

# 令和2年度研究助成 成果報告書

令和 3年 3月 18日

所属 信州大学医学部 循環病態学教室

氏名 新藤 隆行 印

## 成人失明の原因となる眼内病的新生血管の制御法の開発

### 〔背景と目的〕

本邦の中途失明原因の上位を占める糖尿病網膜症や滲出型加齢黄斑変性(nAMD)においては、各々、病的網膜新生血管、脈絡膜新生血管(CNV)が眼内に発生し、これらが浮腫、出血、線維化などを引き起こして、視機能低下を生じる。現在、これらの疾患群に対して、抗 VEGF 薬の硝子体注射が行われているが、反復投与による治療抵抗性や高額な薬剤費が問題となっており、VEGF 以外の血管制御分子に着目した治療法が求められている。我々はこれまで、アドレノメデュリン(AM)が、眼内病的血管新生の治療標的となる可能性を報告してきた。アドレノメデュリン 2/インターメジン(AM2/IMD)は、AM と同じく、カルシトニンスーパーファミリーの1つとして発見された生理活性ペプチドであるが、眼内病的血管新生における意義は不明である。

本研究では、眼内血管新生における AM2 の病態生理学的意義を、AM2 ノックアウト(AM2<sup>-/-</sup>)マウスを用いて検討した。

### 〔材料および方法〕

1) 野生型(WT)、AM2<sup>-/-</sup>マウスに、酸素誘発網膜症(OIR)を誘導し、出生 7、12、17 日目に眼から網膜展開標本を作製し、網膜血管について WT と AM2<sup>-/-</sup>マウスで比較した。また、PBS,AM,AM2 の局所投与が、OIR の病的網膜新生血管に与える影響を検討した。

2) レーザー誘導脈絡膜新生血管(LI-CNV) を、9-12 週齢の雄マウスの眼に誘導し、7 日後に脈絡膜展開標本を作成し、CNV や網膜下線維化の面積、マクロファージ浸潤を評価した。さらに、各種遺伝子発現を qPCR 法で確認し、WT、AM2<sup>-/-</sup>マウス間で比較した。

3) LI-CNV 誘導直後に、浸透圧ポンプを用いて PBS、AM、AM2 のいずれかを持続投与し、2) 同様に比較した。

4) フルオレセイン蛍光眼底造影によって、LI-CNV からの漏出に対する AM2 の影響を検討した。また、網膜血管内皮細胞(TR-iBRB)に対して、VEGF 単独あるいは AM2 との共投与を行い、血管透過性と電気抵抗に与える影響を評価した。

5) ヒト網膜色素上皮細胞(ARPE19)に対して、TGF- $\beta$  2+TNF- $\alpha$  による刺激を行い、上皮間葉転換(EMT)を誘導し、AM2 投与の有無による EMT への影響を、免疫染色および qPCR 法にて検討した。

6) 3)と同様のサンプルを用いて、トランスクリプトーム解析を行い、LI-CNV における AM2 の効果への関与が考えられる候補遺伝子について、qPCR 法によって遺伝子発現を確認した。

7) 脈絡膜複合体における Meox2 の遺伝子発現・タンパク質の発現を、qPCR 法・免疫染色で確認した。さらに、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に対して Meox2 siRNA によるノックダウン実験を行い、内皮間葉転換(EndMT)や NF- $\kappa$ B シグナルに与える影響を検討した。

## 〔結果〕

1) WT、AM2<sup>-/-</sup>新生仔マウス間で、生理的網膜血管新生、無血管領域、病的網膜新生血管領域には有意差を認めなかった。また、AM2 の局所投与は病的網膜新生血管に明らかな変化を生じなかった。

2) AM2<sup>-/-</sup>マウスでは、WT マウスに比べて、CNV は拡大し、網膜下線維化やマクロファージ浸潤の亢進を認めた。さらに、脈絡膜複合体での Vegfa, Kdr, Cd68, Cyba, Ncf1, Tgfb1, Ccn2, Serpine1 の遺伝子発現は AM2<sup>-/-</sup>マウスにおいて有意な亢進を認めた。

3) 逆に、AM2 の投与は、CNV 形成、網膜下線維化やマクロファージ浸潤を抑制した。また、AM2 投与により、脈絡膜複合体での Vegfa, Kdr, Cd68, Cyba, Ccn2 の有意な発現低下を認めた。

4) CNV からのフルオレセインの漏出は、AM2<sup>-/-</sup>マウスで増加し、AM2 投与で減弱した。培養血管内皮細胞において、VEGF によって惹起された血管透過性の亢進および電気抵抗の減少は、AM2 の投与で抑制された。

5) ARPE19 に対する TGF- $\beta$ 2+TNF- $\alpha$  刺激は、上皮系マーカーの発現低下と間葉系マーカーの発現亢進を生じたが、AM2 の投与によりそれらは抑制された。また、TGF- $\beta$ 2+TNF- $\alpha$  刺激により、ARPE19 において有意な AM2 の発現亢進を認めた。

6) トランスクリプトーム解析にて、2 倍以上もしくは 1/2 以下の有意な発現変化が認められた遺伝子は、コントロールと比べて、AM 投与で 113 遺伝子、AM2 投与で 82 遺伝子認められた。そのうち、AM と AM2 で同様な発現変化を認めた遺伝子は Meox2 を含む 15 遺伝子であった。

