



Title	Novel Molecular Targets for Treatment of Ocular Neovascular Diseases
Author(s)	董, 震宇
Description	配架番号 : 2098
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11226号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11226
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55589
Type	doctoral thesis
File Information	Dong_Zhenyu.pdf



学 位 論 文

Novel Molecular Targets for Treatment of Ocular
Neovascular Diseases

(眼内血管新生性疾患治療における新規標的分子の探索)

2014 年 3 月

北海道大学

董 震宇

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	5 頁
実験方法	6 頁
実験結果	10 頁
考察	17 頁
総括および結論	20 頁
謝辞	21 頁
引用文献	22 頁

なお、本文における図、表の一部はすでに Molecular Vision に掲載されており、本論文における使用に当たっては出版社より承諾を得ている。

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Dong Z, Noda K, Kanda A, Fukuhara J, Ando R, Murata M, Saito W,
Hagiwara M, Ishida S.

Specific inhibition of serine/arginine-rich protein kinase attenuates
choroidal neovascularization.

Mol Vis. 2013;19:536-43.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 董震宇、野田航介、齋藤航、木下哲志、福原淳一、安藤亮、村田美幸、
神田敦宏、萩原正敏、石田晋

SRPK 阻害薬による脈絡膜血管新生の抑制効果

第 117 回日本眼科学会総会 2013 年 4 月 東京

2. Dong Z, Noda K, Kanda A, Fukuhara J, Ando R, Murata M, Saito W, Hagiwara
M, Ishida S.

Serine/Arginine-Rich Protein Kinase Blockade Attenuates Choroidal
Neovascularization

ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting.

2013.5. Seattle, USA

緒言

滲出型加齢黄斑変性 (wet age-related macular degeneration, wet AMD. 図 1) は、脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) を生じて網膜下あるいは網膜内で出血と吸収を繰り返しながら、徐々に視力低下をきたす疾患である。wet AMD は、欧米先進諸国における高齢者の主要な失明原因の一つとなっており¹、我が国においても高齢化の進行とともに中途失明の大きな割合を占めるようになりつつある。事実、2007 年に報告された福岡県久山町における疫学調査によれば、50 歳以上の住民における wet AMD の有病率は 1.2%であり、1998 年の同調査での 0.67%と比較して大幅に増加している。wet AMD は失明によって患者本人の quality of life を著しく低下させるだけでなく、労働力の低下という大きな社会的損失にもつながる。そのため、この急増する失明疾患 wet AMD の病態、すなわち CNV の発症メカニズムを解明し、有効で確実な治療法を確立することは眼科学における急務である。

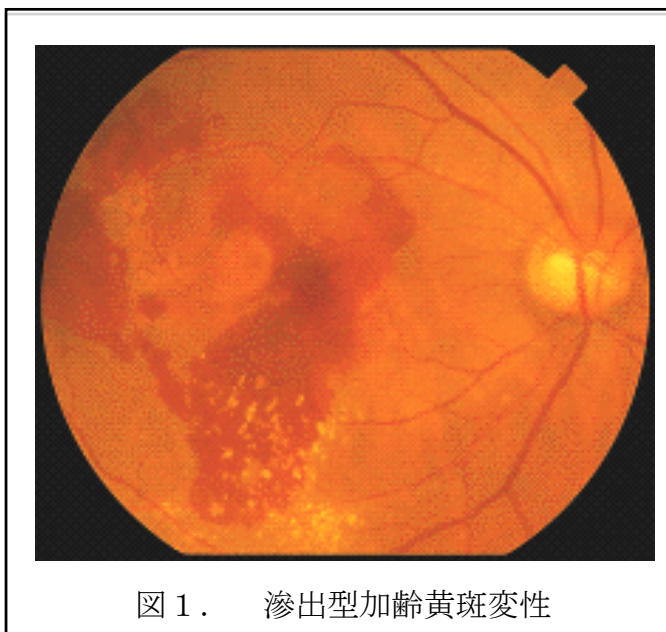


図 1. 滲出型加齢黄斑変性

CNV 形成は種々のサイトカイン、代謝、遺伝、環境などの複数の因子が関与する複雑な過程である。近年の基礎研究²および臨床研究³⁻⁵により、CNV 形成に関与する種々のサイトカインの中で血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) が CNV の病態形成および進展における中心的な役割を演じていることが明らかとなった。そして、その VEGF を標的とする複数の抗 VEGF 製剤の臨床応用によって wet AMD の視力予後は改善するようになり、その治療は現在大きく変化しつつある^{4,5}。

しかしながら、血管新生の病態メカニズムにおける VEGF の関与はそれほど単純ではないことを示唆する知見が相次いで報告されている。VEGF pre mRNA は 8 個のエクソンから構成されており、転写の選択的スプライシングにより各種アイソフォームが産生されることはすでに知られていたが、2002 年に血管新生を促進すると考えられていた従来の VEGF アイソフォームとは異なり、血管新生を抑制する VEGF アイソフォーム、VEGF165b の存在が報告された。それ以降も続々と血管新生抑制型アイソフォームが発見され (図 2)、現在では VEGF は VEGF165 に代表される血管新生促進型 VEGF と、VEGF165b

に代表される血管新生抑制型 VEGF が存在すると一部のグループから提唱されている。これらのことは、wet AMD や増殖糖尿病網膜症など血管新生をその病態に有する眼疾患において VEGF がより複雑に関与していることを示唆している⁶。この VEGF165b は C 末端の 6 個のアミノ酸が VEGF165 と異なるが、VEGF165 と同様に 165 個のアミノ酸から構成されており⁶、生理的な状態では眼組織における VEGF 全体の半分以上を占めているとされる⁷。さらに VEGF165b は、VEGF レセプターに対して VEGF165 と同等の親和性を持っており、VEGF165 を競合阻害することによって血管新生抑制、白血球遊走阻害をおこなう⁸。事実、VEGF165b を投与することにより腫瘍血管新生および腫瘍の進展が抑制されたことが報告されており⁹、また眼科領域においても VEGF165b が網膜血管新生を阻害することが *in vivo* および *in vitro* 系実験で確認されている¹⁰。さらに、リコンビナント VEGF165b を用いたマウス CNV モデルでも、CNV に対する抑制効果が確認された¹¹。これらの知見は、血管新生抑制型 VEGF と血管新生促進型 VEGF のバランス調整が CNV 形成を阻害する新たな治療アプローチとなりうることを示している。

