

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861449

研究課題名(和文) 網膜血管新生におけるSIRT1の役割の解明及びSIRT1活性化経路の解析

研究課題名(英文) Investigation of roles in retinal angiogenesis and pathway of SIRT1 activation.

研究代表者

松宮 亘 (Matsumiya, Wataru)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：30707120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではcAMPを介するSIRT1活性化の解析と、病的血管新生と加齢変化におけるSIRT1及びcAMP輸送体であるMRP4の機能解析を行うことを目的とした。まずin vitro実験においてcAMPの上昇に伴いSIRT1が上昇することが示された。さらにMrp4ノックアウト(KO)マウスの高酸素負荷モデルを用いたところ、P17のKOマウスにおいて病的新生血管や虚血はより重症であった。P28でもKOマウスの血管形成は正常化に至っていない印象であった。一方、加齢に伴う網膜組織の変化は少ないものと考えられた。Mrp4はcAMPやSIRT1を介して血管新生において重要な役割を担う可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aims to investigate pathway of SIRT1 activation and functions of SIRT1 and MRP4 as cAMP transporter in pathological retinal angiogenesis and in age-related alterations. In vitro, it was shown that elevation of cAMP by Forskolin could induce activation of SIRT1 expression. In OIR model, the severity of retinopathy in P17 was greater in Mrp4<sup>-/-</sup> mice as compared with WT mice. The primary cause of exacerbated retinopathy in Mrp4<sup>-/-</sup> mice may be due to enhanced retinal vascular obliteration. Mrp4 might have a suppressive role in pathological retinal angiogenesis. Moreover, recovery from retinopathy in P28 might be better in WT mice as compared with Mrp4<sup>-/-</sup>. On the other hands, Mrp4 deficiency does not exert any noticeable influence on age-related retinal changes. These results suggests that Mrp4 play an important role via cAMP and SIRT1 in pathological retinal angiogenesis.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜血管新生 SIRT1 cAMP MRP4 病的血管新生 加齢性変化 ノックアウトマウス

## 1. 研究開始当初の背景

(1)糖尿病網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症(AMD)などの網膜血管新生疾患は、我が国における失明の主要な原因である。一方、近年これらに対する治療は、硝子体手術の進歩や抗血管内皮増殖因子(VEGF)療法に代表される各種薬物療法の導入など目覚ましい発展を遂げてきた。しかし、治療技術の向上にもかかわらずいまだに治癒が極めて困難な疾患でもあることから、これらの疾患に対しては早期の介入が望ましいと考えられ、その標的として網膜血管形成に関わる様々な分子が検討されている。我々も *in vivo* 実験において網膜血管形成における Multidrug resistance protein 4(Mrp4)の重要性を報告しており、特に MRP4 が cAMP 濃度を調整することで網膜血管新生において重要な役割を果たしているかと予想された(Matsumiya W. et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012)。(2)一方で我々は抗 VEGF 硝子体注射による AMD の治療経過を検討し、視力悪化と BMI が相関することを報告した(Matsumiya W. et al. BMC Ophthalmol. 2013)。AMD の発症病態の根幹には加齢や光暴露など網膜色素上皮の酸化ストレス応答に伴う慢性炎症の存在が指摘されている。一方で AMD の病態は脈絡膜新生血管の進展であり、治療経過はその活動性に左右されている。そのため網膜色素上皮細胞(RPE)と網膜血管内皮細胞の両者に発現し、酸化ストレス応答や血管新生において重要な機能をもつと推測される SIRT1 に着目した。SIRT1 は NAD<sup>+</sup>依存性脱アセチル化酵素である Sirtuin ファミリーに属し、老化・寿命を制御する分子として知られる。7種類の Sirtuin 分子の中で SIRT1 は最も広く研究され、網膜血管内皮細胞において網膜血管新生への関与や SIRT1 の活性化経路の上流に cAMP の存在が報告されたことから、SIRT1 が病的血管新生においても重要な役割を果たしているものとして考えられた。

## 2. 研究の目的

cAMP を介する SIRT1 活性化の解析とノックアウトマウスの病的血管新生モデルを用いた実験によって、病的血管新生における SIRT1 の機能解析を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)