7) マウス脈絡膜複合体における Meox2 の遺伝子発現は、レーザー照射後 1 日目に約 1/2 に低下し、1 週間後にはレーザー照射前と同等のレベルまで戻った。レーザー照射後 1 日目の、脈絡膜複合体における Meox2 の発現は、AM2 の投与で有意に亢進し、AM2<sup>-/-</sup>マウスで有意に低下した。AM2<sup>-/-</sup>での Meox2 の発現低下を免疫染色で確認した。さらに、HUVEC において TGF- $\beta$ 2+TNF- $\alpha$  によって惹起される EndMT は、AM2 の投与で抑制されたが、siRNA による Meox2 のノックダウンにより AM2 の効果はキャンセルされた。同様に、TNF- $\alpha$  によって即時に惹起される NF- $\kappa$ B の活性化は、AM2 の投与で抑制されたが、Meox2 のノックダウンにより AM2 の効果はキャンセルされた。

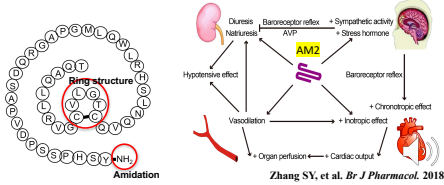
## 〔結論〕

AM2 は、血管透過性抑制、酸化ストレス抑制に加えて、Meox2 発現亢進を介した抗線維化作用や、抗炎症作用などを介して、nAMD の病態を改善させる。

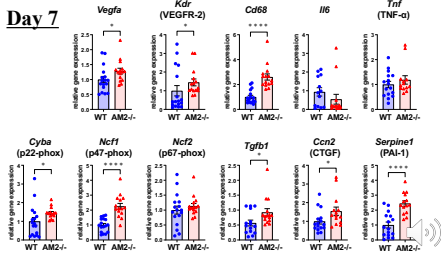
**Adrenomedullin-2/ intermedin : AM2/IMD**

アドレノメデュリン2 (AM2) はAMと同じカルシトニンファミリーペプチドとして発見された新たなペプチドです。  
 トラフグから5つのadrenomedullins (AM1-5) がクローニングされ、AM1/4/5は哺乳類におけるAdrenomedullinに対応していた。トラフグにおけるAM2/3に対応するcDNAを同定する試みの結果、ヒトとラットにおいてアドレノメデュリン2 (AM2) が武井らにより同定された。

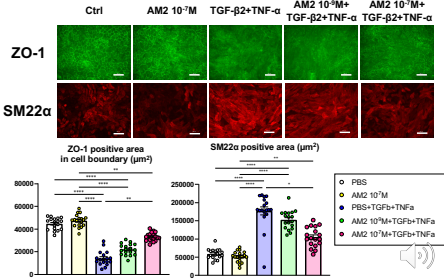
FEBS Lett., 556, 53 (2004)



The expression of the genes involved in angiogenesis, inflammation, oxidative stress, and fibrosis in the choroid was upregulated in AM2-/-

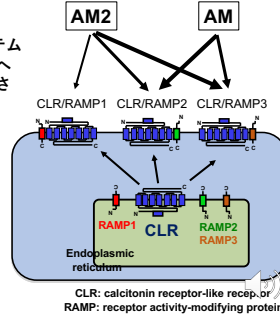


The epithelial to mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells was suppressed by AM2



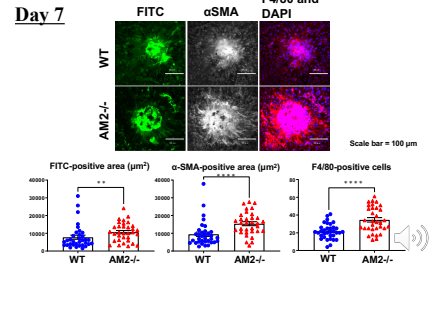
**AM2 receptor system**

AMとAM2は受容体システムを共有しますが、受容体への親和性が異なると報告されている。

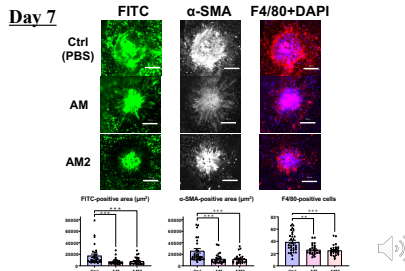


AM-/- とRAMP2-/-は、全身性の浮腫と出血により胎生致死となるが、AM2-/-は正常に生まれ成体がえらえる。

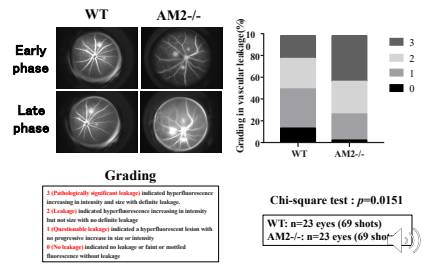
**AM2-/- showed increased CNV area, fibrosis area, and macrophage infiltration**



**Exogenous AM2 suppressed CNV formation, fibrosis, and inflammation**

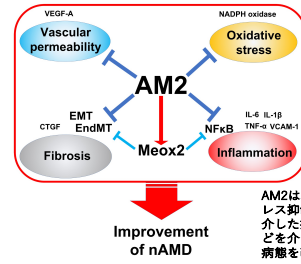
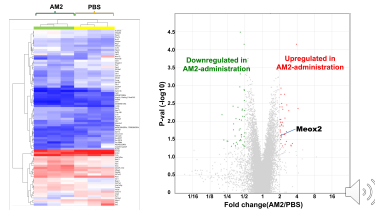


**AM2 knockout exacerbated retinal vascular permeability**



**Transcriptome analysis in choroidal complex**

There were 82 genes in the AM2-treated group whose expression was significantly changed by more than twofold or less than one-half.



AM2は、血管透過性抑制、酸化ストレス抑制に加えて、Meox2発現亢進を介した抗線維化作用や、抗炎症作用などを介して、滲出型加齢黄斑変性症の病態を改善させる。