

一ゼ(ARG)IIの発現上昇を認めたことから、細胞傷害へのARGIIの関与を明らかにすることを目的とし解析を行った。

B. 研究方法

1. ARGII mRNAの発現誘導を、real-time PCRおよびODC siRNAを用いて検討した。
2. GAモデルの細胞傷害に対するARGIIの関与を、ARGII siRNAを用いて検討した。
3. ARGIIの基質であるアルギニンの細胞傷害への関与を検討した。
4. 一酸化窒素(NO)の細胞傷害への関与を、NOドナー(SNAP)を用いて検討した。
5. GAモデルにおけるNO合成酵素(NOS)の誘導をRT-PCRで検討し、NO産生をグリース法で測定した。また、ARGIIの発現抑制におけるNO産生も同様に測定した。

C. 研究結果

1. ARGII mRNAは、オルニチンの濃度と作用時間に依存して発現上昇を認め、GAモデルにおけるARGII mRNAの発現上昇は、ODCの発現を抑制しても認められた(図1)。

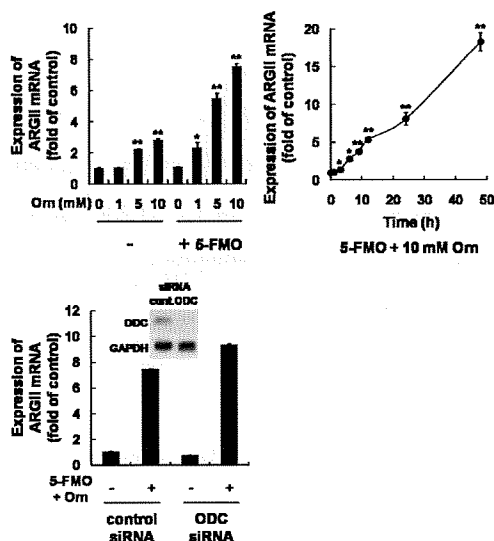


図1 オルニチンによるARGIIの発現誘導

2. ARGIIの発現抑制により、GAモデルでの細胞傷害が増強した(図2)。

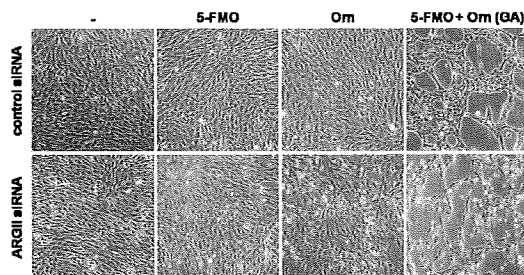


図2 ARGII発現抑制による細胞傷害

3. アルギニンの添加により細胞傷害を認め、5-FMO存在下で増強した(図3)。

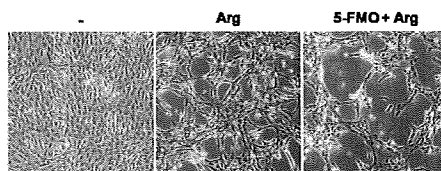


図3 アルギニンによる細胞傷害

4. SNAPの濃度と作用時間に依存して細胞傷害の増強を認めた(図4)。

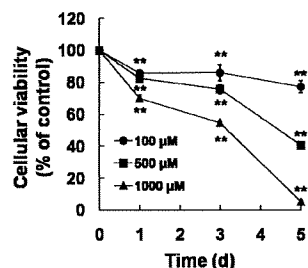


図4 NOドナー(SNAP)による細胞傷害

5. GAモデルにおいて、iNOS mRNAの発現誘導と、それに伴うNO産生の上昇を認めた。また、NO産生はARGIIの発現抑制でより上昇した(図5)。

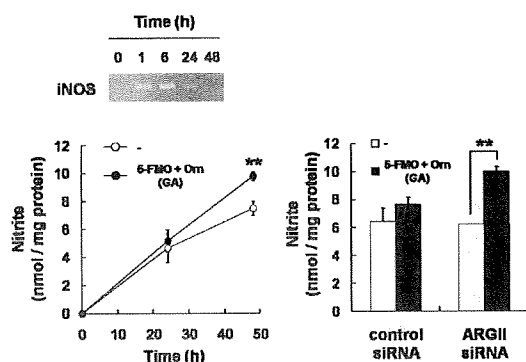


図5 iNOS の発現誘導と NO 産生

D. 考察

in vitro GA モデルによって発現上昇が認められた ARGII は、発現抑制により細胞傷害を増強させた。このことから、ARGII は細胞傷害ではなく、細胞保護に作用するものであることが示唆された。さらに、ARGII の発現抑制は NO 産生を上昇させたことから、ARGII の細胞保護は、NO 産生の抑制を介したものであることが示唆された。臨床で有用とされている低アルギニン食の機序は不明とされているが、本解析で得られた知見はそれを説明するものであると推察された。

E. 結論

OAT 遺伝子疾患として知られる GA では、RPE 細胞における細胞傷害を特徴とする。今回の解析によって本細胞傷害は、細胞内オルニチンの増加といった既知の知見にあわせ、NO によって生じるものであることを明らかにした。さらに GA モデルで発現上昇が認められた ARGII は、細胞内アルギニン濃度を低下させ、NO 産生の抑制を生じ、細胞保護に関与することを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

大中誠之 他：脳回転状脈絡網膜萎縮症の網膜色素上皮細胞におけるアルギナーゼ II の役割. 第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Simell O et al: Raised plasma-ornithine and gyrate atrophy of the choroid and retina. Lancet 1: 1031-1033, 1973.
2. Wang T et al: A mouse model of gyrate atrophy of the choroid and retina: early retinal pigment epithelium damage and progressive retinal degeneration. J Clin Invest 97: 2753-2762, 1996.
3. Ueda M et al: Prevention of ornithine cytotoxicity by proline in human retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 39: 820-827, 1998.

