

網脈絡膜疾患の病態解明並びに  
新規治療ターゲットの探索研究

田中 美留豊

2022年

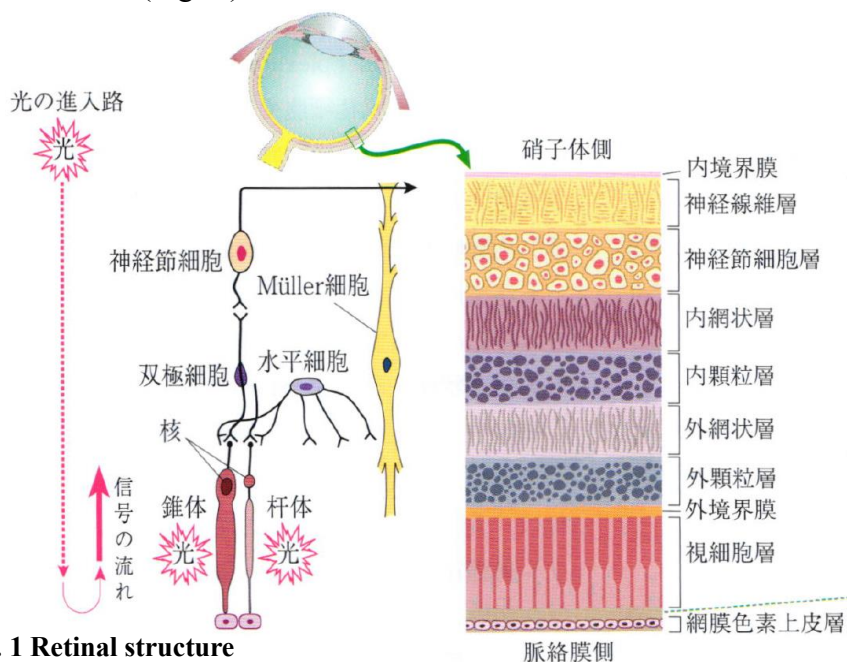
## 目次

序論	1 頁
第 1 章 光誘発網膜視細胞障害に対する神経保護因子の探索	7 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料及び方法	
第 3 節 実験成績	
第 4 節 考察	
第 2 章 網脈絡膜血管疾患における BTB タンパク質の役割	37 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料及び方法	
第 3 節 実験成績	
第 4 節 考察	
第 3 章 慢性網膜虚血が眼恒常性に及ぼす影響	81 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料及び方法	
第 3 節 実験成績	
第 4 節 考察	
総括及び結論	104 頁
謝辞	107 頁
引用文献	109 頁
略語一覧表	125 頁

## 序論

人間は外界情報の約 8 割を視覚から得ており、網膜は視覚を得るための感覚器として機能する (1)。視覚器は眼球と眼球付属器、視神経及び視中枢によって構成される。眼球は直径約 24 mm の球形で (2)、外側から、外膜 (角膜、胸膜)、中膜 (ぶどう膜 : 虹彩、毛様体、脈絡膜)、内膜 (網膜) の 3 層で構成される眼球壁と、その中を満たす眼内容から形成されている。中間透過体である眼内容には房水、水晶体、硝子体が含まれる。眼に入った光は、網膜で電気刺激に変換され、視神経、視交叉、視索を経て外側膝状体に入る (3)。最終的に、後頭葉に存在する視中枢で情報処理されることで、映像として認識される。

網膜は、神経外胚葉に由来する中枢神経組織であり、感覚神経と網膜色素上皮から構成される (4)。発生学的に、感覚網膜 (神経上皮) は眼杯内板から、網膜色素上皮は眼杯外板から分化することが分かっている (5)。網膜は内層から、①内境界膜、②神経線維層、③神経節細胞層、④内網状層、⑤内顆粒層、⑥外網状層、⑦外顆粒層、⑧外境界膜、⑨視細胞層、⑩網膜色素上皮層の 10 層構造から構成される (Fig. 1)。視覚器における 1 次ニューロンは視細胞であり、網膜へ

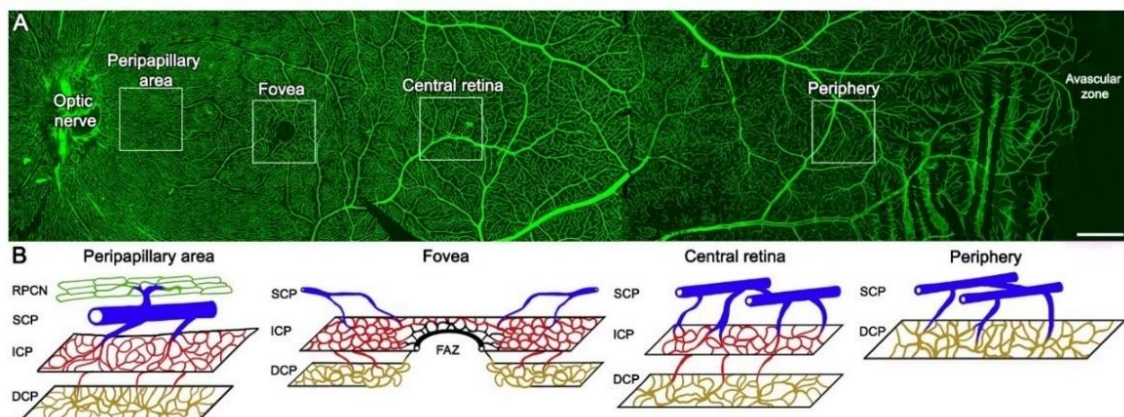


**Fig. 1 Retinal structure**

STEP 眼科 Step Series より引用

入った光は視細胞外節に存在する視物質を介して神経シグナルへと変換される(3)。視細胞は錐体細胞と桿体細胞からなり、網膜における機能やその分布は異なる。錐体細胞は明所で応答し、色覚や視力に重要である。一方、桿体細胞は暗所における光覚を司る。錐体細胞で受容した光刺激は、その後、双極細胞(2次ニューロン)、神経節細胞(3次ニューロン)を介して外側膝状体へシグナル伝達される(3)。網膜の中心に位置する部分は黄斑といい、高精細な視覚情報を得るために特殊な構造を呈する。黄斑は、ルテインやゼアキサンチンから構成されるキサントフィルという黄色色素が存在するため、黄色く見える(6)。黄斑の中でも中心部は中心窩と呼ばれ、光透過に干渉する血管が存在しない無血管領域であり(7)、且つ錐体細胞が密集していることが形や色を鮮明に見分けるなど、高い視力を生み出すことに繋がっている。

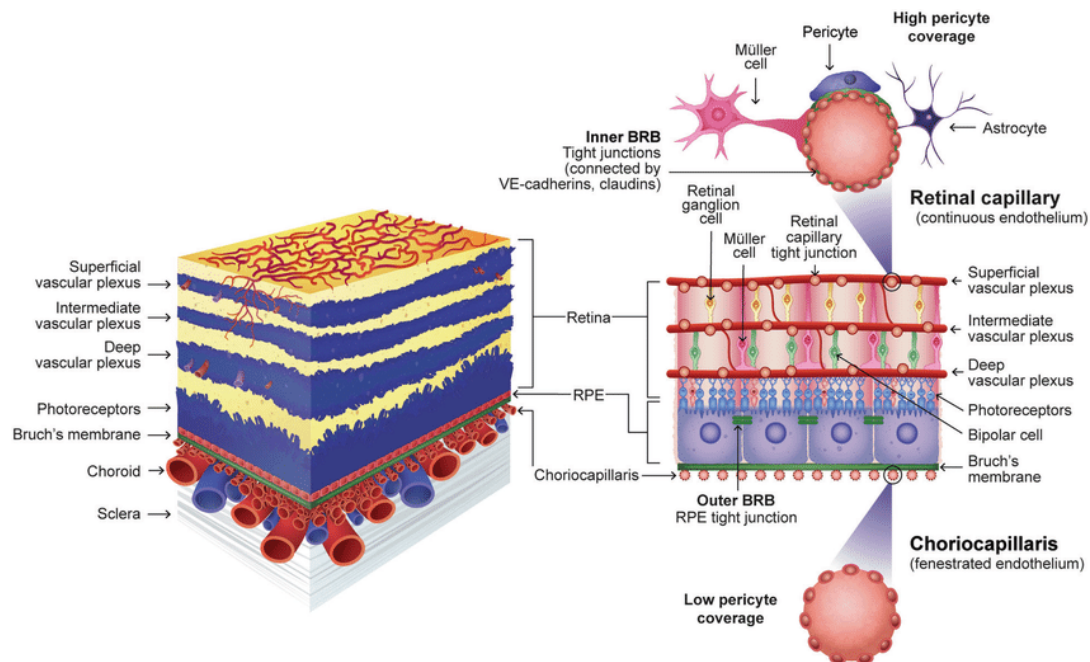
網膜に血液供給する血管は、内頸動脈から分かれた眼動脈に由来し、網膜内層(内顆粒層まで)を栄養する網膜血管と網膜視細胞を栄養する脈絡膜血管の2つに大別される。網膜毛細血管は、表層毛細血管網(superficial capillary plexus: SCP)、中層毛細血管網(intermediate capillary plexus: ICP)、深層毛細血管網(deep capillary plexus: DCP)から構成され、視神経から黄斑部にかけては放射状乳頭周囲毛細血管網(radial peripapillary capillary plexus: RPCP)が分布する(Fig. 2)。神経



**Fig. 2 Morphology of vascular plexuses of human retina**

Boned-Murillo *et al.*, *Biomedicines.*, 2021 より引用

節細胞層には SCP、内顆粒層の内境界面には ICP、内顆粒層の外境界面には DCP が存在する。構造上、網膜毛細血管と脈絡膜毛細血管は大きく異なる。脈絡膜に存在する血管内皮細胞にはタイトジャンクションが存在せず、小孔を認める有窓構造を特徴としている。そのため、網膜色素上皮におけるタイトジャンクションは脈絡膜血管から漏出した血漿成分が網膜内へ移行するのを阻害している。この機構は外側血液網膜関門 (Outer blood-retinal barrier [BRB]) と呼ばれる。一方、網膜血管の内皮細胞は有窓構造がなく、隣接内皮細胞間でタイトジャンクションを形成することでバリア機能を発揮する (内側血液網膜関門: Inner BRB)。Inner BRB を構成する内皮細胞は壁細胞であるペリサイトによって被覆されており、さらにその外側には Müller 細胞が存在する。これらの細胞による 3 次元的な構造が存在することで、成熟した inner BRB が完成する (Fig. 3)。このように、網膜における物質輸送は BRB によって高度に制御されており、網膜内で不要な水分や血漿成分が貯留しない仕組みが存在している。



**Fig. 3 Structure of the inner and outer BRB**

Joussen *et al.*, *Eye.*, 2021 より引用

視細胞の障害を特徴とする主要な失明原因疾患として、加齢黄斑変性が挙げられる。加齢黄斑変性は先進国における中途失明原因第 1 位に位置し、本邦においても 4 位を占める重篤な眼疾患である (8)。加齢黄斑変性は、欧米人で多い萎縮型と日本人に多い滲出型に分けられる。萎縮型は黄斑の萎縮病巣である地図上萎縮病巣を特徴とし、滲出型では黄斑部の血管新生を認める。加齢黄斑変性は、加齢や人種 (9)、喫煙 (10)、遺伝子多型 (11)、光曝露 (12, 13) など、多様なリスクファクターが発症や進展に関与する多因子疾患である。滲出型加齢黄斑変性に対する治療薬として血管内皮増殖因子を標的とした抗 vascular endothelial growth factor (VEGF) 薬が開発されたが、萎縮型加齢黄斑変性に対する有効な治療薬は存在しない。中枢神経系に属する網膜は再生能力が低く、加齢黄斑変性によって網膜色素上皮細胞や網膜視細胞が障害を受けると、不可逆的な視力障害や失明へと至る (14)。加齢黄斑変性の代表的な疾患感受性遺伝子として補体 H 因子 (*CFH*) (15) やセリンプロテアーゼである *ARMS/HTRA1* (16) が挙げられる。これまでに RPE65 (17) や、補体因子 D (18) を標的とした薬剤が萎縮型加齢黄斑変性の治療薬候補として開発されてきたが、いずれも承認には至っていない。また近年、induced Pluripotent Stem (iPS) 細胞を用いた治療法の開発に注目が集まっている。網膜色素変性や加齢黄斑変性患者に対して、iPS 細胞から網膜視細胞シートや網膜色素上皮シートを作製し、網膜下へ移植する手術が行われた (19–21)。これまでに移植した網膜色素上皮シートが網膜に生着することや安全性について良好な結果が報告されている (19, 20)。しかしながら、自家移植では移植シートを作るまでに長期間必要であることや高額な治療費が問題であり、加齢黄斑変性に対する標準治療となるには超えるべき課題が多く存在する。加齢黄斑変性の視細胞及び網膜色素上皮の障害は不可逆的であり、

再生医療も未だ現実的な治療法ではないため、眼内の細胞障害を未然に防ぐことができる治療法の開発が臨床課題とされている。

BRB の破綻を特徴とする網脈絡膜血管疾患は、中途失明上位の疾患に共通する病態であり、滲出型加齢黄斑変性や網膜静脈閉塞症に代表される (22, 23)。とくに、滲出型加齢黄斑変性は脈絡膜から異常な血管新生が発生することで視力低下を来す疾患である。網膜色素上皮細胞の基底膜であるブルッフ膜は物理的なバリアとして機能しており、脈絡膜からの新生血管の発生を抑制するが、outer BRB が破綻すると脈絡膜血管新生がブルッフ膜を貫通して活動性を獲得する (16)。その結果、網膜浮腫や出血を生じ、視力低下に至る (24)。マクロファージや網膜色素上皮細胞から産生された VEGF が脈絡膜血管新生を惹起するマスターレギュレーターとして機能すると考えられているが (25, 26)、抗 VEGF 薬に耐性を持つ患者が存在することや (27)、長期的に視力改善が維持されないことが課題である (28)。

また、代表的な網膜血管疾患の一つに網膜静脈閉塞症がある。網膜静脈閉塞症は、世界に 1,600 万人程度の患者が存在する虚血性網膜疾患である (29)。網膜静脈が閉塞し、網膜浮腫や網膜内出血を生じることで視力障害に陥る (30, 31)。網膜静脈が閉塞して血流が低下すると、網膜組織が虚血状態となり VEGF をはじめとする様々なサイトカインが網膜内に大量に分泌される (32)。すると、網膜血管における inner BRB が崩壊し、血管バリア機能が低下するため網膜内へ血漿成分が貯留する (31)。網膜静脈閉塞症に対して、VEGF を標的とした抗 VEGF 薬が承認されているが、上述した滲出型加齢黄斑変性と同様、耐性を持つ患者の存在が問題として挙げられる (33)。さらに、網膜静脈閉塞症は血管新生緑内障という合併症を伴うことがある。虚血により網膜内で過剰に VEGF が分泌されると、硝子体や房水中の VEGF 濃度が増加し、結果として虹彩や隅角

などの前眼部に新生血管が生じる (34, 35)。網膜静脈閉塞症の中でも、網膜中心静脈閉塞症は 100-day glaucoma と呼ばれ (36)、血管新生緑内障を発症する確立が高い。血管新生緑内障は放置すると房水の流出路が障害され、眼圧が上昇することで失明へと至る。2020 年には抗 VEGF 薬が血管新生緑内障に対する治療薬として承認された。しかしながら、血管新生緑内障の病態発症には VEGF 以外の因子も関与することが示唆されており (37)、臨床研究に加え、眼組織を用いた分子病態の解明が可能な動物疾患モデルを用いた検討が必要である。

失明性疾患における視力低下を防ぐには、網膜視細胞の保護や眼血管の恒常性維持が重要である。そこで本研究では、網膜視細胞保護因子の探索に加え、網脈絡膜血管疾患の病態解明及び新規治療ターゲットの探索を目的に研究を展開した。第 1 章では光誘発網膜視細胞障害モデルを作製し、網膜視細胞保護作用を有する薬剤や治療標的の探索を行った。第 2 章では、網脈絡膜血管疾患の病態モデルを用いて新規血管病変制御因子を探索した。第 3 章では、網膜静脈閉塞症に伴って誘導される血管新生緑内障モデルを確立し、慢性的な網膜虚血状態が眼恒常性に及ぼす影響を検討した。



## 第1章 光誘発網膜視細胞障害に対する神経保護因子の探索

### 第1節 緒言

我が国における中途失明原因上位を占める疾患のうち、網膜色素変性症や加齢黄斑変性で網膜視細胞の欠損が認められる。これらの疾患においては、モノを見るために必要な網膜視細胞が障害されることで失明へと至る。2014年の本邦における網膜色素変性症の医療受給者証所持者数は29,330人であり、2015年には指定難病に認定された。また、加齢黄斑変性は日本全体で約69万人[2007年、久山町スタディ(38)]が罹患していると推定されており、米国では中途失明原因1位を占める(33)。とくに、高齢化が進行する本邦においては罹患者数の増加が予想され、加齢黄斑変性に対する治療薬の開発は喫緊の課題である。過度な光曝露は、加齢黄斑変性における重要な発症リスクファクターであり、光誘発網膜障害モデルを用いた神経保護薬の探索は、臨床的意義が大きい。

