

19980062

血管増殖疾患における新しい血管新生機構の解明と診断法
遺伝子治療への応用

課題番号 H10-特別-030

平成10年度厚生省科学研究費補助金 厚生科学特別
研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者 高木 均
(京都大学大学院医学研究科視覚病態学・助手)

総括研究報告書

血管増殖眼疾患における新しい血管新生機構の解明と診断法 遺伝子治療への応用

主任研究者 = 高木 均 (京都大学大学院研究科視覚病態学)

研究要旨 循環血液中の血管内皮前駆細胞に血管新生抑制遺伝子導入することにより眼内血管新生疾患を抑制しうる可能性が示された。

A. 研究目的

増殖糖尿病網膜症や加齢性黄斑変性症などの眼内血管増殖疾患では病的血管新生が起り、新生血管からの出血、透過性亢進、新生血管膜収縮による牽引性網膜剥離が主病態である。このような眼内血管新生のメカニズムとして虚血や血管内皮増殖因子(Vascular endothelial growth factor; VEGF)による調節が重要であることが明らかとなってきた。また、従来、眼内における血管増殖は既存の隣接血管内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成によりおこる angiogenesis とされてきたが、最近、成人の末梢血中に血管前駆細胞が存在し、虚血性血管新生部位において胎生期と同様な vasculogenesis type の血管新生に寄与していることが報告された。本研究ではこのような虚血性・ VEGF 依存性血管新生を調節する分子機構を解明するとともに、これを用いたより限局的な抗血管新生遺伝子治療法を可能とするために眼内血管増殖疾患患者眼において vasculogenesis を応用した遺伝子導入が可能であるか検討した。VEGF 依存性血管新生を調節すると考えられるレニン・アンジオテンシン(ANG)機構やアンジオポイエチン(Ang)の網膜微小血管系における調節機構を明らかにすることを第一の目的とした。さらに、血管増殖のメカニズムがあまり理解されていない老人性黄斑変性症において VEGF・Ang やこれらを調節するサイトカインによる脈絡膜血管新生の詳細な分子機構を解明することを目的とした。このようにして明らかになった分子機構を応用して眼内血管増殖疾患患者血管新生部位に限局的に治療を行うために vasculogenesis が実際の眼内血管増殖疾患で存在するかどうかを摘出脈絡膜新生血管膜と増殖性糖尿病網膜症の血管増殖膜を用いて検討した。

B. 研究方法

- (1)培養ウシ周皮細胞を用いて、Ang-II 刺激による VEGF の分泌増加を Northern blot 解析や免疫沈降法などの分子生物学的手法にて検討し、また Ang-II 刺激に反応する VEGF の promoter 領域をルシフェラーゼアッセイにより同定した。
- (2)培養ヒト RPE を用い、炎症性サイトカイン IL-1 β や TNF- α 刺激による VEGF の分泌増加を Northern blot 解析にて検討し、摘出脈絡膜新生血管膜にて IL-1、TNF- α の分泌細胞を二重染色法にて同定した。

(3)培養ウシ血管内皮細胞を用い、VEGF 刺激や低酸素による Ang-Tie2 系の発現制御を Northern blot 解析、免疫沈降法により検討した。さらに低酸素刺激による発現制御を *in vivo* で検討するため、マウス虚血性網膜血管新生モデルを作成し、*in situ* hybridization 法を行った。

(4)Ang-1, Ang-2 と Tie2 の発現部位を脈絡膜新生血管膜で免疫組織化学的に検討した。

(5)眼内血管新生疾患において循環血液中の血管内皮前駆細胞が血管新生に関与する可能性を検討するため、血管内皮前駆細胞が発現する細胞マーカーが新生血管組織中の血管内皮細胞に発現されているかを検討した。増殖性糖尿病網膜症、老人性黄斑変性症近視性新生血管黄斑症、特発性新生血管黄斑症、網膜色素線条を対象疾患とし、硝子体手術で摘出したこれら疾患の血管新生膜組織について、内皮細胞のマーカーである CD34, CD31 (PECAM-1), von Willbrand factor, Flk-1, VE cadherin に対する各抗体で免疫組織化学的染色を行った。

C.結果と考察

(1)Ang-II は周皮細胞の VEGF 分泌を刺激し、この作用は VEGF の promoter の AP-1 領域を介するものであった。この転写調節機構を制御することにより内皮細胞にパラクラインに働く VEGF を抑制し血管増殖治療法となる可能性が示唆される。

(2)IL-1b と TNF-a はともに *in vitro* で RPE の VEGF 分泌を刺激し、摘出脈絡膜新生血管膜ではマクロファージと RPE がこれら炎症性サイトカインを分泌していた。マクロファージが分泌する IL-1b や TNF-a が RPE で VEGF を誘導するメカニズムが示唆され、虚血眼内血管新生疾患と異なり、低酸素誘導が主因ではない老人性黄斑変性症においてはこれらの炎症性サイトカインを抑制する治療法が有効がある可能性が示唆された。

(3)血管内皮細胞では、VEGF 刺激と低酸素がともに Ang-Tie2 系の中で Ang-2 のみを選択的に発現増強させた。また、*in vivo* ではマウスモデルを用いた虚血性網膜血管新生において、Ang-2 の著明な発現増強が確認された。これらの条件下において、Ang-2 が血管新生に関与する可能性が示唆された。

