

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861442

研究課題名(和文) AM-RAMP2系の脈絡膜新生血管における病態生理学的機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathophysiological mechanisms in AM-RAMP2 system in choroidal neovascularization.

研究代表者

家里 康弘 (IESATO, Yasuhiro)

信州大学・医学部・助教(特定雇用)

研究者番号：00708357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円

研究成果の概要(和文)：VEGFが血管新生と血管透過性の亢進をきたすことが知られている一方で、VEGFと同様に眼内血管新生に関連するAM-RAMP2系の血管透過性に対する作用は不明であった。本研究はAM-RAMP2系の眼内血管新生に対する研究を端緒に眼内の血管透過性に対する病態生理学的な意義を解明した。マウス実験ではAMの全身・局所投与によりVEGFによる血管透過性の亢進が抑えられ、炎症関連サイトカインを抑制するなど抗炎症作用によるものであった。細胞実験においても同様であった。本研究は糖尿病黄斑浮腫や加齢黄斑変性などの治療としてAM-RAMP2系が新たなターゲットとなる可能性を示唆するものと思われる。

研究成果の概要(英文)：VEGF is well known to contribute to increased vascular permeability and angiogenesis. AM-RAMP2 system is also known as angiogenic factor like VEGF, however, action on the vascular permeability of AM-RAMP2 system was unknown. This study is to begin the research for the AM-RAMP2 system in choroidal neovascularization and it was to elucidate the pathophysiological significance for vascular permeability in the eye. In mice experiment, systemic and local administration of AM suppressed increased vascular permeability by VEGF and it was found to inhibit inflammatory cytokines. In vitro, the same effects were observed. The current study showed that AM suppresses the enhancement of vascular permeability by VEGF, which was shown to be due to an anti-inflammatory effect. This study suggests that the AM-RAMP2 system is the potential target of new therapies for such as diabetic macular edema and age-related macular degeneration.

研究分野：網膜

キーワード：血管新生 血管透過性 アドレノメデュリン

## 1. 研究開始当初の背景

アドレノメデュリン(AM)はヒト褐色細胞腫から血管拡張作用を有するタンパク質として発見された。その後、血管内皮細胞を含む全身の臓器において発現していることが認められ、その作用も血管拡張作用以外に血管新生作用、抗炎症作用、抗酸化作用など多彩な生理活性を有していることが報告されている。また、AM 受容体は、カルシトニン受容体様受容体(CRLR)に 2 つの受容体活性調節蛋白(RAMP2 および RAMP3)が作用することにより形成されるが、なかでも RAMP2 が重要であることが AM および RAMP2 ノックアウトマウスの胎児の研究から知られている。

AM における血管新生作用は、低酸素で誘導され VEGF を介することも報告されているが、眼内における AM-RAMP2 系の作用についての知見は乏しく、最近になって網膜における局在が報告され、研究代表者らも網膜血管新生における重要性を報告した。一方で、脈絡膜新生血管における AM の血管新生作用は反対の結果が報告されており、いまだ解明されていない点が多い。そこで研究代表者らは AM だけではなく受容体である RAMP2 に着目し、また血管特異的に欠失したマウスを用いることで AM-RAMP2 系の眼内新生血管における意義を一層明確にし、今後の幅広い治療への応用が可能になると考えた。

## 2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究では脈絡膜新生血管の病態生理学的作用を、AM-RAMP2 系とくに RAMP2 受容体の側面から機能的・形態的・生理生化学的側面から明らかにし、新たな治療ターゲットとしての可能性を明らかにすることを目的とした。今までは網膜光凝固や抗 VEGF 抗体の硝子体注射、ステロイド投与が行われており、一定の効果を上げているものの頻回投与が必要であることや、治療に抵抗する症

例も存在する。本研究によって AM-RAMP2 系をターゲットとした新たな治療法の可能性が示されれば、既存の治療法では十分な効果が得られなかった患者の視力を救うことが期待できる。

## 3. 研究の方法

(1) マウスのレーザー誘導脈絡膜新生血管モデルの確立。脈絡膜新生血管の病的状態の評価検討のために必要である疾患モデルの作成を確立し、AM ノックアウトマウスおよび RAMP2 ノックアウトマウスを用いて血管新生および血管透過性に対する予備実験を行った。