眼に入った光は、視細胞に存在する視物質に受容されることで電気信号に変換される。錐体視細胞が密集する黄斑では、光による酸化ストレスに常に曝されている。そのため、網膜には光酸化ストレスに対する防御機構が存在している。ルテインやゼアキサントシンなどの黄斑色素は、青色光の吸収作用や、酸化ストレスの原因となる一重項酸素を消去する機能を有している(39, 40)。一方、加齢に伴って酸化ストレスを十分に処理できなくなると、細胞障害が惹起され、視細胞を損失する。重要なことに、網膜は再生能が低い組織であり、網膜障害を抑制する神経保護薬は加齢黄斑変性治療に奏功する可能性がある。ロピニロールはパーキンソン病治療薬として開発されたドパミン受容体刺激薬である。興味深いことに、ロピニロールはドパミン D2 受容体を介した神経保護作用に加えて、ドパミン受容体を介さないフリーラジカル捕捉能を有することが報告される(41-45)。網膜疾患治療に用いられる薬剤の多くは眼内に直接投与する必

要があり、侵襲性の高い治療が必要となる。一方、中枢移行性を有するロピニロールは、末梢投与により網膜視細胞障害を抑制する可能性が期待できる。

プログランニューリンは 68.5 kDa のシステインに富む 593 個のアミノ酸からなる分泌型タンパク質であり、通常 88 kDa の糖鎖修飾された状態で分泌される。その構造は、7 回半のグランニューリンリピートからなり、N 末端から順に、パラグランニューリン、グランニューリン G、F、B、A、C、D、E と同定されている (46)。プログランニューリンは、炎症下において分泌される好中球エラスターゼ (47)、Matrix metalloproteinase (MMP)-12 (48)、MMP-14 (49)、Proteinase 3 (50)、A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 7 (ADAMTS-7) (51)、Cathepsin L (52) などのプロテアーゼによってグランニューリンへと切断されることが明らかになっている (Fig. 4)。一方、secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) や HDL/Apo A-I などのタン

パク質は、上記プロテアーゼによるプログランニューリンの切断反応を阻害する (47, 53)。中枢神経系において、プログランニューリンは主に神

プログランニューリン



SLPI, Apo A-I —| ↓ MMP-12, MMP-14, Proteinase 3, ADAMTS-7, Cathepsin L

グランニューリン

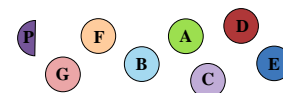


Fig. 4 Cleavage of progranulin

経細胞あるいはミクログリアから産生されることが明らかになっている (54)。2006 年にはプログランニューリンの遺伝子変異が、前頭側頭型認知症の原因となることが報告された (55, 56)。この発見以降、プログランニューリンの神経保護に関する知見は多数報告され、神経伸長や細胞生存を促進させることや (57)、アミロイド β による神経毒性から細胞を保護することが明らかになった (58)。これまで、プログランニューリンが光誘発網膜障害を抑制することや (59)、プログランニューリン欠損が網膜機能異常を惹起することが報告されている (60–62)。このように、

プログラニューリンは神経保護作用を有するため、神経変性疾患に対する治療ターゲットとしての応用が期待されている。しかしながら、グラニューリンが中枢神経系へ及ぼす影響については未だ不明な点が多い。末梢組織において、プログラニューリンとグラニューリンは相対する作用を有することが明らかになっており、前者は抗炎症作用 (47, 63)、後者は炎症促進作用を有すると考えられている (64, 65)。中枢神経系においてプログラニューリンは神経保護作用を示すが (57, 66, 67)、グラニューリンは神経保護作用 (57, 67) 及び神経毒性作用 (64) を示すことが報告されている。このように、中枢神経系におけるグラニューリンの作用については未解明な点が多く、網膜障害に対するプログラニューリンの有用性を議論する上でグラニューリンの作用を解明することは非常に重要である (Table 1)。

	プログラニューリン	グラニューリン	文献
末梢	好中球における TNF- $\alpha$ 産生を抑制する。	上皮細胞からの IL-8 産生を亢進する。	Zhu <i>et al.</i> , <i>Cell</i> , 2002 (46)
	3つのグラニューリン組み換え体 (Attstrin) が TNF- $\alpha$ と TNFR2 の相互作用を阻害し、抗炎症作用を保持する。		Tang <i>et al.</i> , <i>Science</i> , 2011 (62)
	好中球の遊走を抑制し、抗炎症作用を示す。	-	Kessenbrock <i>et al.</i> , <i>Journal of Clinical Investigation</i> , 2008 (49)
	血管平滑筋細胞からの IL-8 産生を抑制する。	血管平滑筋細胞からの IL-8 産生を亢進する。	Kojima <i>et al.</i> , <i>Atherosclerosis</i> , 2009 (64)
中枢神経系	不溶性の TDP-43 発現を低下させ、神経変性を抑制する。	-	Beel <i>et al.</i> , <i>Molecular Neurodegeneration</i> , 2018 (65)
	-	グラニューリン (B と E) が、TDP-43 による毒性を増悪する。	Salazar <i>et al.</i> , <i>Journal of Neuroscience</i> , 2015 (63)
	神経伸長を促進する。	グラニューリン E が、神経伸長を促進する。	Van Damme <i>et al.</i> , <i>Journal of Cell Biology</i> , 2008 (56); Beel <i>et al.</i> , <i>Human molecular genetics</i> , 2017 (66)

**Table 1. Roles of progranulin and granulins in the periphery and the central nervous system**

本章では、光誘発網膜障害モデルを用いて、網膜視細胞障害を予防できる網膜保護薬あるいは治療標的の探索を目指した。先ず、ロピニロールの投与が光曝露による網膜菲薄化を抑制できるのか否かについて検討した。さらに、グラニューリンが網膜視細胞障害に及ぼす影響を検討した。

## 第2節 実験材料及び方法

### 2-1 実験材料

実験に用いた薬物及び試薬は、以下の通りである。

生理食塩液は大塚製薬株式会社 (Tokushima, Japan)、塩化ナトリウム (sodium chloride: NaCl) はキシダ化学株式会社 (Osaka, Japan)、パラフィン (Paraplast High Melt)、Hematoxylin 560、Define MX、Blue Buffer 8、Alcoholic Eosin Y 515 は Leica Biosystems (Wetzlar, Germany)、サイプレジン®1%点眼液、ミドリン®P 点眼液 (0.5%トロピカミド及び 0.5%フェニレフリン塩酸塩)、ヒアレイン®点眼液 0.1% (精製ヒアルロン酸ナトリウム) は参天製薬株式会社 (Osaka, Japan)、ケタミン は第一三共株式会社 (Tokyo, Japan)、キシラジンはバイエル薬品株式会社 (Osaka, Japan)、ペニシリン、ストレプトマイシンは Meiji Seika ファルマ株式会社 (Tokyo, Japan)、Tween-20 Solution は Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)、fetal bovine serum (FBS) は Biosera (Kansas City, MO, USA)、Immobilin-P は Millipore (Bedford, MA, USA)、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail 2、phosphatase inhibitor cocktail 3、Igepal CA-630 は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)、Propidium iodide (PI)、Hoechst 33342、Pierce BCA Protein Assay Kit は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)、Can Get Solution 1、Can Get Solution 2 は東洋紡株式会社 (Osaka, Japan)、プラミペキソール塩酸塩水和物は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan)、Blocking One-P、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (sodium dihydrogen phosphate dihydrate:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、リン酸水素二ナトリウム十二水和物 (disodium hydrogen phosphate dodecahydrate:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )、リン酸二水素カリウム (potassium dihydrogen phosphate:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、1 mol/L Tris-塩酸緩衝液 (pH 8.0)、キシレンはナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan)、ロピニロール塩酸塩、メタノール、エタノール、デオキシコ

ール酸ナトリウム、塩化カリウム (potassium chloride: KCl)、塩酸 (hydrochloric acid: HCl)、SuperSep Ace 5-20%、パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde: PFA)、6-アミノヘキサン酸、Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol)、ImmunoStar<sup>®</sup>LD、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS: sodium dodecyl sulfate)、Sample Buffer Solution with 3-Mercapto-1,2-propanediol (×4)、グリシン、スクロースは富士フィルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan)、Cell Counting Kit-8 は株式会社同仁化学研究所 (Kumamoto, Japan)、normal horse serum は Vector Labs (Berlingame, CA, USA)、イソフルランはヴィアトリス製薬株式会社 (Tokyo, Japan)、O.C.T compound はサクラファインテックジャパン株式会社 (Tokyo, Japan) よりそれぞれ購入した。

Phosphate buffer (PB) は蒸留水に 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O、0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O となるように調製、Tris-buffered saline (TBS) は蒸留水に 50 mM Tris、138 mM NaCl、2.7 mM KCl となるように調製、Running buffer は Milli-Q (Millipore) に 25 mM Tris、190 mM グリシン、1% SDS となるように調製、anode buffer 1 は Milli-Q に 0.3 M Tris、20%メタノールとなるように調製、anode buffer 2 は Milli-Q に 25 mM Tris、20%メタノールとなるように調製、cathode buffer は Milli-Q に 25 mM Tris、20%メタノール、40 mM 6-アミノヘキサン酸となるように調製した。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 実験動物

本研究では、日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入した 8 週齢雄性 ddY マウスを用いた。マウスはプラスチック製ケージ (縦 24.5 × 横 17.5 × 高さ 12.5 cm) を使い、自由給水下で固形飼料 (CE-2; 日本クレア株式会社、Tokyo, Japan) により飼育した。実験動物の取り扱いには Association for Research in

Vision and Ophthalmology で決められたガイドラインを遵守して実施した。すべてのマウスは設定温度;  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、設定湿度;  $55 \pm 15\%$ 、明暗各 12 時間 (照明; 午前 8 時~午後 8 時) で飼育した。実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。

## 2-2-2 光照射によるマウス急性網膜障害モデル

マウスを 24 時間、完全な暗室で飼育し暗順応させた。光照射の 30 分前にサイプレジン®1%点眼液により散瞳した。散瞳を確認後、白色蛍光灯 (Toshiba、Tokyo、Japan) を上部にセットした鏡張りの装置を用いて、8,000 lux の光環境下で 3 時間マウスを飼育することで網膜障害を惹起した。ロピニロール塩酸塩 80 mg/kg 及びプラミペキソール塩酸塩水和物 1 mg/kg は、光照射を開始する直前に経口投与した。

## 2-2-3 組織学的評価

### 2-2-3-1 網膜層の組織切片作製

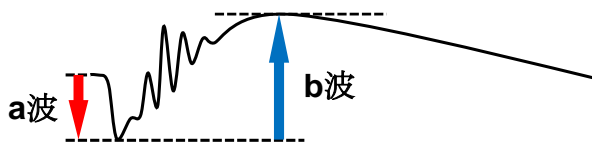
2-2-2 に従って網膜障害を惹起した後、24 時間の暗順応を行い、通常飼育下にて 3 日間飼育を行った。さらに暗室で 24 時間飼育した後に、組織学的評価を行った。マウスを頸椎脱臼にて安楽死させ、マウス眼球を摘出した。その後、4% PFA 含有 0.1M PB (pH 7.4) を  $2 \mu\text{L}$  硝子体内に投与し、同液にて 48 時間  $4^{\circ}\text{C}$  で固定した。固定後、70%エタノール 2 時間、90%エタノール 1 時間、無水エタノール 1 時間×5 回、キシレン 1 時間×3 回、融解パラフィン 4.5 時間の順に浸透させた。その後、パラフィンにて眼球を包埋し、ミクロトーム (Leica Biosystems) を用いて、厚さ  $5 \mu\text{m}$  の切片を作製し、カバーガラス (松波硝子工業株式会社、Osaka、Japan) にのせ  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 日乾燥し、室温にて保存した。

#### 2-2-3-2 ヘマトキシリン・エオジン染色

パラフィン切片は、キシレンに浸してパラフィンを洗浄した。つづいて段階的にアルコール濃度を下げた溶液に浸し、蒸留水に浸透した後、Hematoxylin 560、Define MX、Blue Buffer 8、Alcoholic Eosin Y 515 に浸して、段階的にアルコールで脱水し、キシレンで透徹しマウントクイック (大道産業株式会社、Tokyo、Japan) を用いて封入した。切片は、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X710; 株式会社キーエンス、Osaka、Japan) を使用して撮影した。

#### 2-2-4 網膜電図

2-2-2 に従って網膜障害を惹起した後、24時間の暗順応を行い、通常飼育下にて3日間飼育を行った。さらに網膜電図を測定するために暗室で24時間飼育することで暗順応させた。その後、120 mg/kg ケタミン及び6 mg/kg キシラジンの混合麻酔を腹腔内投与し、ミドリン<sup>®</sup>P 点眼液により散瞳した。不関電極を口腔、接地電極を臀部に設置し、角膜に関電極として白色 LED 電極を接触させることでフラッシュ electroretinogram (ERG) を測定した。測定は以下の5種の条件で行った。まず $-2.91 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ の光刺激で測定し、30秒間の暗順応の後に $-1.92 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ の光刺激で測定、1分間の暗順応の後に $-1.02 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ の光刺激で測定、1分間の暗順応の後に $-0.02 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ の光刺激で測定、2分間の暗順応の後に $0.98 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ の光刺激で測定を行った。波形の基線から最下端までを a 波、a 波の頂点から最頂端までの振幅を b 波として解析した (Fig. 5)。



	解析方法	機能
a波	基線から最下端までの振幅	網膜視細胞の機能を反映
b波	a波の頂点から最頂端までの振幅	双極細胞及びMüller細胞の機能を反映

Fig. 5 The ERG for functional assessment

#### 2-2-5 光照射によるマウス慢性網膜障害モデル

ロピニロール塩酸塩は、光照射 1 週間前から ALZET 浸透圧ポンプ (Durect Corporation, Cupertino, CA, USA) を用いて 2 mg/kg/day で投与した。ロピニロールを充填した ALZET 浸透圧ポンプ (model 2006; ポンプ流速 0.15  $\mu$ L/h) は、イソフルラン麻酔下で背部皮下に埋め込んだ。マウスを 4 週間連続で 100 lux の青色 LED 照射条件下で 8 時から 20 時までの 12 時間、飼育することで網膜障害を惹起した。光照射終了後、2-2-3 に従って組織学的評価を行った。

#### 2-2-6 血中ロピニロール濃度

2-2-5 に従って ALZET 浸透圧ポンプをマウスに埋め込み、2 mg/kg/day でロピニロールを投与した。ポンプ設置から 1、7 日後、イソフルラン麻酔下のマウス尾静脈から血液を採取した。また、ポンプ設置から 14 日後に下大静脈から血液を採取した。上記により採取したサンプルを用いて、ロピニロールの血中濃度を測定した。

#### 2-2-7 細胞培養

マウス錐体視細胞株 661W は、Muayyad Al-Ubaidi 博士 (University of Houston、



Houston, TX, USA) より提供された。661W 細胞は、10% FBS、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを含む DMEM (ナカライテスク株式会社) を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> のインキュベーター中で培養を行った。継代数 30 までの細胞を実験に使用した。

#### 2-2-8 エラスターゼによるプログラニューリンの切断

プログラニューリンはエラスターゼによりグラニューリンへと切断されることが知られており (47)、本研究ではブタ膵臓由来エラスターゼ (E7885; Sigma-Aldrich) を用いた。エラスターゼは、100 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0)、960 mM NaCl の溶媒に希釈して使用した。5.0 µg/mL のマウスプログラニューリン (R&D systems、Minneapolis、MN、USA) は、0.1、0.5、1.0 U/mL のエラスターゼと混合し、37°C で 1 時間インキュベートすることによって切断した。エラスターゼとの反応後、Sample buffer (x4) を加えて、100°C の水浴で 5 分間加熱し、ウエスタンブロット法により切断反応を解析した。

#### 2-2-9 PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) によるエラスターゼ活性の阻害

2-2-8 で作成したプログラニューリン切断産物を 661W 細胞へ添加する際には、1.0 mM の PMSF (ナカライテスク株式会社) と混合して、37°C で 15 分間インキュベートすることで不要なエラスターゼ活性を阻害した。エラスターゼが細胞生存性に及ぼす影響は Cell Counting Kit-8 を用いて確認した。661W 細胞を 96well プレートに 3,000 cells/mL の密度で播種し、24 時間培養した。その後、Cell Counting Kit-8 を各 well に 10 µL ずつ添加して、さらに 2 時間インキュベートした。Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific) を用いて 450 nm の吸光度 (対照波長 650 nm) を測定し、細胞生存性を測定した。

#### 2-2-10 分画フィルターによる全長プログラニュリンの除去

50,000 MW 以下のタンパク質を分離できる遠心式分画フィルター (Amicon Ultra-15; Millipore) を用いて、2-2-8 で作成したプログラニュリン切断産物 400  $\mu$ L を分画した。サンプルは 4°C、7,000  $\times$  g で 20 分間、遠心することで分画を行った。遠心後、フロースルーを全量回収し、再度 400  $\mu$ L となるように PBS を加えた。上記により作成したサンプルは、ウエスタンブロット法による解析又は 2-2-9 に従ってエラスターゼ活性を阻害した後に *in vitro* 光誘発視細胞障害モデルに用いた。