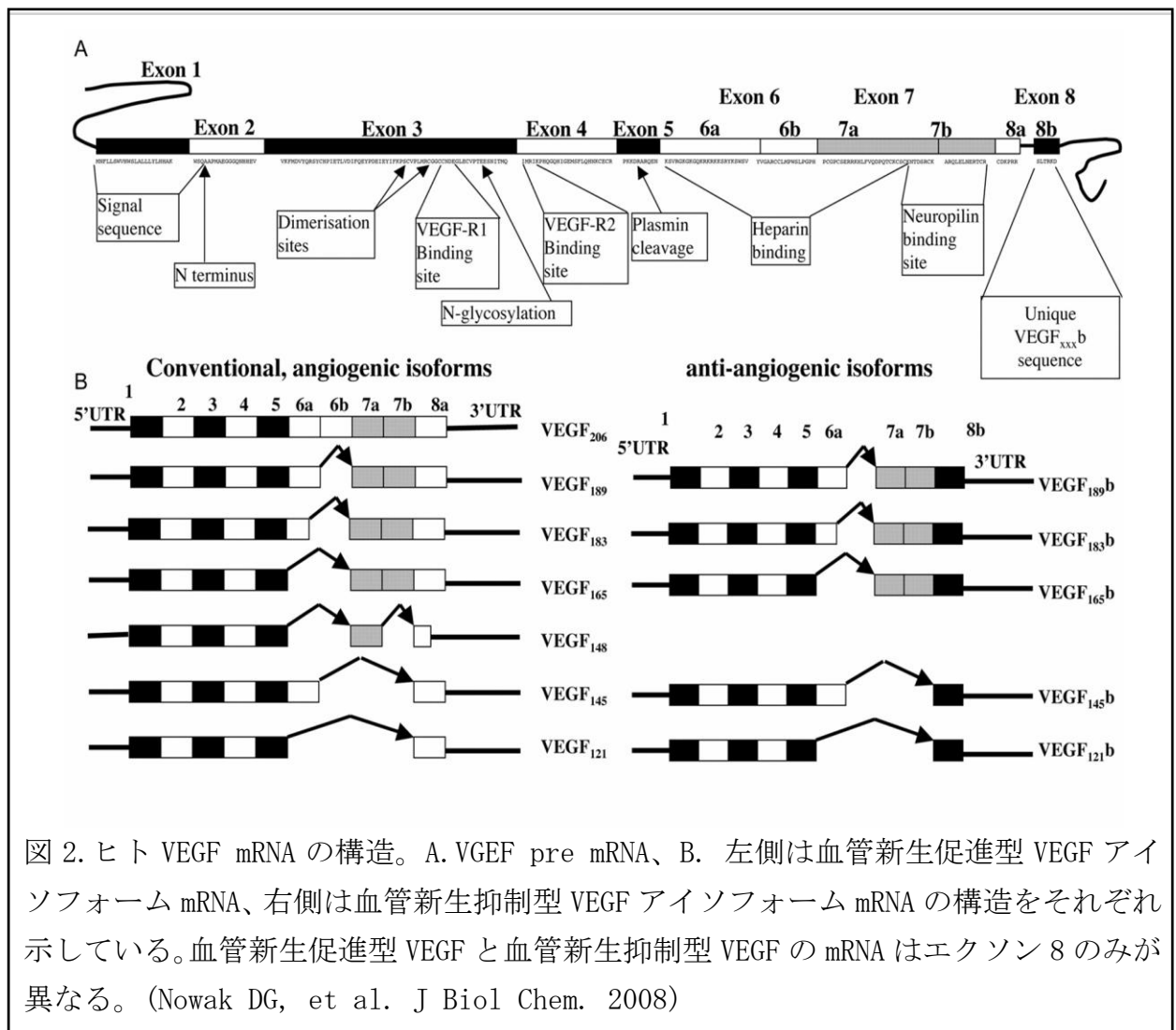


図 2. ヒト VEGF mRNA の構造。A. VEGF pre mRNA、B. 左側は血管新生促進型 VEGF アイソフォーム mRNA、右側は血管新生抑制型 VEGF アイソフォーム mRNA の構造をそれぞれ示している。血管新生促進型 VEGF と血管新生抑制型 VEGF の mRNA はエクソン 8 のみが異なる。(Nowak DG, et al. J Biol Chem. 2008)

VEGF165b と VEGF165 は同一の VEGF 遺伝子より転写された pre mRNA が選択的スプライシングを経た翻訳産物である。VEGF mRNA は 8 つのエクソンから構成されており、8 番目のエクソンがさらに 8a と 8b に分かれ、それぞれに proximal splicing site (PSS) および distal splicing site (DSS) が存在する¹²。PSS に相当する 8a エクソンにおいて選択的スプライシングがおこなわれる場合は VEGF165 mRNA 発現が亢進する結果、病的血管新生が亢進する。一方、DSS に相当する 8b エクソンにおいて選択的スプライシングがおこなわれる場合は、VEGF165b mRNA 発現が亢進すると同時に VEGF165 産生が抑制されるため、病的血管新生が抑制される¹²。すなわち、wet AMD における CNV や増殖糖尿病網膜症における線維性血管組織などの眼内血管新生でも、虚血や炎症などによってこの VEGF165/VEGF165b 産生のバランスが崩れ、血管新生促進型の VEGF165 が優位に産生されることがその病態メカニズムの根底にあると考えられた。

この選択的スプライシングは、種々の生理的、病理的条件による異なるシグナル経路で活性化され、さらに serine/arginine-rich (SR) proteins (SR 蛋白質)と呼ばれる一群の蛋白質およびそれらをリン酸化する SR protein kinase (SRPK)により複雑に制御されている¹³。2006 年に SRPK に対する特異的阻害剤 SR protein phosphorylation inhibitor (SRPIN)340 が共同研究者である萩原正敏らのグループにより発見された¹⁴。さらに、SRPIN340 は血管新生抑制型 VEGF (VEGF165b)産生を促進して oxygen-induced retinopathy (OIR) model mouse において網膜血管新生を抑えることが明らかとなっている¹⁵。OIR 同様に VEGF165 が血管新生の中心的な役割を果たす CNV においても、SRPIN340 が CNV に対する抑制効果を有する可能性は高い。

本研究の目的は、この VEGF165b 産生を促進する SRPIN340 が眼内血管新生である CNV 形成に対する抑制効果を有するかを検討することにある。

略語表

AMD	age-related macular degeneration
CDK	cyclin dependent kinase
Clk	CDK-like kinases
CNV	choroidal neovascularization
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole
DSS	distal splicing site
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
OIR	oxygen-induced retinopathy
PDR	proliferative diabetic retinopathy
PSS	proximal splicing site
SR	proteins serine/arginine-rich proteins
SRPK	SR protein kinase
SRPIN340	SR protein phosphorylation inhibitor 340
VEGF	vascular endothelial growth factor

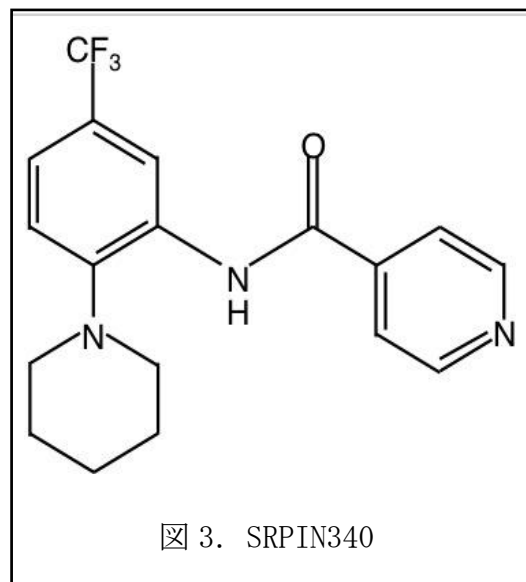
実験方法

レーザー誘導 CNV モデルマウス作製

レーザー誘導 CNV モデルマウス作製に C57Bl/6J マウス(♂、8 週齢、クレアジャパン、東京)を使用した。本研究は北海道大学動物実験に関する規定 (http://www.hokudai.ac.jp/jimuk/reiki/reiki_honbun/u0100658001.html)に従って実施した。CNV 作製に際して、まずマウスをペントバルビタール(0.05mg/g)腹腔内注射により麻酔し、5%トロピカミドフェニレフリン塩酸塩(参天製薬、大阪市)で散瞳したうえ、角膜にカバーガラスを置き、スリットランプで眼底を確認しながら視神経乳頭を中心にその周囲にレーザーを4発照射した(レーザー条件: 532nm、200mW power、0.1秒、75 μ m spot size、Novus Spectra ; Lumines、東京)。レーザー照射によりブルッフ膜が破壊されていれば気泡が観察されるので、これにより効果的なレーザー照射を確認した。レーザー照射により硝子体出血、網膜下出血が生じたマウスは実験解析から除外した。

Serine/arginine-rich protein kinase inhibitor (SRPIN340)

SRPIN340 は イ ソ ニ コ チ ン ア ミ ド 化 合 物 の 一 つ で (N-[2-(1-piperidiny1)-5-(trifluoromethyl)p henyl], (図 3)、シンチレーション近接アッセイ (scintillation proximity assay)を用いた、SPRK に特異的に結合する化合物のスクリーニングの中で発見された。SRPIN340 は SRPK1 および SRPK2 の酵素活性を選択的に阻害し、他の SR ドメインをリン酸化する酵素 (cyclin dependent kinase (CDK)-like kinases (Clk1、Clk4) ^{16, 17} を阻害しないことも確認されている。



SRPIN340 硝子体注射

SRPIN340 は 100%ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide、DMSO)で保存された状態で共同研究者である萩原正敏らから提供された。DMSO の細胞毒性のため、実験に際して、あらかじめ phosphate buffered saline (PBS, potassium chloride, 2.68mM; potassium phosphate monobasic, 1.47mM; sodium chloride, 136.89mM; sodium phosphate dibasic, 8.10mM) を使用して、20 μ M SRPIN340 0.1%DMSO、2 μ M SRPIN340

0.1%DMSO、0.2 μ M SRPIN340 0.1%DMSO と希釈しておいた。マウス眼球にレーザー照射後、速やかに角膜輪部より 33 ゲージ針(Extreme Microsyringe, Ito Corporation, Tokyo)を用いて SRPIN340 投与群に各濃度の SRPIN340、コントロール群に基剤である 0.1%DMSO をそれぞれ 1 μ L 硝子体内注射した。

CNV 面積測定

レーザー照射 7 日後に、5%ペントバルビタールを 2mL 腹腔内注射することによりマウスを麻酔したうえ、左心室より 5mL の PBS, 続いて 2.5mL の 0.5% fluorescein-isothiocyanate-labeled dextran (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を灌流した。灌流後に眼球を摘出し、2%パラホルムアルデヒドで 30 分固定した後、前眼部、水晶体、網膜を取り除き、スライドガラスの上で網膜色素上皮-脈絡膜と強膜を、視神経乳頭を中心に 4～6 箇所切開を入れて flat mount として展開した。最後に mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA)で固定してカバーガラスをかけた。Flat mount は蛍光顕微鏡(Biorevo, Keyence, Tokyo)で観察し、CNV の最大面積を測定した。これにより SRPIN340 による CNV 抑制効果を確認するとともに、最適投与量を決定した。

RNA 抽出および real-time PCR

レーザー照射及び硝子体注射 3 日後、眼球を摘出し TRIzol Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA)を用いて脈絡膜-網膜色素上皮より RNA を回収した。DNAase (Promega, Madison, WI)で処理した後、GoScrip Reverse Transcriptase及び oligo dT(20) primers (Promega)を用いて総量 800ng の RNA を逆転写させた。Real-time PCR で使用した total *VEGF*, *VEGF164a* 及び *Actb* のプライマーは表 1 に記載した配列を使用し、*F4/80* TaqMan probe は Life Technologies 社より購入した。Real-time PCR は