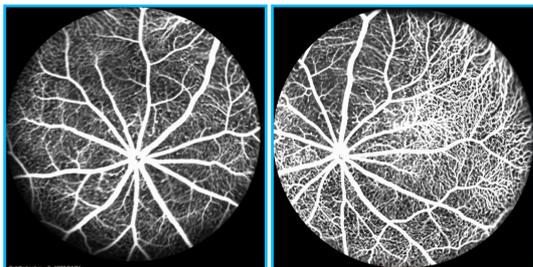
(2) レーザー誘導脈絡膜新生血管モデルで AM-RAMP2 系が血管新生だけではなく、病態として血管透過性に対しても強く関連する可能性が示唆されたため、hVEGF165 トランスジェニックマウスである Kimba マウスを用いて血管透過性亢進を蛍光眼底造影検査で評価し、網膜組織サンプルから遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR、タンパク質をウェスタンブロットにて評価した。AM の全身および硝子体内への局所投与でも同様の評価を行った。また血管透過性亢進を In Vitro でも血管内皮細胞を用いて経内皮電気抵抗 (TEER) やフルオレセインを用いた溶質透過試験を行い評価し、細胞の遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR で評価した。

## 4. 研究成果

AM-RAMP2 系は VEGF による血管透過性亢進を抑制し、AM による抗炎症作用の関与が示された。

蛍光眼底造影検査での血管透過性の評価で、野生型マウスにおいて AM の全身投与の前後で血管透過性に変化はなかった。(図 1)

図 1.野生型マウスの AM 全身投与の前後



しかし、VEGF が亢進している Kimba マウスでは、生理的食塩水だけの投与では血管透過性が亢進していた一方で、AM の全身投与によって血管透過性の亢進が抑制されていた。(図 2,3)

図 2.Kimba マウスの生理的食塩水の投与前後

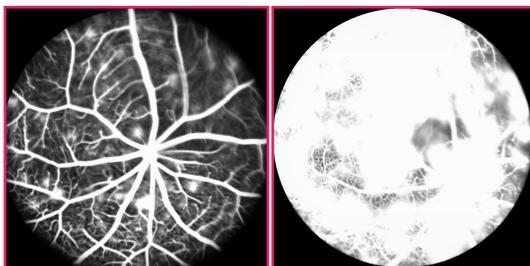
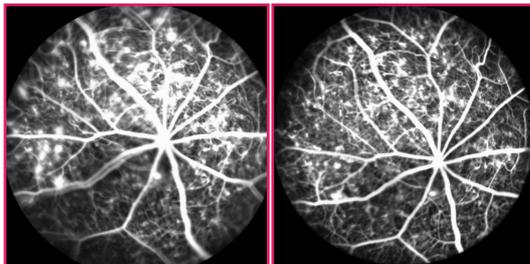
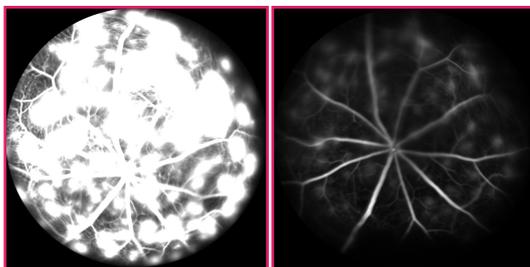


図 3.Kimba マウスの AM 全身投与の前後



また血管透過性がすでに亢進している状態で AM を硝子体内への局所投与することで血管透過性が抑えられた。(図 4)

図 4.AM の硝子体内投与の前後

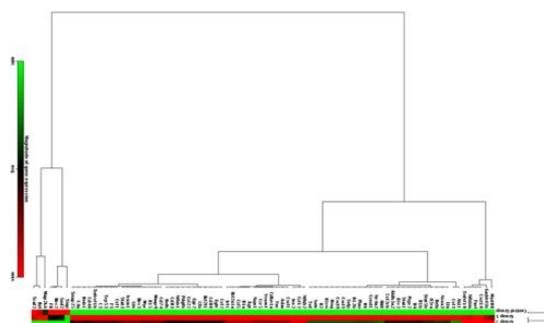


局所投与後の網膜組織のリアルタイム PCR による遺伝子発現の変化では、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP-1、IL-6 などの炎症関連サイトカイン、ICAM-1、VCAM-1 などの炎症性接着因子が AM

投与によって抑制されていた。(図 5)