#### 2-2-11 *In vitro* 光誘発視細胞障害モデル

661W 細胞を 96 well プレートに 3,000 cells/mL の密度で播種し、24 時間培養した。その後、1% FBS 含有 DMEM に培地交換し、各試薬を添加した。プログラニュリン、エラスターゼ、PMSF は、それぞれ終濃度が 500 ng/mL、0.1 U/mL、0.1 mM となるように調製した。PKC 阻害剤 Gö 6976 (Calbiochem, CA, USA) はプログラニュリン切断産物添加の 1 時間前に、終濃度 500 nM となるように添加した。試薬添加 1 時間後、白色蛍光灯 (Nikon, Tokyo, Japan) を用いて 2,500 lux の照射条件下で細胞を培養した。光照射 24 時間後、Hoechst 33342 (8.1  $\mu$ M) 及び PI (1.5  $\mu$ M) を用いて核染色を行い、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X710) を用いて画像を取得した。Hoechst 陽性細胞数に対する PI 陽性細胞数を算出した。

#### 2-2-12 ウエスタンブロット法

##### 2-2-12-1 タンパク質の抽出

タンパク質抽出のための細胞溶解液は、RIPA buffer [50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)、150 mM NaCl、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、1%

Igepal CA-630] を protease inhibitor: protease inhibitor cocktails 2: protease inhibitor cocktails 3: RIPA buffer = 1:1:1:100 の割合で混合することで作製した。マウス網膜からタンパク質を抽出する際は、マウスを頸椎脱臼にて安楽死させ、摘出した眼球から網膜を単離した。単離した網膜は 1.5 mL チューブの中に入れ、液体窒素中で急速凍結した。サンプルはタンパク質抽出まで -80°C に保存した。網膜が入った 1.5 mL チューブ内に細胞溶解液 100  $\mu$ L を添加し、ホモジナイザー (マイクロテック・ニチオン株式会社、Chiba, Japan) を用いてホモジナイズした。上記にて作成した細胞溶解液は、4°C にて 12,000  $\times$  g で 20 分間遠心分離し、その上清をタンパク質抽出液として実験に用いた。

#### 2-2-12-2 タンパク質定量及びタンパク質濃度調製

タンパク質定量は、Pierce BCA Protein Assay Kit を用いて行った。標準曲線作製のため、0、25、125、250、500、750、1000、1500 及び 2000  $\mu$ g/mL の濃度に調製した BSA を用いた。それぞれのタンパク抽出液に、Pierce BCA protein assay reagent A 液と B 液を 50:1 で混合した溶液を添加し、37°C に温めたアルミニウムブロックバス (株式会社サイニクス、Tokyo, Japan) 上で 30 分間反応させた。その後、Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific) を用いて 562 nm の吸光度を測定した。測定したタンパク質濃度に基づいて、タンパク質濃度が均一になるように調製し、3-Mercapto-1,2-propanediol を含む Sample buffer (x4) と混合した。調製した溶液は 100°C の熱湯で 5 分間煮沸し、電気泳動まで -80°C に保存した。

#### 2-2-12-3 電気泳動及び転写

濃度が均一になるように調製したサンプルを氷上で融解した。SDS-PAGE (SuperSep 5-20%) を電気泳動装置にセットし、running buffer で容器内を満たし

た。サンプルを添加後、ゲル1枚あたり20 mAの条件で80分間泳動した。泳動後、ゲルをcathode bufferに15分間浸漬した。転写膜(Immobilon P<sup>®</sup>、Millipore)は、30秒間メタノールに浸したあと、15分間Milli-Qに浸漬した。陽極側から、anode buffer 1に浸漬したろ紙、anode buffer 2に浸漬したろ紙、転写膜、ゲル、2枚のcathode bufferに浸漬したろ紙の順に積み上げ、転写膜1枚につき100 mAで45分間転写した。

#### 2-2-12-4 タンパク質発現量の解析

転写後の膜は、0.05% Tween-20 含有 TBS (T-TBS) で洗浄し、Blocking One-Pにより30分間ブロッキングした。転写膜をT-TBSで洗浄後、Can get signal solution 1に希釈した一次抗体溶液に浸漬し、4°Cで一晩以上反応させた。その後、T-TBSで転写膜を洗浄し、Can get signal solution 2で希釈した二次抗体溶液に浸漬し、室温で1時間反応させた。T-TBS洗浄後、ImmunoStar<sup>®</sup>LDに浸漬して5分間反応させて、Amersham Imager 680 (GE Healthcare Life Sciences、Chicago、IL、USA) 及び Amersham Imager 680 Analysis Software (GE Healthcare Life Sciences) を用いてバンドを検出した。

一次抗体には、sheep anti-progranulin (1:100; R&D systems)、mouse anti-SLPI (1:100; Santa Cruz Biotechnology、CA、USA)、rabbit anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1) (1:200; 富士フイルム和光純薬株式会社)、mouse anti- $\beta$ -actin (1:2000; Sigma-Aldrich) を用いた。二次抗体には、Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti-sheep antibody (1:1,000; Thermo Fisher Scientific)、HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (1:1,000; Thermo Fisher Scientific)、HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:1,000) を用いた。

#### 2-2-13 網膜組織の凍結切片作製

光照射から 24、48 時間後に頸椎脱臼にてマウスを安楽死させ、眼球を摘出した後に、4% PFA 含有 0.1M PB (pH 7.4) にて 24 時間 4°C で固定した。ついで、25%スクロース含有 0.1M PB (pH 7.4) 液に 48 時間 4°C にて保存した。その後、液体窒素を用いて O.C.T compound により凍結包埋し、薄切するまで-80°C にて保存した。クライオスタット (Leica Biosystems) を用いて、-20°C 中で厚さ 10 µm の網膜切片を作製し、MAS コーティングされたカバーガラス (松波硝子工業株式会社) にのせ、その後-80°C で保存した。

#### 2-2-14 免疫染色

凍結切片は染色時、-80°C より取り出し、-20°C で 1 時間静置した。その後、4°C で 1 時間保存し、さらに室温で 1 時間乾燥させた。その後、super PAP pen (大道産業株式会社、Saitama, Japan) にて反応液の流出を防ぐために切片の周囲を囲んだ。10% horse serum にて 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、10% horse serum に希釈した一次抗体を用いて 4°C で一晩反応させた。一次抗体には、sheep anti-progranulin antibody (1:50)、rabbit anti-Iba-1 antibody (1:100) を用いた。

その後、PBS で洗浄を行い、10% horse serum に希釈した二次抗体によって 1 時間反応させた。二次抗体には、Alexa Fluor<sup>®</sup>647-conjugated donkey anti-sheep IgG (1:1,000; Thermo Fisher Scientific)、Alexa Fluor<sup>®</sup>546-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:1,000; Thermo Fisher Scientific)を用いた。PBS で洗浄後、Hoechst 33342 (1:1,000) を用いて核染色を行った。染色後、fluoromount (Diagnostic BioSystems (Pleasanton, CA, USA) 及びカバーガラスを用いて封入した後、レーザー走査型共焦点蛍光顕微鏡 (FV3000; オリンパス株式会社、Tokyo, Japan) にて

撮影を行った。本検討では、視神経から 500  $\mu\text{m}$  の位置を撮影し、解析に用いた。

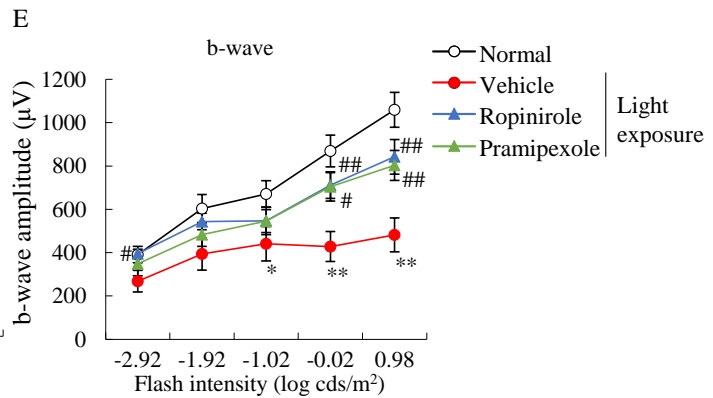
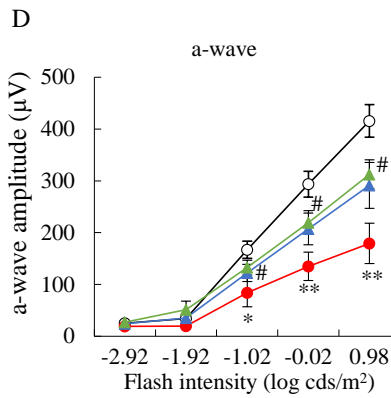
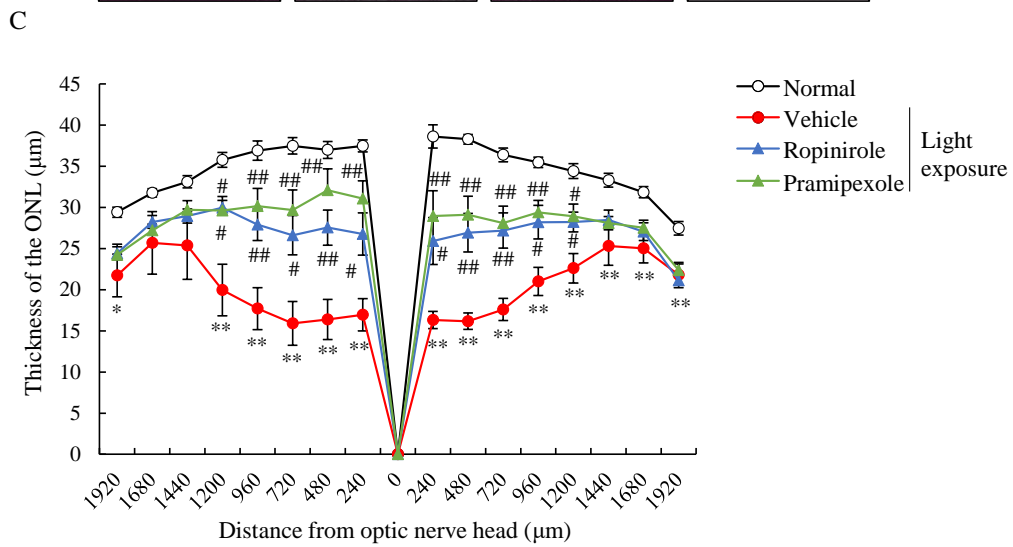
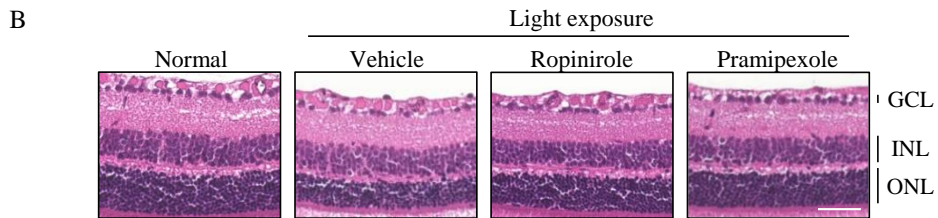
### 2-3 統計学的解析

実験成績は平均値 $\pm$ 標準誤差 (standard error of the mean: SEM) で示した。統計学的な比較は、Statistical Package for the Social Science 15.0 J for Windows software (IBM, Armonk, NY, USA) を用いて行った。2 群間の比較は、Student's *t*-test を行った。多群間の比較は、one-way analysis of variance (ANOVA) 後に Dunnett's test または Tukey's test を行った。危険率が 5%未満を有意差有りとした。

### 第3節 実験成績

#### 3-1 網膜視細胞障害に対するロピニロールの作用

過度な光照射は、萎縮型加齢黄斑変性のリスクファクターであり、網膜視細胞障害による視機能低下を惹起する。そこでマウス光誘発網膜障害モデルを作製し、網膜機能の低下を抑制できる薬剤の探索を目指した。神経保護作用が報告されるロピニロール及び同効薬であるプラミペキソール投与後の網膜保護作用を検討するために、光照射後の網膜の組織学的評価及び網膜電図による評価を行った (Fig. 6A)。溶媒投与群において、光照射後の網膜外顆粒層の厚さは、正常群の約 50%程度に菲薄化し、ロピニロール (80 mg/kg) 及びプラミペキソール (1.0 mg/kg) の単回経口投与は、この菲薄化を著明に抑制した (Fig. 6B-C)。光照射後の網膜電図を測定した結果、網膜視細胞の機能を反映する a 波、双極細胞及び Müller 細胞の機能を反映する b 波が共に低下することが確認された (Fig. 6D-E)。これに対して、ロピニロール及びプラミペキソールは a 波、b 波の低下を抑制した。



Continued on the next page.



**Fig. 6 Acute light-induced retinal damage was reduced by the oral administration of ropinirole or pramipexole.**

(A) The experimental design for the murine retinal degeneration model. Thirty minutes before light exposure, the eyes of the mice were dilated. Mice were then treated with either ropinirole (80 mg/kg) or pramipexole (1.0 mg/kg) by oral administration, just before light exposure. Mice were exposed to 8,000 lux white fluorescent light for 3 h. Five days after light exposure, ERG measurements and Hematoxylin and Eosin (H&E) staining were performed. (B-C) Histological analysis of the outer nuclear layer (ONL). (B) Representative images of retina stained with H&E staining. Scale bar = 50  $\mu$ m. (C) The quantitation of ONL thickness after light exposure. Ropinirole and pramipexole treatments suppressed the thinning of the ONL. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 7-10). \*,  $p < 0.05$  vs. Normal; \*\*,  $p < 0.01$  vs. Normal; #,  $p < 0.05$  vs. Vehicle; ##,  $p < 0.01$  vs. Vehicle (Student's *t*-test). (D-E) Average dark-adapted ERG a-wave (D) and b-wave (E) amplitudes. Data are shown as the mean  $\pm$ SEM (n = 7-10). \*,  $p < 0.05$  vs. Normal; \*\*,  $p < 0.01$  vs. Normal; #,  $p < 0.05$  vs. Vehicle; ##,  $p < 0.01$  vs. Vehicle (Student's *t*-test). GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer.

### 3-2 浸透圧ポンプによるロピニロール投与後の血中濃度

ロピニロールはパーキンソン病に対する治療薬として経口薬や貼付剤などの薬剤が開発されており、中枢神経系の組織である網膜に薬剤が送達する可能性がある。ALZET 浸透圧ポンプを用いてロピニロール (2 mg/kg/day, s.c.) を持続的に投与したところ、投与 1、7、14 日後の血中でロピニロールが検出された (Table 2)。血中ロピニロール濃度は、浸透圧ポンプ設置から経時的に増加し、14 日後においては 8.96 ng/mL と最も高値を示した。

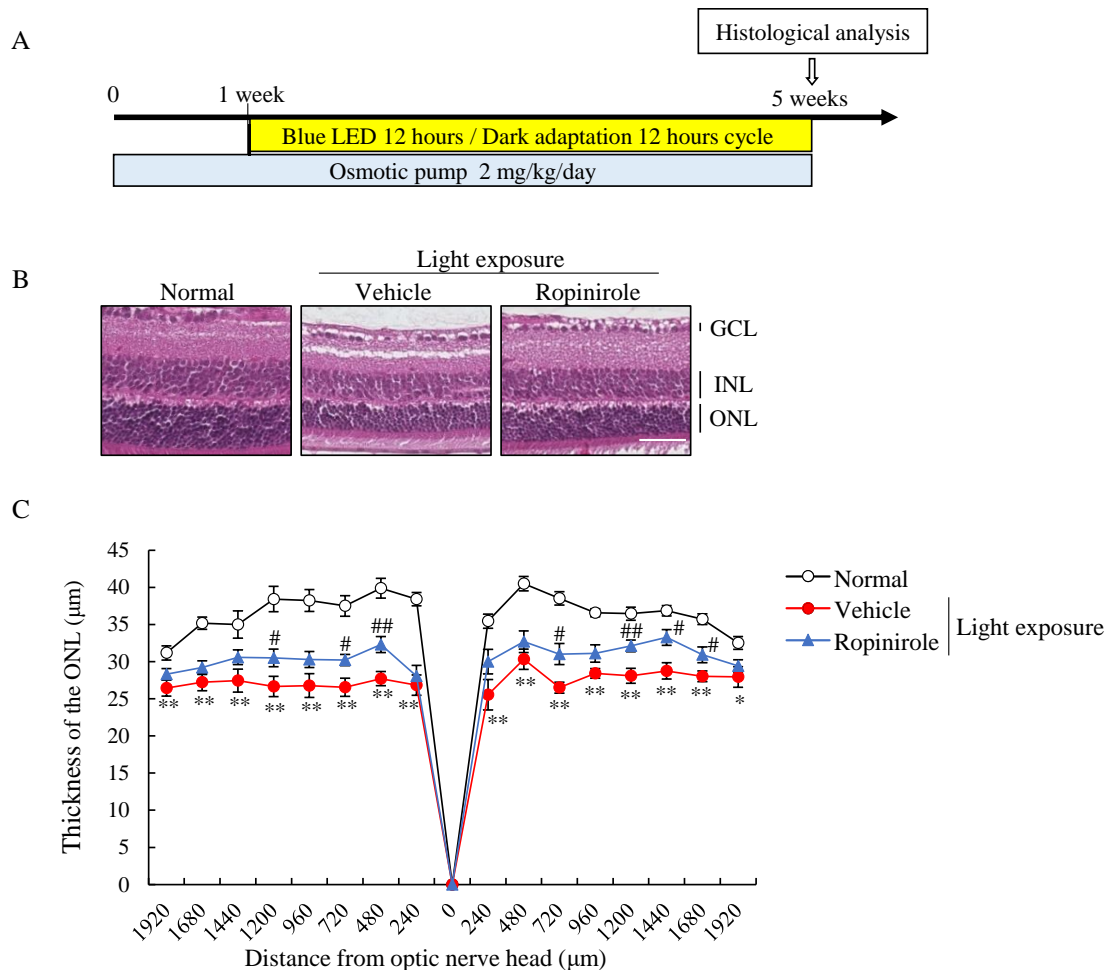
**Table 2. The blood ropinirole concentration with osmotic pump implantation**

Time	1 day	7 days	14 days
Concentration (ng/mL)	2.93 $\pm$ 0.44	6.53 $\pm$ 0.78	8.96 $\pm$ 3.11

Data are shown as  $\pm$  SEM (n = 5).

