

眼内血管新生性疾患におけるアペリンの役割

笠井 淳司

Pathological Role of Apelin in Angiogenic Eye Disease

Atsushi KASAI

Department of Pharmacotherapeutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University,
45-1 Nagaotouge-cho, Hirakata, Osaka 573-0101, Japan

(Received May 10, 2011)

Progression of ischemic retinal diseases, such as diabetic retinopathy, is closely associated with pathological retinal angiogenesis mainly induced by vascular endothelial growth factor (VEGF). Anti-angiogenic therapy using anti-VEGF antibodies is effective in treating diabetic retinopathy, even though its efficacy is not long-lasting. Since many factors are involved in angiogenesis, it is reasonable to seek new therapeutic target molecules in pathological retinal angiogenesis. We have found that apelin/APJ system is involved in not only physiological but also pathological retinal angiogenesis using a mouse model of oxygen-induced retinopathy (OIR). Oxygen-induced vessel loss in the retinas of OIR model leads to a significant increase in the capillary density accompanied by abnormal vessel growth, similar to aneurysms, which are hardly detected in the retinas of control mice. Compared with age-matched control mice, retinal apelin expression was dramatically increased during retinal angiogenesis in OIR model. Immunostaining for APJ, apelin receptor, in retinal from OIR model revealed that APJ was localized in proliferating endothelial cells in the retinal vascular plexus. Retinal angiogenesis in the OIR model was rarely observed in apelin deficient mice, although temporal expression pattern of VEGF was similar to that of wild-type OIR model. In addition, clinical study showed that vitreous concentrations of apelin were significantly higher in the proliferative diabetic retinopathy group than in the control group. Taken together, these findings clearly suggest that apelin/APJ system may be a crucial factor for pathological retinal angiogenesis. Inhibition of this system could offer new therapeutic opportunities against ischemic retinopathy.

Key words—apelin; angiogenesis; diabetic retinopathy; vascular endothelial growth factor (VEGF); apelin receptor (APLR/APJ); retina

1. はじめに

近年の高齢化社会により、中途失明を引き起こす糖尿病網膜症や加齢黄斑変性の患者数が増加している。¹⁾ これら疾患では、眼内血管新生が病態を悪化させることから、従来その血管新生を抑制する目的でレーザー照射による光凝固術が行われてきた。この光凝固術では、網膜を傷害するため、視野の欠落を引き起こしてしまうことが問題であったが、最近では、網膜を傷害しない新たな治療法として、血管

内皮増殖因子 (VEGF) の特異的中和抗体の硝子体内投与による治療が開始されている。²⁾ しかし、VEGF 中和抗体が効果的な治療効果を示す一方で、効果が一過性であること^{3,4)} や抗 VEGF 抗体に反応しない血管の存在が報告されていること⁵⁾ など、新たな問題が生じている。そのため、現在の問題点を解決する効果的な治療薬の開発には、網膜血管新生に関与する新たな因子の同定が必要と考えられる。

本稿では、このような臨床研究の知見を基に、われわれが血管新生因子として見出したアペリンの新規創薬標的分子としての可能性について紹介する。

2. アペリン/APJ システム

ヒトゲノム配列が解読され、既存の 7 回膜貫通型受容体の膜貫通領域配列を手掛かりに新規の遺伝子を見出すことが可能になった。その新規受容体のうち、リガンドが未知のものをオーファン受容体と

摂南大学薬学部薬物治療学研究室 (〒573-0101 大阪府枚方市長尾峠町 45-1)

現所属：カリフォルニア大学ロサンゼルス校, Department of Psychiatry, Semel Institute for Neuroscience and Human Behavior, University of California, Los Angeles (635 Charles E. Young Drive South, Los Angeles, CA, 90095 USA)