表 1. Primer Sequences			
mouse total <i>Vegf</i>	Forward	5'	-AAG GAG AGC AGA AGT CCC ATG A-3'
	Reverse	5'	-CTC AAT CGG ACG GCA GTA GCT-3'
mouse <i>Vegf</i> containing エクソン 8a	Forward	5'	-GTT CAG AGC GGA GAA AGC AT-3'
	Reverse	5'	-TCA CAT CTG CAA GTA CGT TCG-3'
mouse <i>Actb</i>	Forward	5'	-CAT CCG TAA AGA CCT CTA TGC CAA C-3'
	Reverse	5'	-ATG GAG CCA CCG ATC CAC A-3'
Vegf, vascular endothelial growth factor; Actb, beta-actin			

GoTaq qPCR Master Mix (Promega), THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (TOYOBO, Tokyo,

Japan) を使用し、StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies) でおこなった。反応条件はtotal VEGF、VEGFa : 95°C 5分, 続いて95°C 20秒, 55°C 20秒、72°C 20秒が40サイクル、最後に70°C 20秒; F4/80 : 95°C 5分, 続いて95°C 20秒、60°C 20秒が40サイクル、最後に70°C 20秒。Threshold cycle (C_T) 値はStepOnePlus Real-Time PCR Systemに内蔵されたプログラムにより自動的に測定された。既報¹⁸⁾に基づき *Actb* を内因性コントロールとし、各サンプルにおける各遺伝子の相対的な発現量を ΔCT 法でまず算出し、さらにSRPIN340投与群とコントロール群との間には、 $\Delta\Delta CT$ 法で各遺伝子の発現を比較した。

マウス血管新生抑制型 VEGF の検出

今回我々は、SRPK 阻害によりマウス網膜色素上皮-脈絡膜における VEGFb の産生が誘導されるという仮説を証明するため、マウス VEGFb の検出を PCR 法で試みた。マウス VEGF mRNA エクソン 8 の構造の特徴、すなわちエクソン 8a の 5'側の 66 塩基を除いた部分がエクソン 8b に相当すること(図 4)を考慮すると、フォワードプライマーをエクソン 7、リバープライマーをエクソン 8b 内でデザインすれば、VEGFa に相当する産物と VEGF b に相当する産物が得られると予想され、また、エクソン 7 内でフォワードプライマーを、エクソン 7 とエクソン 8b のジャンクションを挟むようにリバープライマーをそれぞれ設計すれば、VEGF b に相当する産物のみがみられると予想された。使用したプライマーは下記の通りである。

VEGFa と VEGFb 双方を検出するプライマー

Forward 5' -GTTTCAGAGCGGAGAAAGCAT-3'

Reverse 5'-CGTGGTGGTGACATGGTTAATCG-3'

VEGFb を検出するプライマー

Forward 5' -GTTTCAGAGCGGAGAAAGCAT-3'

Reverse 5'-TCCGGTGAGAGGTCTGCAAG-3'

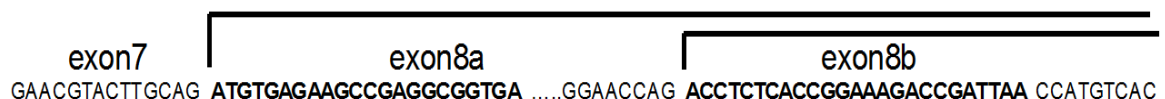


図 4. マウス VEGF mRNA の配列。エクソン 8a の 5'側の 66 塩基を除いた部分がエクソン 8b に相当する。太字は VEGFa あるいは VEGFb 蛋白質 C 末端の 6 個アミノ酸をコードする配列である。

マクロファージに対する免疫染色

AMD (CNV) の病態形成におけるマクロファージの関与は以前から報告されており、CNV モデルマウスにおいてもその関連が証明されている^{19,20}。CNVへのマクロファージ浸潤を評価するために、上記real-time PCRの他に、マウスマクロファージの得意的マーカーであるF4/80に対する免疫染色もおこない、CNV形成に促進的に作用するマクロファージの遊走に対するSRPIN340の阻害効果を検証した。

レーザー照射及び硝子体注射3日後に、眼球を摘出し、前眼部および水晶体を除去して、後眼部(網脈絡膜と強膜)を1%牛血清アルブミン(BSA)で30分ブロッキングし、ポリクローナル抗マウスCD31抗体(100倍希釈; Abcam, Tokyo)およびポリクローナル抗F4/80抗体(100倍希釈; Serotec, Oxford, UK)で4℃、一夜反応させた。続いてPBSで5回洗浄し、Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit及びAlexa Fluor® 546 goat anti-rat secondary antibody(各200倍希釈; Life Technologies)でそれぞれ30分、室温で反応させた。最後に網膜を除去しVectashield mounting medium (Vector Laboratories)で固定した。サンプルは蛍光顕微鏡(Biorevo)で観察し、CD31により染色された領域の面積、及びその中で染色されたマクロファージの数を計測し、面積1,000 μm^2 あたりのマクロファージ数を算出した。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

レーザー照射及び硝子体注射3日後、眼球を摘出し脈絡膜-網膜色素上皮細胞を採取して超音波で破碎した後、遠心(12,000 rpm, 4℃, 10分)した上で上清を採取した。脈絡膜-網膜色素上皮中のVEGF、単球走化因子(monocyte chemoattractant protein, MCP)-1、及び白血球接着分子(intercellular adhesion molecule, ICAM)-1の蛋白濃度をそれぞれのELISA kit(R&D Systems, Minneapolis, MN)で測定した。さらに各サンプルの総蛋白濃度をBCA Protein Assay Kit(Thermo Scientific, Rockford, IL)で測定し、各蛋白質濃度を補正した。

統計解析

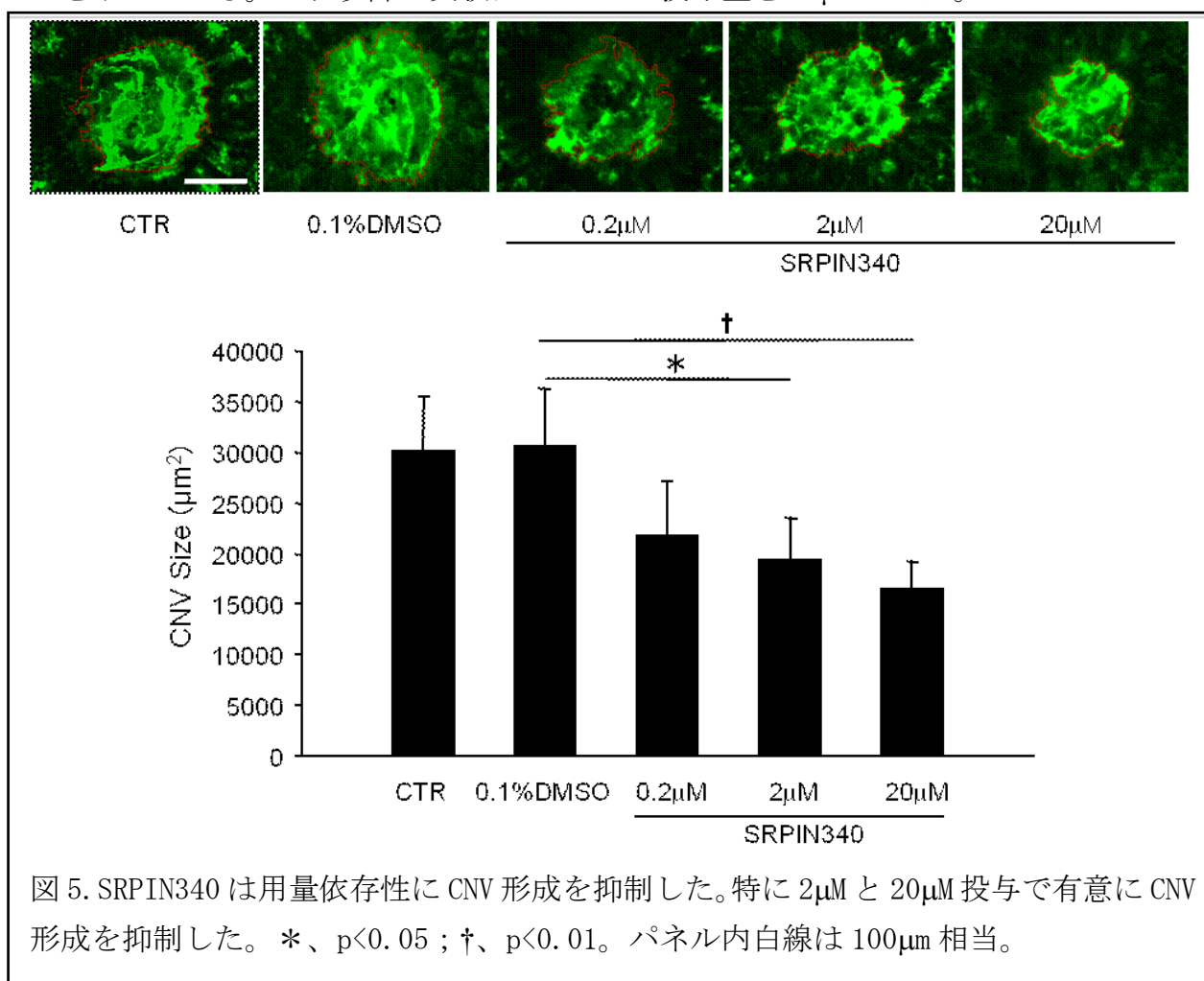
実験結果はすべて平均 $\pm$ 標準誤差で示している。統計解析は two-tailed unpaired Student *t*-test を用いた。p 値が 0.05 以下を有意とした。