### 3-3 ロピニロール投与による網膜視細胞保護作用

浸透圧ポンプを用いたロピニロールの持続的な投与が網膜視細胞の保護作用を示すかを検討するために、ロピニロール投与後の網膜について組織学的評価による解析を行った。1日12時間の青色光(100 lux)を、4週間マウスに照射することで慢性網膜障害を惹起した (Fig. 7A)。ロピニロールは浸透圧ポンプにより、2 mg/kg/day (s.c.) で光照射開始の1週間前から投与した (Fig. 7A)。網膜の組織学的評価の結果、溶媒投与群では正常群と比較して網膜外顆粒層が約3割菲薄し、ロピニロールはこの菲薄化を有意に抑制した (Fig. 7B, C)。



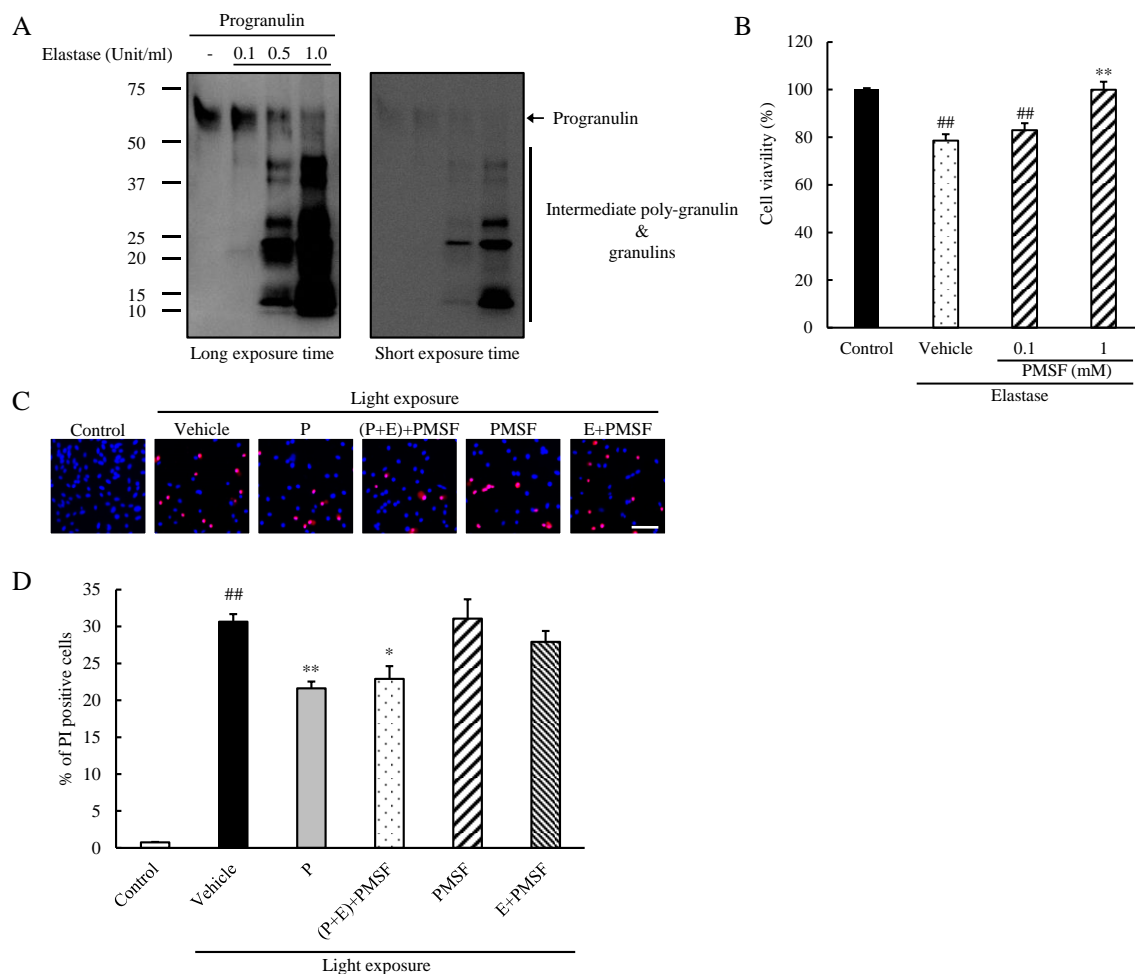
Continued on the next page.

**Fig. 7 Chronic light-induced retinal damage was rescued by continuous ropinirole administration.**

(A) The experimental design for the chronic retinal degeneration model. Ropinirole (2 mg/kg/day) was continuously administered by the implantation of an osmotic pump. One week after the implantation, mice were exposed to a 12-h blue LED (100 lux)/12-h dark cycle for 4 weeks. Finally, a histological analysis was performed using H&E staining. (B) Representative images of retina stained with H&E staining. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . (C) Quantitative analysis of the ONL in mice implanted with an osmotic pump filled with ropinirole. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 8-10). \*\*,  $p < 0.01$  vs. Normal; #,  $p < 0.05$  vs. Vehicle; ##,  $p < 0.01$  vs. Vehicle (Student's *t*-test). GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer.

### 3-4 成長因子プログラニューリン及びグラニューリンによる網膜視細胞死抑制作用

先行研究により、プログラニューリン欠損が網膜ミクログリア異常活性化や網膜色素上皮細胞の機能異常を惹起することが示唆されている (61, 62)。炎症下ではプログラニューリンはエラスターゼによってグラニューリンに切断されるが、グラニューリンの網膜機能に対する役割は明らかになっていない。そこで光誘発網膜視細胞死に対するプログラニューリン及びその切断産物であるグラニューリンの作用を検討した。プログラニューリンを 0.1、0.5、1.0 Unit/mL のエラスターゼと 1 時間反応させると、50 kDa 以下の位置において複数の中間産物や 10 kDa に位置するグラニューリンの存在が認められた (Fig. 8A)。1.0 Unit/mL のエラスターゼで処置した際に 10 kDa のグラニューリンが顕著に増加したため、以下の検討では 1.0 Unit/mL のエラスターゼを使用した。ただし、エラスターゼによる網膜視細胞株 661W の細胞生存性の低下が認められたため、セリンプロテアーゼ阻害剤である PMSF を加えることで、切断反応後の不要なエラスターゼ活性を阻害した (Fig. 8B)。PMSF 1.0 mM は、エラスターゼによる細胞生存性の低下を抑制し、その値は Control 群と同程度であった。つぎに、光誘発視細胞死に対するプログラニューリン及びその切断産物の保護作用を検討した。光照射群において PI 陽性の死細胞の割合が約 30%まで増加した (Fig. 8C, D)。また PMSF や、エラスターゼと PMSF (E+PMSF) の処置群は、溶媒投与群と同程度の細胞死率を示した。これに対して、プログラニューリン(P)、及びプログラニューリン切断産物 [(P+E)+PMSF] 処置群は、光照射による細胞死率の増加を抑制し、これらの抑制作用は同程度であった (Fig. 8C, D)。

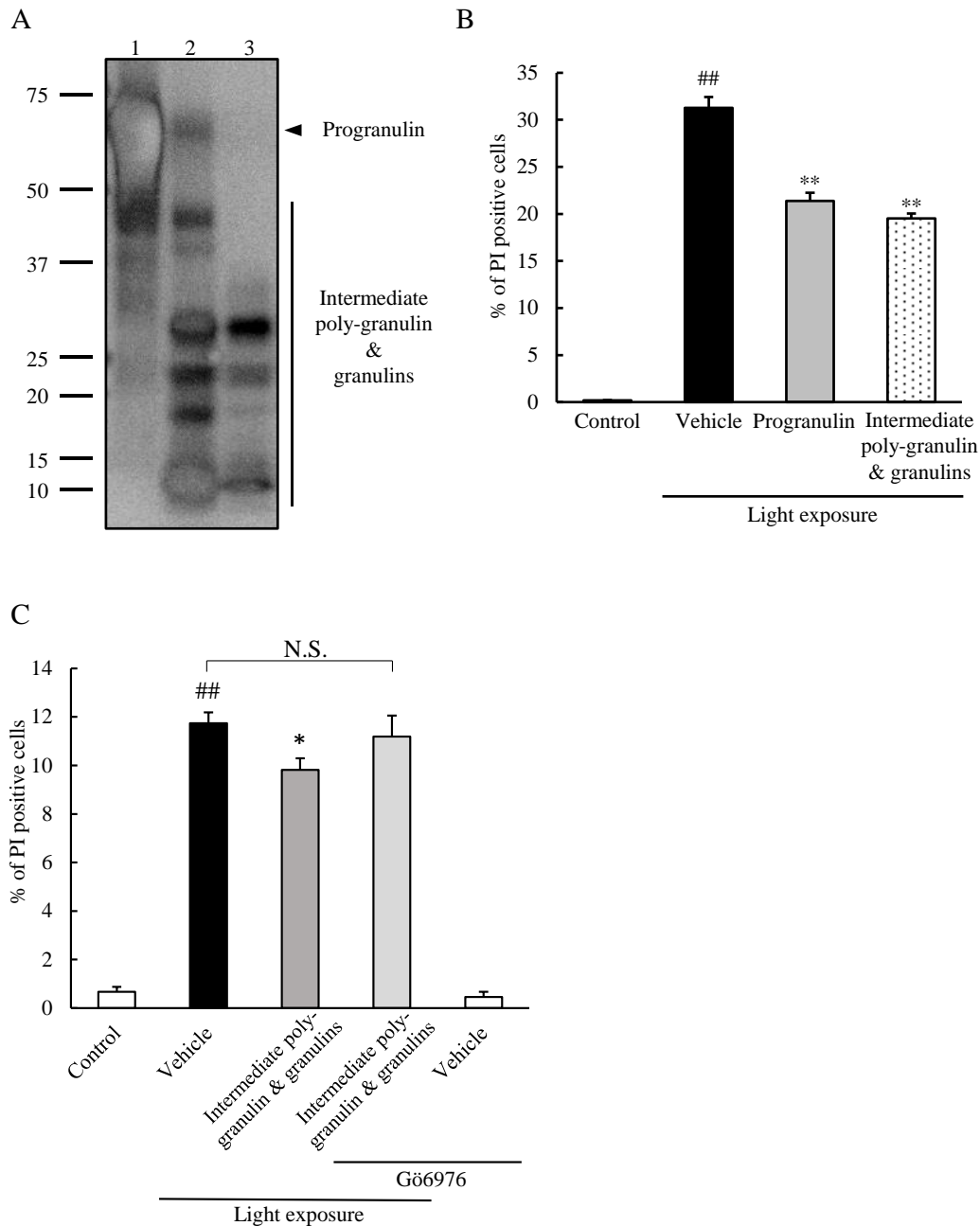


**Fig. 8 Progranulin and granulins reduced light-induced photoreceptor cell death.**

(A) Western blot analysis of recombinant progranulin and recombinant progranulin treated with 0.1, 0.5, 1.0 Unit/mL elastase from porcine pancreas. Recombinant progranulin was incubated with elastase for 1 h. Left and right images was detected by long- or short- exposure time, respectively. (B) PMSF inhibited elastase's cytotoxicity against 661W cells. Elastase was incubated with PMSF for 15 min to inhibit elastase's cytotoxic effects. PMSF inhibited reduced cell viability (661W) induced by elastase-treatment. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5$ ). <sup>##</sup>,  $p < 0.01$  versus control; <sup>\*\*</sup>,  $p < 0.01$  versus vehicle (Tukey's test). (C-D) Protective effects of Progranulin and cleaved Progranulin treated with elastase against light-induced photoreceptor cell death. 661W cells were incubated under light exposure. Progranulin, cleaved Progranulin ([P+E] +PMSF), PMSF, and elastase incubated with PMSF (E + PMSF) were added to the medium. The number of PI positive cells was increased after light exposure. (C) Representative images of 661W stained with Hoechst 33342 and PI. Scale bar = 100 $\mu$ m. (D) Recombinant Progranulin and cleaved-Progranulin significantly suppressed light-induced photoreceptor cell death. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. ( $n = 5$ ). <sup>##</sup>,  $p < 0.01$  versus control; <sup>\*\*</sup>,  $p < 0.01$  versus vehicle; <sup>\*</sup>,  $p < 0.05$  versus vehicle (Tukey's test). P, progranulin; E, elastase.

### 3-5 全長プログラニューリン除去後の Progranulin 切断産物の作用

プログラニューリンはエラスターゼによる切断後も視細胞保護作用を保持することを明らかにしたが、上記の方法では、一部全長プログラニューリンが残存していた (Fig. 8A)。そこで分画分子量 50 kDa の遠心式分画フィルターを用いて全長プログラニューリンを除去できるかどうか検討した。ウエスタンブロットによる解析の結果、エラスターゼによる切断後に認められる全長プログラニューリン (レーン 2) は、遠心分離後のサンプルにおいては認められなかった (レーン 3) (Fig. 9A)。遠心分離後のプログラニューリン切断産物 (Intermediate poly-granulin & granulins) は、光照射による 661W 細胞死率の増加を抑制し、その作用はプログラニューリンと同程度であった (Fig. 9B)。全長を除去したプログラニューリン切断産物は光誘発網膜視細胞死を抑制したが、PKC 阻害剤 Gö6976 の処置により、その細胞死抑制作用が消失した (Fig. 9C)。



**Fig. 9 Purified intermediate poly-granulin and granulins still have the protective effect on photoreceptor cells via PKC signal pathway.**

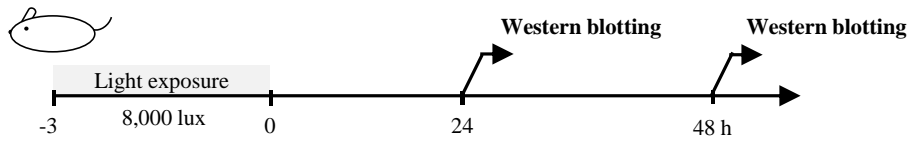
(A) Recombinant progranulin was incubated for 1 h, and then cleaved Progranulin was fractionated with centrifugal filter (*lane 1* recombinant progranulin, *lane 2* cleaved progranulin, *lane 3* intermediate poly-granulin and granulins). Arrowhead marks the full-length Progranulin. (B) Full-length Progranulin and Granulins with intermediate poly-granulins rescued the cell death induced by light exposure. Data are shown as mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$  or  $9$ ). <sup>##</sup>,  $p < 0.01$  versus control; <sup>\*\*</sup>,  $p < 0.01$  versus vehicle (Tukey's test). (C) Purified intermediate poly-granulin and granulins were added to 661W cells with PKC inhibitor (Gö6976), and white fluorescent light were irradiated for 24 h. PKC inhibitor diminished the protective effects. Data are shown as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). <sup>##</sup>,  $p < 0.01$  versus control; <sup>\*</sup>,  $p < 0.05$  versus vehicle (Student's  $t$ -test). N.S., not significant.