43. 網膜色素上皮細胞における血管内皮増殖因子発現増加への

小胞体ストレスの関与

加地 秀、松井朝子、藤井康生、寺崎浩子

(名古屋大)

研究要旨 ドルーゼンの構成成分であるアミロイドβの負荷により、網膜色素上皮 (RPE) での血管内皮増殖因子 (VEGF) 産生が増加することが報告されている。本研究ではこの VEGF 産生増加への小胞体ストレスの関与の有無を検討し、小胞体ストレスを抑制する 4-フェニル酪酸 (PBA) により VEGF 産生の抑制が可能であるかを検討した。培養 RPE 細胞へのアミロイドβ負荷により VEGF 産生は増加するが、同時に小胞体ストレスマーカーの産生も増加していた。また、これに PBA を添加することにより、小胞体ストレスマーカー、VEGF の産生は減少した。小胞体ストレスを標的とした薬剤は加齢黄斑変性の予防に有用である可能性がある。

A. 研究目的

小胞体は、タンパク質の生成と適正な 3 次元構造への折りたたみ、異常な構造となったタンパク質の分解を行う細胞内小器官である。このタンパク質の折りたたみ機構の破綻や、処理能力を超える量のたんぱく質の生成、遺伝学的変異などによる異常なたんぱく質の合成などにより、小胞体内に異常なタンパク質が過剰に蓄積することによって引き起こされる状態を小胞体ストレスといい、近年、神経変性疾患や糖尿病などさまざまな疾患の原因となりうるとして注目されている。そのようなストレス状態が生じたときに働く細胞の恒常性維持のための調節機構を unfolded protein response (UPR) と呼び、1) 折りたたみを実行する小胞体シャペロンと呼ばれる分子の転写を活性化させ、小胞体内の折りたたみ容量を

増加させるという反応、2) これ以上小胞体に送られるタンパク質の量が増えないようにする翻訳抑制という反応、3) 小胞体関連分解と呼ばれる異常タンパク質の分解機構を活性化させるという反応をしめすが、これらの反応の限界を超えると、細胞はアポトーシスをおこす。小胞体ストレスを惹起する原因としては酸化ストレスや炎症などが報告されており、これらにより小胞体ストレスが生じた結果、UPR が活性化し、その結果として、炎症性サイトカインの発現上昇、補体の活性化がおこることが報告されており、VEGF についてもその発現が上昇するという報告がある。一方ではドルーゼンの構成成分であるアミロイドβの負荷により、RPE での VEGF 産生が増加することが報告されている¹⁾。本研究の目的は1) この VEGF 産生の増加への小胞体ストレスの

関与の有無を検討すること、2) 小胞体ストレスを標的として VEGF の産生の抑制が可能であるかを検討することである。

B. 研究方法

最初にヒト RPE 由来の培養細胞である ARPE-19 をコンフルエントまで培養した。その後 1, 10 あるいは 25 μM のアミロイド β を加えた培養液に交換して 24 時間培養したものと、4-フェニル酪酸 (以下 PBA) を添加した培養液で 14 時間培養したのちに、アミロイド β を負荷したものの細胞と培養液を回収した。ELISA 法にて培養液中の VEGF 濃度を測定し、ウェスタンブロット法にて細胞ライセート中の GRP78/Bip、caspase12、コントロールとしての GAPDH を検出した。ウェスタンブロットティングのバンドはスキャナでコンピュータに取り込み、SCION Image により GRP78/Bip、caspase12、GAPDH の相対値を計算した。

PBA とは、ケミカルシャペロンと呼ばれる低分子脂肪酸で、小胞体ストレスの抑制作用を持つとされる薬剤である。また、GRP78/Bip は、小胞体ストレスによって転写が促進される小胞体シャペロンであり、caspase12 は、小胞体ストレスによってのみ活性化されるカスパーゼである。

(倫理面への配慮)

本研究は、実験動物やヒトを実験対象としていない。

C. 研究結果

アミロイド β 負荷により、コントロールと比較して VEGF の濃度は上昇しており (25 μM の場合で約 2 倍)、PBA の添加により VEGF 濃度はコントロール以下に低下していた負

(図 1A 上)。しかしながらアミロイド β の荷により GAPDH も減少しており (図 1A 下)、VEGF を GAPDH で補正すると、アミロイド β 負荷により VEGF の発現は増大し (25 μM の場合で約 7 倍)、PBA を加えた群での VEGF はコントロールと同程度になっていた (図 1B)。

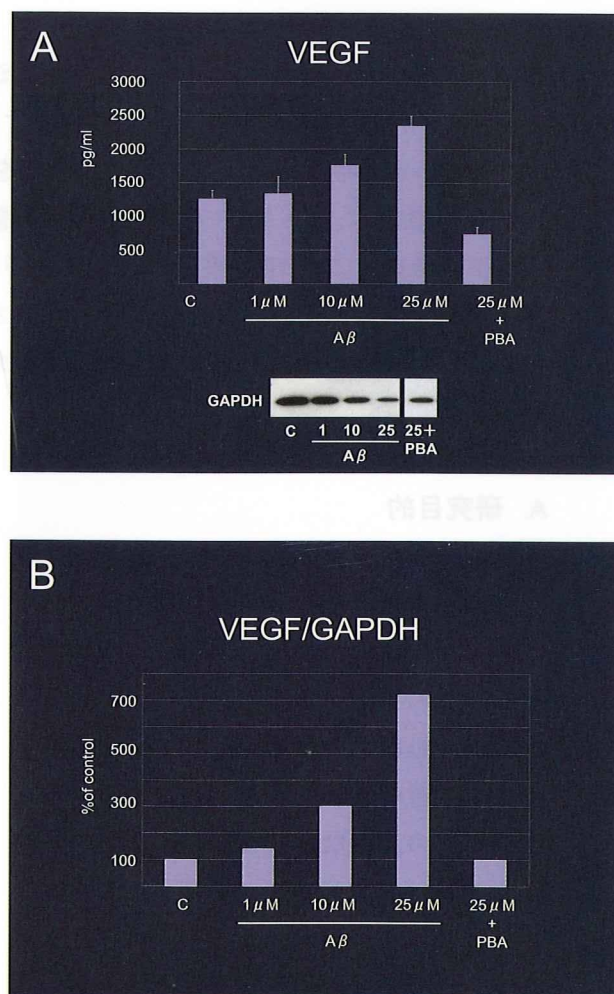


図1 アミロイド β 、PBA 負荷による VEGF、GAPDH 量の変化

GRP78/Bip、caspase12 のウェスタンブロットティングの結果を GAPDH の結果で補正したところ、アミロイド β 負荷により、GRP78/Bip、caspase12 の発現は上昇して