図 5.RT2 Profiler PCR Arrays より

Kimba マウス網膜の炎症関連因子の亢進と AM 添加による同因子亢進の抑制



In vitro で検討した血管内皮細胞を用いた TEER では VEGF が用量依存的に%TEER の低下を示し、透過性亢進を示した一方で、AM の添加によって%TEER は上昇し、透過性低下を示した。また分子量 70kDa のフルオレセインを用いた溶液透過試験では VEGF により亢進した透過性が AM 添加によって抑制された。(図 6,7,8)

図 6.VEGF 用量依存的に低下した%TEER

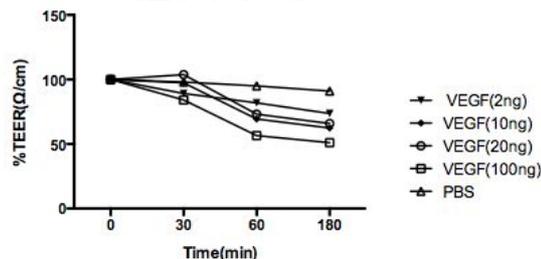


図 7.AM 添加によって%TEER は上昇した

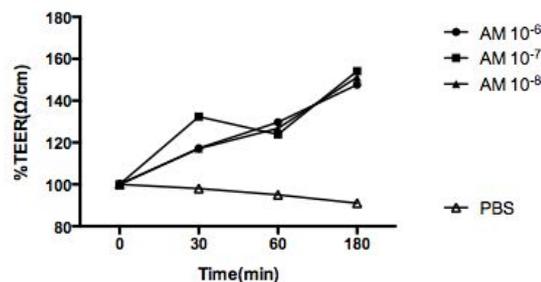
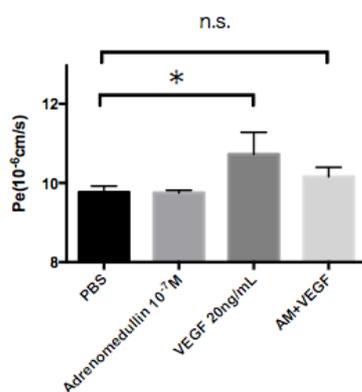


図 8. VEGF による透過性亢進が AM により抑制



現在に至るまで眼科領域において AM-RAMP2 系の疾患に対する報告は数少なく、またとくに血管透過性に対する報告はごくわずかであった。血管透過性の亢進は糖尿病などの血管疾患において黄斑浮腫といった視力低下を引き起こす主たる病態と考えられており、現在のところ治療への応用という観点では VEGF だけが大きな成果をあげていた。

本研究は糖尿病黄斑浮腫や網膜静脈閉塞症などに対して VEGF 阻害薬だけが主流となっている現在、AM-RAMP2 系が新たな治療法のターゲットとなる可能性の先鞭をつけるものであると思われる。

#### 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 1 件)

##### 1. 家里 康弘

平成 26 年日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説 網膜血管新生におけるアドレノメデュリン - Receptor activity-modifying protein 2 (RAMP2) 系

日本眼科学会雑誌 119 (11) 761-771  
2015 査読有り

[学会発表](計 3 件)

##### 1. 家里 康弘、今井 章、鳥山 佑一、平

野 隆雄、村田 敏規

網膜静脈分枝閉塞症の黄斑浮腫へのラニズマブ投与と網膜光凝固併用療法の検討 第 54 回日本網膜硝子体学会総会・第 32 回日本眼循環学会合同学会  
2015 年 12 月 4 日～6 日 東京

2. Akira Imai, Yuichi Toriyama, Yasuhiro Iesato, Takayuki Sakurai, Akiko Kamiyoshi, Yuka Ichikawa-Shindo, Hisaka Kawate, Takayuki Shindo, Toshinori Murata  
Adrenomedullin reduces VEGF-induced retinal vascular hyperpermeability  
ARVO2015 May3-7 Denver Colorado USA

##### 3. 家里 康弘

アドレノメデュリン - RAMP2 系の網膜血管新生における重要性  
日本眼科学会学術奨励賞記念講演  
第 119 回日本眼科学会総会 2015 年 4 月 16 日～19 日 札幌

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

家里 康弘 (IESATO, Yasuhiro)

信州大学・医学部・助教 (特定雇用)

研究者番号: 00708357