e-mail: akasai@mednet.ucla.edu

本総説は、平成 22 年度日本薬学会近畿支部奨励賞 (生物系薬学) の受賞を記念して記述したものである。

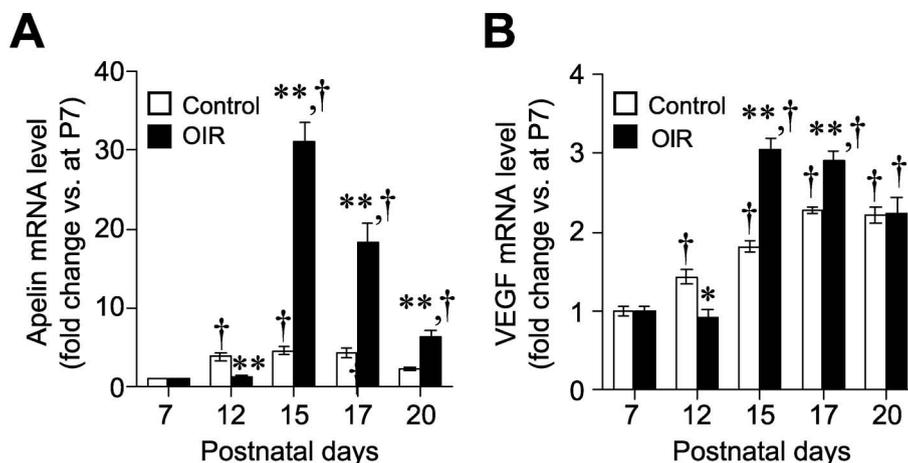


Fig. 1. Gene Expression in the Retinas of OIR Model Mice

Temporal expression patterns of apelin (A) and VEGF (B) in the retinas of control (open columns) and OIR model (closed columns) mice were examined by real-time RT-PCR ($n=4$ to 5). Data are mean \pm S.E.M. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. control; † $p<0.05$ vs. P7 values for each genotype.

呼ぶ。⁶⁾ オーフアン受容体の一つ APJ は、アンジオテンシン II 受容体 AT1 の膜貫通領域と類似性が認められるものとして発見された受容体であり、⁷⁾ アペリンは APJ の内因性リガンドとして同定されたペプチドである。⁸⁾ AT1 との相同性から、アペリン/APJ システムの機能については、血圧や心機能調節作用が最も研究されてきた。⁹⁻¹¹⁾ これらの作用に加えて、アペリンは、低酸素により発現誘導され、¹²⁾ 血管内皮細胞の増殖及び遊走作用を示すことから、^{13,14)} 血管新生との関連に注目が集まっている。われわれは、*in vitro* における血管内皮細胞に対するアペリンの作用に加えて、¹³⁾ アペリン遺伝子欠損 (KO) マウスの生理的網膜血管形成が遅延することを見出し、アペリンが生理的な網膜血管形成の促進因子であることを明らかにしてきた。¹⁵⁾

生理的な血管形成の必須因子を欠損させたマウスは、胎生致死となることがほとんどであるが、アペリン KO マウスは、正常に生まれ、野生型マウスと行動や組織学的な臓器の構造に違いがほとんど見られなかった。¹⁵⁾ また、アペリンはがん組織内の血管内皮細胞に強く発現しており、^{16,17)} 病態時血管新生モデルと考えられる角膜ポケット法では、VEGF や FGF2 の血管新生作用がアペリン KO マウスで減弱していた。¹⁵⁾ これらのことから、アペリン/APJ システムは、生理的な血管形成よりも病態時の血管新生に深く関与する可能性が考えられる。

3. 虚血性網膜血管新生とアペリン

マウス網膜では、生後一週間までに網膜表面血管

が形成され、その後立体的な網膜血管網の構築が完了する。¹⁸⁾ 糖尿病網膜症などの虚血性網膜症モデルとして汎用されている酸素誘導網膜症 (OIR) モデルでは、生後 7 日から 75% 酸素条件で 5 日間飼育すること (hyperoxic phase) で、立体的な血管形成を抑制し、網膜中心部分に無血管領域を形成する。その後通常大気で飼育することで無血管領域が慢性虚血となりそこに向かう新生血管が形成される (hypoxic phase)。本モデルの hypoxic phase で生じる新生血管は、生理的な網膜血管にはみられない動脈瘤のような異常形態を示し、それらの血管形態がヒト網膜症患者でみられる形態と類似していること¹⁹⁾ から、本モデルを用いた研究から得られる知見は、ヒト虚血性網膜症との関連が示唆されている。