(4)摘出脈絡膜新生血管膜において RPE は Ang-1 よりも Ang-2 を強く発現していた。新生血管では殆どの血管細胞が Ang-2 を発現するのに対し、Ang-1 は一部の血管細胞でしかみとめられなかった。Ang-2 が Ang-1 に対して相対的に優位な状況が脈絡膜血管新生疾患の背景にあると考えられ、Ang-2 を抑制することにより、これら疾患における血管新生を抑制出来る可能性が示唆された。

(5)硝子体手術により摘出した眼内血管新生膜組織における血管内皮細胞マーカーの検討では、抗 CD34 抗体は抗 von Willbrand factor 抗体とほぼ同様に多くの新生血管を検出した。しかし、抗 CD31 抗体、抗 Flk-1 抗体、抗 VE cadherin抗体は前 2 者と比較し検出された新生血管数が減少した。循環血液中の CD34 陽性血管内皮前駆細胞は分化に従い、他の内皮細胞マーカーを発現増強することが報告されている。したがって今回検討した組織の中で CD34 陽性内皮細胞群の中で Flk-1, CD31,

VE cadherin が陽性あるいは陰性の血管が観察できたことは、内皮細胞の分化程度の相異を示唆するものであり、これはすなわち眼内血管増殖組織における内皮細胞 in situ な分化過程を表していると考えられる。

D. 結論

以上の研究より糖尿病網膜症においては周皮細胞で Ang-II により誘導される VEGF が血管新生に関与する可能性が示唆され、その転写調節領域を制御することにより血管新生を抑制できる可能性が示された。脈絡膜血管新生疾患においては主としてマクロファージが分泌する炎症性サイトカインである IL-1b や TNF-a の抑制、また RPE から分泌される Ang-2 の抑制を図ることにより、血管新生が抑制される可能性が示された。虚血性網膜血管新生においては、低酸素や VEGF 刺激下で発現増強する Ang-2 を抑制することにより血管新生を抑制しうる可能性が示された。血管内皮前駆細胞が脈絡膜新生血管膜や増殖性糖尿病網膜症の血管増殖膜で見出されたことは、循環血液中の CD34 陽性血管内皮前駆細胞に上述のサイトカインを抑制する遺伝子を導入することにより in vivo に高い特異性で選択的に新生血管を target とした血管新生抑制治療が可能となりうることを示唆していると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Matsumura M, Honda Y. Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively upregulate angiopoietin2 in bovine retinal microvascular endothelial cells. J Biol Chem, in press

Otani A, Takagi H, Suzuma K, Oh H, Honda Y : AngiotensinII stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in bovine retinal pericytes. 投稿中

Oh H, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, Matsumura M, Ogura Y, Honda Y. The potential role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. 投稿中

Expressions of Angiopoietins and Tie2 in Human Choroidal Neovascular Membranes. Otani A, Takagi H, Oh H, Koyama S, Matsumura M, Honda Y. 投稿中

2. 学会発表

XIII International Congress of Eye Research (ICER) 1998.7.26~31 Paris, France

Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Honda : Role of Angiopoietin-Tie2 system in ischemia-induced retinal neovascularization. Exp Eye Res 67 : S230, 1998.

ARVO(IOVS) 1999. 5.9-15 Fort Lauderdale USA

Potential role of angiopoietin/Tie2 system in ischemia-induced retinal neovascularization. Takagi H, Seike H, Oh H, Nishimura K, Yancopoulos GD, Honda Y.

Role of Angiopoietin-Tie2 system in choroidal neovascular diseases. Oh H, Takagi H, Otani A, Ogura Y, Honda Y.

Hypoxic regulatory mechanism of angiopoietin2 in retinal microvascular cells Koyama S, Takagi H, Oh H, Otani A, Suzuma K, Honda Y

第103回日本眼科学会、千葉市

虚血性血管新生における Angiopoietin/Tie2 系の役割 高木均、清家寿之、王英泰、大谷篤史、小山真治、本田孔士

脈絡膜血管新生膜におけるアンギオポイエチンと Tie2 受容体の役割 王英泰、高木均、大谷篤史、小山真治、松村美代、本田孔士、小椋祐一郎

F.知的所有権の取得状況

該当無し

19980062

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
下記の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

**Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate
angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells.**

Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Matsumura M, Honda Y.
J Biol Chem. 1999 May 28;274(22):15732-9.

**The potential angiogenic role of macrophages in the formation of
choroidal neovascular membranes.**

Oh H, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, Matsumura M,
Ogura Y, Honda Y.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999 Aug;40(9):1891-8.

**Angiotensin II-stimulated vascular endothelial growth factor expression
in bovine retinal pericytes.**

Otani A, Takagi H, Oh H, Suzuma K, Matsumura M, Ikeda E, Honda Y.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000 Apr;41(5):1192-9.

**Expressions of angiopoietins and Tie2 in human choroidal neovascular
membranes.**

Otani A, Takagi H, Oh H, Koyama S, Matsumura M, Honda Y.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999 Aug;40(9):1912-20.