網膜血管内皮細胞では Angiopoietin-2 (Ang2) の発現が亢進することを確認している。Ang2 は内皮細胞に発現する Tie2 チロシンキナーゼ受容体に結合するが、Tie2 の活性化は誘導しないため、Ang1 の内在性アンタゴニストとして作用する (Maisonpierre et al. *Science* 1997)。さらに Ang2 は VEGF と協同して血管透過性・血管新生を促進するため、現在までに複数の Ang2 阻害薬が開発されており、米国では VEGF 阻害薬と組み合わせて腫瘍血管新生阻害効果を検証する臨床試験が実施されている。こうした背景から、糖尿病黄斑浮腫に対する Ang2 阻害療法が有効である可能性が期待される。

2. 研究の目的

ペリサイト消失による糖尿病網膜症モデルマウスを用いて網膜浮腫における Ang2 の役割を解明し、Ang2 阻害薬による浮腫改善効果を検証する。

3. 研究の方法

・新生仔マウス (野性型 C57BL/6 または ICR) の腹腔内に抗 PDGFR β 阻害抗体 (clone APB5) を投与し、網膜血管におけるペリサイト集積を阻害した。

・網膜ホールマウント標本を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、免疫組織化学染色または in situ hybridization により Ang2 発現を同定した。

・Ang2-lacZ および Ang2-GFP レポーターマウスを用いて、網膜における Ang2 発現を同定した。

・ガラスキャピラリーを装着したマイクロインジェクターにより Ang2 阻害抗体をマウス眼内に注射した後に網膜パラフィン薄切切

片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色により網膜組織構造を観察した。

・成体マウス腹腔内にアクリジンオレンジを投与した上で超広角蛍光眼底カメラにより網膜内に浸潤した白血球を観察した。

4. 研究成果

・新生仔マウス網膜では出生直後から血管発生が開始するが、ほぼ全ての内皮細胞はペリサイトにより被覆されていた。

・抗 PDGFR β 阻害抗体の腹腔内投与によりペリサイト被覆が阻害された網膜では血管が拡張・蛇行するとともに、生後 8 日頃から浮腫・出血が急速に進行した。

・正常マウス網膜では Ang2 が新生血管先端部の内皮細胞に限局して発現するのに対し、ペリサイト消失網膜血管では広範囲にわたって内皮細胞の Ang2 発現が上昇した。

・抗 PDGFR β 阻害抗体の腹腔内投与と抗 Ang2 阻害抗体の眼内投与を組み合わせると、網膜血管のペリサイトが消失しているにもかかわらず、網膜浮腫・出血が抑制された。

・抗 PDGFR β 阻害抗体の投与量・投与時期を調整することにより、成体に至っても網膜血管異常が持続するモデルマウスの作成に成功した。

・成体網膜症モデルマウスでは、網膜内への白血球浸潤が持続しており、ペリサイト消失により網膜の炎症が遷延化することが明らかとなった。

・成体網膜症モデルマウスの眼内に抗 Ang2 阻害抗体を投与すると網膜内白血球浸潤が抑制された。

・以上の結果から、糖尿病網膜症においてペリサイト消失に起因する網膜血管バリア機能の破綻や炎症が、Ang2 阻害療法により改善される可能性が示唆された。

・今後さらに、ペリサイト消失網膜症モデルマウスを用いて VEGF 阻害薬と Ang2 阻害薬同時投与の相乗効果について検討し、糖尿病黄斑浮腫に対する新規創薬開発に展開する。

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 5 件)

1. Kim C, Yang H, Fukushima Y, Saw PE, Lee J, Park JS, Park I, Jung J, Kataoka H, Lee D, Heo WD, Kim I, Jon S, Adams RH, Nishikawa S, Uemura A, Koh GY. Vascular RhoJ is an effective and selective target for tumor angiogenesis and vascular disruption. *Cancer Cell*. 25:102-117, 2014. doi: 10.1016/j.ccr.2013.12.010. (査読有)

2. Uemura A. Identification of novel drug targets for the treatment of diabetic retinopathy. *Diabetes Metab J*. 37:217-224, 2013. doi: 10.4093/dmj.2013.37.4.217. (査

読無)