実験結果

SRPK 阻害による CNV 形成抑制

まず SRPK 抑制による CNV 形成抑制効果を検討した。レーザー照射及び SRPIN340 または基剤の硝子体内注射後 7 日目に眼球摘出して、CNV 面積を測定した。基剤投与群 ($30,737 \pm 3758 \mu\text{m}^2$, $n=31$) に比較して、 $2 \mu\text{M}$ SRPIN340 投与群は有意に CNV 形成が抑制された ($19,870 \pm 1935 \mu\text{m}^2$, $n=33$, $p<0.05$)。 $20 \mu\text{M}$ SRPIN340 投与群はさらに顕著な CNV 形成抑制効果がみられた ($15,649 \pm 1803 \mu\text{m}^2$, $n=23$, $p<0.01$)。一方 $0.2 \mu\text{M}$ SRPIN340 投与群は特に CNV 形成抑制効果がみられなかった ($21,741 \pm 3695 \mu\text{m}^2$, $n=17$, $p=0.10$)。

これらの結果は SRPIN340 による SRPK 抑制は用量依存性に CNV 形成を阻害できることを示している。これ以降の実験は SRPIN340 投与量を $20 \mu\text{M}$ とした。



血管新生抑制型 VEGF (VEGF164b) の検出

既報では、RPIN340 による SRPK 抑制で全 VEGF に占める血管新生促進型 VEGF の割合が低下したことが示されている。今回我々は、SRPIN340 が血管新生促進型 VEGF の産生を抑制し、その一方で血管新生抑制型 VEGF の産生を誘導することで CNV 形成を抑制

するという仮説を証明するために、マウスから血管新生抑制型 VEGF (VEGF164b) の検出を試みた。マウス脈絡膜—網膜色素上皮細胞、網膜、肝臓、心臓、腎臓および肺から組織を採取して複数回 PCR を行ったが、VEGFa と VEGF b 両方を検出するようにデザインされたプライマーでは、VEGFa に相当するバンドしかみられず、一方 VEGFb を特異的に検出するようにデザインしたプライマーでは、まったくバンドが見られなかった。

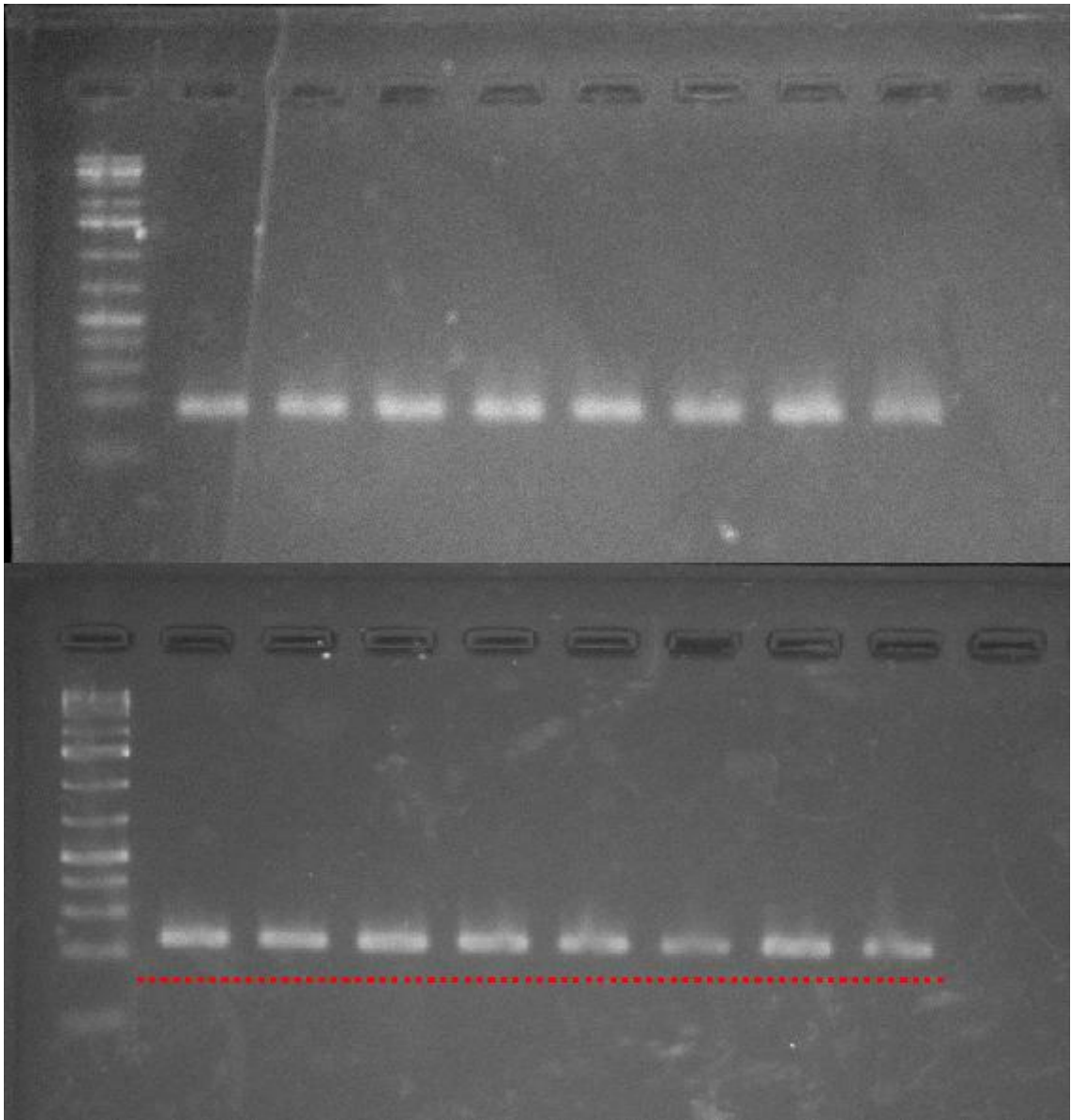


図 6. マウス網膜色素上皮—脈絡膜から採取した検体で行った PCR。上の図は β actin、下の図は VEGFa と VEGFb 双方を検出するプライマーを用いた PCR の結果を示しておりそれぞれの右端のレーンは陰性コントロールである。VEGFa に相当するバンドはみられるが、予想された VEGFb に相当するバンド(赤い点線)はみられなかった。