細胞内 cAMP の誘導物質であるフォルスコリン(FSK)が SIRT1 発現に及ぼす影響について、real-time RT-PCR 法を用いて測定を行う。ヒト網膜血管内皮細胞(HREC)を無血清培地(CSC培地)で24時間培養した後洗浄し再度6時間培養させた後、異なる濃度(10,50,100 μM)のFSKを添加し培養し、0.5時間後、2時間後に細胞ライセートを回収し SIRT1 mRNA の定量を行った。

(2)cAMP ならびに SIRT1 の病的網膜血管新生における役割を調べるために、Mrp4KO マウスにおいて酸素誘発症モデル(OIR)を用いて

評価を行う。具体的には Mrp4KO マウス及びコントロールマウス(野生型)に対し高酸素負荷を行い、OIR モデルの原則通り生後 12 日に通常酸素濃度下に戻して管理を行って生後 17 日時点(P17)での無血管領域と Retinopathy Scoring System におけるスコアを評価した。

・無血管領域の計測については Stahl らの既報に従い行う。P17 の網膜伸展標本を作製し CD31 で網膜血管を免疫染色し、蛍光顕微鏡で取得した画像の無血管領域のピクセル数を Photoshop により計測し実施。

・Retinopathy Scoring System は 1999 年に報告された OIR における網膜症の重症度をスコア化する方法で。Blood vessel growth, Blood vessel tufts, Extra retinal neovascularization, Central vasoconstriction, Retinal hemorrhage, Blood vessel tortuosity, の 6 項目につきスコア化を行います。すべてのスコアの合計を total score として集計し計測した。

さらに Mrp4KO マウス及びコントロールマウス(野生型)に対して OIR 負荷を行い、原則通り生後 12 日に通常酸素濃度下に戻して管理を行って生後 28 日時点(P28)での網膜血管構造変化についてそれぞれ解析を行う。

(3)cAMP ならびに SIRT1 の加齢に伴う網膜組織変化に対する影響を調べるため Mrp4KO マウスを用いた *in vivo* 実験を行った。Mrp4 KO マウスとコントロール(野生型)マウスを用いて成体マウス(生後 8-10 週)、リタイアマウス(生後 9-12 ヶ月)の加齢性網膜構造変化及び網膜血管構造変化を解析した。

・成体マウス(生後 8-10 週)の両眼球を摘出し、片眼から網膜伸展標本を、もう片眼から網膜切片を作成し、それぞれ免疫組織染色法にて細胞特異的マーカー(血管内皮細胞, CD31; アストロサイト, GFAP; ミュラー細胞, glutamine synthetase; アマクリン細胞・水平細胞, calbindin D-28K)の発現を調べた。

・次に、リタイアマウス(生後 9-12 ヶ月)においても同様の実験を行い、表現型の比較を行った。

## 4. 研究成果

(1)10 μM FSK 及び 50 μM FSK においては SIRT1 の有意な発現変化を認めなかったが、100 μM FSK において有意な増加( $P<0.05$ )を認めた。

以上より HREC において cAMP は SIRT1 の発現を促進する可能性が示唆された。

(2)

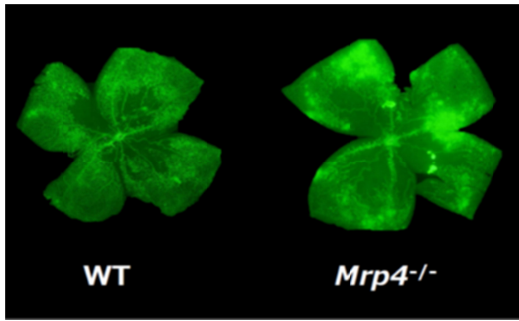


図 1 : P17 の網膜展開標本  
網膜展開標本上、Mrp4 ノックアウトマウスでは中心部の無血管領域が WT マウスに比べて広く、結果として網膜外新生血管が旺盛であることが示された。実際に評価項目のうち両者(Mrp4KO/WT)の比較で無血管領域( $29.1 \pm 4.0/17.9 \pm 2.1$ )、Blood vessel tufts( $3.8 \pm 0.5/2.3 \pm 0.5$ )、Central vasoconstriction( $3.0 \pm 0.0/1.3 \pm 0.5$ )、total スコア( $14.5 \pm 1.0/8.3 \pm 1.3$ )、で統計学的有意差( $P < 0.05$ )が認められた。