### 3-6 光誘発網膜障害モデルにおけるプログラニューリン及びグラニューリンの発現

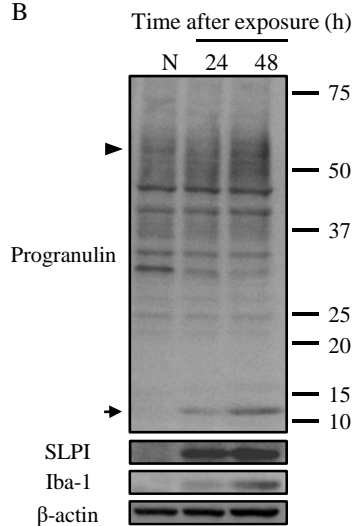
光照射による障害後の網膜におけるプログラニューリン及びグラニューリンの発現を明らかにするため、マウス光誘発網膜障害モデルを用いてウェスタンブロット法及び免疫染色による検討を行った (Fig. 10A)。正常網膜と比較して、光照射から 24、48 時間後の網膜において 10 kDa に位置するグラニューリン (矢印) の発現が増え、48 時間後においては発現量が約 3.4 倍に増加した (Fig. 10B, C)。プログラニューリン (矢尻) の産生は正常群と比較して、約 1.7 倍~1.8 倍の増加傾向を認めた (Fig. 10B, D)。また光照射後 48 時間後網膜のプログラニューリンに対するグラニューリンの割合は、正常網膜と比較して約 4.3 倍まで増加し、網膜視細胞障害に伴うプログラニューリンの切断亢進が認められた (Fig. 10B, E)。また、プログラニューリンの切断阻害活性を有する SLPI の発現量は光照射から 48 時間後の網膜において、約 2.4 倍まで増加した (Fig. 10B, F)。最後に、プログラニューリンの主要な産生源として知られているマクロファージの関与を検討するため、マクロファージマーカーである Iba-1 の発現量を検討した。Iba-1 の発現量は、光照射 48 時間後の網膜において約 1.5 倍に増加した (Fig. 10B, G)。



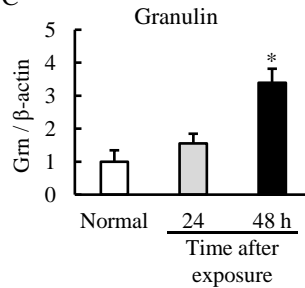
A



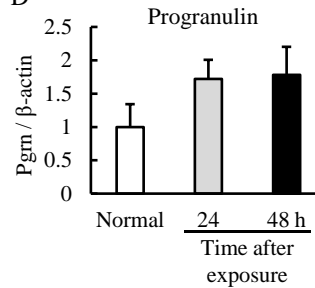
B



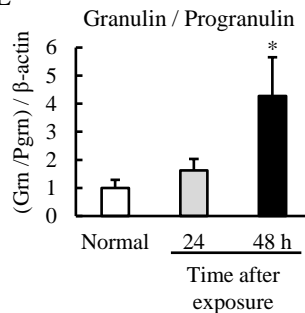
C



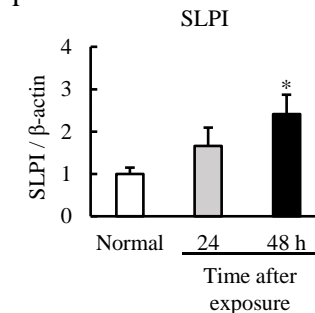
D



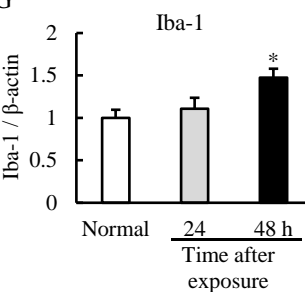
E



F



G

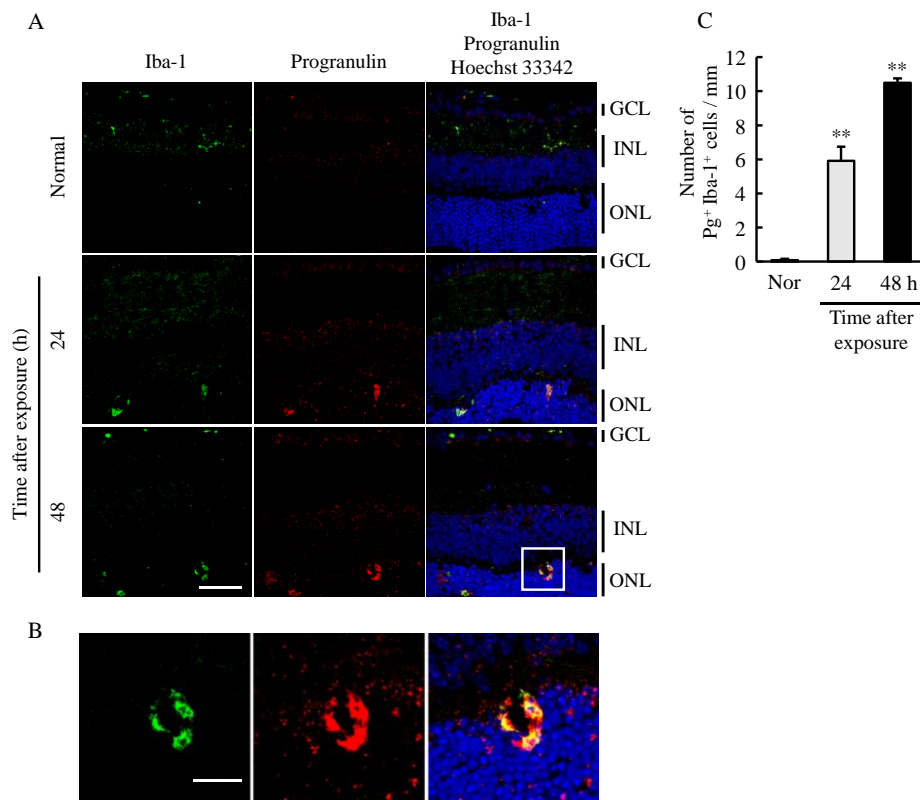


**Fig. 10 Expression of progranulin and granulin after excess light exposure.**

(A) Schematic of the experimental protocol. Albino male mice were exposed to white light at 8,000 lux for 3 h, then Western blot analysis was performed 24 and 48 h after light exposure. (B) Arrowhead and arrow indicate the band of Progranulin and Granulin, respectively. (C-G) Quantification analysis show the expression level of granulin (C), granulin/progranulin (E), SLPI (F), and Iba-1 (G) were increased in the retina after light exposure. The increasing tendency was observed in progranulin expression level (D). Data are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 5). \*,  $p < 0.05$  versus Normal (Dunnett's test). N, normal; PGRN, progranulin; Grn, Granulin.

### 3-7 光誘発網膜障害モデルにおけるプログランニューリン及びグラニューリンの局在

光照射後の網膜におけるプログランニューリン及びグラニューリンの産生細胞を明らかにするため、マウス光誘発網膜障害モデルの網膜を用いて免疫染色を行った。正常網膜と比較して、光照射 24、48 時間後の網膜において Iba-1 陽性細胞が網膜外顆粒層において認められた (Fig. 11A, B)。また、光照射後の網膜において増加した Iba-1 陽性細胞はプログランニューリン抗体で検出されるシグナルと共局在した。さらに、網膜外顆粒層における Iba-1 陽性及びプログランニューリン陽性のダブルポジティブ細胞は、光照射 24、48 時間後のいずれのタイミングにおいても有意に増加した (Fig. 11C)。



**Fig. 11 Co-localization of progranulin/granulins and Iba-1 positive cells.**

(A) Expression of progranulin and macrophage marker (Iba-1) were colocalized after light exposure in the ONL. The enlarged image is shown (B). (C) Light exposure enhanced the number of progranulin<sup>+</sup> Iba-1<sup>+</sup> double-positive cells in the ONL. Data are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 3). \*\*,  $p < 0.01$  versus normal (Dunnett's test). Scale bars = 50  $\mu$ m (A) and 20  $\mu$ m (B). GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer; Pg, progranulin; Nor, normal.

#### 第4節 考察

本章では、網膜視細胞障害の危険因子である光曝露に焦点を当て、網膜保護作用を示す薬剤の探索並びに病態進展に関わる因子を検討した。ロピニロールは光誘発網膜障害モデルに対して、網膜視機能の低下や網膜外顆粒層の菲薄化を抑制した。また、成長因子グラニューリンはプログラニューリンと同様に網膜視細胞に対して保護作用を示すことを明らかにした。

加齢黄斑変性の病態進展には、酸化ストレスが密接に関わることが示唆されている (68)。2001年に公表された米国国立眼病研究所主導の大規模前向き研究 (AREDS: Age-Related Eye Disease Study) では、ビタミンC、E、 $\beta$ -カロテンなどの抗酸化物質及び亜鉛を処方することで、後期加齢黄斑変性へ進行を予防できることが示唆された (69)。2013年に発表された AREDS2 では、黄斑色素を構成するカロテノイドであるルテインやゼアキサンチンが加齢黄斑変性のリスクを抑制することが報告された (70)。また、本章で用いた光誘発視細胞障害においても酸化ストレスの関与が示唆されており、抗酸化剤が網膜視細胞を保護する有力な治療薬となることが期待されている (71)。このように、加齢黄斑変性の進展を予防し、視力を維持するためには、酸化ストレスを減弱させることが重要である。

ロピニロールを含む非麦角系ドパミンアゴニストは、フリーラジカル捕捉による抗酸化作用を示すことが明らかになっており (44)、パーキンソン病以外の中枢疾患への応用が期待されている。実際、ロピニロールは iPS 細胞創薬の検討から ALS 病態を改善させることが報告された (43)。2021年には ALS を対象にした医師主導治験において、生存期間の中央値がプラセボ投与群で 22.4 週である一方、ロピニロール投与群で 50.3 週と約 7 か月病気の進行を遅らせることが報告されている (JMA-IIA00397)。また、ロピニロールは貼付剤としての剤形

が開発されており、加齢に伴い認知症や嚥下障害を併発した加齢黄斑変性患者に対して投与面でのメリットがある (72, 73)。したがって、ロピニロールは萎縮型加齢黄斑変性に対する新規治療薬として有益な効果をもたらすことが期待できる。本章では、白色光あるいは青色 LED 光による網膜外顆粒層の菲薄化に対してロピニロールが抑制作用を示しており、ロピニロールが光照射による酸化ストレスを減弱したことで網膜視細胞保護作用を示したと推測される。また、本検討で用いた慢性網膜障害モデルでは、青色 LED の照射を 100 lux に設定しており、これはおよそ照明を設置した室内の明るさに相当する。つまり、本モデルは日常生活における長期的な光曝露を模倣した疾患モデルであり、8,000 lux の白色光を照射するモデルよりも自然な病態発症を示すと考えられる。以上より、加齢による慢性的なストレスに対してロピニロールが予防効果を示すことから、ロピニロールが萎縮型加齢黄斑変性の新規治療薬として有用である可能性が示された。

プログラニューリンは、アルツハイマー病 (58) やパーキンソン病 (74) などの神経変性疾患、あるいは脳虚血障害に起因する神経細胞障害 (75) に対して神経保護作用を示すことが報告されている。*Grn* 変異がその発症要因となる前頭側頭型認知症に対してもプログラニューリンは保護作用を示し、現在はプログラニューリン融合タンパク質 (TAK-594; NCT05262023, phase1/2)、Sortilin 阻害によりプログラニューリン発現を増加させる抗体 (AL001; NCT04374136, phase 3) の臨床試験が行われている。これらの報告は中枢神経系におけるプログラニューリンの重要性を示しており、中枢神経細胞保護薬としてプログラニューリンを標的とした薬剤が将来開発されることが十分に期待できる。しかし、プログラニューリンは、炎症環境下で増加するエラスターゼによって切断を受けるため、炎症が惹起されている神経変性疾患においてはグラニューリンが組織中に存在する可能性が高

い。つまり、神経変性疾患へのプログラニューリンの治療応用を考える上ではグラニューリンの役割を解明することは非常に重要である。本章では、プログラニューリン切断後産物であるグラニューリンはプログラニューリンと同程度の網膜視細胞保護作用を示すことを明らかにした。さらに、これらの視細胞保護作用は PKC シグナルを介していることが示唆された。グラニューリン中間産物の機能については、ほとんど明らかになっていないが、Tang らは 3 つのグラニューリン組み換え体がプログラニューリンと同様の tumor necrosis factor receptor (TNFR) 2 阻害活性を示すことを報告している (63)。したがって、今回エラスターゼとの反応により作製したグラニューリン及びグラニューリン中間産物は、切断されても視細胞保護に必要な活性部位を保持していると考えられる。上記のことから、プログラニューリンによる視細胞保護作用はグラニューリンドメインが持つ活性部位に起因している可能性が高く、今後は活性部位の同定や、活性部位のみで構成される修飾グラニューリンの開発が重要である。

本章で得られた結果から、プログラニューリン及びグラニューリンに着目した網膜疾患への治療応用として、マクロファージを標的にした治療戦略を提示したい。プログラニューリン及び切断産物グラニューリンは視細胞に対して保護作用を持つこと、さらに網膜におけるこれらの発現はマクロファージが主要な産生源であることから、マクロファージ由来プログラニューリン発現を増加させることが治療に繋がると考えられる。マクロファージの集積は萎縮型加齢黄斑変性における特徴の一つである (76)。萎縮型加齢黄斑変性モデルにおいてマクロファージを枯渇させると網膜障害が抑制されることから、マクロファージは病態進行に強く寄与することが分かる (77)。一方、マクロファージは免疫細胞として機能し、生体機能の恒常性を維持には必須であるために、マクロファージそのものを枯渇させることは治療法として現実的でない。プログラニューリンは、マ

クロファージからの炎症性サイトカインや補体産生を負に制御することが分かっている (78)。上記のことを踏まえると、マクロファージにおけるプログラニューリンの分泌促進は、視細胞保護的なプログラニューリン及びグラニューリンの産生増加に加えて、マクロファージの炎症性フェノタイプを抑制できる可能性がある。

本章の研究成果により、ロピニロールが光障害による網膜視細胞変性を抑制し得ること、また、プログラニューリン及びグラニューリンが、網膜視細胞障害を抑制できる治療ターゲットとして有用であることが示された。第 2 章では、網膜視細胞に二次的な障害を誘発する網脈絡膜血管疾患に着目し、その病態機序解明と新たな治療標的の探索を目指した。

## 第2章 網脈絡膜血管疾患における BTB タンパク質の役割

### 第1節 緒言

網膜病変の中には、眼に栄養や酸素を送る循環系が障害されることで発症及び進展する病変がいくつか存在する。眼組織へ栄養供給する眼動脈は、内頸動脈から分岐し、視神経とともに眼窩内へと入った後に、網膜中心動脈と毛様体動脈に分かれる (Fig. 12)。網膜中心動脈は網膜内層に栄養を供給した後、網膜中心静脈を通して流出する。一方、短後毛様動脈は強膜を通して眼内へ入り、脈絡膜に分布することで網膜視細胞及び網膜色素上皮細胞に栄養を供給し、渦静脈を介して眼外に流出する。滲出型加齢黄斑変性や網膜静脈閉塞症などの眼血管疾患においては、脈絡膜血管や網膜静脈血管の恒常性が破綻することで異常血管新生や網膜浮腫が形成され、最悪の場合には失明に至る。抗 VEGF 薬は、これらの網脈絡膜血管疾患における網膜浮腫の抑制を目的に使用されている。2022年には VEGF とアンジオポエチン-2 を阻害するバイスペシフィック抗体 (バビースモ<sup>®</sup>; 一般名 ファリシマブ) が中心窩下脈絡膜新生血管を伴う加齢黄斑変性及び糖尿病黄斑浮腫に対して承認された。しかし、抗 VEGF 薬に対して耐性を持つ患者が一定数存在しており、未知の病態制御因子が病態形成に大きく寄与していることが考えられる (27, 33)。また、抗 VEGF 薬はあくまで対症療法であり、再燃を繰り返す場合には、侵襲的な硝子体内注射を長年にわたり受けなければならない。さらに、長期的な抗 VEGF 薬投与は、網膜視機能へ悪影響を

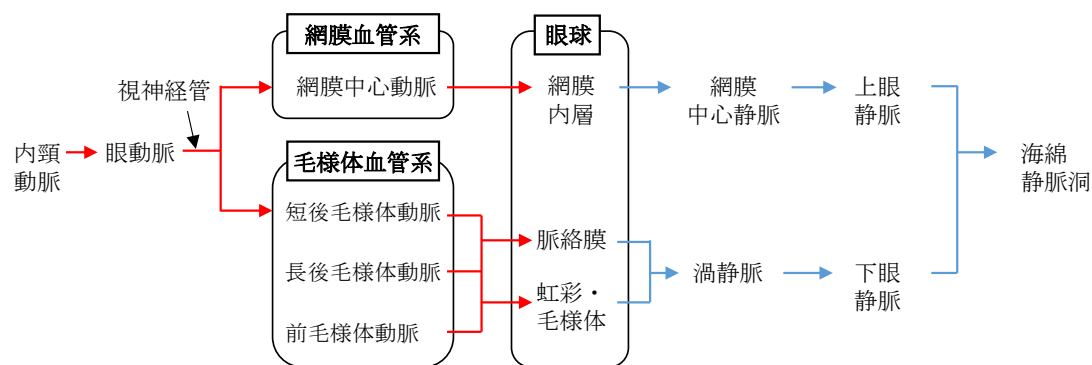


Fig. 12 Ocular circulation

与えることが示唆されている (79–82)。したがって、抗 VEGF 薬のこれら課題を解決できる新たな網脈絡膜血管疾患の治療薬創出が望まれている。

近年、E3 ユビキチンリガーゼ複合体足場タンパク質である Cullin 3 (CUL3) が血管新生に非常に重要な役割を担うことが明らかになった。CUL3 は Bric-a-brac,

Tramtrack and Broad Complex (BTB) タンパク質というアダプタータンパク質と複合体を形成することで、標的基質タンパク質をユビキチン化し、分解へと導く (Fig. 13)。ヒトでは 183 種の BTB タンパク質が報告されている。CUL3-speckle-type POZ

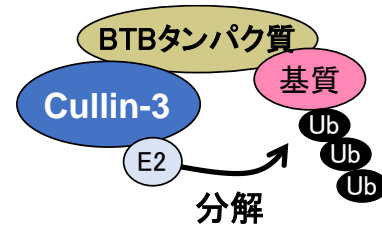


Fig. 13  
BTB-CUL3 ubiquitin ligases

protein (SPOP)-death-domain associated protein (DAXX) 軸は血管内皮細胞における vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) 発現量を制御し (83)、CUL3-potassium channel tetramerisation domain-containing 10 (KCTD10)-Ras Homolog Family Member B (RhoB) 軸は血管内皮細胞のバリア機能を制御する (84)。このように、CUL3 は標的とする基質によって BTB タンパク質を組み替えることで、多様な血管新生制御機構を発揮すると考えられている。BTB タンパク質の中でも、ankyrin repeat and FYVE domain containing 1 (ANKFY1) は human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) 細胞における接着因子インテグリン  $\beta 1$  の細胞内局在の制御に重要であることが報告される (85)。しかし、眼血管内皮細胞における ANKFY1 の役割は明らかになっておらず、細胞増殖、遊走などの血管新生プロセスに与える影響は不明である。

興味深いことに VEGF-Notch シグナルバランスを制御する BTB タンパク質として B-cell CLL/lymphoma 6 member B protein (BCL6B/BAZF/ZBTB28/ZNF62) が同定された (86)。Notch シグナルは、血管新生を阻害する機構として知られており、 $\gamma$ -セクレターゼによる切断を受けた Notch 細胞内ドメイン (NICD: Notch



intracellular domain) が C promotor-binding factor 1 (CBF-1) と結合することで Notch 標的遺伝子を発現誘導し、血管新生を阻害する。VEGF 刺激により発現が増加した BCL6B は、CBF1 と複合体を形成し、CUL3 によるポリユビキチン化を介して CBF1 を分解する。この一連の流れにより BCL6B は VEGF-Notch バランスを制御し、血管新生を促進する。眼血管新生病態においては Notch シグナルが減弱することが報告されており (87)、Notch シグナル活性化は網膜血管新生の阻害へと繋がる (88, 89)。以上の報告は、網脈絡膜血管疾患における VEGF-Notch シグナルバランスの破綻に、BCL6B が密接に関与している可能性を示すが、BCL6B が網脈絡膜血管疾患の病態進展に及ぼす影響は明らかになっていない。

本章では、網脈絡膜血管疾患の病態進展を制御する新たな病態制御因子の同定を目的に検討を行った。まず、眼血管内皮細胞における ANKFY1 の機能を検討した。さらに、サルレーザー誘発脈絡膜血管新生モデル及びマウス網膜静脈閉塞症モデルを用いて、BCL6B が異常血管新生や網膜浮腫の形成に及ぼす影響を検討した。

## 第2節 実験材料及び方法

### 2-1 実験材料

実験に用いた薬物及び試薬は、以下の通りである。

クラビット®点眼液 0.5%は参天製薬株式会社、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識デキストラン (分子量: 2,000 kDa) は Sigma-Aldrich、Lipofectamine RNAiMAX、Opti-MEM は Thermo Fisher Scientific、recombinant human VEGF<sub>165</sub> は R&D systems、塩化マグネシウム (magnesium chloride: MgCl<sub>2</sub>)、塩化カルシウム (calcium chloride: CaCl<sub>2</sub>) は富士フィルム和光純薬株式会社、Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) は Corning (Corning, NY, USA)、normal goat serum、M.O.M.