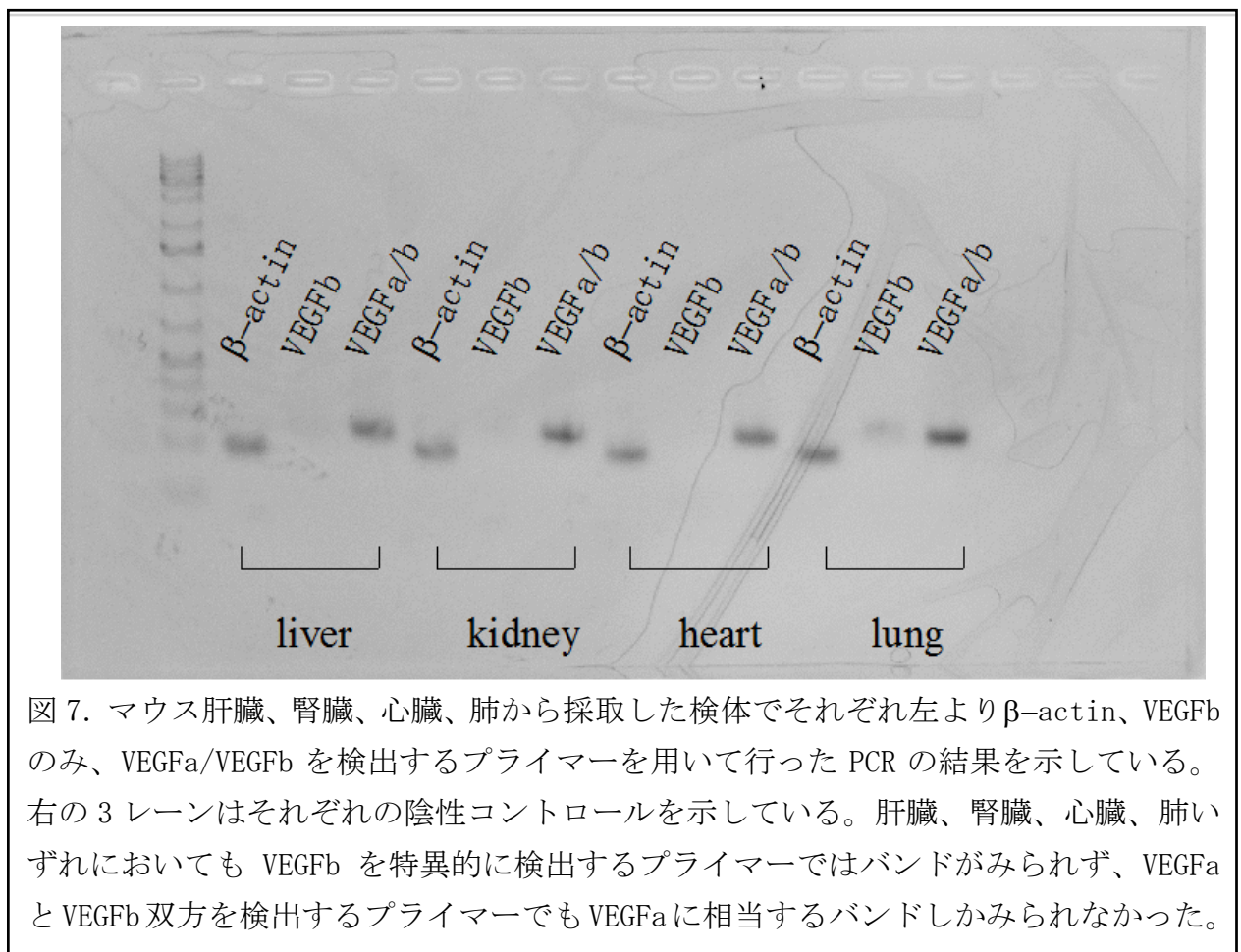
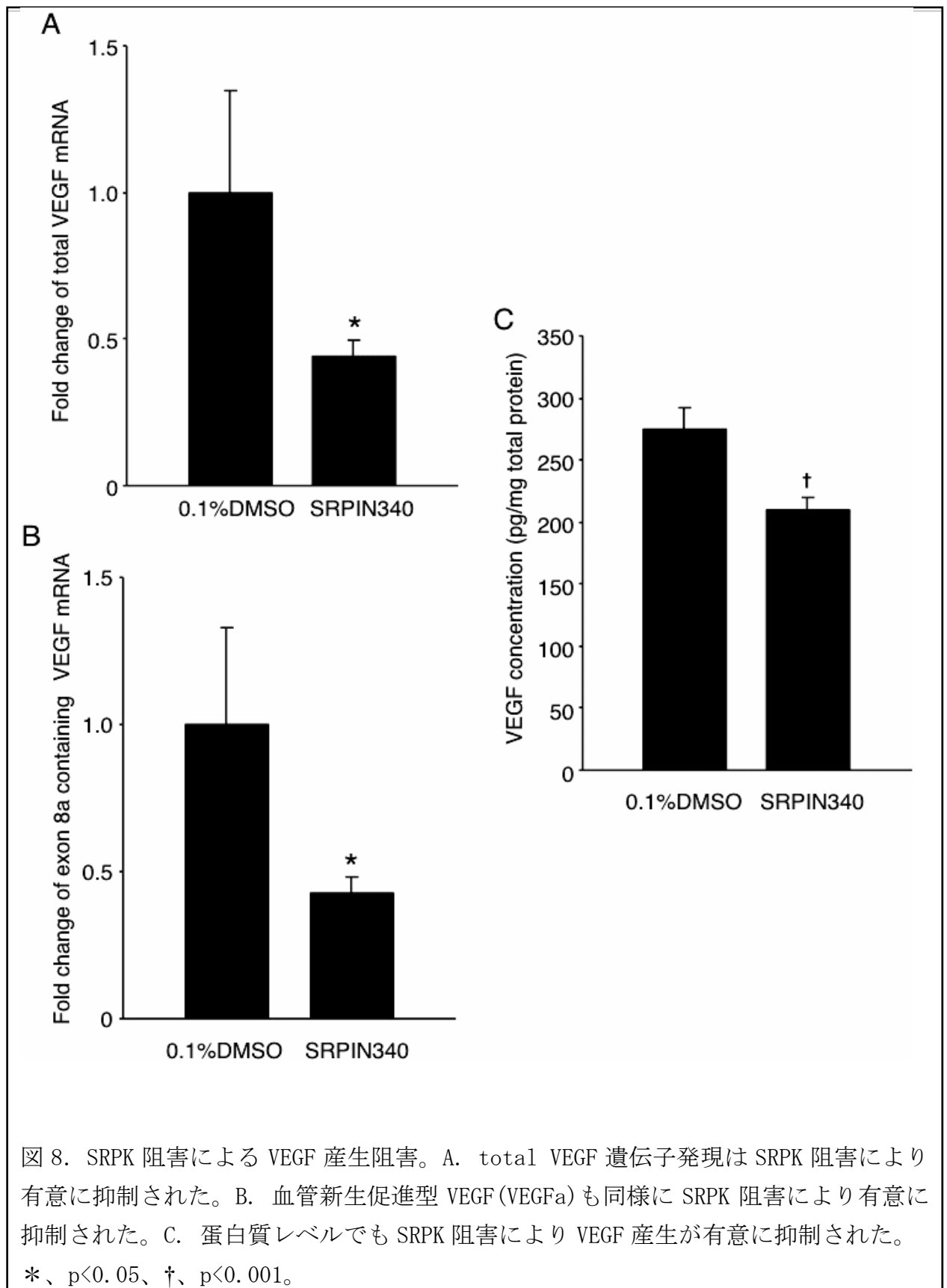


図 7. マウス肝臓、腎臓、心臓、肺から採取した検体でそれぞれ左より β -actin、VEGFbのみ、VEGFa/VEGFbを検出するプライマーを用いて行ったPCRの結果を示している。右の3レーンはそれぞれの陰性コントロールを示している。肝臓、腎臓、心臓、肺いずれにおいてもVEGFbを特異的に検出するプライマーではバンドがみられず、VEGFaとVEGFb双方を検出するプライマーでもVEGFaに相当するバンドしかみられなかった。