おり、PBAにより減少していた(図2)。

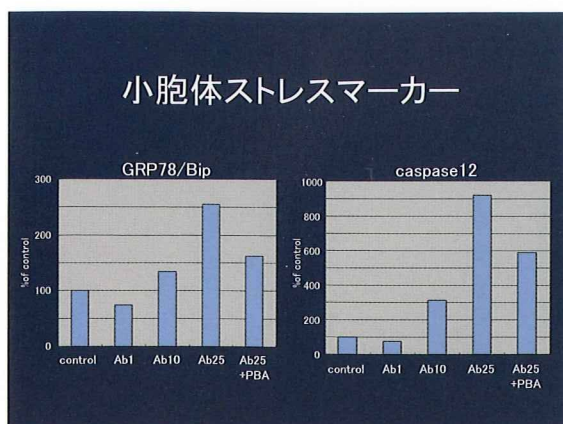


図2 アミロイドβ、PBA 負荷による GRP78/Bip、caspase12 量の変化

D. 考察

ARPE19 に対するアミロイドβ負荷により、小胞体ストレスマーカーである GRP78/Bip、caspase12 と VEGF の発現が増大しており、PBA の添加により、小胞体ストレスマーカーである GRP78/Bip、caspase12 と VEGF の発現は減少していた。このことから、アミロイドβによる VEGF 発現の増加は小胞体ストレスを介したものであると考えられる。また、小胞体ストレスによりアミロイドβの発現が増大するという報告もあつことから²、実際の眼内では蓄積したアミロイドβが小胞体ストレスを引き起こし、それがさらにアミロイドβの産生を促すというポジティブフィードバックがかかるという可能性も考えられる。*In vivo* での研究としては糖尿病、未熟児網膜症モデルマウスにおける網膜での VEGF 発現増大、新生血管発生に小胞体ストレスが関与しているということが報告されており³、小胞体ストレスを標的とした治療は滲出型加齢黄斑変性発症の予防に有用である可能性がある。また小胞体ストレス負荷により RPE のアポトーシス

がおこること⁴、網膜変性モデルの視細胞死に小胞体ストレスが関与していることが報告されている⁵。今回の研究においてもアミロイドβ負荷により GAPDH の減少と、caspase12 の増加、PBA 添加により GAPDH の増加と、caspase12 の減少が観察されたことから、小胞体ストレスを標的とした治療は萎縮型加齢黄斑変性発症の予防にも有用であるかもしれない。

E. 結論

RPE へのアミロイドβ負荷による VEGF 産生の増加には、小胞体ストレスが関与している可能性がある。また、小胞体ストレスを抑制する薬剤により RPE での VEGF 産生の抑制が可能であったことから、小胞体ストレスを標的とした薬剤は加齢黄斑変性の予防に有用である可能性があると考えられる。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 松井朝子 他：網膜色素上皮細胞における血管内皮増殖因子発現増加への小胞体ストレスの関与. 第 48 回日本網膜硝子体学会総会、名古屋市、2009.

H. 知的財産権の出願、登録情報

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

1. 参考文献

1. Yoshida T et al: The potential role of amyloid beta in the pathogenesis of age-related macular degeneration. J Clin Invest 115: 2793-2800, 2005.
2. Koyama Y et al: Induction of amyloid beta accumulation by ER calcium disruption and resultant upregulation of angiogenic factors in ARPE19 cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 49: 2376-2383, 2008.
3. Li J et al: Endoplasmic reticulum stress is implicated in retinal inflammation and diabetic retinopathy. FEBS Lett 583: 1521-1527, 2009.
4. Bian ZM et al: Regulated expression of caspase-12 gene in human retinal pigment epithelial cells suggests its immunomodulating role. Invest Ophthalmol Vis Sci 49: 5593-5601, 2008.
5. Yang LP et al: Activation of endoplasmic reticulum stress in degenerating photoreceptors of the rd1 mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci 48: 5191-5198, 2007.

44. Transwell™を用いた極性ヒト網膜色素上皮細胞の培養の

確立およびその利用について

園田祥三^{1) 2)}、加瀬 諭²⁾、坂本泰二¹⁾

(¹⁾ 鹿児島大、²⁾ Doheny 眼研究所)

研究要旨 極性を持つヒト網膜色素上皮細胞 (RPE) の培養を試み、その特性について評価を行った。胎生眼球 (18-20 週) から RPE を分離し、初代培養を 75T フラスコ上で行った。80-90%コンフレントで、トリプシン処理により細胞を回収、24 ウェルカルチャー内に挿入した Transwell™ 上に 1×10^5 個細胞を播種した。培地は、Minimum Essential Medium に N1 supplement, taurine, hydrocortisone 等を添加した培地を用いた。培養後約 2 週間でコンフレントになり、六角形の形態をとるようになった。約 3 週間後には、色素沈着が散見され、上皮細胞バリア機能の指標である Trans epithelial resistance (TER) の上昇も見られた ($>200 \Omega \cdot \text{cm}^2$)。4 週間後には TER は $400 \Omega \cdot \text{cm}^2$ を超え、電子顕微鏡所見では生体 RPE 同様に、微絨毛、細胞間接着装置、色素顆粒、細胞内器官の極性分布等の所見を認めた。また、免疫染色により ZO-1 や occludin, Na-K ATPase を細胞辺縁に一致して確認した。ELISA 法によって、分泌蛋白である血管内皮増殖因子 (VEGF) や色素上皮由来因子 (PEDF) を測定した結果、VEGF は基底側、PEDF は上皮側に分泌が有意であり、極性をもつ分泌を示した。我々の培養 RPE は極性を示し、形態・機能的にも生体 RPE の持つ特徴を示し、この極性 RPE 細胞を利用することで、*in vitro* でより正確な病態解析が行える可能性がある。

A. 研究目的

RPE の培養細胞を用いた研究が盛んに行われているが、従来の培養法では、生体 RPE がもつバリア機能、細胞間接着装置、物質輸送能などを持たない細胞 (細胞極性がない細胞) を使った実験が行われている。極性を持たない細胞を使った研究では生体の環境を厳密に反映しているとはいえない。本研究では、Transwell insert™ を利用して極性をもつ RPE の培養を確立し、その有効性、臨床応用について検討することである。