Immunodetection Kitは Vector Labs よりそれぞれ購入した。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 実験動物

本実験では、日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入した 8 週齢雄性 ddY マウス及び日本チャールス・リバー株式会社 (Yokohama, Japan) より購入した 8 週齢雄性 C57BL/6J マウスを用いた。BCL6B 欠損マウス (90) は、C57BL/6J マウスと 6 世代以上のバッククロスを行い、同腹仔を実験に使用した。第 1 章 2-2-1 と同様の方法でマウスを飼育した。実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。また、遺伝子組み換え動物は、岐阜大学バイオセーフティ委員会に遺伝子組み換え実験申請を行い、許可を得て使用した。

3-5 年齢の雄性カニクイザルの飼育及び実験は、株式会社新日本科学にて実施した。ステンレス製ケージ (奥行 680 × 幅 620 × 高さ 770 mm) 内で、23~29°C、湿度 30~70% の環境で飼育した。1 時間に 15 回換気を行い、7 時~19 時の人工照明のもと、自動給水装置により自由飲水させた。また、約 108 g (約 12 g × 9 個) の固形資料 (HF Primate J 12G 5K9J, ロット番号 APR12211 及び MAY18211, Purina Mills, LLC) を 1 日 1 回与えた。サルを用いた試験は、株式会社新日本科学の動物実験委員会により承認されており、同社動物実験規程に従って実施した。なお、試験施設は AAALAC International により認証されている。

### 2-2-2 マウスレーザー誘発脈絡膜血管新生モデル

#### 2-2-2-1 マウスレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルの作成

ミドリン<sup>®</sup>P 点眼液をマウスの眼に点眼して散瞳させた。ケタミン及びキシラ

ジンの混合液 7:1 を生理食塩水で 10 倍希釈したものを筋肉内投与 (10 mL/kg) した。麻酔後は眼表面の乾燥を防ぐために、ヒアレイン点眼液 0.1% を点眼した。カバーガラスを眼表面に接触させることで眼底を観察しながら、レーザー光凝固装置 (MC-500; NIDEK、Tokyo、Japan) を用いてレーザーを照射した。レーザーは、視神経乳頭の周辺に等間隔で 6 発、波長 647 nm、照射スポットサイズ 50  $\mu\text{m}$ 、照射時間 0.1 s、出力 120 mW の条件で行った。グアナベンズは生理食塩水に希釈し、レーザー照射日から 14 日間、1 日 2 回、腹腔内投与した。

#### 2-2-2-2 脈絡膜血管新生面積の評価

レーザー照射から 14 日後、ケタミン及びキシラジンの混合液 7:1 を生理食塩水で 10 倍希釈したものを筋肉内投与 (10 mL/kg) し、20 mg/mL の FITC-デキストラン (分子量: 2,000 kDa) を 0.5 mL 尾静脈内投与した。デキストラン投与から 5 分後、マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、眼球を摘出した。眼球は 4% PFA 含有 0.1M PB (pH 7.4) で 12 時間固定した。その後、眼球から角膜、水晶体、網膜を除去し、網膜色素上皮-脈絡膜-強膜複合体に 6 ヶ所切り込みを入れ、Fluoromount で封入することでフラットマウントを作製した。フラットマウントは、共焦点顕微鏡 (Fluoview FV10i; オリンパス株式会社) により撮影した。取得した画像は脈絡膜血管新生の周囲を囲み、その面積を脈絡膜血管新生面積とした。

#### 2-2-3 細胞培養

ヒト網膜毛細血管内皮細胞 (HRMEC: human retinal microvascular endothelial cells) は Cell Systems (Kirkland、WA、USA) より購入した。HRMEC は CultureBoost-R を含む complete classic medium (Cell Systems) に、100 U/mL ペニシ

リン、100 µg/mL ストレプトマイシンを添加して、37°C、5% CO<sub>2</sub> 中で培養を行った。培養器材は attachment factor (Cell Systems) で予めコートしたものを使用した。継代数 3 から 9 の培養細胞を実験に用いた。

#### 2-2-4 RNA 干渉

HRMEC は  $4.0 \times 10^4$  cells/mL の密度で播種し、37°C で 24 時間培養した。培養後、抗生物質不含培地へ培地交換した。ANKFY1 siRNA (25 nM) 又は BCL6B siRNA (25 nM)、Lipofectamine RNAiMAX 及び Opti-MEM の混合溶液を作製し、培地に添加してトランスフェクションした。ANKFY1 siRNA は 24 時間、BCL6B siRNA は 48 時間トランスフェクションした。ネガティブコントロールとして control siRNA (SIC-001; Sigma-Aldrich) を用いた。ANKFY1 siRNA 及び BCL6B siRNA の配列は以下の通りである。

ANKFY1 siRNA,

5'-GAUGUGAGAAGGGUGUUAU-3'(sense)

5'-AUAACACCCUUCUCACAUC-3'(antisense)

BCL6B siRNA,

5'-ACACCAAAGUGCACUACCAAtt-3'(sense)

5'-UGGUAGUGCACUUUGGUGUtt-3'(antisense)

#### 2-2-5 細胞生存性評価

HRMEC は  $3 \times 10^4$  cells/mL の細胞密度で 96 well プレートに播種した。24 時間の培養後、2-2-4 に従って ANKFY1 siRNA、BCL6B siRNA を導入した。その後、CultureBoost-R を含まない 10% FBS 含有 Complete medium に培地交換した。24 時間インキュベートした後、VEGF (10 ng/mL) を添加して、さらに 48 時間イン

キュベートした。Cell Counting Kit-8 溶液を 10  $\mu$ L ずつ添加して 2 時間培養し、Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific) を用いて 450 nm の吸光度 (対照波長 650 nm) を測定した。

#### 2-2-6 スクラッチアッセイ

HRMEC は  $3 \times 10^4$  cells/mL の細胞密度で 24 well プレートに播種した。24 時間の培養後、2-2-4 に従って ANKFY1 siRNA を導入した。その後、CultureBoost-R を含まない 1% FBS 含有 Complete medium に培地交換した。6 時間インキュベートした後、P1000 ピペットチップを用いて Well の中央線上に存在する細胞を剥離した。PBS にて洗浄後、培地交換を行い、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X710) を用いてスクラッチした部分を撮影した。さらに 24 時間培養後、同様の箇所を撮影し、画像を取得した。1well あたり 4 ヶ所撮影し、細胞が存在しない場所の面積を測定した。

#### 2-2-7 細胞表面ビオチン化アッセイ

HRMEC は 2-2-4 に従って ANKFY1 siRNA を 24 時間トランスフェクションした。MgCl<sub>2</sub> 1mM、CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM を含む PBS (PBS/MgCl<sub>2</sub>/CaCl<sub>2</sub>) で細胞を洗浄し、0.5 mg/mL の EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo Fisher Scientific) を 4°C で 1 時間反応させた。その後、PBS/MgCl<sub>2</sub>/CaCl<sub>2</sub> に希釈した 50 mM グリシンを加えて 4°C で 3 分間反応させることでビオチン化反応を停止した。第 1 章 2-2-12 に従って作製した細胞溶解液を細胞へと添加し、4°C、12,000  $\times$  g で 20 分間遠心した。Dynabeads M-280 Streptavidin (Thermo Fisher Scientific) はビオチンとの反応前に、0.01% Tween-20 含有 PBS で 2 回洗浄したものを用いた。遠心後のサンプルの上清に Dynabeads M-280 Streptavidin を加えて、4°C で 3 時間反応させた。反応

後、磁石で分離した Dynabeads M-280 Streptavidin を細胞溶解液で3回洗浄した。その後、磁石で分離したサンプルを 3-Mercapto-1,2-propanediol を含む Sample buffer (x4) と混合して、100°C の熱湯で5分間煮沸し、2-2-16 に従ってウェスタンブロットによる解析を行った。

#### 2-2-8 管腔形成

HRMEC は管腔形成の試験を行う前に、CultureBoost-R を含まない 1% FBS 含有 complete classic medium で12時間培養した。Matrigel® GFR は96 well プレートに 50  $\mu$ L ずつ添加し、37°C で1時間インキュベートすることでゲル化した。細胞数  $1.0 \times 10^4$  の HRMEC をゲル上に播種し、6時間インキュベートすることで管腔を形成した。培養後、Calcein-AM (株式会社同仁化学研究所) で生細胞を染色し、明視野及び蛍光画像をオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X710) で撮影した。管腔形成の程度は、ImageJ Angiogenesis Analyzer プラグイン (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて、メッシュ数、分岐数、全管腔長を解析した。

#### 2-2-9 細胞免疫染色

2-2-4 に従って HRMEC に BCL6B siRNA を導入し、8 well チャンバースライド (SCS-N08、松波硝子工業株式会社) で培養し、コンフルエントになるまで毎日培地交換を行った。コンフルエントに達した HRMEC に対して、VEGF (10 ng/mL) を添加して、さらに 24 時間インキュベートした。CaCl<sub>2</sub> (0.2 mM) 及び MgCl<sub>2</sub> (2.0 mM) を含む PBS (PBS c/m) を用いて、培養細胞を洗浄した。PBS c/m に溶解した 4% PFA を用いて、室温で 10 分間固定した。PBS c/m で洗浄後、0.3% Triton X-100 を含む PBS c/m を用いて、室温にて 5 分間の細胞透過性処理を行った。5% horse serum 含有 PBS c/m にて 1 時間ブロッキングを行った。ブロッ

キング後、5% horse serum に希釈した rabbit anti-VE-Cadherin antibody (1:250; Abcam, Cambridge, UK) を用いて 4°C で一晩反応させた。二次抗体は 5% horse serum に希釈し、室温にて 1 時間反応させた。核染色は、Hoechst 33342 (1:1000) を用いて行った。二次抗体には Alexa Fluor® 546-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:1000; Thermo Fisher Scientific) を用いた。ProLong (Thermo Fisher Scientific) にて封入後、レーザー走査型共焦点蛍光顕微鏡 (FV3000; オリンパス株式会社) にて撮影を行った。VE-Cadherin シグナル輝度値の解析には ImageJ を用いた。

#### 2-2-10 カニクイザルレーザー誘発脈絡膜血管新生モデル

ミドリン®P 点眼液を点眼して散瞳していることを確認した後、ケタミン及びキシラジンの混合液 7:1 を筋肉内投与 (0.2 mL/kg) して麻酔を導入した。コンタクトレンズ (セントラリスダイレクト: Volk Optical Inc.) の接眼部にスコピゾル眼科用液 (千寿製薬株式会社、Osaka, Japan) を適量滴下することで接眼した。レーザー照射は、マルチカラーレーザー光凝固装置 (MC-500, 株式会社ニデック) を用いて、中心窩を避けた黄斑周囲に 8 ヶ所照射した。レーザーの照射条件は、緑色レーザー波長 532 nm、照射スポットサイズ 80 µm、照射時間 0.1 s、出力 1000 mW とした。レーザー照射後はクラビット®点眼液 0.5%を照射翌日より 1 日 1 回、3 日間投与した。

#### 2-2-11 カニクイザルを用いた光干渉断層画像撮影及び硝子体内投与

カニクイザルの網膜層は、光干渉断層計 Spectralis OCT2 (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany) を用いて光干渉断層画像を取得した。BCL6B siRNA は、アテロコラーゲン (AteloGene® Systemic Use; KOKEN, Tokyo, Japan) を用いて硝子体内投与した。氷冷下で、BCL6B siRNA 200 µM 調製液を

AteloGene と 1:1 の割合で調製し、気泡を避けるためピペットを用いて穏やかに混合した。4°C、10,000 rpm、1 分間の条件で遠心して脱泡を行い、これを 100 µM 投与液とした。siRNA と AteloGene®の混合液は、レーザー照射 1 週間前、1 週間後及び 3 週間後、計 3 回の投与を行った。感染予防のため、硝子体内投与の 3 日前から毎日 1 回、クラビット®点眼液 0.5%を点眼投与した。作製した BCL6B siRNA はヒト及びサルに交差性があり、免疫原性回避のためメチル化修飾を施している。BCL6B siRNA の配列は以下の通りである。

BCL6B siRNA,

5'-ACACCAAAGUGCACUACCAAtt-3'(sense)

5'-UGGUAGUGCACUUUGGU(M)G(M)U(M)tt-3'(antisense)

#### 2-2-12 マウス網膜静脈閉塞症モデル

ケタミン (120 mg/kg) 及びキシラジン (6 mg/kg) の混合麻酔液を生理食塩液で 10 倍希釈したものを、大腿筋肉内へ投与 (10 mL/kg) することで麻酔を施し、光増感剤ローズベンガル (20 mg/kg) を尾静脈内に 0.15 mL 投与した。ローズベンガルは、特定波長の光照射後、光化学反応により産生された活性酸素、主に一重項酸素が血管内皮を障害、血小板主体の血栓を引き起こす光増感剤である。ローズベンガルを投与後、5 µL のミドリン®P 点眼液により散瞳させ、眼球の乾燥を予防するためにヒアレイン®点眼液 0.1%を施した。マウス眼底撮影装置 Micron IV (Phoenix Researchlabs, Pleasanton, CA, USA) にレーザー照射装置 (MERIDIANAG, ierigutstrasse, Switzerland) を装着し、マウス右眼の視神経乳頭から 3 乳頭径離れた静脈にレーザーを照射することで静脈を閉塞させた。ddY マウスに対して、静脈 1 本あたり 10-20 回レーザー照射 (波長: 532 nm、レーザー出力: 50 mW、照射時間: 5 s、スポットサイズ: 50 µm) を行った。C57BL/6J マ



ウスに対して、静脈 1 本あたり 20-30 回レーザー照射 (波長: 532 nm、レーザー出力: 130 mW、照射時間: 0.3 ms、スポットサイズ: 50  $\mu$ m) を行った。静脈は 1 眼につき 3 本閉塞させ、眼底画像によりレーザー照射した静脈が完全に閉塞していることを確認した。

#### 2-2-13 マウス網膜静脈閉塞症モデルに対する薬剤の硝子体内投与

硝子体内投与を行うために、34G のナノパスニードル (テルモ株式会社、Tokyo, Japan) を微細チューブの先に装着し、チューブ内に薬液を充填して、チューブの逆側にハミルトンシリンジを装着した投与針を準備した。siRNA は、Control siRNA (SIC-001; Sigma-Aldrich) または BCL6B siRNA を Invivofectamine 3.0 reagent と混合して 12.5  $\mu$ M としたものを投与した。抗 VEGF 抗体 [goat polyclonal anti-mouse VEGF164 antibody (Catalog # AF-493-NA)] は PBS に溶解して 200  $\mu$ g/mL に希釈したものをを用いた。本検討で使用した抗 VEGF 抗体は、HUVEC の増殖を濃度依存的に抑制し、中和活性を有することが報告されている。マウスはケタミン (120 mg/kg) 及びキシラジン (6 mg/kg) の混合麻酔液を生理食塩液で 10 倍希釈したものを大腿筋肉内へ投与 (10 mL/kg) することで麻酔を施し、角膜の縁をピンセットで持ち上げ、角膜輪部から後眼部側に針を刺し、siRNA 又は抗 VEGF 抗体を 2  $\mu$ L 投与した。炎症の予防としてクラビット®点眼液 0.5%を投与直後に 5  $\mu$ L 点眼した。BCL6B siRNA の配列は以下の通りである。

