

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20312

研究課題名(和文) 網膜静脈閉塞症の病態解明とAM-RAMP2系の病態生理学的機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathophysiological mechanism of AM-RAMP 2 system in retinal vein occlusion

研究代表者

家里 康弘 (Iesato, Yasuhiro)

信州大学・医学部附属病院・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) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：ローズベンガル腹腔内投与による網膜静脈閉塞症モデルを確立した。これを用いて網膜血管密度・血流評価を行った。処置1日目に主要血管を含めた網膜血管閉塞を確認し、その後徐々に血流の再開を確認した。VEGF、炎症性サイトカインとともにアドレノメデュリン(AM)の遺伝子発現亢進を認め、AMの病態生理への関与が示唆された。AMノックアウトマウス(KO)で野生型よりも血管密度・血流の減少を認めた。AM持続皮下投与で血管密度・血流の改善を認めた。AM受容体活性調節蛋白RAMP2KOでもAMKOと同様の表現型を示した。AM-RAMP2系は網膜血管閉塞症において保護的意義を有し、有望な治療標的として期待される。

研究成果の概要(英文)：We established a model of retinal vein occlusion by intraperitoneal administration of Rose Bengal. we evaluated retinal blood vessel density and blood flow using this model. Retinal vessel occlusion including the main blood vessel was confirmed on day 1, and blood flow gradually resumed. The level of VEGF, proinflammatory cytokines and adrenomedullin (AM) gene expression was increased. That suggests AM play a role of pathophysiology in retinal vein occlusion. AM knockout mouse (KO) showed decreased retinal blood vessel density and blood flow than wild type. Improvement of retinal blood vessel density and blood flow were found with AM continuous subcutaneous administration. RAMP2, AM receptor activity regulating protein, KO also showed the same phenotype as AMKO. The AM-RAMP 2 system has protective role in retinal vein occlusion and is expected as a promising therapeutic target.

研究分野：眼科

キーワード：アドレノメデュリン RAMP2 網膜静脈閉塞症

1. 研究開始当初の背景

網膜静脈分枝閉塞症は中高年以上に好発する一般的な疾患である。またこれに伴う黄斑浮腫は代表的な視力低下を来す疾患である。近年、抗 VEGF 薬により良好な視力改善を得られるようになったが、一方で薬剤の効果は一過性であり、臨床においては3割近くに黄斑浮腫の再発があり、医療経済的にも問題となっている。また他領域においては血管再生治療が臨床応用をされてきている一方で、網膜血管閉塞症においては有用な疾患モデルがないことも含めて網膜血管閉塞症の病態生理学的探求や閉塞血管に対する治療は疾患頻度に比して十分とは言えなかった。

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、カルシウム受容体様受容体(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。

申請者らは過去に AMRAMP2 系が網膜において低酸素刺激での VEGF 発現等に関与していること、病的・生理的血管新生に対する作用を有していることを明らかにしてきた。その観点から網膜血管閉塞症においても血管閉塞に伴う炎症・低酸素により AMRAMP2 系がその病態生理に強く関連しており、治療標的としての可能性を有しているものと考えられたことから本研究を企図した。

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、本研究では網膜血管閉塞症の病態生理学的作用を、疾患モデルの確立から AM-RAMP2 系を中心とした機能的・形態的・生理生化学的側面を明らかにし、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

本研究では、まず疾患の病態生理を解明するために再現性の高く安定的に作製可能な新たな網膜静脈分枝閉塞症のマウスモデルの

確立を端緒とした。血管閉塞症におけるメカニズムの解明(組織切片による評価、遺伝子や蛋白質の変化)、同疾患における AM-RAMP2 系の病態生理学的意義の探索と、既存の抗 VEGF 療法にない新たな治療(インフュージョンポンプを使用した AM の持続投与や AM および RAMP2 の抗体の硝子体投与など)としての可能性を明らかにした。具体的には以下の通りである。

(1) マウス網膜静脈閉塞症モデルの確立

8-12 週齢のオスのマウスを用いて、ローズベンガルを腹腔内投与し、そののち片眼の眼底(視神経乳頭周囲の網膜静脈分枝)に半導体レーザー(810nm; Oculight SLx; Iris Medical Instrumens, Mountain View, CA)で血管の閉塞するように照射(50 μm spot size, 200 mW intensity, 500 ms duration)を行い、1, 3, 7 日後に生体で蛍光眼底造影検査(FAG)を施行、安楽死させた後眼球摘出を行い、4%パラホルムアルデヒドによる固定後、網膜血管、血管外漏出を確認・評価した。摘出眼球に関しては網膜の伸展標本を作成し、網膜血管とくに網膜血管網を抗 isolectin 抗体で染色し形態的に評価した。