B. 研究方法

胎生眼球 (18-20 週) から RPE を分離し、初代培養を 75T フラスコ上で行い、80-90%コンフレントの状態、トリプシン処理によって細胞を回収する。24 ウェルカルチャー内に挿入した Transwell™ (pore size; $0.4 \mu\text{m}$, 直径 1.2cm、細胞播種前に、fibronectin coat 処理) 上に 1×10^5 個細胞を播種する。培地は、Minimum Essential Medium に N1 supplement, taurine, hydrocortisone 等を添加した培地 (FBS については、培養の経過において 10%FBS 含

有から1%へ順次減量)を用いた。経過中、EVOM™によりTERを測定し、極性の程度を評価や、免疫染色によるTight junction proteinの発現を確認、電子顕微鏡による形態的な培養細胞の評価をおこなった。また、培養細胞に、recombinant bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)を添加して、VEGF、PEDFの極性分泌についてELISA法で測定した。

(倫理面への配慮)

本研究はドヘニー眼研究所との共同研究であり、胎児眼球が利用可能でありIRBの許可のもと実験を行っている。

C. 研究結果

培養開始後、細胞は約2週間で六角形の形態を示し、その後色素沈着が出現。RPEの特徴がみられた。電子顕微鏡検査では、微絨毛、細胞間接着装置、色素顆粒、basal infold、細胞内器官の極性分布等の所見を認めた。ZO-1やoccludin、Na-K ATPaseなどのtight junction proteinの発現を免疫染色で確認した(図1)。バリア機能の指標である、TERも上記の細胞形態の変化に伴って上昇し、4週間後には $400 \Omega \cdot \text{cm}^2$ を超えた。また、生体RPEはVEGFは基底側、PEDFは上皮側に有意に分泌が多いが、本研究の培養細胞でも同様の極性をもつ分泌を示した。BMP-4刺激を行った場合、PEDF分泌は対照と比較し増加はなかったが、VEGFは上皮側のみ用量依存的に分泌量が増加した。

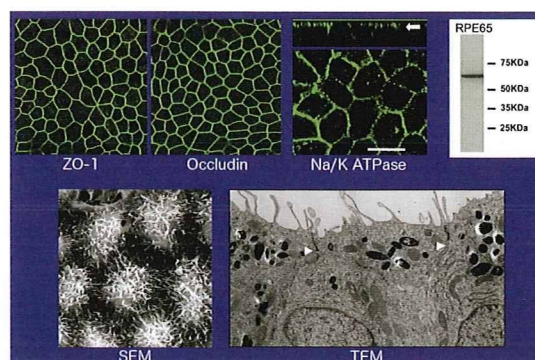


図1; 培養細胞の形態学的解析

D. 考察

本研究による、培養方法は高い再現性があり、安定した極性をもつRPEの培養が可能である。Transwell™を使用することで、培養cultureが上下2つのコンパートメントに仕切られ(図2)、それぞれRPEの上皮面・基底面に分けてVEGF、PEDFの分泌量の解析が可能となった。

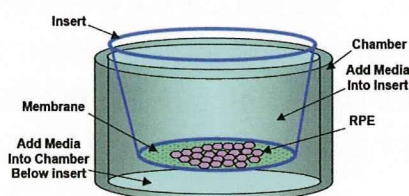


図2; Transwell™培養系

E. 結論

本研究の培養RPEは極性を示し、形態・機能的にも生体RPEの持つ特徴を示した。この培養細胞を利用することで、*in vitro*でより正確な病態解析が行える可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sonoda S et al: A protocol for the culture and differentiation of highly polarized human retinal pigment epithelial cells. Nat Protoc 4(5) : 662-673, 2009.

2. 学会発表

1. TranswellTM を用いた極性ヒト網膜色素上皮細胞の培養及びその評価 日本眼科学会総会 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 参考文献

1. Maminishkis A et al: Confluent monolayers of cultured human fetal retinal pigment epithelium exhibit morphology and physiology of native tissue. IOVS, 2006.

45. 小胞体ストレス負荷時の網膜色素上皮細胞における

tight junction の変化

吉川匡宣¹⁾、緒方奈保子¹⁾、伊豆田洋志²⁾、嶋澤雅光²⁾、原 英彰²⁾、高橋寛二¹⁾

(¹⁾ 関西医大、²⁾ 岐阜薬大)

研究要旨 近年、小胞体ストレスが糖尿病や加齢黄斑変性また神経変性疾患の原因となっていることが明らかになりつつある。我々は、小胞体ストレスを負荷した時の網膜色素上皮細胞における tight junction の変化を real time PCR 法にて検討した。その結果、occludin、claudin1 および血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現が増加しており、小胞体ストレスによって、培養網膜色素上皮細胞の tight junction に転写レベルで変化が生じていた。小胞体ストレスによって網膜色素上皮細胞の機能が変化し、加齢黄斑変性や糖尿病網膜症の病態に関与することが考えられた。

A. 研究目的

近年、小胞体ストレスが糖尿病や神経変性疾患の原因となっていることが明らかになりつつある。また小胞体ストレスによって炎症性サイトカインの発現が増強することが知られてきた。この小胞体ストレスによる炎症性サイトカインの誘導が加齢黄斑変性や糖尿病網膜症の発生、進展の一因であると報告されている。網膜色素上皮細胞の機能は加齢黄斑変性や糖尿病網膜症の病態に大きく関与する。そこで我々は、小胞体ストレスを負荷した時の網膜色素上皮細胞における tight junction の変化を検討した。

B. 研究方法

ヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE19) を培養し、小胞体ストレスを惹起する Tunicamycin (TM) を $1\mu\text{g/ml}$ 、Thapsigargin (TG) を $1\mu\text{M}$ でそれぞれ培養液に添加した。添加 6、

12、24、48 時間後に細胞を回収して RNA を抽出し、小胞体ストレス発現の指標として GRP78/Bip (小胞体固有シャペロン) および C/EBP-homologous protein(CHOP)、tight junction として occludin、claudin 1、さらに血管内皮増殖因子 (VEGF) および色素上皮由来因子 (PEDF) の発現を real time PCR 法にて検討した。また TM を添加し 48 時間後に transepithelial electorical resistance (TER) を測定した。

C. 研究結果

TM, TG 負荷で GRP78/Bip および CHOP の発現が増加しており、とくに CHOP の発現が 40 倍以上増加していた。occludin、claudin1 の発現は TM, TG 負荷で増加した (図 1, 2)。さらに VEGF の発現も TM, TG 負荷で増加した。また VEGF と occludin は時間経過とともに発現が増加していた。しかし VEGF と PEDF