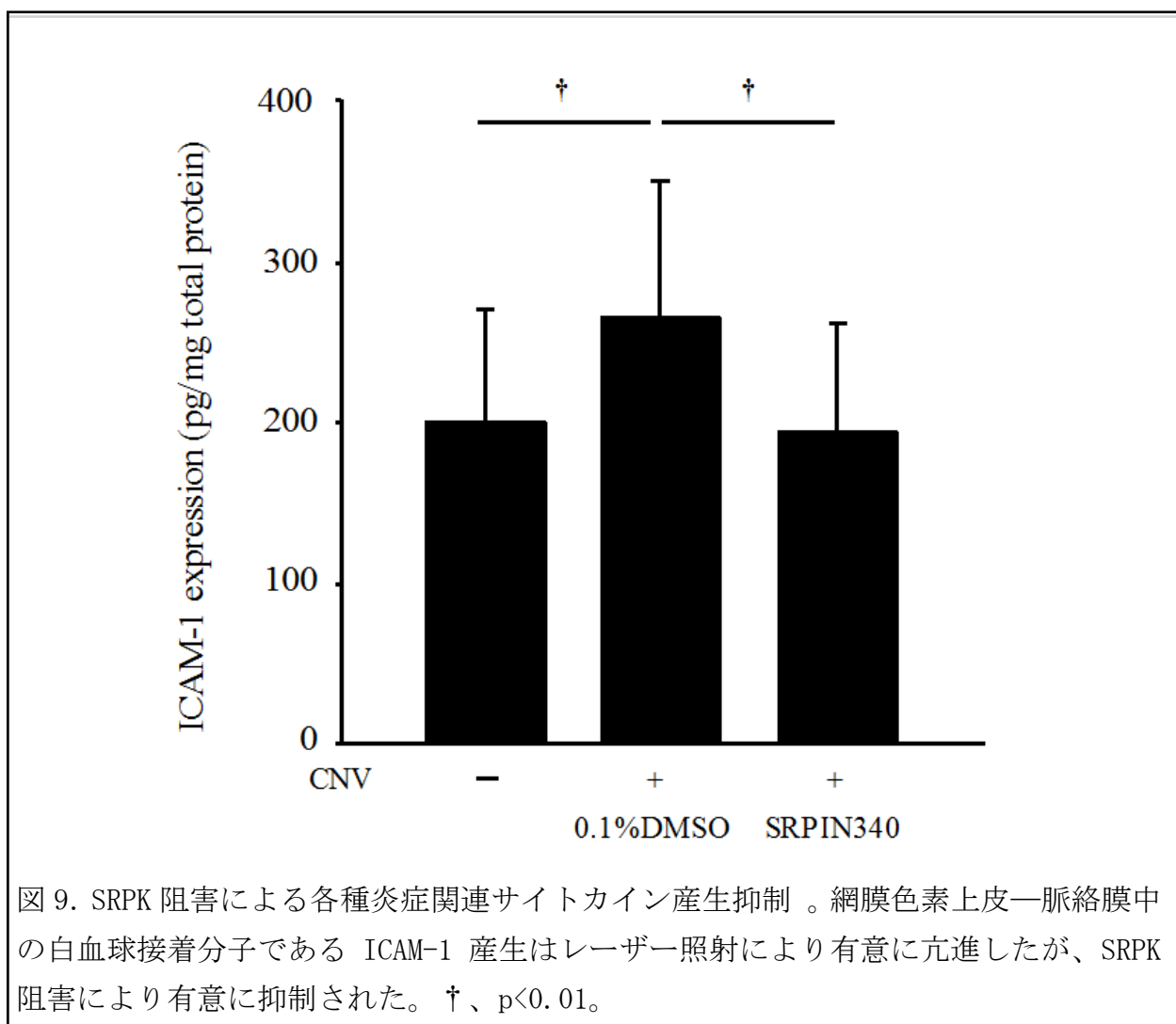
SRPK 阻害による VEGF 産生抑制

SRPIN340 による VEGF 各種アイソフォーム発現への影響を調べるため、レーザー照射および SRPIN340 または基剤投与 3 日後に、眼球を摘出して脈絡膜—網膜色素上皮より RNA を回収して、total VEGF、血管新生促進型 VEGF (VEGFa) の mRNA の発現を real-time PCR で調べた。基剤投与群 (n=8) に比較して、20 μ M SRPIN340 投与群 (n=6) では、total VEGF の発現が 56% 低下し ($p < 0.05$)、同様に血管新生促進型 VEGF (VEGFa) も 57% に低下した ($p < 0.05$)。さらに脈絡膜—網膜色素上皮中の VEGF 蛋白質濃度も基剤投与群 (274.2 ± 17.9 pg/mg, n=10) に比較して、SRPIN340 投与群は有意に低かった (209.2 ± 10.9 pg/mg, n=8. 図 8)。これらの結果は SRPIN340 による SRPK 抑制で VEGF 産生を mRNA レベルで抑制していることを示している。

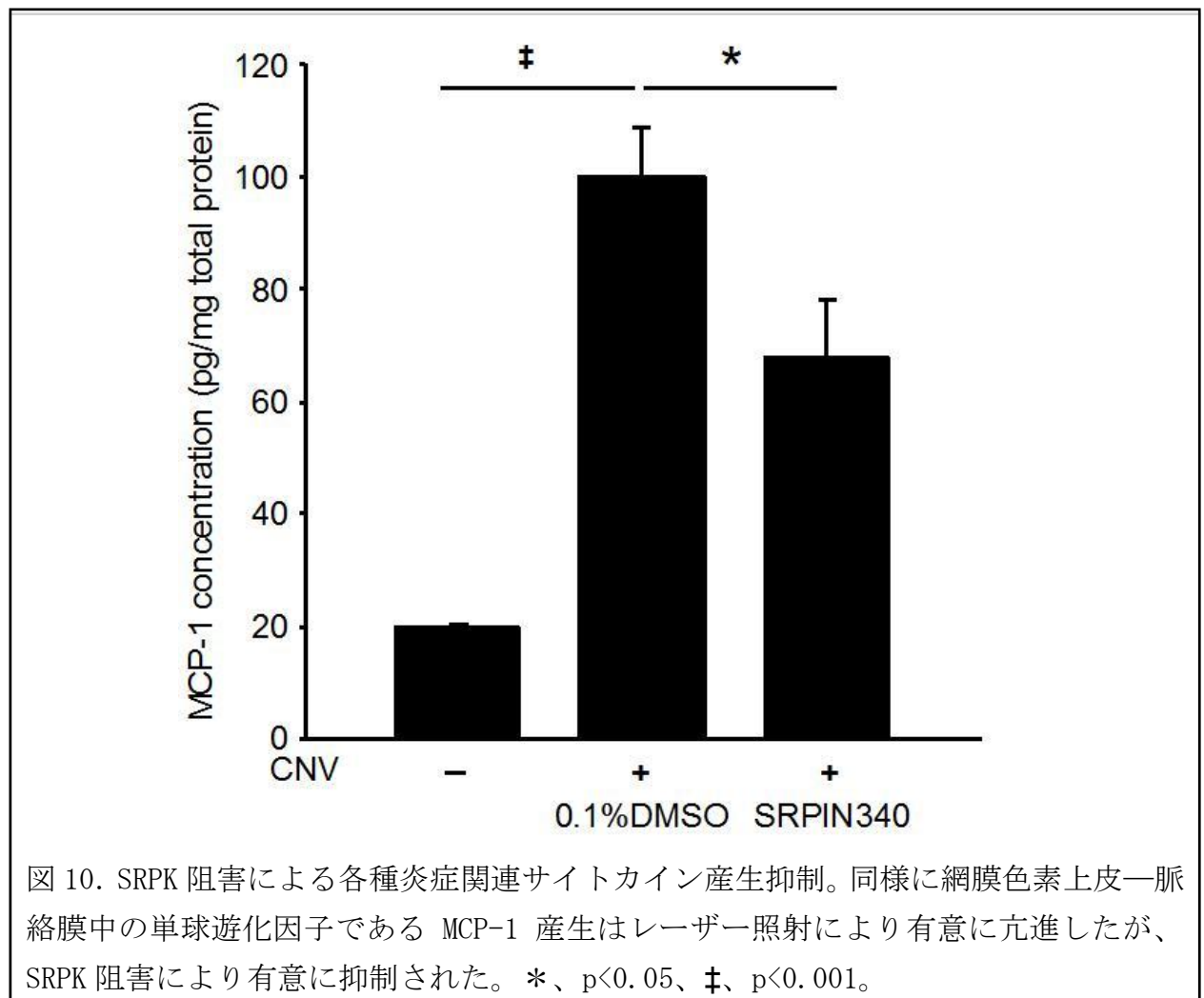


SRPK 阻害による各種炎症関連分子産生抑制およびマクロファージ浸潤抑制

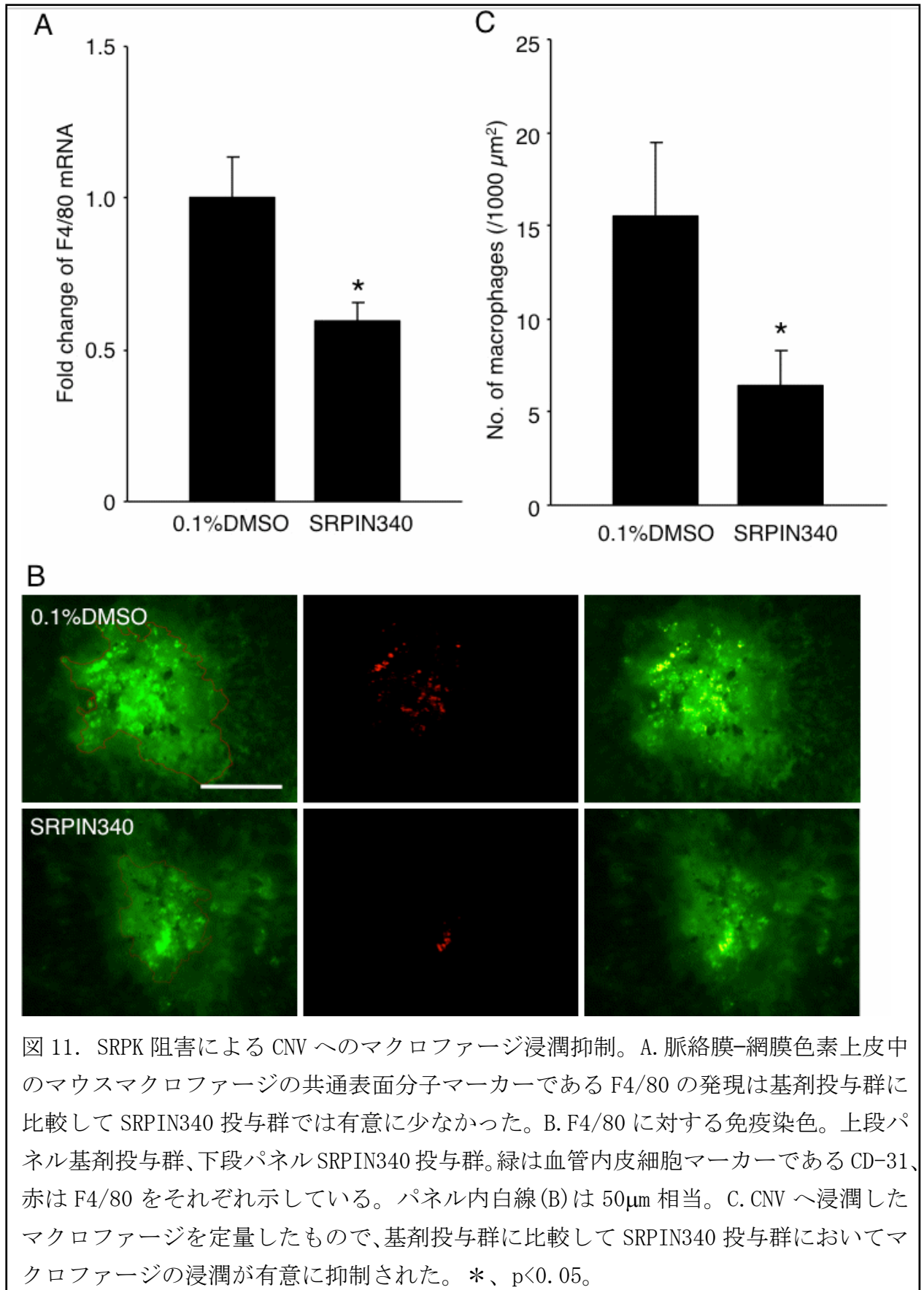
SRPIN340 による SRPK 抑制が CNV 形成を抑制する機序をさらに調べるために、CNV 形成に関与する脈絡膜—網膜色素上皮中の炎症性サイトカインである ICAM-1 と MCP-1 の濃度も測定した。ICAM-1 濃度は正常マウス ($199.6 \pm 15.5 \text{ ng/mg}$, $n=8$) に比較して、基剤投与群では有意に ($265.4 \pm 12.3 \text{ ng/mg}$, $n=10$, $p<0.01$) 増加したが、 $20 \mu\text{M}$ SRPIN340 投与群では有意 ($192.9 \pm 11.6 \text{ ng/mg}$, $n=8$, $p<0.01$, 図 9) に低下した。