網膜におけるアペリンの発現は、生理的な血管形成期でも血管形成に伴って上昇するが、OIR モデルでは、上昇の程度がより大きかった。また、既存の血管新生因子である VEGF は、血管新生が終わる時期でも発現が維持されているのに対して、アペリンは、血管新生が起こる時期に一致して一過性の



笠井淳司

カリフォルニア大学ロサンゼルス校客員研究員、博士 (薬学)。2007 年大阪大学大学院薬学研究科博士課程修了。'07 年摂南大学薬学部助教。'11 年 UCLA 客員研究員、現在に至る。研究テーマ：1) 眼内血管新生性疾患におけるアペリンの役割。2) 未熟児後遺症に関連するオリゴデンドロサイト発達障害に対する神経炎症の役割。

発現上昇を示すことから、アペリンは、網膜血管新生に特異的に作用している可能性が考えられる (Fig. 1).²⁰⁾ 一方、受容体 APJ は、新生血管及びその元となる血管にある血管内皮細胞に強く発現しており、血管新生を伴わない血管の血管内皮細胞では

ほとんど発現がみられなかった (Fig. 2).²⁰⁾ また、APJ は、網膜表面から硝子体側に突出する細胞に強く発現しており、その多くが増殖マーカーと共局在していた (Fig. 3).²⁰⁾ これらのことは、アペリン/APJ システムが OIR モデルで生じる異常な血管

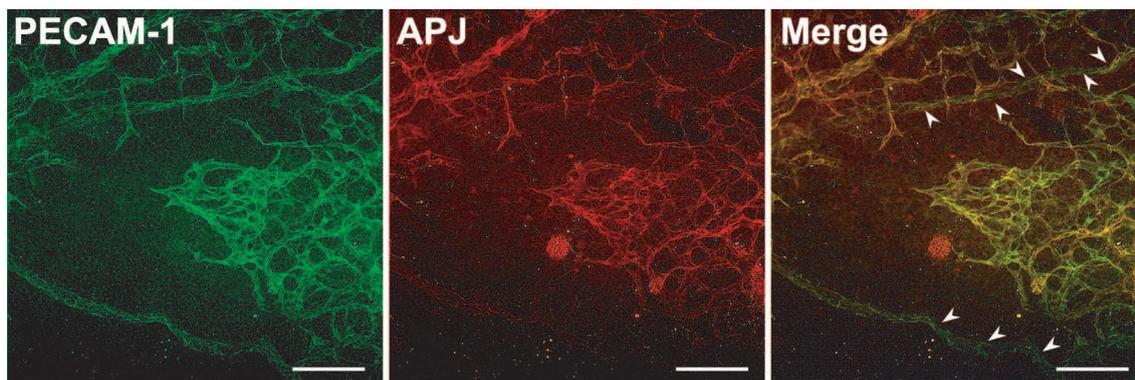


Fig. 2. APJ Expression in the Retina of OIR Model

Double immunostaining for platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) and APJ in flat-mount retina specimens from OIR model mice at P15. Representative pictures are shown. APJ expression was not detected in the endothelial cells of vessels that were not accompanied by capillary sprouting (arrowheads). The bar indicates 100 μ m.