の発現にあきらかな相関はなかった。また TM 負荷により TER は有意な上昇を認めた。

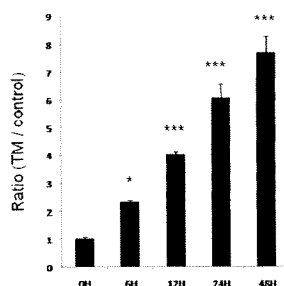


図1 Occludin の発現

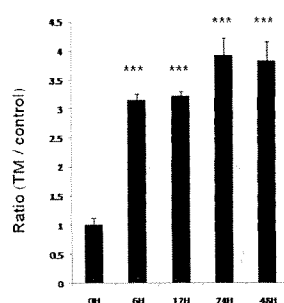


図2 Claudin1 の発現

D. 考察

今回、ER stress により VEGF の発現が上昇したが、occludin, claudin-1 の発現が増加、さらに TER は上昇していた。ER stress に対し細胞内で UPR が活性化し細胞維持に働いた可能性がある。

E. 結論

小胞体ストレスによって、培養網膜色素上皮細胞の tight junction に転写レベルで変化が生じていた。小胞体ストレスによって網膜色素上皮細胞の機能が変化し、加齢黄斑変性や糖尿病網膜症の病態に関与することが考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 参考文献

なし

46. アドレノメジュリンの脈絡膜新生血管に対する影響

湯田健太郎¹⁾、高橋秀徳¹⁾、上田高志¹⁾、井上達也¹⁾、柳 靖雄¹⁾、玉置泰裕¹⁾、
新家 眞¹⁾、永井良三²⁾

(¹⁾ 東京大、²⁾ 東京大循環器内科)

研究要旨 Adrenomedullin (ADM) はその生理作用より脈絡膜新生血管との関連性が考えられるため、その作用機序を検討した。ADM ヘテロ欠損マウスにおいてレーザー誘発性新生血管を作成したところ野生型と比較して新生血管の活動性が高かった。その作用機序を検討するため網膜色素上皮培養細胞株に ADM を投与したところ CCL2 の発現量の低下、さらに網膜色素上皮細胞が持つマクロファージ遊走作用の抑制が認められた。ADM を野生型の硝子体内に投与したところ新生血管の活動性の抑制およびマクロファージの滲出の抑制も認められた。以上より ADM は網膜色素上皮細胞からの CCL2 を抑制、それに伴うそれに伴うマクロファージの新生血管周囲への浸潤を抑制することで、脈絡膜新生血管抑制作用を発揮することが示唆された。

A. 研究目的

ADM は脂肪細胞によって産生されるサイトカインで血管新生作用、抗炎症作用などさまざまな生理作用をもつ。また最近では脈絡膜新生血管の発生機序に関与するとされる Complement factor H と複合体を形成すると報告されている。このような観点から ADM と脈絡膜新生血管との関連性が考えられるため、その作用機序を検討した。

B. 研究方法

(1) ADM ヘテロ欠損マウスにおいてレーザー誘発性新生血管を作成、蛍光眼底造影検査 (FA) 及び falt-mount 法により新生血管の面積で比較した。また、新生血管周囲のマクロファージの浸潤を免疫組織学的に検討した。(2) マウスマクロファージ培養細胞株 (RAW264.7) に ADM を投与、遊走能への影響

を検討した。(3) ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の管腔形成を指標として ADM の血管内皮への直接的な影響を検討した。(4) 網膜色素上皮培養細胞株 (D407) に ADM を投与、血管新生関連因子を RT-PCR 法で測定することで、ADM 添加による網膜色素上皮細胞からの血管誘導因子の発現の変動を検討した。

C. 研究結果

野生型と比較して ADM ヘテロ欠損マウスでは脈絡膜新生血管の活動性が有意に高いことが示された (FA: 1.88 倍 vs control, $P < 0.01$, choroidal flatmount: 1.47 倍 vs control, $P < 0.05$)。また、ヘテロ欠損マウスにおいて新生血管周囲のマクロファージの浸潤は野生型と比較して 2.82 倍 ($P < 0.03$) 上昇していた。In vitro の実験

では ADM は血管内皮細胞の管腔構造形成に直接的な作用は認めず、網膜色素上皮培養細胞からの CCL2 の発現を抑制(0.14 倍 vs control, $P < 0.001$)、またマクロファージの遊走を抑制(0.45 倍 vs control, $P < 0.05$)することが示された。

D. 考察

ADM ヘテロ欠損マウスでは脈絡膜新生血管の活動性が高くなることより ADM は脈絡膜において血管新生を抑制する作用を持つことが考えられる。しかしながら ADM は血管内皮細胞の管腔構造形成に直接的な作用は認めず、網膜色素上皮培養細胞からの CCL2 の発現を抑制、マクロファージの遊走が抑制されることより、その作用機序は血管内皮への直接的な作用ではなく網膜色素上皮細胞からの CCL2 の分泌抑制効果とそれに伴う新生血管の活動性を高めるマクロファージの遊走能の低下によるものと考えられる。

E. 結論

ADM は網膜色素上皮細胞からの CCL2 を抑制、それに伴うマクロファージの新生血管周囲への浸潤を抑制することで、脈絡膜新生血管抑制作用を発揮することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 参考文献

1. Kitamura K: Biochem Biophys Res Commun 192: 553–560, 1993.
2. Cuttitta F: J Biol Chem 276: 12292–12300, 2001.
3. W. Kim: FASEB J 17: 1937–1939, 2003.
4. Nikitenko: Pharmacol Sci 23: 101–103, 2002.
5. Shichiri, M: Hypertens Res 26: S9–14, 2003.