同様に MCP-1 濃度も正常マウス ($19.5 \pm 0.9 \text{ pg/mg}$, $n=8$) に比較して、基剤投与群では有意に ($99.9 \pm 8.6 \text{ ng/mg}$, $n=10$, $p<0.001$) 増加したが、 $20 \mu\text{M}$ SRPIN340 投与群では有意 ($67.8 \pm 10.2 \text{ ng/mg}$, $n=8$, $p<0.05$, 図 10) に低下した。これらの結果は、SRPIN340 による SRPK 阻害で炎症性サイトカインである ICAM-1 と MCP-1 の産生も抑制されることを示していた。



さらに、CNV へのマクロファージ浸潤を検討するため、脈絡膜—網膜色素上皮中のマウスマクロファージの共通表面分子マーカーである F4/80 の発現を real-time PCR もおこなった。基剤投与群 (n=8) に比較して、20 μ M SRPIN340 投与群 (n=6) では F4/80 の発現が 41 %低下した ($p < 0.05$)。さらに抗 F4/80 抗体を用いてマクロファージに対する免疫染色でも同様に、基剤投与群より 20 μ M SRPIN340 投与群のほうがマクロファージの浸潤を著明に抑制された。CNV 中のマクロファージ数は基剤投与群 ($15.5 \pm 4.0/1000\mu\text{m}^2$, n=13) に比較して 20 μ M SRPIN340 投与群では ($6.5 \pm 1.8/1000 \mu\text{m}^2$, n=15, 図 11) 有意に少なかった。これらの結果は SRPIN340 による SRPK 阻害が CNV へのマクロファージ浸潤を抑制していることを示している。



考察

VEGF 阻害剤の臨床応用によって、AMD に対する治療は急速に変化を遂げた。しかしながら、網膜色素上皮裂孔や眼内炎などの眼局所合併症や心血管イベントなどの全身合併症など、全 VEGF アイソフォームを抑制する抗 VEGF 製剤の長期投与による弊害も指摘されるようになってきている²¹⁻²⁵。血管新生抑制型 VEGF の発見は、AMD 治療において VEGF アイソフォーム別に治療ターゲットを定めることの重要性、および VEGF pre mRNA における選択的スプライシングを制御することによる新たな治療アプローチの可能性を示しており、抗 VEGF 療法の新しい局面につながると考えられるものである。事実、SRPIN340 に代表されるような低分子化合物が選択的スプライシングに関与する創薬ターゲットとして注目を集めている^{14, 26, 27}。

しかしながら、今回の研究結果においては血管新生抑制型 VEGF の存在およびその血管新生抑制効果について確証を得ることができなかった。現在までの血管新生における VEGF pre-mRNA の選択的スプライシング制御に関する報告は、主に *in vitro* 実験から得られている。これらの検討は、複数の血管新生をとまなう病態において SRPK 阻害により血管新生促進型 VEGF の産生が誘導されると同時に血管新生抑制型 VEGF の産生が抑制されることを報告している^{7, 9, 29, 30}。しかしながら、実験動物を用いた *in vivo* 実験では同様な検討がほとんどなされておらず、少数ながら低酸素誘導網膜症モデルマウス¹⁵と腫瘍を異種移植されたヌードマウス³¹において、SRPK 阻害が血管新生を効果的に抑制できたことが報告されているのみである。また、これらの動物モデルを使用した報告は、SRPK 阻害による血管新生抑制が VEGF pre mRNA の選択的スプライシングにおいて血管新生促進型 VEGF の産生を抑制し、血管新生抑制型 VEGF と血管新生促進型 VEGF のアンバランスを解消したことによると推察しているが、どちらも血管新生抑制型 VEGF の存在を直接示しておらず、total VEGF mRNA の変化や VEGF 蛋白質の変化にも言及していない。それに対して、今回われわれは SRPIN340 による SRPK 阻害が mRNA レベルで total VEGF およびエクソン 8a を含む血管新生促進型 VEGF を抑制すること、さらに蛋白レベルでも VEGF 産生が抑制されることを確認した。この結果からは、少なくとも SRPK 阻害は血管新生促進型 VEGF に対して抑制効果を有していると推測される。

しかしながらその一方で、血管新生抑制型 VEGF の存在は確認することができなかった。今回の実験結果を得た後に、再度論文検索をおこなったところ、近年になって血管新生抑制型 VEGF の存在に関してそれを疑問視する³²、あるいは存在そのものを否定する報告³³もなされていることがわかった。また、そのうちの論文の一つは血管新生抑制型 VEGF とはプライマーのミスプライミングによる産物であり、血管新生抑制型 VEGF そのものはおそらく存在しないと記述している³³。この報告において著者らは市

販されたマウスの cDNA、ヒト cDNA も使用し、さらに最初に血管新生抑制型 VEGF を報告した論文と同様な PCR プロトコールとサンプルを使用しても、血管新生抑制型 VEGF を検出できなかったとしている。緒言で述べたように、血管新生抑制型 VEGF mRNA の配列は血管新生促進型 VEGF mRNA より 66 塩基だけ 3' 側にあるというマウス VEGF mRNA エクソン 8 の構造を考えると、血管新生抑制型 VEGF が存在するのであれば、エクソン 8b の一部、あるいはエクソン 8b より 3' 側の配列に基づいてデザインされたプライマーをリバースプライマーとして PCR を行えば、理論的に血管新生促進型 VEGF と血管新生抑制型 VEGF 双方を検出できるはずである。しかし、複数のプライマーで PCR をおこなって検討したが、既報と同様に血管新生抑制 VEGF を検出することは最終的にできなかった。また、血管新生抑制型 VEGF を特異的に検出するためにマウス VEGF mRNA エクソン 7 とエクソン 8b を跨ぐリバースプライマーも使用して PCR を行ったが、やはり血管新生抑制型 VEGF を検出することができなかった。既報及び本研究の結果に基づいて、現在申請者は少なくともマウスにおいては血管新生抑制型 VEGF は存在しないと考えている。

しかし、本研究でも既報^{15,31}と同様に SRPK 阻害は血管新生を抑制することを確認できた。さらに SRPK 阻害は total VEGF mRNA と血管新生促進型 VEGF mRNA 両方を抑制したことを確認した。SRPK は SR 蛋白質をリン酸化し、pre mRNA のスプライシングにおけるサイトセレクションに関与する^{34,35}だけではなく、スプライソソームそのものの形成にも関与することが知られている^{36,37}。転写と mRNA スプライシングにおける SR 蛋白質や SRPK の関与はまだ解明されていない部分が数多くあるが、これらの報告を考えると、SRPK 阻害による VEGF の産生低下はスプライシング制御の結果だけではなく、スプライソソーム形成そのものが阻害された結果でもあると推測された。

レーザー誘導 CNV モデルマウスにおいて、VEGF は MCP-1 や ICAM-1 などの分子との相互作用により、マクロファージ浸潤を介して CNV を形成させる。VEGF は血管内皮細胞上に発現されている VEGF レセプター (VEGFR-2) と結合することで、内皮細胞の分裂増殖を促進するだけではなく、細胞表面上の ICAM-1 の発現³⁸および MCP-1 の産生^{20,39}を誘導する一方、マクロファージ表面に発現している VEGF レセプター 1 (VEGFR-1)⁴⁰を介してマクロファージをレーザー照射部位へと誘導する。さらに遊走したマクロファージは VEGF を分泌するため²⁰、レーザー照射部位において、VEGF、ICAM-1、MCP-1 というサイクルが形成され、結果的に CNV が形成すると考えられている。したがって、VEGF の産生低下はこのサイクルを遮断し、マクロファージ浸潤を抑制して CNV 形成を抑制できると考えられる。本研究における SRPIN340 による SRPK 阻害は VEGF 産生を抑制した結果、MCP-1 と ICAM-1 の産生およびマクロファージ浸潤をも抑制したと考えられた。

SRPK は細胞の生存にかかわる酵素であるため、それを阻害することに副作用がともなうことが容易に想像される。しかしながら、既報ではラットに 2,000 mg/kg の SRPIN340 投与でも明らかな有害事象が観察されなかったと報告されている¹⁴。これは SRPK 阻害による影響は分子ごとに異なるため、あるいは SRPK 阻害により代償経路が活性化するためかもしれない。今後、選択的スプライシングにおける SR 蛋白質と SRPK の関与、および SRPK 阻害による生体内の効果等に関するさらなる解明が待たれる。