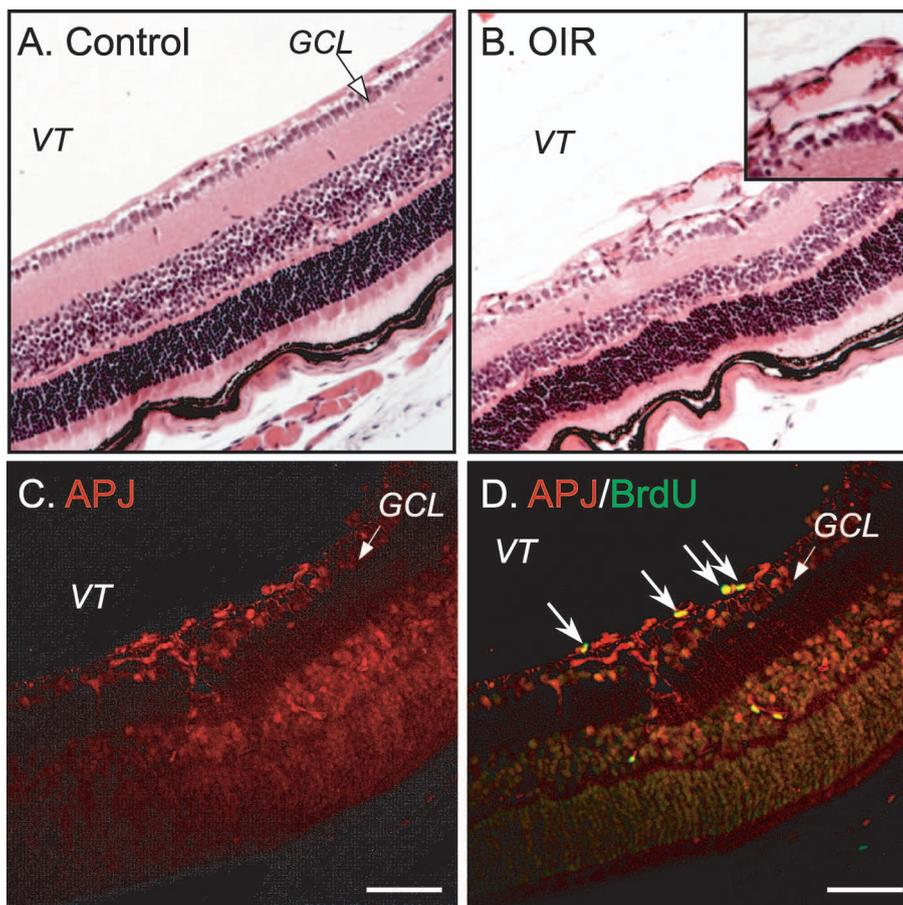


Fig. 3. Neovascular Responses and APJ Expression in the Retina of OIR Model

A and B, HE staining reveals control retina (A) and comparable neovascular responses in OIR (B) model mice. C and D, Double immunostaining for APJ and BrdU in retinal cross sections in OIR model mice at P17. GCL indicates ganglion cell layer; VT, vitreous; and arrows, double labeled cells. The bar indicates 50 μ m.

新生に深く関与していることを示している。

さらに、アペリン KO マウスを用いた OIR モデルでは、異常形態の新生血管を含む血管新生が有意に抑制され、網膜から硝子体側に突出する細胞数が有意に減少していた (Fig. 4).²⁰⁾ これまで報告されている血管新生に関与する因子は、VEGF の発現を調節していることが知られている。²¹⁻²³⁾ アペリンが VEGF の発現調節を介して血管新生を調節しているのか否かについて、アペリン KO マウスの網膜の VEGF 及びその受容体の発現量を解析した。その結果、アペリン KO マウスでは、hypoxic phase における VEGF の発現上昇は、野生型マウスと同程度もしくはそれ以上であること (Fig. 5)²⁰⁾ から、アペリン KO マウスにおける血管新生の低下は、既存の血管新生因子の発現量調節によるものではなく、アペリン/APJ システムの血管内皮細胞の増殖

作用が欠落した結果であると考えられる。

4. ヒト網膜症患者におけるアペリン

OIR モデルでは、アペリンが病的網膜血管新生に関与する因子であることが明らかになったものの、アペリンがヒト疾患で機能しているかは不明である。最近、増殖性糖尿病網膜症患者の硝子体内アペリン濃度は、対照群の患者の値より有意に上昇していることが明らかにされた。²⁴⁾ また、血中では、アペリン濃度の上昇がみられないことから、眼内血管新生が起きている局所で作用していることが考えられる。一方で、これらの患者の VEGF 濃度は、硝子体内及び血中でも上昇している。²⁴⁾ 血中での VEGF 濃度上昇は、VEGF 中和抗体を用いた時に全身性の副作用につながると考えられる。また、硝子体内アペリン濃度は、VEGF 濃度と相関がないことから、これらのシグナルの独立性が示され、