47. アルドース還元酵素阻害剤 Fidarestat による

脈絡膜新生血管抑制

野崎実穂¹⁾、中島淳志²⁾、守本亘孝²⁾、加藤憲明²⁾、小椋祐一郎¹⁾

(¹⁾ 名古屋市大、²⁾ 三和化学研究所)

研究要旨 アルドース還元酵素阻害剤は、糖尿病神経障害治療薬として開発されてきたが、最近、炎症に関連するサイトカインを抑制させる作用も発見され、炎症性疾患治療薬として新たに注目されている。そこで、今回、我々は、加齢黄斑変性(AMD)に対するアルドース還元酵素阻害剤の治療効果について、実験的レーザー脈絡膜新生血管(CNV)モデルで検討した。マウスを用い、Fidarestat を混餌投与した。CNV はレーザー網膜光凝固により誘導し、Fidarestat 治療群はレーザー2 日前から摂取開始した。無治療群、レーザー照射直後に血管内皮増殖因子(VEGF)中和抗体を硝子体内に投与した VEGF 抗体群、Fidarestat 摂取と VEGF 抗体の硝子体内投与を行った併用群と比較検討した。レーザー網膜光凝固 3 日後に眼球を摘出、血管内皮増殖因子(VEGF)、単球走化因子(MCP)-1 の発現を ELISA を用いて検討した。また、7 日後に蛍光眼底造影(FA)、CNV 容積を測定した。レーザー網膜光凝固 3 日後、VEGF は有意に増加していたが、Fidarestat 治療群では、無治療群と比較して有意に減少していた。MCP-1 も有意に増加していたが、Fidarestat 治療群では、無治療群と比較し減少していた。CNV 容積は、併用群で最も抑制されていた。アルドース還元酵素阻害剤である Fidarestat は、実験的レーザーCNV モデルにおいて、MCP-1、VEGF の発現を抑制し、CNV を抑制させたことから、今後、Fidarestat を用いた経口 AMD 治療の可能性が考えられた。

A. 研究目的

アルドース還元酵素阻害剤 Fidarestat¹⁾は、糖尿病神経障害治療薬として開発されてきたが、最近、炎症に関連するサイトカインを抑制させる作用も発見され、炎症性疾患治療薬として新たに注目されている^{2, 3)}。そこで、今回、我々は、炎症の関与が示唆されている加齢黄斑変性(AMD)に対するアルドース還元酵素阻害剤 Fidarestat の抑制効果について、マウスを用いた実験的レーザー脈絡膜新生血管(CNV)モデルで検討

した。

B. 研究方法

実験動物は、雄の生後約 6 週の C57BL/6J マウスを用い、Fidarestat (32mg/kg/day)を粉末飼料で混餌投与した。CNV はレーザー網膜光凝固により誘導し、Fidarestat 治療群はレーザー2 日前から摂取開始した。無治療群、レーザー照射直後に血管内皮増殖因子(VEGF)中和抗体 (1 ng)を硝子体内に投与した VEGF 抗体群、Fidarestat 摂取と

VEGF 抗体の硝子体内投与を行った併用群と比較検討した。レーザー網膜光凝固 3 日後に眼球を摘出、血管内皮増殖因子(VEGF)、単球走化因子(MCP)-1 の発現を ELISA を用いて検討した。また、7 日後に蛍光眼底造影(FA)を行い、CNV からの蛍光漏出をグレーディングした後、眼球を摘出、レーザー共焦点顕微鏡で CNV 容積を測定した。

C. 研究結果

蛍光眼底造影では、無治療群(control)と比較し、Fidarestat と抗 VEGF 抗体を併用した群で最も leak が抑制されていた($p < 0.001$)。

CNV 容積は、無治療群で $399174.4 \pm 41530.3 \mu\text{m}^3$ 、VEGF 抗体群で $329265.0 \pm 38720.3 \mu\text{m}^3$ 、Fidarestat 治療群で $174186.0 \pm 13060.0 \mu\text{m}^3$ 、併用群で $141794.9 \pm 11290.5 \mu\text{m}^3$ と併用群で最も CNV 容積が抑制されていた(図 1) ($p < 0.001$)。

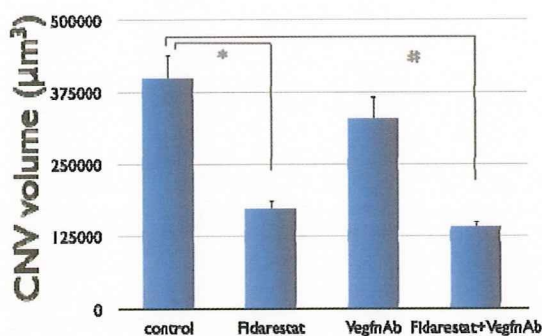


図 1 CNV 容積

control; 無治療群、Fidarestat; Fidarestat 治療群、VegfnAb; VEGF 抗体群、Fidarestat+VegfnAb; 併用群。

(Bar: Mean ± SEM, * $p < 0.05$, # $p < 0.001$)

レーザー網膜光凝固 3 日後、VEGF は有意に

増加していたが、Fidarestat 治療群では、無治療群と比較して有意に減少していた(図 2) ($p < 0.01$)。

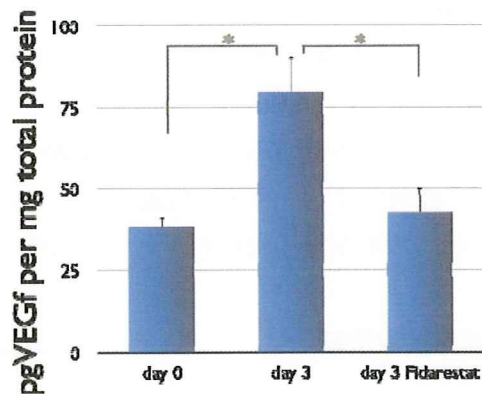


図 2 VEGF ELISA

(Bar: Mean ± SEM, * $p < 0.01$)

MCP-1 も網膜光凝固 3 日後に有意に増加していたが、Fidarestat 治療群では、無治療群と比較し 65.3%まで減少していた。

D. 考察

以上の結果から、アルドース還元酵素阻害剤である Fidarestat は、実験的レーザー CNV モデルにおいて、VEGF 中和抗体とともに CNV を抑制させた。最近の報告では、アルドース還元酵素阻害剤 Fidarestat が、ラット虚血再灌流モデルで保護作用を有していること、その機序として、Fidarestat 投与により、TNF- α 、ICAM-1 の発現が抑制されたためと考えられている²⁾。またアルドース還元酵素阻害剤が、マウス気管支喘息モデルで、TNF- α を抑制し、IL-6、IL-8 の発現を抑制したという報告もある³⁾。AMD の発症機序に、マクロファージ⁴⁾、IL-6 や TNF- α といった炎症性サイトカイン、VEGF が関与していると考えられているが、今回の結果からも、Fidarestat 投与により MCP-1 の発現を抑え、VEGF 発現を抑制させ