#### BCL6B siRNA

5'-GAGGACAAGCCCUAUAAAUt-3' (sense)

5'-AUUUAUAGGGCUUGUCCUCt-3' (antisense)

#### 2-2-14 リアルタイム RT-PCR 法による解析

#### 2-2-14-1 RNA 抽出

RNA 抽出には、NucleoSpin® RNA (タカラバイオ株式会社) を用いた。培養細胞からの RNA 抽出の際は、各 Well に 350  $\mu$ L の RA1 を加えて抽出した。マウス網膜からの RNA 抽出の際は、マウスを頸椎脱臼にて安楽死させ、摘出した眼球から網膜を単離した。単離した網膜は 1.5 mL チューブの中に入れ、液体窒素にて急速凍結した。サンプルは RNA 抽出まで -80  $^{\circ}$ C に保存した。網膜サンプルは、ホモジナイザー (マイクロテック・ニチオン株式会社) を用いて氷冷下で粉碎及び均一化した後、タンパク質除去用のシリカメンブランカラムに移し、11,000  $\times g$  で 1 分間遠心した。カラムを取り除き、ろ液に 350  $\mu$ L の 70% エタノールを加え、十分に混合した後、RNA 吸着用のシリカメンブランカラムに移し、11,000  $\times g$  で 30 秒間遠心した。新しいチューブにカラムを移し、350  $\mu$ L の脱塩用溶液 MDB buffer を加え、11,000  $\times g$  で 1 分間遠心した。その後、90  $\mu$ L の Reaction buffer for rDNase と 10  $\mu$ L rDNase の希釈溶液を加え、室温で 15 分間インキュベートした。200  $\mu$ L の Buffer RAW2 を加え、11,000  $\times g$  で 30 秒間遠心した。回収用チューブを交換し、700  $\mu$ L の Buffer RA3 を加え、11,000  $\times g$  で 30 秒間遠心した。さらに、回収用チューブを交換し、250  $\mu$ L の Buffer RA3 を加え、11,000  $\times g$  で 2 分間遠心した。最後に、RNA 溶液回収用のチューブにカラムをセットし、30-60  $\mu$ L の RNase-free H<sub>2</sub>O を加え、11,000  $\times g$  で 1 分間遠心し、RNA を抽出した。

#### 2-2-14-2 RNA 逆転写

RNA 濃度は Nano Vue Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB、Uppsala、Sweden) を用いて、260 nm 波長の分光測定から算出し、RNase-free H<sub>2</sub>O を加えて、各サンプルの RNA 濃度が等しくなるよう調製した。RNA 逆転写には Prime Script RT

reagent Kit (タカラバイオ株式会社) を用いた。抽出した 6.5  $\mu$ L の RNA に 2  $\mu$ L の 5 $\times$ Prime Script Buffer (for Real Time)、0.5  $\mu$ L の Prime Script RT Enzyme Mix I、0.5  $\mu$ L の Oligo dT Primer (50  $\mu$ M)、0.5  $\mu$ L の Random 6 mers (100  $\mu$ M) を加え、混合した。その後、Takara PCR Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Gradient (タカラバイオ株式会社) を用いて、37°C で 15 分間の逆転写反応、続いて 85°C で 5 秒間の逆転写酵素失活反応を行い、cDNA を作製した。

#### 2-2-14-3 リアルタイム RT-PCR 法

リアルタイム RT-PCR 法には、TB Green Premix Ex TaqII 又は TB Green Fast qPCR Mix (タカラバイオ株式会社) を用いた。SYBR<sup>®</sup> Premix EX TaqII (Tli RNaseH Plus) 10  $\mu$ L に各プライマー (0.2  $\mu$ M)、RNase-free H<sub>2</sub>O、cDNA 溶液を加え、全量を 20  $\mu$ L に調製した。その後、Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ株式会社) を用いて、95°C、30 秒間を 1 サイクル、95°C で 5 秒間、60°C で 30 秒間を 40 サイクルの PCR 反応を行った。使用したプライマーの配列を以下に示す。

##### *ANKFY1* (human)

Forward, 5'-AGCCTCAAAGATTCCCGAGACC-3'

Reverse, 5'-CGTCCTGAGTCCTGCTGACATT-3'

##### *BCL6B* (human)

Forward, 5'-CGGGAAGTGAATTTTTCAGC-3'

Reverse, 5'-TGGTAAGGCTTTTCCCCTGT-3'

##### $\beta$ -actin (human)

Forward, 5'-TCAAGATCATTGCTCCTCCTG-3'

Reverse, 5'-CTGCTTGCTGATCCACATCTG-3'

*Hes* (human)

Forward, 5'-ACGTGCGAGGGCGTTAATAC-3'

Reverse, 5'-GGGGTAGGTCATGGCATTGA-3'

*Hey2* (human)

Forward, 5'-AAGGCGTCGGGATCGGATAA-3'

Reverse, 5'-AGAGCGTGTGCGTCAAAGTAG-3'

*VEGFR1* (human)

Forward, 5'-CACCAAGAGCGACGTGTG-3'

Reverse, 5'-TTTTGGGTCTCTGTGCCAG-3'

*BCL6B* (mouse)

Forward, 5'-ATCTTCCTAAATGGAGGTGAGTTGTC-3'

Reverse, 5'-TTCGAACCCAGGCAAACC-3'

*GAPDH* (mouse)

Forward, 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'

Reverse, 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'

#### 2-2-15 組織学的評価

マウスを頸椎脱臼にて安楽死させ、マウス眼球を摘出した。その後、第 1 章 2-2-3 に従って組織切片の作製とヘマトキシリン・エオジン染色を行い、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X710) を使用して撮影した。平均 INL 厚は、視神経乳頭から鼻側・耳側に 480、720、960  $\mu\text{m}$  (計 6 ヶ所) の INL 厚を用いて算出した。

#### 2-2-16 ウェスタンブロット法

第 1 章 2-2-12 に従って、サンプルを調製し、ウェスタンブロット法による評

価を行った。培養細胞からタンパク質を抽出する際は、各 well に細胞溶解液を加えた。マウス網膜からタンパク質を抽出する際は、マウスを頸椎脱臼にて安楽死させ、摘出した眼球から網膜を単離した。単離した網膜は 1.5 mL チューブの中に入れ、液体窒素中で急速凍結した。サンプルはタンパク質抽出まで-80°C に保存した。

一次抗体には、rabbit anti-phospho-VEGFR2 Tyr1175 (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、rabbit anti-VEGFR2 (1:1000; Cell Signaling Technology)、rabbit anti-phospho-phospholipase C- $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) Tyr783 (1:1000; Cell Signaling Technology)、rabbit anti-PLC $\gamma$  (1:1000; Cell Signaling Technology)、rabbit anti-phospho-protein kinase B (Akt) Ser473 (1:1000; Cell Signaling Technology)、rabbit anti-Akt (1:1000; Cell Signaling Technology)、rabbit anti-phospho-endothelial nitric oxide synthase (eNOS) Ser1177 (1:1000; Cell Signaling Technology)、rabbit anti-eNOS (1:1000; Cell Signaling Technology)、rabbit anti-Bax (1:1000; Millipore)、rabbit anti-Bcl-2 (1:1000; Abcam)、mouse anti- $\beta$ -actin (1:2000; Sigma-Aldrich)、mouse anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (1:1000; Santa Cruz Biotechnology)、mouse anti-VEGF (1:200; Santa Cruz Biotechnology)、mouse anti-CBF1 (1:200; Santa Cruz Biotechnology)、mouse anti-NICD (1:1000; Cell Signaling Technology)、rabbit anti-neuron-gial antigen 2 (NG2) (1:1000; Abcam)、rabbit anti-VE-Cadherin (1:100; Abcam)、rabbit anti-claudin5 (1:1000; Thermo Fisher Scientific) antibody を用いた。二次抗体には、HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:1,000)、HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (1:1,000) を用いた。

## 2-2-17 マウス網膜の免疫染色

### 2-2-17-1 網膜組織の凍結切片作製

マウス眼球を摘出し、4% PFA 含有 0.1 M PB (pH 7.4) にて 48 時間 4°C で固定した。ついで、5、10、15、20% スクロース含有 0.1M PB (pH 7.4) 液にそれぞれ 4°C で 2 時間静置し、25%スクロース含有 0.1 M PB (pH 7.4) 液に 24 時間 4°C にて保存した。さらに、液体窒素を用いて O.C.T compound により凍結包埋し、薄切するまで -80°C にて保存した。クライオスタット (Leica Biosystems) を用いて、-20°C 中で厚さ 10  $\mu\text{m}$  の網膜切片を作製し、MAS コーティングされたカバーガラス (松波硝子工業株式会社) にのせ、免疫染色まで -80°C で保存した。

#### 2-2-17-2 網膜フラットマウントの作製

マウス尾静脈から 20 mg/mL の FITC-デキストラン (分子量: 2,000 kDa) を 0.5 mL 尾静脈内に投与した。眼球を摘出後、4% PFA 含有 0.1 M PB (pH 7.4) にて 10 分間 4°C で固定した。角膜・水晶体を含む前眼部を除去して、さらに 10 分間 4°C で固定した。組織固定後、4 か所の切り込みを入れたフラットマウントを作製し、免疫染色を行った。

#### 2-2-17-3 免疫染色

凍結切片及びフラットマウントは、0.3% Triton X-100 を含む M.O.M. blocking reagent (PBS: M.O.M. blocking reagent = 250  $\mu\text{L}$ : 9  $\mu\text{L}$ ) 又は 10% goat serum により 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、一次抗体を用いて 4°C で一晩反応させた。PBS で洗浄後、Hoechst 33342 (1:1,000) を用いて核染色を行った。染色後、fluoromount 又は ProLong (Thermo Fisher Scientific) 及びカバーガラスを用いて封入した後、レーザー走査型共焦点蛍光顕微鏡 (FV3000; オリンパス株式会社) 又はオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X710; 株式会社キーエンス) にて撮影を行った。輝度解析では、視神経から 500  $\mu\text{m}$  の位置を撮影後、ImageJ を用いて網膜内顆粒

層における GS の蛍光輝度を解析した。

一次抗体には、rabbit anti-BCL6B (1:50; 株式会社免疫生物研究所、Gunma、Japan)、rat anti-CD31 (1:50; BD Pharmingen、San Diego、CA、USA)、mouse anti-glutamine synthetase (GS) antibody (1:100; Millipore) を用いた。また、血管の標識には、Alexa Fluor™ 594-conjugated Griffonia simplicifolia isolectin B4 (1:50; Thermo Fisher Scientific) を用いた。二次抗体には Alexa Fluor® 647-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:1000; Thermo Fisher Scientific)、Alexa Fluor® 488-conjugated donkey anti-rat IgG (1:1000; Thermo Fisher Scientific)、Alexa Fluor® 546-conjugated goat anti-mouse IgG (1:1000; Thermo Fisher Scientific) を用いた。マウス由来一次抗体を用いる際、M.O.M. protein concentrate (PBS: M.O.M. protein concentrate = 250 µL: 20 µL) を用いて、一次抗体及び二次抗体を希釈した。

### 2-3 統計学的解析

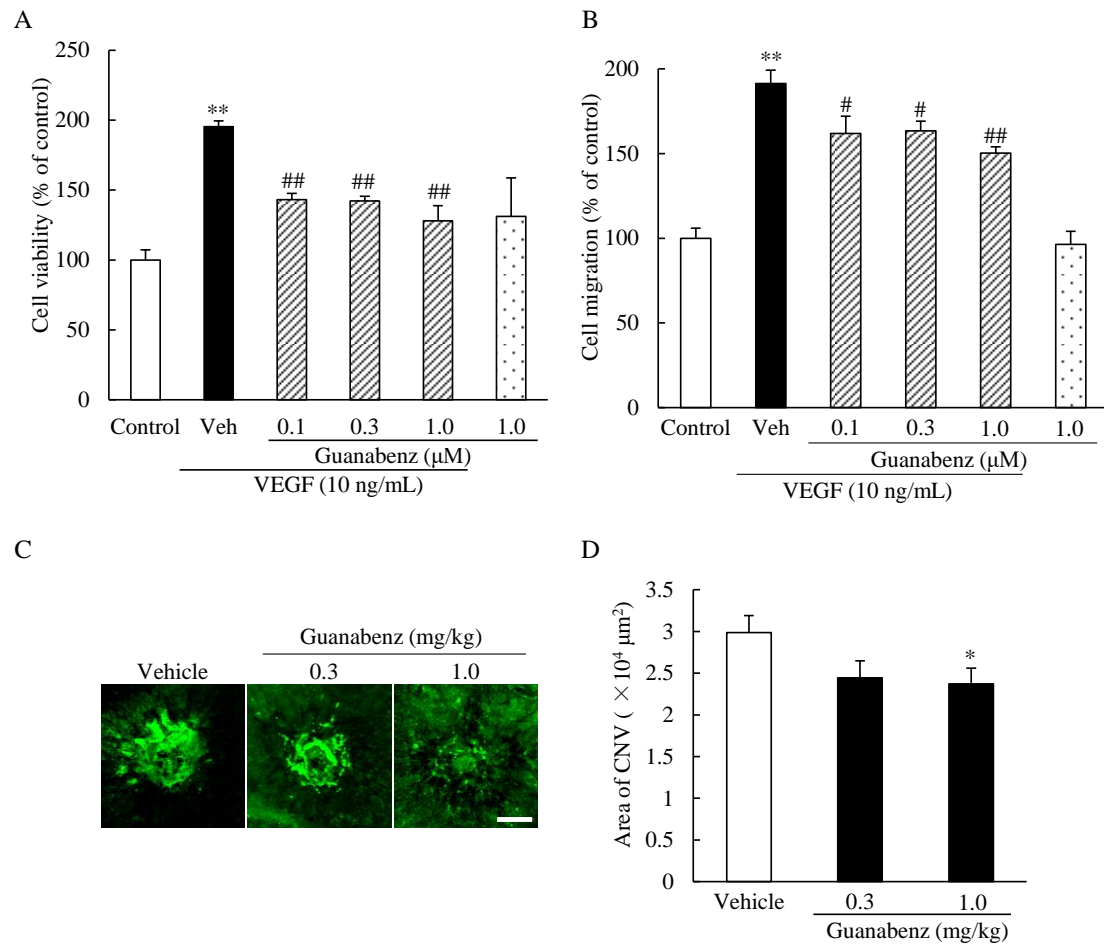
実験成績は平均値±標準誤差 (standard error of the mean: SEM) で示した。統計学的な比較は、Statistical Package for the Social Science 15.0 J for Windows software (IBM) を用いて行った。2 群間の比較は、Student's *t*-test または Welch's *t*-test を行った。多群間の比較では、one-way analysis of variance (ANOVA) 後に Games-Howell's test、Dunnett's test または Tukey's test を行った。危険率が 5%未満を有意差有りとした。

### 第3節 実験成績

#### 3-1 眼血管新生における血管内皮細胞の増殖及び遊走

網脈絡膜血管新生における血管内皮細胞の役割を明らかにするため、ヒト網膜毛細血管内皮細胞 HRMEC を用いて VEGF に対する反応性を検討した。VEGF 添加により、HRMEC の生存性は約 2 倍に増加した (Fig. 14A)。スクラッチアッセイにより細胞遊走能を解析したところ、VEGF により細胞遊走が約 1.9 倍に増加した (Fig. 14B)。つぎに、眼血管病変の一つである脈絡膜血管新生と類似した病態を示すレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルを作製した。新生血管は FITC-デキストランにより標識した。レーザー照射から 14 日後、脈絡膜からの血管新生が認められた (Fig. 14C, D)。同モデルにおいて高血圧症治療剤であるグアナベンズがラットの脈絡膜血管新生を抑制することから (91)、本検討では陽性対照薬として使用した。グアナベンズは VEGF 誘発 HRMEC 増殖及び遊走に対して抑制作用を示した (Fig. 14A, B)。また、レーザー照射によるモデル作製日からサンプリングまで、1 日 2 回グアナベンズ (0.3、1.0 mg/kg) を腹腔内投与したところ、溶媒投与群と比較してグアナベンズ (1.0 mg/kg) 投与群は脈絡膜血管新生面積の減少が認められた (Fig. 14C, D)。以上より、眼血管内皮細胞の増殖及び遊走が、血管新生の制御に重要であることが示唆された。