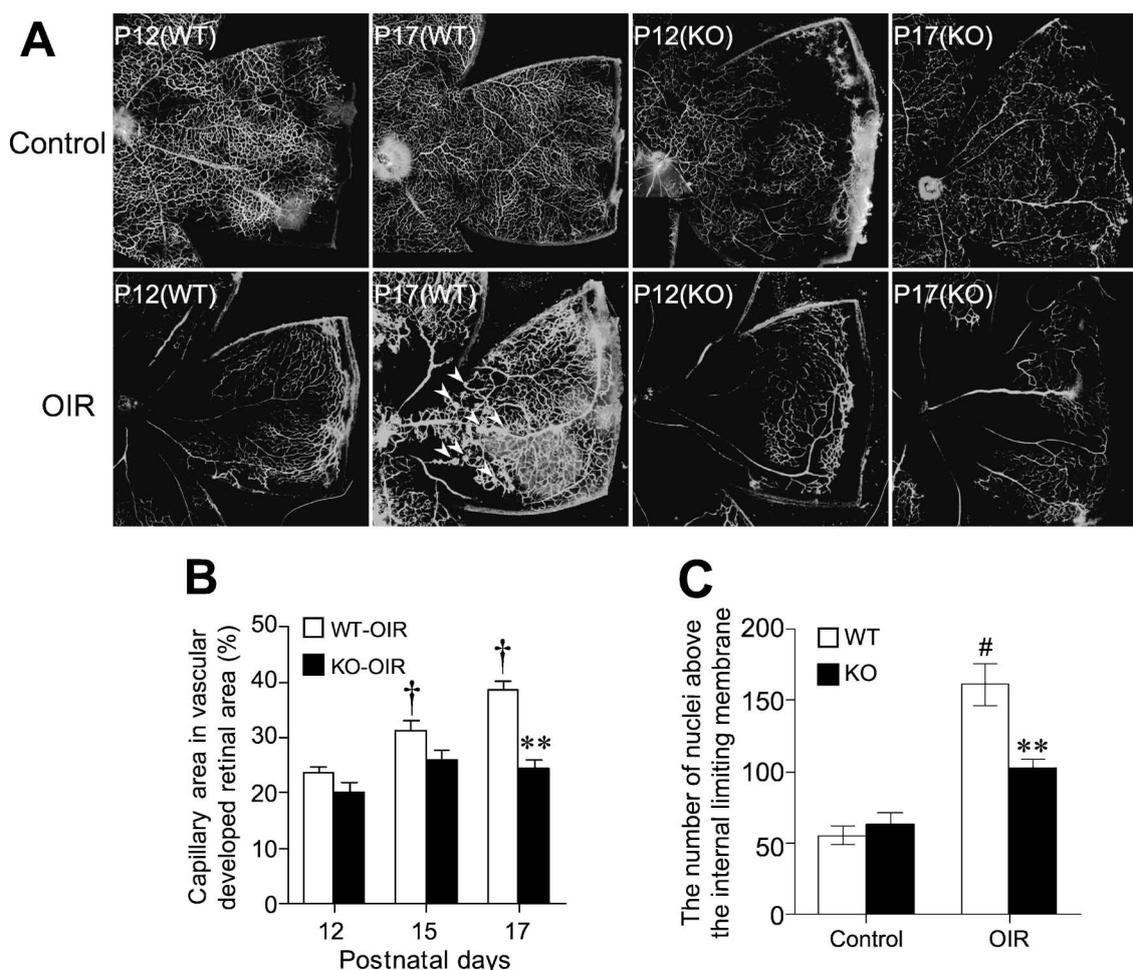


Fig. 4. Apelin-KO OIR Model Mice

A, Representative pictures show vaso-oblivation and pathological angiogenesis in apelin-KO and WT mice. Arrowheads indicate abnormal vessels. B, Capillary density in the retinas of OIR model mice ($n=5$ to 14). C, The number of cell nuclei on the vitreal side of the internal limiting membrane. Data are given as the mean \pm S.E.M. ** $p<0.01$ vs. WT-OIR, † $p<0.05$ vs. P12 values, ‡ $p<0.05$ vs. control.