総括および結論

本研究の結果により以下の結論が得られた。

1. SRPK 阻害は VEGF 遺伝子発現を阻害することにより VEGF 産生を低下させ、CNV モデルマウスにおいて血管新生を抑制できることが示された。
2. SRPIN340 のような低分子化合物による VEGF pre mRNA のスプライシング制御は今後血管新生抑制の新たな治療アプローチとなりうる。
3. 血管新生抑制型 VEGF は少なくともマウスでは存在しない可能性がある。

VEGF165b に代表される血管新生抑制型 VEGF が報告されたことにより、血管新生における VEGF の役割を全面的に見直す必要が生じていただけでなく、臨床で用いられている抗 VEGF 薬の治療成績を見直す必要も生じた。なぜなら、現在眼科で用いられている抗 VEGF 薬は、血管新生促進型 VEGF だけではなく、血管新生抑制型 VEGF をも阻害してしまう一方、抗 VEGF 薬無効例の中には血管新生抑制型 VEGF が血管新生促進型 VEGF より優位に産生されていた例が存在する可能性があるためである。

本研究は最初に血管新生抑制型 VEGF の存在を前提として開始したが、マウスから血管新生抑制型 VEGF を検出することがついにできなかった。ヒトとマウスの遺伝子の類似性から考えるとヒトでも同様に血管新生抑制型 VEGF が存在しない可能性が考えられるが、それについて今回検討しておらず、まだ既報によっても完全に否定されるわけではない。いわゆる血管新生抑制型 VEGF がヒトにおいても実は存在しないことが確認されれば、今まで血管新生抑制型 VEGF に関する知見が根底から覆されることになるため、今後さらに検証する必要がある。

さらに、マウス網脈絡膜における SRPK の発現および網脈絡膜の脈管形成や血管新生における SRPK の役割に関してもまだ詳細に検討されておらず、今後免疫染色法や siRNA 干渉等の方法を用いてさらに検討する必要がある。

謝辞

本研究をおこなうにあたり、ご支援とご指導を下さいました北海道大学大学院医学研究科眼科学分野 石田晋教授、京都大学大学院医学研究科生体構造医学講座形態形成機構学教室 萩原正敏教授に深く感謝致します。また、多くの助言、励ましを下さいました北海道大学大学院医学研究科眼科学分野 野田航介准教授、同神田敦宏特任講師、加瀬諭先生をはじめとした研究委員会の先生方ならびに眼細胞生物学視覚科学研究室のスタッフの皆様(廣瀬育代さん、吉田志帆さん、石塚タンエルダルさん)にも深く感謝致します。さらにもともに研究生活を送り、互いに切磋琢磨した大学院生の仲間たちにも心から感謝の意を表します。最後に陰で支えてくれた妻陽子と、いつもかわいい笑顔でいやしてくれた子供達に心から感謝致します。

引用文献

1. Seddon, J.M. & Chen, C.A. The epidemiology of age-related macular degeneration. *Int. Ophthalmol. Clin.* 44, 17-39 (2004).
2. Spilsbury, K., Garrett, K.L., Shen, W.Y., Constable, I.J. & Rakoczy, P.E. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization. *Am. J. Pathol.* 157, 135-144 (2000).
3. Spaide, R.F., *et al.* Intravitreal bevacizumab treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Retina.* 26, 383-390 (2006).
4. Gragoudas, E.S., Adamis, A.P., Cunningham, E.T., Jr., Feinsod, M. & Guyer, D.R. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 351, 2805-2816 (2004).
5. Rosenfeld, P.J., *et al.* Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 355, 1419-1431 (2006).
6. Bates, D.O., *et al.* VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer. Res.* 62, 4123-4131 (2002).
7. Perrin, R.M., *et al.* Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia.* 48, 2422-2427 (2005).
8. Cebe Suarez, S., *et al.* A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell. Mol. Life. Sci.* 63, 2067-2077 (2006).
9. Rennel, E., *et al.* The endogenous anti-angiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice. *Br. J. Cancer.* 98, 1250-1257 (2008).
10. Konopatskaya, O., Churchill, A.J., Harper, S.J., Bates, D.O. & Gardiner, T.A. VEGF165b, an endogenous C-terminal splice variant of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice. *Mol. Vis.* 12, 626-632 (2006).
11. Hua, J., *et al.* Recombinant human VEGF165b inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 4282-4288 (2010).
12. Harper, S.J. & Bates, D.O. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat. Rev. Cancer.* 8, 880-887 (2008).
13. Caceres, J.F. & Kornblihtt, A.R. Alternative splicing: multiple control

- mechanisms and involvement in human disease. *Trends. Genet.* 18, 186–193 (2002).
14. Fukuhara, T., *et al.* Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103, 11329–11333 (2006).
 15. Nowak, D.G., *et al.* Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms: a novel therapeutic strategy for angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 285, 5532–5540 (2010).
 16. Nikolakaki, E., *et al.* Phosphorylation by LAMMER protein kinases: determination of a consensus site, identification of in vitro substrates, and implications for substrate preferences. *Biochemistry.* 41, 2055–2066 (2002).
 17. Colwill, K., *et al.* SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors. *T. J. Biol. Chem.* 271, 24569–24575 (1996).
 18. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(–Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25, 402–408 (2001).
 19. Killingsworth, M.C., Sarks, J.P. & Sarks, S.H. Macrophages related to Bruch’s membrane in age-related macular degeneration. *Eye (Lond).* 4 (Pt 4), 613–621 (1990).
 20. Tsutsumi, C., *et al.* The critical role of ocular-infiltrating macrophages in the development of choroidal neovascularization. *J. Leukoc. Biol.* 74, 25–32 (2003).
 21. Verheul, H.M. & Pinedo, H.M. Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition. *Nat. Rev. Cancer.* 7, 475–485 (2007).
 22. Ueta, T., Yanagi, Y., Tamaki, Y. & Yamaguchi, T. Cerebrovascular accidents in ranibizumab. *Ophthalmology.* 116, 362 (2009).
 23. Semeraro, F., Morescalchi, F., Parmeggiani, F., Arcidiacono, B. & Costagliola, C. Systemic adverse drug reactions secondary to anti-VEGF intravitreal injection in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 9, 629–646 (2011).
 24. Cunningham, E.T., Jr., Feiner, L., Chung, C., Tuomi, L. & Ehrlich, J.S.

- Incidence of retinal pigment epithelial tears after intravitreal ranibizumab injection for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 118, 2447–2452 (2011).
25. Garg, S., *et al.* Retinal pigment epithelial tears after intravitreal bevacizumab injection for exudative age-related macular degeneration. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 36, 252–256 (2008).
 26. Bakkour, N., *et al.* Small-molecule inhibition of HIV pre-mRNA splicing as a novel antiretroviral therapy to overcome drug resistance. *PLoS Pathog.* 3, 1530–1539 (2007).
 27. Karakama, Y., *et al.* Inhibition of hepatitis C virus replication by a specific inhibitor of serine-arginine-rich protein kinase. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 54, 3179–3186 (2010).
 28. Nowak, D.G., *et al.* Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J. Cell. Sci.* 121, 3487–3495 (2008).
 29. Schumacher, V.A., *et al.* Impaired glomerular maturation and lack of VEGF165b in Denys-Drash syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 719–729 (2007).
 30. Varey, A.H., *et al.* VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br. J. Cancer*. 98, 1366–1379 (2008).
 31. Amin, E.M., *et al.* WT1 mutants reveal SRPK1 to be a downstream angiogenesis target by altering VEGF splicing. *Cancer. Cell.* 20, 768–780 (2011).
 32. Dokun, A.O. & Annex, B.H. The VEGF165b “ICE-o-form” puts a chill on the VEGF story. *Circ. Res.* 109, 246–247 (2011).
 33. Harris, S., *et al.* Do anti-angiogenic VEGF (VEGFxxx) isoforms exist? A cautionary tale. *PLoS One*. 7, e35231 (2012).
 34. Kamachi, M., *et al.* Human autoimmune sera as molecular probes for the identification of an autoantigen kinase signaling pathway. *J. Exp. Med.* 196, 1213–1225 (2002).
 35. Mathew, R., *et al.* Phosphorylation of human PRP28 by SRPK2 is required for integration of the U4/U6-U5 tri-snRNP into the spliceosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 435–443 (2008).
 36. Roscigno, R.F. & Garcia-Blanco, M.A. SR proteins escort the U4/U6.U5

- tri-snRNP to the spliceosome. *RNA*. 1, 692-706 (1995).
37. Xiao, S.H. & Manley, J.L. Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes. Dev.* 11, 334-344 (1997).
 38. Ishida, S., *et al.* VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 2155-2162 (2003).
 39. Yoshida, S., Yoshida, A., Ishibashi, T., Elner, S.G. & Elner, V.M. Role of MCP-1 and MIP-1alpha in retinal neovascularization during postischemic inflammation in a mouse model of retinal neovascularization. *J. Leukoc Biol.* 73, 137-144 (2003).
 40. Barleon, B., *et al.* Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*. 87, 3336-3343 (1996).