(2) ノックアウトマウスおよび AM 投与による評価

網膜静脈閉塞症モデルの確立後に、野生型マウス、AM ノックアウトマウス(AMKO)、RAMP2 ノックアウトマウス(RAMP2KO)を用いて、1, 3, 7 日後の生体で蛍光眼底造影検査を施行し、Angio Tool を用いて網膜血管、血管外漏出を確認・評価した。摘出眼球に関しては網膜の伸展標本を作成し、網膜血管とくに網膜血管網を抗 isolectin 抗体で染色し形態的に評価した。また網膜組織を採取し、RNA を抽出し、Trizol 試薬(Invitrogen 社製)を用いて、フェノール/クロロホルム処理を行い、精製する。Primer Express ソフトウェア(ABI 社製)を用いて作成したプライマー(Taqman probe もしくは SYBR)を使用して PRISM7000 定量 PCR 装置(ABI)で遺伝子発現を定量化し、変動を詳細に検討した。各測定において3回繰り返す。遺伝子発現については血管新生関連因子、炎症性サイトカインを中心として解析を行った。また野生型マウスに対して Osmotic pump を用いて AM の皮下持続投与の効果検討を行った。サンプル採取や形態的・機能的評価を前述と同様に行い、AM 投与による効果を比較検討した。

4. 研究成果

(1) 疾患モデルの確立

従来はローズベンガルをマウスの尾静脈へ注射することが必要であり手技の習熟が必要とされていたが、本法ではローズベンガル(1mg)の腹腔内投与を行い、3分後に網膜中心静脈に対してレーザー照射(532 nm, 50 mW, 50 μm, 3 秒間)を行うことで安定的にモデルを作製することが可能となった(図1)。眼底写真では人間と同様に網膜出血を認め、

FAG において網膜血管閉塞と血管外漏出を認め、Isolectin B4 との網膜進展標本でも血管閉塞を確認した(図2、3)。また FAG の経時的評価において、網膜血管はレーザー施行後から徐々に再開通を認めた(図4)

図1 網膜血管の閉塞と網膜標本における網膜出血

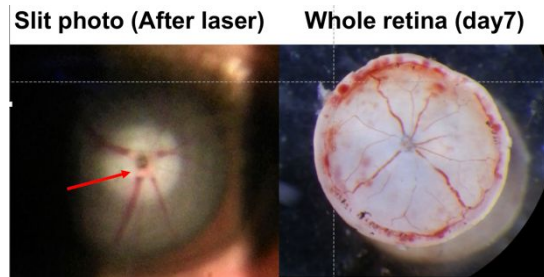


図2 眼底写真と FAG

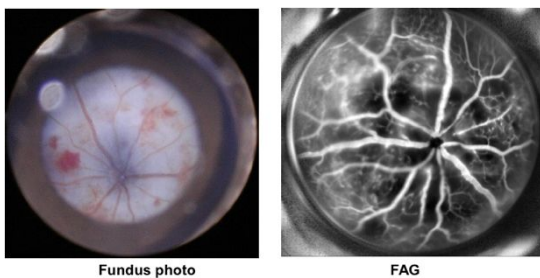


図3 網膜進展標本 (Isolectin B4 (赤) と FITC-Dextran (緑))

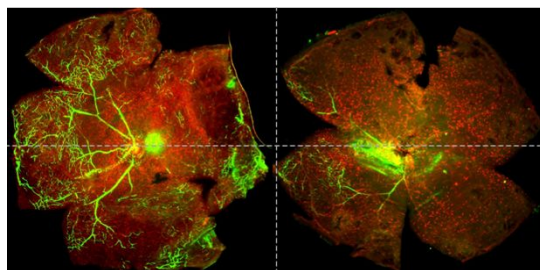
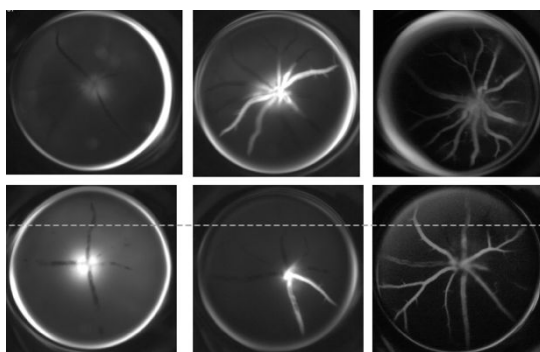