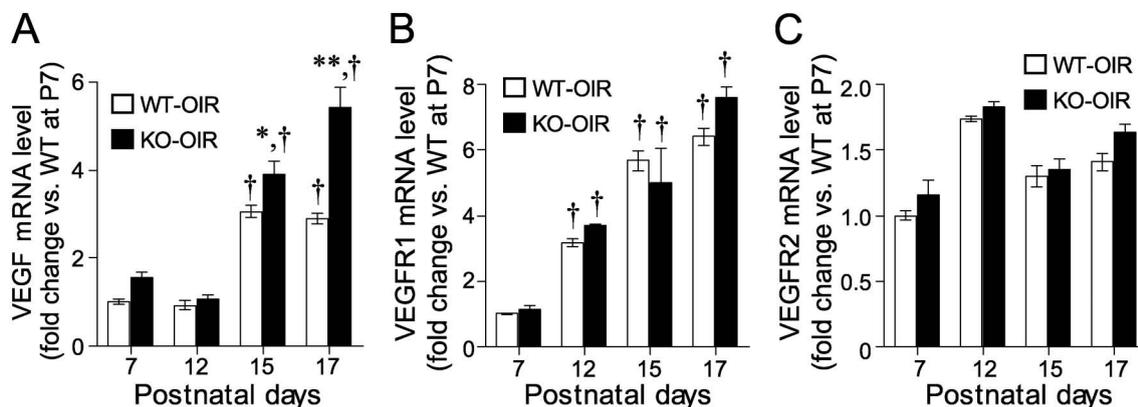


Fig. 5. VEGF Expression in the Retinas of Apelin-KO OIR Model Mice

A through E, Expressions of VEGF (A), VEGFR1 (B), and VEGFR2 (C) in the retinas of WT and apelin-KO mice were examined by real-time RT-PCR ($n=4$ to 5). Data are given as the mean \pm S.E.M. * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ vs. control, † $p<0.05$ vs. P7 values for each genotype.

VEGF に依存しない血管新生にアペリンが関与する可能性が考えられる。

5. おわりに

現在臨床応用されている医薬品の約半数が G タンパク質共役型受容体を標的としている。そのため、多くの製薬企業が既にもつライブラリーデータや創薬に向けた方法が確立されている点において、GPCR を標的とするアペリン/APJ システムは、臨床応用されやすいと考えられる。

また、VEGF は、血管形成期だけではなく、血管内皮細胞の機能維持にも重要な役割を担うため、²⁵⁾ その発現は、血管形成後も低下せず維持されている。そのため、VEGF 中和抗体を用いると、血管内皮細胞の維持に必要な作用も抑制され、副作用につながる。これに対して、アペリン及び APJ の網膜における発現は、成体マウスになるとほとんど検出されないため、血管新生時にのみ特異的に発現上昇するシグナルであることが示されている。すなわち、糖尿病網膜症などを罹患するヒトでは、アペリン発現は血管新生を伴う患者でのみみられる可能性が高い。これらのことから、アペリン/APJ システムを標的とする治療薬は、副作用の少ない特異的な血管新生抑制を示す可能性を持っている。また、VEGF シグナルとは独立していることが示唆されていることから、VEGF 中和抗体と併用することで、より多くの血管新生を抑制できることが考えられる。本研究の成果から、今後、臨床応用される新規治療薬が開発されることを切に願っている。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました摂南大学薬学部前田定秋教授を始めとする諸先生方、ご協力を頂きました薬物治療学研究室の皆様に深謝いたします。