3. 植村明嘉. 網膜血管新生における網羅遺伝子発現解析. *血管医学* 14:369-375, 2013. (査読無)
4. 植村明嘉. 糖尿病網膜症に対する新規創薬標的分子の探索. *日本糖尿病眼学会誌* 18:26-28, 2013. (査読無)
5. 植村明嘉. 網膜症における血管新生. *糖尿病合併症* 27:72-75, 2013. (査読無)

[学会発表] (計 18 件)

1. 第 119 回日本眼科学会総会シンポジウムロイトン札幌 (北海道札幌市) 2015 年 4 月 16 日
植村明嘉: 糖尿病網膜症モデルマウスを用いた創薬開発
2. Asia-ARVO 2105 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2015 年 2 月 16 日
Uemura A: Pathophysiology of pericyte-free retinal vessels.
3. 第 68 回日本臨床眼科学会ランションセミナー 神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市) 2014 年 11 月 14 日
植村明嘉: 基礎から考える糖尿病黄斑浮腫治療
4. The 2nd Ad Hoc IRCNS Seminar 熊本大学 (熊本県熊本市) 2014 年 10 月 27 日
植村明嘉: Novel drug targets for the treatment of diabetic retinopathy.
5. 2014 International Conference on Diabetes and Metabolism イルサン (韓国) 2014 年 10 月 18 日
Uemura A: Novel molecular targets for the treatment of diabetic retinopathy.
6. 第 3 回代謝と脳心血管疾患研究会 京都タワーホテル (京都府京都市) 2014 年 9 月 20 日
植村明嘉: 糖尿病網膜症に対する創薬開発
7. 第 5 回 Molecular Cardiovascular Conference II 神戸ベイシェラトンホテル&タワーズ (兵庫県神戸市) 2014 年 9 月 5 日
植村明嘉: 網膜血管新生病に対する治療戦略
8. 第 16 回 Japan Macula Club 蒲郡クラシックホテル (愛知県蒲郡市) 2014 年 8 月 23 日
植村明嘉: 糖尿病網膜症に対する創薬開発
9. 18th International Vascular Biology Meeting みやこめっせ (京都府京都市) 2014 年 4 月 14 日
Uemura A: RhoJ defines angiogenic endothelial cell motility by integrating VEGF and Sema3E signals.
10. 第 39 回日本微小循環学会総会 北里大学 (東京都港区) 2014 年 2 月 8 日
植村明嘉: RhoJ defines angiogenic endothelial cell motility by integrating VEGF and Sema3E signals.
11. 2nd Cornea Cell Biology Symposium at Wakayama 和歌山医科大学 (和歌山県和歌山市) 2013 年 11 月 10 日
Uemura A: Regulation of ocular angiogenesis and lymphangiogenesis by guidance molecules.
12. 第 67 回日本臨床眼科学会シンポジウム パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2013 年 11 月 1 日
植村明嘉: 糖尿病網膜症に対する創薬標的分子の探索
13. EMBO Workshop. Semaphorin function and mechanism of action パリ (フランス) 2013 年 10 月 30 日
Uemura A: RhoJ defines endothelial cell motility by integrating VEGF and Sema3E signals.
14. 第 21 回日本血管生物医学会シンポジウム 千里阪急ホテル (大阪府豊中市) 2013 年 9 月 26 日
植村明嘉: RhoJ defines endothelial cell motility by integrating VEGF and Sema3E signals
15. 第 15 回 Japan Macula Club 蒲郡クラシックホテル (愛知県蒲郡市) 2013 年 8 月 17 日
植村明嘉: 糖尿病黄斑浮腫に対する創薬開発
16. Gordon Research Conference. Angiogenesis ニューポート (米国) 2013 年 8 月 8 日
Uemura A: RhoJ defines endothelial cell motility by integrating VEGF and Sema3E signals.
17. 26th Spring Congress of the Korean Diabetes Association & 1st Korea-Japan Diabetes Forum 済州島 (韓国) 2013 年 5 月 10 日
Uemura A: RhoJ integrates VEGF and Sema3E signals in angiogenic endothelial cells.
18. 第 117 回日本眼科学会総会チバビジョン

シンポジウム 東京国際フォーラム（東
京都千代田区）2013年4月6日
植村明嘉: 眼内血管新生病に対する創薬
標的分子の探索

〔図書〕（計1件）

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.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://ncu-ganka.jp/ended-chair>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植村 明嘉 (Uemura, Akiyoshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
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)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70647031