ることにより、CNV 抑制に働いたと考えられた。

E. 結論

アルドース還元酵素阻害剤である Fidarestat は、実験的レーザーCNV モデルにおいて、MCP-1、VEGF の発現を抑制し、CNV を抑制させた。今後、Fidarestat を用いた経口 AMD 治療の可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願完了(出願番号：特願 2010-006159)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

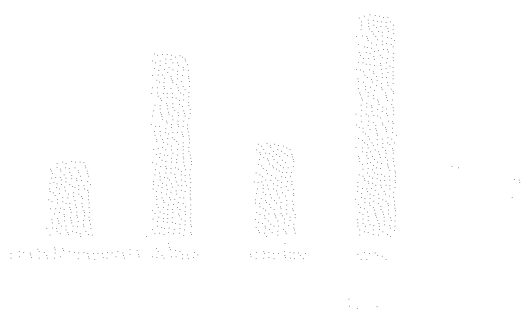
1. Mizuno K et al: Profile of a new aldose reductase inhibitor, (2S, 4S)-6-Fluoro-2', 5'-Dioxospiro-[Dhroman-4', 4'-Imidazolidine]-2-Carboxamide (SNK-860). In: Current concepts of aldose reductase and its inhibitions. Ed by Sakamoto N et al. Elsevier Science Publisher B.V.: p89-96, 1990.
2. Agardh CD et al: The aldose reductase

inhibitor fidarestat suppresses ischemia-reperfusion-induced inflammatory response in rat retina. Pharmacology 84: 257-263, 2009.

3. Yadav UC et al: Inhibition of aldose reductase prevents experimental allergic airway

inflammation in mice. PLoS One 6: e6535, 2009.

4. Sakurai E et al: Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci 44: 3578-4585, 2003.



48. 網膜への small interfering RNA プラスミド導入による

ICAM-1 の抑制

平野佳男、櫻井英二、松原明久、小椋祐一郎

(名古屋市大)

研究要旨 白血球は様々な眼疾患の発症に深く関わっている。白血球の接着分子である。Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)をコントロールすることはそれらの治療法につながると考えられる。今回我々は ICAM-1 をターゲットとした small-interfering RNA (siRNA)を効率よく細胞内で発現させるためのプラスミドをデザインし、全身投与あるいは硝子体内投与により網膜内で過剰に発現した ICAM-1 をノックダウンできるか検討した。マウスの尾静脈よりハイドロダイナミクストランスフェクション法で Green fluorescent protein (GFP)発現プラスミドを投与すると、網膜の各層に GFP の発現が認められ、網膜の細胞内へのプラスミドの導入が確認できた。汎網膜光凝固やストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスモデルでの ICAM-1 の過剰な発現を ICAM-1 をターゲットとした siRNA プラスミドを投与することにより、有意に抑制することができた。この方法を用いて眼科領域での白血球の接着に関わるぶどう膜炎、糖尿病網膜症、加齢黄斑変性による脈絡膜新生血管などの疾患の治療となりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

白血球は様々な眼疾患の発症に深く関わっている。白血球の接着分子である Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)をコントロールすることはそれらの治療法につながると考えられる。近年、特定の遺伝子発現を抑制する技術として RNA 干渉の応用が多数報告されている。そこで今回我々は ICAM-1 をターゲットとした siRNA を効率よく細胞内で発現させるためのプラスミドをデザインし、全身投与あるいは硝子体内投与で網膜内に過剰に発現した ICAM-1 をノックダウンできるか検討した。

B. 研究方法

実験動物は雄の C57/BL6J マウス。GFP 発現プラスミド 2 μ g/1.6ml を尾静脈よりハイドロダイナミクストランスフェクション法で投与し、1, 3, 5, 7 日後に眼球を摘出し、網膜の細胞内に GFP の発現が認められるか検討した。次に ICAM-1 をターゲットとした siRNA 発現プラスミドを同様にハイドロダイナミクストランスフェクション法で導入した後、1 週間後に汎網膜光凝固を施行し、翌日眼球を摘出。感覚網膜と網膜色素上皮脈絡膜の ICAM-1 の発現量を ELISA 法で測定した。ICAM-1 をターゲットとした siRNA 発現プラスミドで、過剰に発現した ICAM-1

が抑制されるか検討した。またストレプトゾトシン(STZ)全身投与(250mg/kg)でマウス糖尿病モデルを作成し、ICAM-1を過剰に発現させ、ICAM-1 siRNA プラスミドあるいは、scramble control の siRNA を硝子体内投与(2 μ g/1 μ l)したものと比較検討した。本研究はARVOと名古屋市立大学実験動物センターのガイドラインに沿って行われたものである。

C. 研究結果

GFP ベクター全身投与後、組織学的に網膜各層に GFP による蛍光が確認された。汎網

膜光凝固後、感覚網膜、網膜色素上皮一脈絡膜ともに、ICAM-1 が過剰に発現したが、ICAM-1 をターゲットとした siRNA プラスミドを投与したものでは感覚網膜、網膜色素上皮一脈絡膜ともに有意に抑制された(P<0.05)。STZ を全身投与すると血糖の上昇とともに、ICAM-1 が過剰に発現したが(P<0.05)、ICAM-1 をターゲットとした siRNA プラスミドを硝子体内投与したものでは有意に抑制された(P<0.05)。control の siRNA を投与したものでは過剰に発現した ICAM-1 が抑制されなかった(P>0.1) (図)。