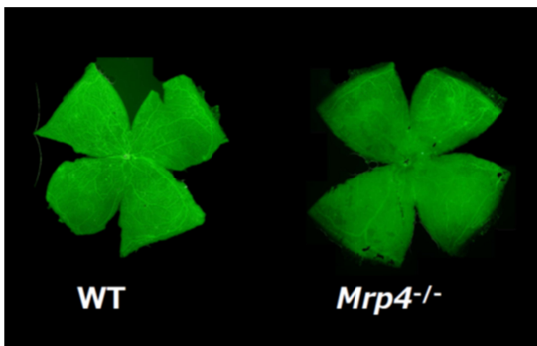


図 2 : P28 の網膜展開標本

さらに P28 において野生型の網膜展開標本では、OIR モデルで生後 17 日目に確認された病的新生血管や虚血領域が改善され、通常の網膜血管構造を認めた。一方、Mrp4KO マウスにおいては、病的新生血管の退縮を認めたが網膜展開標本の後極側における血管構造の回復遅延や周辺部血管の未成熟化が示唆された。Mrp4KO マウスの表現型についてはさらに n 数を増やし、スコア化して比較を行う予定である。

(3)

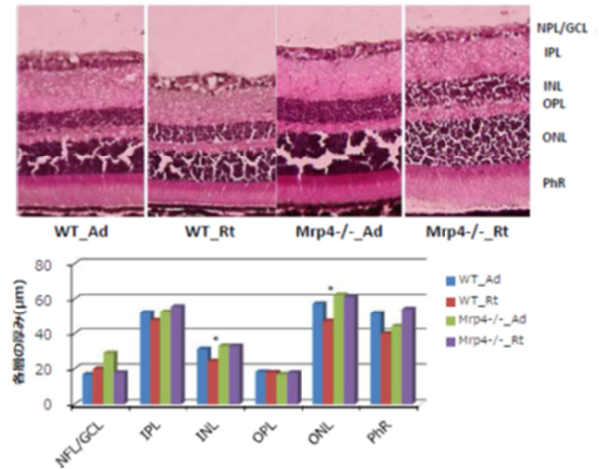


図 3 : Mrp4 ノックアウトマウスにおける加齢性網膜層構造変化

(NFL/GCL:神経線維層/神経節細胞層, IPL:内網状層, INL:内顆粒層, OPL:外網状層, ONL:外顆粒層, PhR:視細胞層)  
加齢性網膜層構造変化についてリタイア Mrp4-/- マウスではコントロールマウスで見られた INL/ONL の菲薄化が認められなかった ( $P < 0.05$ )。

一方、網膜伸展標本において、成体 Mrp4KO マウス・リタイア Mrp4KO マウスのいずれにおいても CD31 陽性網膜血管内皮細胞および GFAP 陽性アストロサイトに形態異常を認めず、野生型マウスと同様の表現型であった。網膜切片においても、glutamine synthetase 陽性ミュラー細胞、calbindin D-28K 陽性アマクリン細胞・水平細胞の表現型について、成体マウス・リタイアマウス間の比較および Mrp4KO マウス・野生型マウス間の比較のいずれにおいても有意な差は確認できなかった。

HREC において cAMP と SIRT1 の相関が示唆された。

加齢性変化におけるストレス下で Mrp4 の役割については明らかではなかったが、OIR モデルを用いた実験により Mrp4 が病的新生血管形成に対して保護的な役割を果たしていることが示された。このことはその器質である cAMP や SIRT1 が病的新生血管においても重要な役割を果たしていることが示唆される。さらに病的新生血管からの回復期における血管形成において Mrp4 の促進的役割が示唆され、Mrp4 や cAMP, SIRT1 の網膜血管疾患に対する治療ターゲットとしての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 11 件)

Nakai S, Honda S, Miki A, Matsumiya W,

Nakamura M.  
Comparison of the 12-Month Outcomes of Intravitreal Ranibizumab between Two Angiographic Subtypes of Polypoidal Choroidal Vasculopathy. *Ophthalmologica*. 2017;237(3):123-127. doi: 10.1159/000455273. Epub 2017 Mar 22.