REFERENCES

- 1) Rosenberg E. A., Sperazza L. C., *Am. Fam. Physician*, **77**, 1431–1436 (2008).
- 2) Campochiaro P. A., *Drugs Today (Barc)*, **43**, 529–537 (2007).
- 3) Simó R., Hernández C., *Diabetologia*, **51**, 1574–1580 (2008).
- 4) Wirostko B., Wong T. Y., Simó R., *Prog. Retin. Eye Res.*, **27**, 608–621 (2008).
- 5) Gomi F., Sawa M., Sakaguchi H., Tsujikawa M., Oshima Y., Kamei M., Tano Y., *Br. J. Ophthalmol.*, **92**, 70–73 (2008).
- 6) Wise A., Jupe S. C., Rees S., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **44**, 43–66 (2004).
- 7) O'Dowd B. F., Heiber M., Chan A., Heng H. H., Tsui L. C., Kennedy J. L., Shi X., Petronis A., George S. R., Nguyen T., *Gene*, **136**, 355–360 (1993).
- 8) Tatemoto K., Hosoya M., Habata Y., Fujii R., Kakegawa T., Zou M. X., Kawamata Y., Fukusumi S., Hinuma S., Kitada C., Kurokawa T., Onda H., Fujino M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **251**, 471–476 (1998).
- 9) Lee D. K., Cheng R., Nguyen T., Fan T., Kariyawasam A. P., Liu Y., Osmond D. H., George S. R., O'Dowd B. F., *J. Neurochem.*, **74**, 34–41 (2000).

- 10) Ishida J., Hashimoto T., Hashimoto Y., Nishiwaki S., Iguchi T., Harada S., Sugaya T., Matsuzaki H., Yamamoto R., Shiota N., Okunishi H., Kihara M., Umemura S., Sugiyama F., Yagami K., Kasuya Y., Mochizuki N., Fukamizu A., *J. Biol. Chem.*, **279**, 26274–26279 (2004).
- 11) Zhang Q., Yao F., Raizada M. K., O'Rourke S. T., Sun C., *Circ. Res.*, **104**, 1421–1428 (2009).
- 12) Ronkainen V. P., Ronkainen J. J., Hänninen S. L., Leskinen H., Ruas. J. L., Pereira T., Poellinger L., Vuolteenaho O., Tavi P., *FASEB J.*, **21**, 1821–1830 (2007).
- 13) Kasai A., Shintani N., Oda M., Kakuda M., Hashimoto H., Matsuda T., Hinuma S., Baba A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325**, 395–400 (2004).
- 14) Masri B., Morin N., Cornu M., Knibiehler B., Audigier Y., *FASEB J.*, **18**, 1909–1911 (2004).
- 15) Kasai A., Shintani N., Kato H., Matsuda S., Gomi F., Haba R., Hashimoto H., Kakuda M., Tano Y., Baba A., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **28**, 1717–1722 (2008).
- 16) Kälén R. E., Kretz M. P., Meyer A. M., Kispert A., Heppner F. L., Brändli A. W., *Dev. Biol.*, **305**, 599–614 (2007).
- 17) Sorli S. C., Le Gonidec S., Knibiehler B., Audigier Y., *Oncogene*, **26**, 7692–7699 (2007).
- 18) Stone J., Itin A., Alon T., Pe'er J., Gnessin H., Chan-Ling T., Keshet E., *J. Neurosci.*, **15**, 4738–4747 (1995).
- 19) Stitt A. W., Gardiner T. A., Archer D. B., *Br. J. Ophthalmol.*, **79**, 362–367 (1995).
- 20) Kasai A., Ishimaru Y., Kinjo T., Satooka T., Matsumoto N., Yoshioka Y., Yamamuro A., Gomi F., Shintani N., Baba A., Maeda S., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **30**, 2182–2187 (2010).
- 21) Ruberte J., Ayuso E., Navarro M., Carretero A., Nacher V., Haurigot V., George M., Llombart C., Casellas A., Costa C., Bosch A., Bosch F., *J. Clin. Invest.*, **113**, 1149–1157 (2004).
- 22) Suganami E., Takagi H., Ohashi H., Suzuma K., Suzuma I., Oh H., Watanabe D., Ojima T., Suganami T., Fujio Y., Nakao K., Ogawa Y., Yoshimura N., *Diabetes*, **53**, 2443–2448 (2004).
- 23) Higuchi A., Ohashi K., Kihara S., Walsh K., Ouchi N., *Circ. Res.*, **104**, 1058–1065 (2009).
- 24) Tao Y., Lu Q., Jiang Y. R., Qian J., Wang J. Y., Gao L., Jonas J. B., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **51**, 4237–4242 (2010).
- 25) Coultas L., Chawengsaksophak K., Rossant J., *Nature*, **438**, 937–945 (2005).