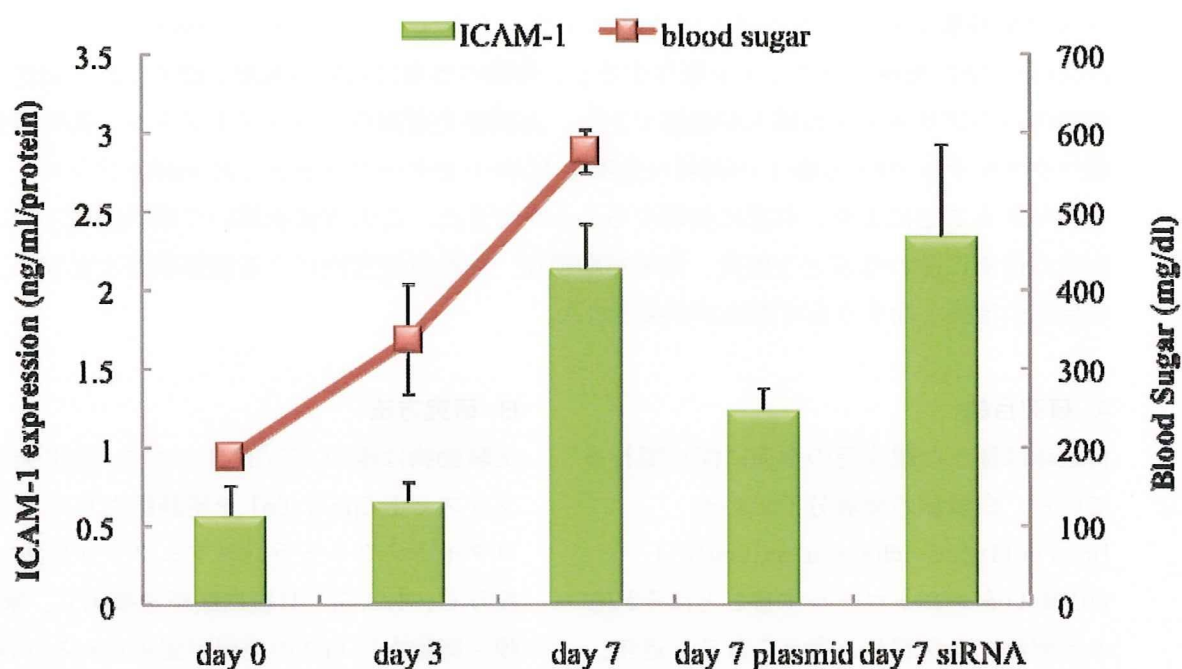


図: STZ 投与後の血糖の推移と感覚網膜における ICAM-1 発現

D. 考察

以上の結果から、siRNA プラスミドベクターが網膜の細胞内に導入され、標的とした ICAM-1 をコントロールできることが明らかとなった。今後は加齢黄斑変性に伴う新生血管への有効性や正常網膜への安全性など

を検証していく必要がある。

E. 結論

今回 in vivo でマウス網膜に ICAM-1 の siRNA プラスミドを導入できた。この方法を用いて眼科領域での白血球の接着に関わ

るぶどう膜炎、糖尿病網膜症、加齢黄斑変性による脈絡膜新生血管などの疾患の治療となりうる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hirano Y et al: Suppression of ICAM-1 in Retinal and Choroidal Endothelial Cells by Plasmid Small-interfering RNA in Vivo. Invest Ophthalmol Vis Sci 51: 508-515, 2010.
2. Hirano Y et al: Indocyanine Green Angiography-Guided Laser Photocoagulation Combined with Sub-Tenon's Capsule Injection of Triamcinolone Acetonide for Idiopathic Macular Telangiectasia. Br J Ophthalmol. In press.
3. Hirano Y et al: Intraocular pressure elevation following triamcinolone acetonide administration as related to administration routes. Jpn J Ophthalmol 53: 519-522, 2009.

2. 学会発表

1. Hirano Y et al: Suppression of ICAM-1 in murine retina by plasmid small interfering RNAs. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort lauderdale, Florida, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

なし

49. 脈絡膜新生血管に対するポリプレックスミセルを用いた

遺伝子治療の有効性の検討

入山 彩¹⁾、柳 靖雄¹⁾、玉置泰裕¹⁾、新家 眞¹⁾、西山伸宏²⁾、
片岡一則²⁾、大庭 誠³⁾、石井武彦⁴⁾

(¹⁾ 東京大、²⁾ 東京大マテリアル工学、³⁾ 東京大血管再生医療講座、⁴⁾ 東京大バイオエンジニアリング)

研究要旨 我々は高分子ミセルが静脈内投与により脈絡膜新生血管に高効率で集積することを示してきた。今回、プラスミドを内包した高分子ミセルであるポリプレックスミセルを用い、マウス脈絡膜新生血管 (CNV) への遺伝子導入及び遺伝子治療の可能性を検討した。全身投与による効率的な遺伝子デリバリーを実現するために安定性の高い PEG-C6-PAsp (DET) ブロック共重合体を設計した。遺伝子導入効率を調べるために C57B16 オス 8 週齢マウスにレーザー誘発性 CNV を作成し Yellow Fluorescent Protein (YFP) 発現プラスミド内包ミセルを 1、3、5 日後に静脈内投与し 7 日後に蛍光眼底造影および組織切片の蛍光顕微鏡観察により、YFP 発現を検討した。次に同様に C57B16 オス 8 週齢マウスに CNV を作成しヒト sflt-1 発現プラスミド内包ミセルを 1、3、5 日後に静脈内投与し 7 日後に脈絡膜伸展標本を作成し CNV 領域を計測した。

YFP ミセル静脈内注入群においては 7 日後 CNV 領域に YFP タンパクの発現が認められた。又ヒト sflt-1 ミセル静脈内注入群では 7 日後コントロール群に比して、CNV を有意に抑制した (67% vs control, $P < 0.01$)。sflt-1 発現プラスミドを内包したポリプレックスミセルを用いた遺伝子治療はマウス CNV モデルに対して有効であった。今回用いた全身投与型ミセルは CNV に対する遺伝子治療において有用な非ウイルスベクターになりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々は今までに高分子ミセルを用いた遺伝子治療について研究を行ってきた。PEG-Plys系高分子ミセルが静脈内投与により CNV に高効率で集積することを示してきた¹⁾。又光感受性物質を結合させる事で光照射による部位特異的遺伝子導入が可能である事を示してきた²⁾。更に高いプロトンスポンジ効果を有する PEG-PAsp (DET) ミセル型

ベクターを開発し効率的な遺伝子発現を有する事を明らかにした³⁾。

今回、更に改良した全身投与型 PEG-PAsp (DET) ミセル型ベクターを用い、マウス脈絡膜新生血管 (CNV) への遺伝子導入及び遺伝子治療の可能性を検討した。

B. 研究方法

全身投与による効率的な遺伝子デリバリー