図4 レーザー施行後の FAG の経過 (左: 1日目、中央: 3日目、右: 7日目)



また網膜での遺伝子発現の変化を未施行のコントロールと比較検討を行ったところ、血管新生因子である VEGF-A や TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、ICAM-1 など炎症関連因子の上昇とともに AM の優位な発現亢進を認め、AM が病態に参与している可能性が示された(図5)

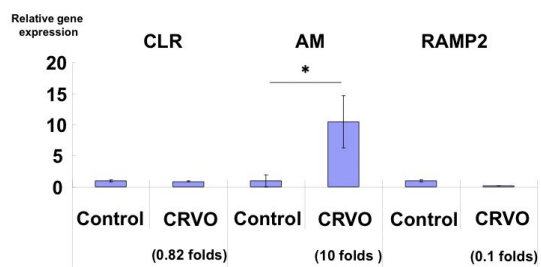
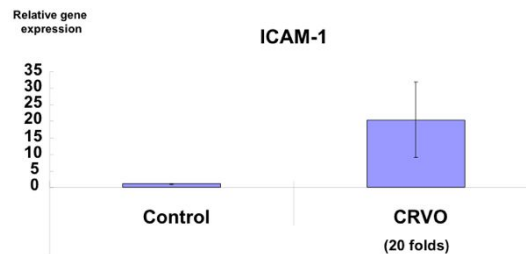
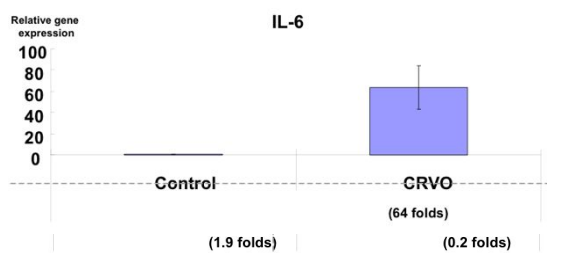
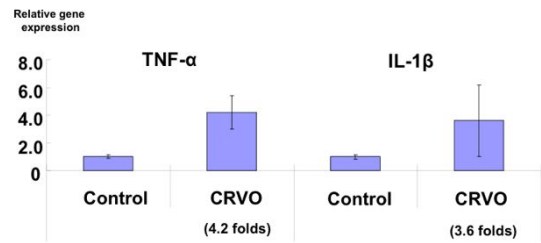


図5 網膜標本の realtime PCR

(2) ノックアウトマウスおよび AM 投与による評価

疾患モデル確立の後、野生型マウス、AMKO マウス、RAMP2KO マウスで FAG を用いて網膜血管の灌流、血管密度を計測し比較検討したところ、AMKO マウス、RAMP2KO マウスではいずれも経時的な再灌流が減少していた。一方で AM 皮下持続投与した野生型マウスでは、コントロールに比較して、再灌流が増加していた(図6、7、8)

図6 FAG (上段:野生型、2段目:AM 皮下持続投与野生型、3段目:AMKO、4段目:RAMP2KO)

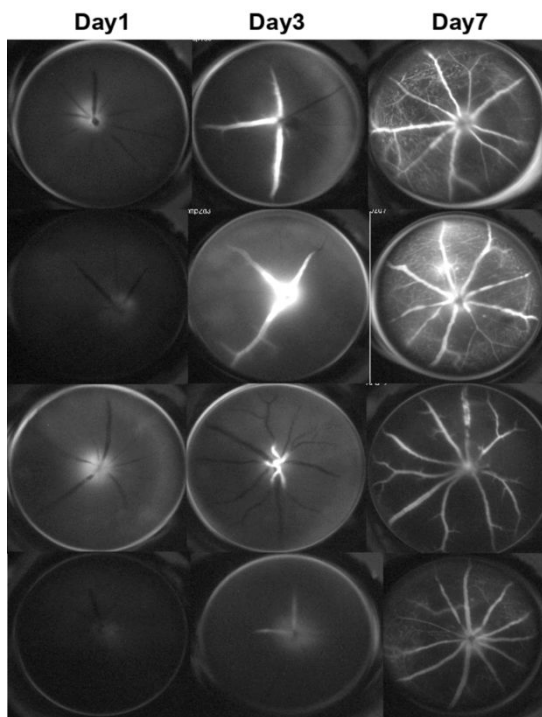


図7 Angio Tool による評価 (図6と同順)

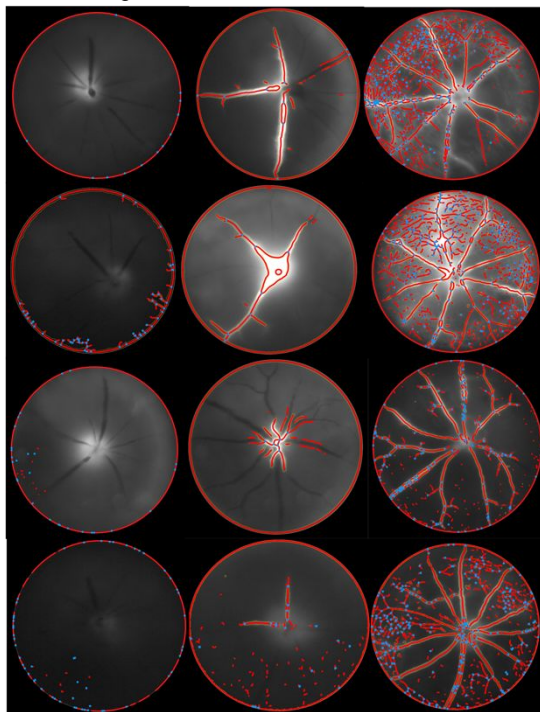
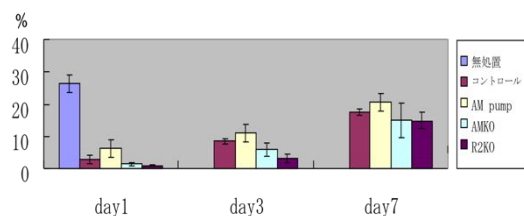


図8 灌流面積の比較



また網膜進展標本においても灌流面積はAMKO マウス、RAMP2KO マウスで減少した (AMKO:13.5%、RAMP2KO:19.2%)。一方、AM 皮下持続投与を行うことで灌流面積は有意に増加した (AM 群:45.2%、コントロール群:27.8%) (図9、10)。

図9 網膜進展標本 (FAG、AngioTool)

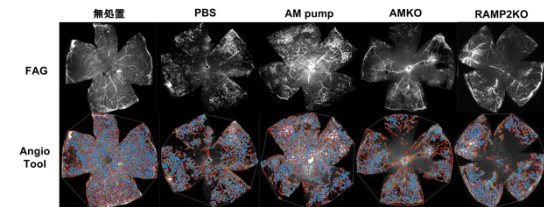
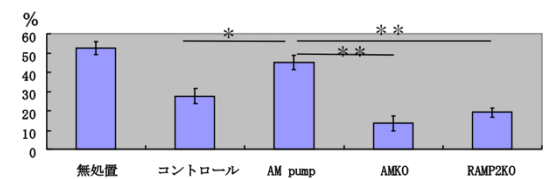


図10 網膜進展標本における血管密度



以上の結果から、AM-RAMP2系は網膜静脈閉塞症モデルにおける病態に網膜血管保護的に作用していることが判明した。現在のところ皮下持続投与での有効性であり、今後はAM-RAMP2系をあらたなターゲットとしてさらなる病態解明と治療応用への新規薬剤・投与ルートが開発が望まれる。

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)

[学会発表](計2件)

(1) Hirabayashi K, Iesato Y, Novel mouse model of CRVO induced by intraperitoneal injection of rose bengal with laser radiation. ARVO 2017年5月 ポルティモア(アメリカ合衆国)

(2) 平林 一貴、田中 正明、今井 章、鳥山 佑一、家里 康弘、桜井 敬之、神吉 昭子、新藤 優佳、河手 久香、田中 愛、山内 啓弘、村田 敏規、新藤 隆行
アドレノメデュリンノックアウトマウスを用いたCRVOモデルの病態解析
第122回日本眼科学会総会 2017年4月 大阪

6. 研究組織

(1)研究代表者

家里 康弘 (Iesato Yasuhiro)

信州大学・医学部附属病院・助教(特定雇用)

研究者番号: 00708357