Matsumiya W, Honda S, Otsuka K, Miki A, Nagai T, Imai H, Kusuhara S, Nakamura M. One-year outcome of combination therapy with intravitreal aflibercept and verteporfin photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2017 Mar;255(3):541-548. doi: 10.1007/s00417-016-3500-1. Epub 2016 Sep 30.

Enomoto H, Miki A, Matsumiya W, Honda S. Evaluation of Oxygen Supplementation Status as a Risk Factor Associated with the Development of Severe Retinopathy of Prematurity. *Ophthalmologica*. 2015;234(3):135-8. doi: 10.1159/000433565. Epub 2015 Jun 19.

Matsumiya W, Honda S, Otsuka K, Miki A, Nagai T, Imai H, Kusuhara S, Nakamura M. Comparison of the Effectiveness and Prognostic Factors of Intravitreal Ranibizumab between Typical Neovascular Age-Related Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy over 24 Months of Follow-Up. *Ophthalmologica*. 2015;234(1):33-9. doi: 10.1159/000431000. Epub 2015 Jun 20.

Ueda K, Matsumiya W, Otsuka K, Maeda Y, Nagai T, Nakamura M. Effectiveness and relevant factors of 2% rebamipide ophthalmic suspension treatment in dry eye. *BMC Ophthalmol*. 2015 Jun 6;15:58. doi: 10.1186/s12886-015-0040-0.

Yanagisawa S, Sakurada Y, Miki A, Matsumiya W, Imoto I, Honda S. The association of elastin gene variants with two angiographic subtypes of polypoidal choroidal vasculopathy. *PLoS One*. 2015 Mar 16;10(3):e0120643. doi: 10.1371/journal.pone.0120643. eCollection 2015.

Hirose M, Matsumiya W, Honda S, Nakamura M. Efficacy and visual prognostic factors of intravitreal bevacizumab as needed for

macular edema secondary to central retinal vein occlusion. *Clin Ophthalmol*. 2014 Nov 19;8:2301-5. doi: 10.2147/OPHT.S74888. eCollection 2014.

Kusuhara S, Matsumiya W, Imai H, Honda S, Tsukahara Y, Negi A. Evaluating dissociated optic nerve fiber layer appearance using en face layer imaging produced by optical coherence tomography. *Ophthalmologica*. 2014;232(3):170-8. doi: 10.1159/000364811. Epub 2014 Oct 15.

Tagami M, Matsumiya W, Imai H, Kusuhara S, Honda S, Azumi A. Autologous antibodies to outer retina in acute zonal occult outer retinopathy. *Jpn J Ophthalmol*. 2014 Nov;58(6):462-72. doi: 10.1007/s10384-014-0347-z. Epub 2014 Oct 1.

Honda S, Miki A, Yanagisawa S, Matsumiya W, Nagai T, Tsukahara Y. Comparison of the outcomes of photodynamic therapy between two angiographic subtypes of polypoidal choroidal vasculopathy. *Ophthalmologica*. 2014;232(2):92-6. doi: 10.1159/000360308. Epub 2014 Jun 27.

Matsumiya W, Honda S, Yanagisawa S, Miki A, Nagai T, Tsukahara Y. Evaluation of clinical and genetic indicators for the early response to intravitreal ranibizumab in exudative age-related macular degeneration. *Pharmacogenomics*. 2014 Apr;15(6):833-43. doi: 10.2217/pgs.14.51.

〔学会発表〕(計 2 件)  
・楠原仙太郎、延吉 章、小島恵子、松宮 亘、中村 誠  
加齢性変化における Multidrug resistance protein 4 (Mrp4)の役割  
日本眼科学会(仙台) 2016年4月7日-4月10日

・Kusuhara S, Matsumiya W, Nakamura M. The role of Mrp4 in pathological angiogenesis of the mouse retina. 2015 ARVO Annual Meeting 「Denver, Colorado(America)」 2015-05-03 - 2015-05-07

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕  
6. 研究組織  
(1)研究代表者

松宮 巨 (Matsumiya, Wataru)  
神戸大学 大学院医学研究科 助教  
研究者番号：30707120

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )