

令和元年6月25日現在

機関番号：13601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06725

研究課題名(和文) AM-RAMP2系を標的とした、網膜浮腫および線維化の新規治療法開発

研究課題名(英文) Development of new treatment for retinal edema and fibrosis targeting AM-RAMP2

研究代表者

今井 章 (Imai, Akira)

信州大学・学術研究院医学系・助教(特定雇用)

研究者番号：60807329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：アドレノメデュリン(AM)とその受容体調整蛋白(RAMP2)の加齢黄斑変性への治療標的としての可能性を検討するため研究を行った。滲出性加齢黄斑変性症のモデルマウスであるレーザー誘導脈絡膜新生血管モデル(Laser induced CNV model)を用いた検討では、AMおよびRAMP2のノックアウトマウスにおいてはCNVサイズとそれに伴って網膜におこる線維化が拡大していることが確認された。網膜線維化には上皮間葉転移(EMT)の関与が報告されており、AM-RAMP2系のEMTにおける役割を検討した。AMは網膜色素上皮細胞でEMTを抑制し、AMDの線維化治療の標的となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢黄斑変性は我が国の中途失明原因の上位を占める。現在、抗VEGF薬による治療が滲出性加齢黄斑変性に対して有効性が示され、臨床応用が確立されている。一方で、滲出が改善した後の網膜の線維化や網膜の萎縮を防ぐことは難しく、網膜の線維化を予防できる新たな治療標的が求められている。

アドレノメデュリン(adrenomedullin; AM)は、ヒト褐色細胞腫組織から発見された血管拡張作用を有する生理活性ペプチドである。循環器疾患や炎症性疾患では産生が増加し、心血管保護作用や抗炎症作用など多彩な生理作用を有する。今回、加齢黄斑変性の治療ターゲットとしてのAMの検討を行う目的で研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Studies were conducted to investigate the potential of adrenomedullin (AM) and its receptor modulator protein (RAMP2) as a therapeutic target for age-related macular degeneration. In a study using laser induced choroidal neovascularization model (Laser induced CNV model), which is a mouse model of exudative age-related macular degeneration, CNV size and concomitant fibrosis in the retina in AM and RAMP2 knockout mice was confirmed to be expanding. The involvement of epithelial foliar metastasis (EMT) in retinal fibrosis has been reported, and the role of AM-RAMP2 in EMT was examined. It has been suggested that AM suppresses EMT in retinal pigment epithelial cells and is a target for fibrotic treatment of AMD.

研究分野：加齢黄斑変性

キーワード：アドレノメデュリン RAMP2 加齢黄斑変性

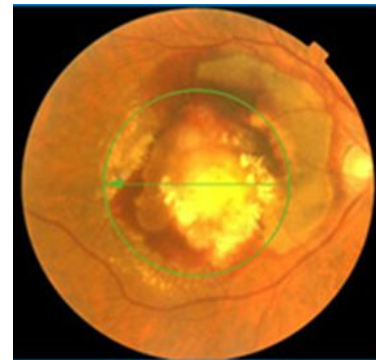
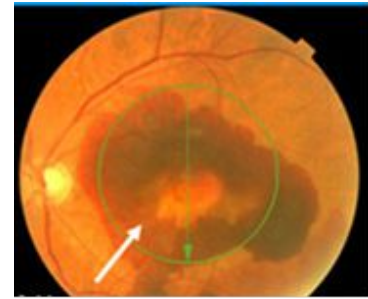
1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は欧米の白人の失明原因の首位であるが、従来我が国ではとても稀な疾患であるとされていた。しかし、近年我が国でも加齢黄斑変性は認識されるようになり増加傾向で、高齢者の重篤な視力障害の原因疾患の1つである。本邦では50歳以上の80人に1人が罹患していると報告されている。患者は中心部が見えないため、読み書きがしにくく移動などの支障は少ない。

以前は効果のある治療方法がなかったが、近年、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor ; VEGF) 阻害薬の眼内注射が行われるようになり、上図のような黄斑部の広汎な網膜下出血 (白矢印)でも抗VEGF阻害薬により、脈絡膜血管新生を抑制することで治療可能となった。出血による視細胞の破壊が軽減されたことにより、重篤な視力障害を生じずに、生活を続けることができる患者も増加している。

しかし、この治療法の普及後5から10年が経過して、出血は吸収傾向となっても、その後に脈絡膜新生血管が退縮した部位に線維化が形成される患者が増えてきた。このため、結局長い時間経過では視力を失う患者が少なくない数で存在している。

加齢黄斑変性における黄斑下組織の線維化による瘢痕形成は永続的な視機能低下につながるが、今なお直接的な治療法は開発されていない。



2. 研究の目的

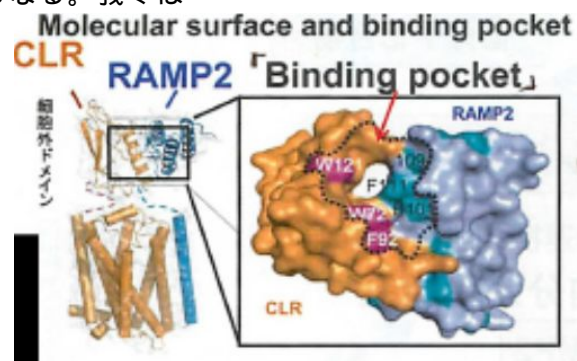
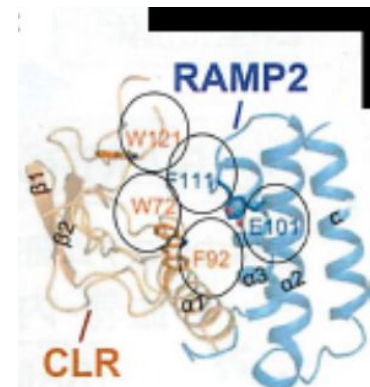
本研究は、生理活性ペプチドであるアドレノメデュリン (ADM)と ADM の受容体活性調節タンパクである RAMP2 から構成される ADM-RAMP2 システムに着目し、網膜疾患における線維化の抑制についての治療薬としての可能性を切り開くことを目的とする。加齢黄斑変性などの眼疾患ではしばしば、疾患鎮静化後に炎症の結果、線維化が残り、それによる慢性組織障害のため視力低下を来す。研究代表者はこれまで、ADM-RAMP2 システムが血管透過性亢進の抑制に働くとともに、炎症の抑制に働く事を見いだした。

アドレノメデュリンは循環器疾患と循環のホメオスタシスに重要な役割を果たしている。アドレノメデュリン・レセプターは receptor activity-modifying protein 2 or 3 (RAMP2, -3)と GPCR calcitonin receptor-like からなる。我々は RAMP-2 がアドレノメデュリンの作用の発現に鍵となる物質であると考え、RAMP-2 ノックアウトマウスを作成した。

RAMP2 の^{-/-}マウスは胎児の間に血管系の脆弱性により重篤な浮腫と出血をきたして死亡する。血管内皮細胞は高度に変形して規定膜から剥離していた。これらの血管内皮細胞の培養細胞では、タイトジャンクションや基底膜の構成成分の産生も低下しており、重篤な浮腫の原因であると考えられた。RAMP2 の^{+/-}マウスは出生して成長し成人にいたるが、血管透過性亢進と、不十分な血管新生がみられた。これらの結果から、RAMP-2 はアドレノメデュリンの作用の発現に鍵となる物質で、血管の新生と、血管の構造の完成において重要な物質であることが明らかになった。

本研究では、ADM-RAMP2 系の眼内における病態生理学的意義、特に網膜血管バリア維持機能、抗炎症作用、抗線維化作用とそのメカニズムを解明し、網膜浮腫や線維化に対する新たな治療標的とすることを目的とする。

本研究では、ADM-RAMP2 系の眼内における病態生理学的意義、特に網膜血管バリア維持機能、抗炎症作用、抗線維化作用とそのメカニズムを解明し、網膜浮腫や線維化に対する新たな治療標的とすることを目的とする。



3. 研究の方法

レーザー誘導脈絡膜線維化モデルにおける治療的実験

1) 8-12 週齢の雄のマウスの片眼眼底、視神経乳頭周囲網膜にアルゴンレーザー照射を行い、Bruch 膜を穿破する。7 日後、21 日後、麻酔下に心臓から FITC-Dextran を灌流し脈絡膜新生血管を評価する。眼球摘出を行い、線維化の評価のため、SMA 抗体を用いて免疫染色を行う。網膜、脈絡膜フラットマウント標本を作成し、レーザー痕に対する線維化面積および脈絡膜新生血管の面積の評価を行う。レーザー照射の後 Adrenomedullin および阻害効果を持つ低分子化合物の投与を行い、眼球の線維化に対する ADM、RAMP2 システムの役割について検討を行う。

2) AM による EndMT, EMT の制御の検討

平成 30 年度の検討に置いて、ヒト網膜色素上皮細胞である ARPE-19 を TGF- β で刺激をすることで、内皮間葉転換 (Endothelial-Mesenchymal Transition; EndMT) を形成することが出来た。EndMT を起こした ARPE19 細胞に対して、アクチンフィラメントの重合状態、ZO-2 などのタイトジャンクションタンパクや、VE-cadherin、E-cadherin のようなアドヘレンスジャンクションタンパクの発現、SMA、FSP-1、ファイブロネクチン、ビメンチン等の間葉系マーカーの発現を評価することで、EndMT あるいは EMT の状態を評価し、ADM の投与により、それらがどのような影響を受けるかを評価する。

4. 研究成果

レーザーによりブルッフ膜を破壊して、脈絡膜から網膜下に脈絡膜血管新生を誘導するモデルを、確実に作成する手技を確立した。上図の treatment は、同様の手技で網膜中心静脈閉塞を形成したときのマウス眼底写真であるが、約 90% の確率で脈絡膜血管新生も網膜中心静脈閉塞も形成できる手技を確立している。

これらのモデルを用いて、脈絡膜下の血管新生に伴う線維化の形成が、アドレノメデュリン RAMP2 knockout (KO) マウスでは、おそらく炎症の抑制により、病巣が小さい傾向がみられて、結果として線維化の程度が減少した。

現在も継続して検討している、ZO-2 などのタイトジャンクションタンパクや、VE-cadherin、E-cadherin のようなアドヘレンスジャンクションタンパクの発現、SMA、FSP-1、ファイブロネクチン、ビメンチン等の間葉系マーカーの発現の評価を、これからも進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

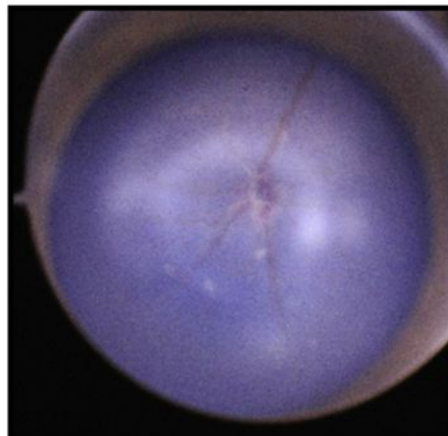
Kazutaka Hirabayashi, Masaaki Tanaka, Akira Imai, Yuichi Toriyama, Yasuhiro Iesato, Takayuki Sakurai, Akiko Kamiyoshi, Yuka Ichikawa-Shindo, Hisaka Kawate, Megumu Tanaka, Kun Dai, Nanqi Cui, Yangxuan Wei, Keisei Nakamura, Shiho Iida, Shuhei Matsui, Akihiro Yamauchi, Toshinori Murata, Takayuki Shindo
Development of a Novel Model of Central Retinal Vascular Occlusion and the Therapeutic Potential of the Adrenomedullin-Receptor Activity-Modifying Protein 2 System
American Journal of Pathology 189(2) 449-466 2019 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

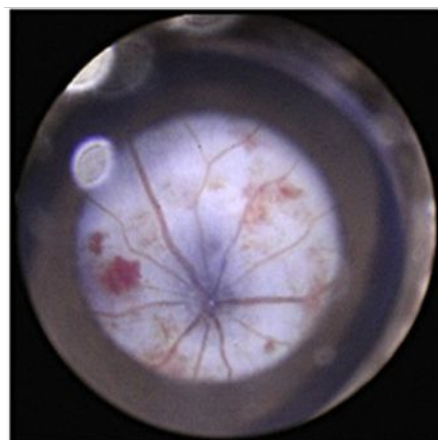
平林 一貴、田中 正明、今井 章、鳥山 佑一、家里 康弘、桜井 敬之、神吉 昭子、新藤 優佳、河手 久香、田中 愛、山内 啓弘、村田 敏規、新藤 隆行

Day 7

No treatment



treatment



CRVO モデルマウスに対するアドレノメデュリンの治療効果
第 123 回日本眼科学会総会 2019 年 4 月 東京

田中 正明、平林 一貴、今井 章、鳥山 佑一、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-RAMP2 系はヒト網膜色素上皮細胞の上皮間葉転換を抑制する
第 123 回日本眼科学会総会 2019 年 4 月 東京

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、田中 愛、山内 啓弘、村田 敏規、新藤 隆行
CRVO モデルにおける網膜浮腫の OCT 評価と、AM-RAMP2 系の関与の検討
第 72 回日本臨床眼科学会 2018 年 10 月 東京

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 2018 年 4 月 大阪

田中 正明、今井 章、鳥山 佑一、平林 一貴、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
レーザー誘導脈絡膜血管新生におけるアドレノメデュリン - RAMP2 系の病態生理学的意義
第 122 回日本眼科学会総会 2018 年 4 月 大阪

Kazutaka Hirabayashi, Toshinori Murata, Yasuhiro Iesato, Akira Imai, Yuichi Toriyama,
Masaaki Tanaka, Takayuki Sakurai, Akiko Kamiyoshi, Yuka Ichikawa-Shindo, Hisaka
Kawate, Mana Tanaka, Takahiro Yamauchi, Takayuki Shindo
Investigation of therapeutic effect of adrenomedullin on central vein occlusion
ARVO2018 4/25-5/3 2018 Honolulu, USA

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。