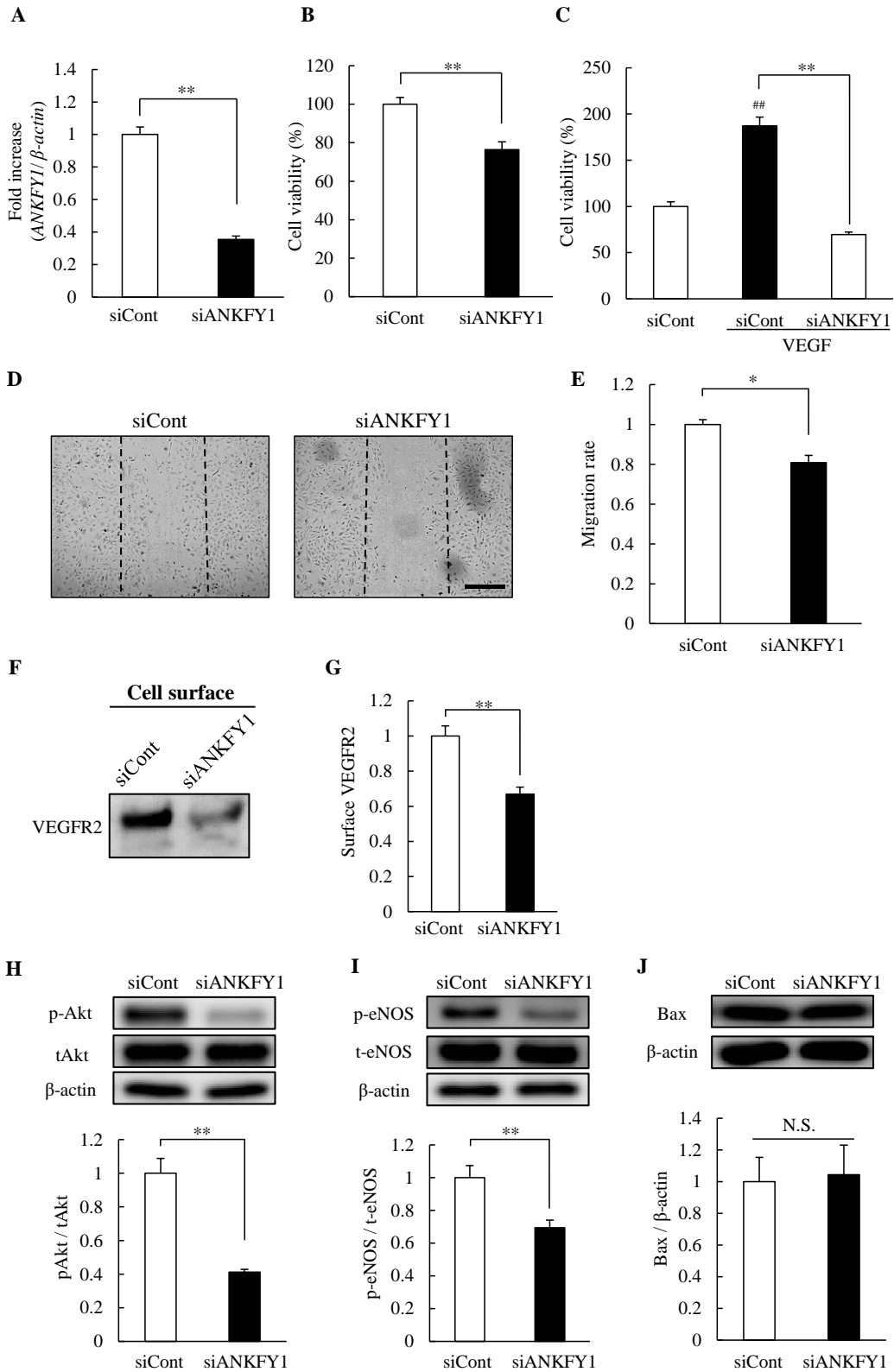


**Fig. 14 Role of retinal endothelial cell growth and migration in the choroidal neovascularization (CNV) formation.**

(A) Quantitative analysis of the CCK-8 assay. Following starvation for 24 h, HRMEC were treated with guanabenz for 1 h. Data are shown as means  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). \*\*,  $p < 0.05$  vs. Control (two-tailed Student's  $t$ -test); ##,  $p < 0.01$  vs. Vehicle (two-tailed Dunnett's test). (B) Quantitative analysis of the scratch assay. Following the starvation for 6 h, HRMEC were scratched and treated with guanabenz. Cells were incubated for 1 h and then stimulated with 10 ng/mL VEGF for 24 h. The migrated cells were counted. Data are shown as means  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). \*\*,  $p < 0.05$  vs. Control (two-tailed Student's  $t$ -test); #,  $p < 0.05$  vs. Vehicle; ##,  $p < 0.01$  vs. Vehicle (two-tailed Dunnett's test). (C) Guanabenz were injected intraperitoneally (2 times/day), and mice were subsequently subjected to laser irradiation. CNV lesions (green) were visualized with FITC-dextran (MW = 2,000 kDa) perfusion 14 days after the laser irradiation. Scale bar = 100  $\mu$ m. (D) Quantitative analysis of choroidal lesions with guanabenz (0.3 or 1.0 mg/kg) administration. Data are shown as means  $\pm$  SEM ( $n = 9-11$ ). \*,  $p < 0.05$  vs. Vehicle (one-tailed Dunnett's test).

### 3-2 BTB タンパク質 ANKFY1 の眼血管内皮細胞における役割

ANKFY1 は BTB ドメインを有する BTB タンパク質であり、タンパク質の細胞内輸送に関わる因子として知られる (92)。また、先行研究において ANKFY1 は HUVEC における血管新生を制御することが報告されている (85)。そこで、眼血管内皮細胞を用いて BTB タンパク質 ANKFY1 の役割を検討した。ANKFY1 のノックダウンにより、HRMEC の細胞生存性は 8 割程度に減少した (Fig. 15A, B)。つぎに、VEGF 誘発細胞増殖に対する ANKFY1 ノックダウンの影響を検討した。VEGF (10 ng/mL) 添加 48 時間後の HRMEC において、細胞生存性が約 1.9 倍に増加した。一方、ANKFY1 siRNA は Control siRNA 群と同程度まで細胞生存性の増加を抑制した (Fig. 15C)。ANKFY1 siRNA 処置後の HRMEC において細胞遊走能を検討したところ、Control siRNA 処置群と比較して ANKFY1 ノックダウンは細胞遊走率を約 2 割低下させた (Fig. 15D, E)。つぎに、細胞膜上に存在する VEGFR2 発現量を検討した。ビオチン標識により回収した細胞膜タンパク質をウエスタンブロットにより解析したところ、対照群と比較して、ANKFY1 をノックダウンした HRMEC では、細胞膜上の VEGFR2 発現量が約 3 割減少した (Fig. 15F, G)。さらに、ANKFY1 siRNA 処置後の血管新生関連タンパク質の変動を検討した。VEGFR2 の細胞内シグナルである Akt や eNOS のリン酸化は、対照群と比べてそれぞれ約 4 割、約 7 割に低下した (Fig. 15H, I)。一方、アポトーシス調節因子である Bax の発現量は変化しなかった (Fig. 15J)。



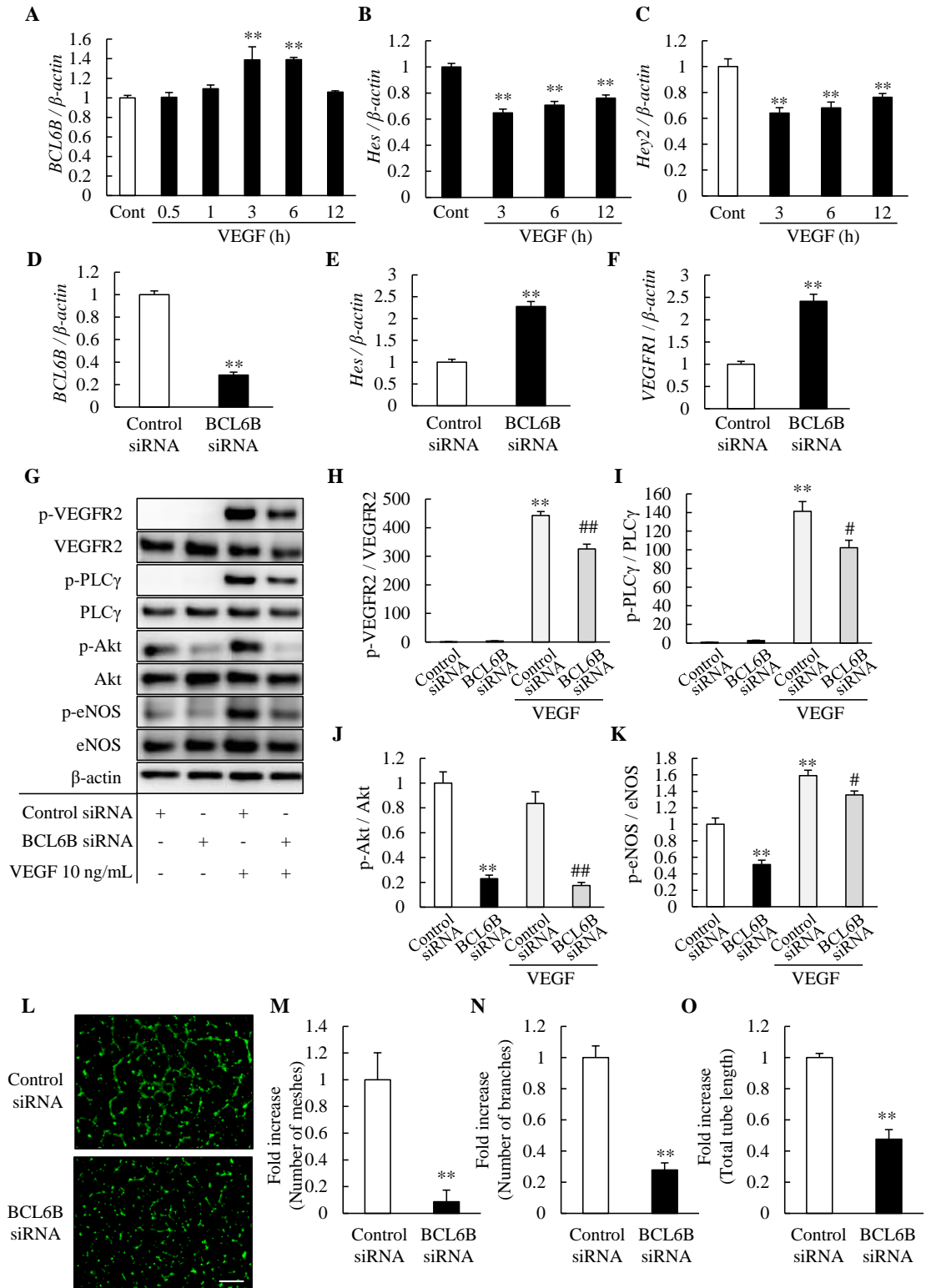
Continued on the next page.

**Fig. 15 ANKFY1 knockdown suppressed HRMEC proliferation and migration.**

(A) RT-PCR analysis of ANKFY1. Data are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 5). \*\*,  $p < 0.01$  versus siCont (Student's  $t$ -test). (B) HRMEC proliferation ratio was decreased in ANKFY1 knockdown cells, compared to control siRNA transfected cells. Data are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 6). \*\*,  $p < 0.01$  versus siCont (Student's  $t$ -test). (C) Knockdown of ANKFY1 reduced VEGF-induced cell proliferation of HRMEC. Data are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 6). ##,  $p < 0.01$  versus siCont; \*\*,  $p < 0.01$  versus VEGF-treated siCont (Tukey's test). (D-E) Effects of ANKFY1 knockdown on HRMEC migration. HRMEC transfected with siCont or siANKFY1 were scratched with a pipette tip and incubated for 24 hours. Images were captured at 0 and 24 hours after scratching. Scale bar = 500  $\mu$ m. (D) Representative images of HRMEC from the scratch assay treated with siCont or siANKFY1. (E) Quantitative analysis of (D). Data are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 3). \*,  $p < 0.05$  versus siCont (Student's  $t$ -test). VEGF, vascular endothelial growth factor; siCont, control siRNA; siANKFY1, ANKFY1 siRNA. (F) Cell surface proteins were labelled with biotin, and pulled down by streptavidin-conjugated beads. Cell surface VEGFR2 was analyzed by Western blot with anti-VEGFR2. (G) Quantification of (F). Data are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 3). \*\*,  $p < 0.01$  versus siCont. (H-J) Western blot analysis of Akt (H), eNOS (I) and Bax (J) in HRMEC transfected with the indicated siRNAs. Data are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 5). \*\*,  $p < 0.01$  versus siCont; N.S., not significant (Student's  $t$ -test).

### 3-3 血管内皮細胞特異的に発現する BCL6B の血管新生抑制作用

BCL6Bは血管内皮細胞特異的な発現を認める BTB タンパク質であり (93)、血管新生の制御に重要な役割を担うことが推測される。VEGF 添加 3 時間後及び 6 時間後の HRMEC において、*BCL6B* messenger RNA (mRNA) の発現が増加した (Fig. 16A)。また、VEGF 添加 3、6、12 時間後の HRMEC において、Notch 標的遺伝子である *Hes*、*Hey2* mRNA 発現が低下した (Fig. 16B, C)。HRMEC に BCL6B siRNA を導入したところ、*BCL6B* mRNA の発現が 3 割程度に減少し、*Hes* mRNA 及び *VEGFR1* mRNA 発現が増加した (Fig. 16D-F)。つぎに、血管新生に対する作用を検討するために VEGFR2 とその下流シグナルである PLC $\gamma$ 、Akt、eNOS のリン酸化についてウエスタンブロットによる発現解析を行った。VEGF 刺激 5 分後の HRMEC では、VEGFR2、PLC $\gamma$  及び eNOS のリン酸化が亢進したが、BCL6B をノックダウンした HRMEC においては VEGF 刺激によるリン酸化亢進が有意に抑制した (Fig. 16G-K)。Akt は VEGF 刺激によるリン酸化亢進を認めなかったが、BCL6B ノックダウンによりリン酸化が抑制された (Fig. 16J)。さらに、BCL6B をノックダウンした HRMEC を用いて管腔形成評価を行ったところ、メッシュ数、分岐数、全管腔長が有意に減少した (Fig. 16L-O)。



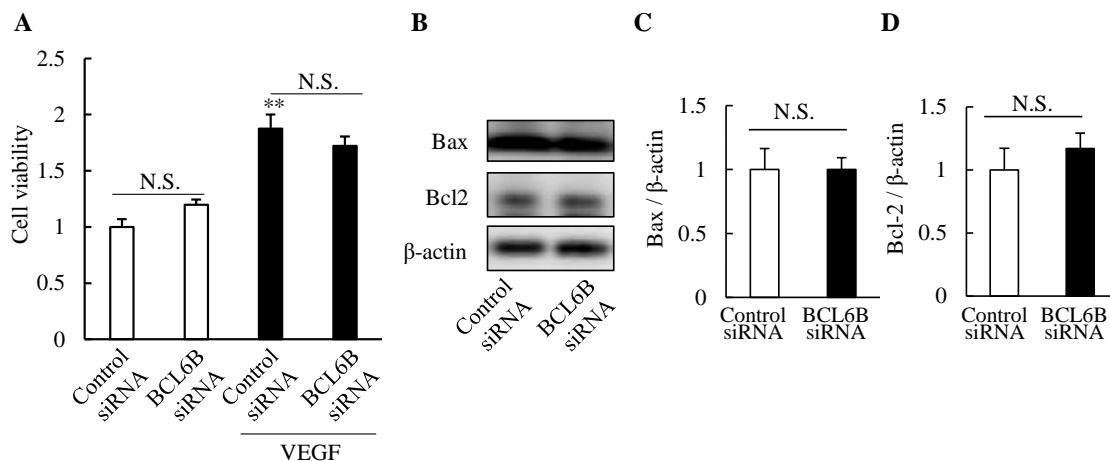
Continued on the next page.

**Fig. 16 BCL6B depletion suppressed the activation of retinal endothelial cells.**

(A-C) Retinal endothelial cells (HRMEC) were stimulated with VEGF (10 ng/mL). The mRNA expression of BCL6B (A) and Notch-related genes (B, C) were analyzed by RT-qPCR. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 6). \*\* $P$  < 0.01 vs. control (Dunnett's test). (D-F) HRMEC were transfected with BCL6B siRNA for 48 h. Graphs showing the relative expression of BCL6B (D), Hes (E) and VEGFR1 (F). Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 6). \*\* $P$  < 0.01 vs. control (Welch's  $t$ -test). (G-K) Downstream of VEGF-VEGFR2 signaling was analyzed by Western blot in HRMEC (G). HRMEC were stimulated with VEGF for 5 min. Phosphorylation of VEGFR2 (H), PLC $\gamma$  (I), Akt (J) and eNOS (K) was analyzed. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 6). \*\* $P$  < 0.01 vs. siCont group; # $P$  < 0.05, ## $P$  < 0.01 vs. VEGF-treated siCont group (Welch's  $t$ -test). (L-O) Representative images showing tube formation in HRMEC transfected with control or BCL6B siRNA (L). Six hours after seeding on the Matrigel GFR, living cells were stained with Calcein-AM. The number of meshes (M), number of branches (N) and total tube length (O) was measured by angiogenesis analyzer. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 5). \*\* $P$  < 0.01 vs. Control siRNA group (Student's  $t$ -test). Scale bar = 500  $\mu$ m.

### 3-4 BCL6B ノックダウンが細胞生存性に及ぼす影響

BCL6B 発現抑制による管腔形成の阻害が、細胞障害を介したものであるか否かを検討するために、WST-8 を用いた細胞内代謝活性について評価した。HRMEC における細胞生存性は BCL6B siRNA により変化しなかった。VEGF 添加 48 時間後の細胞生存性は約 1.9 倍に増加したが、VEGF 処置をした Control siRNA 群と VEGF 処置をした BCL6B siRNA 群の間に有意な差は認められなかった (Fig. 17A)。また、Bax や Bcl-2 などのアポトーシス関連因子の発現量は、BCL6B siRNA 処置により変化しなかった (Fig. 17B-D)。以上の結果は、BCL6B siRNA が細胞生存性に影響を及ぼさないことを示唆している。



**Fig. 17 BCL6B siRNA had no cytotoxicity in HRMEC.**

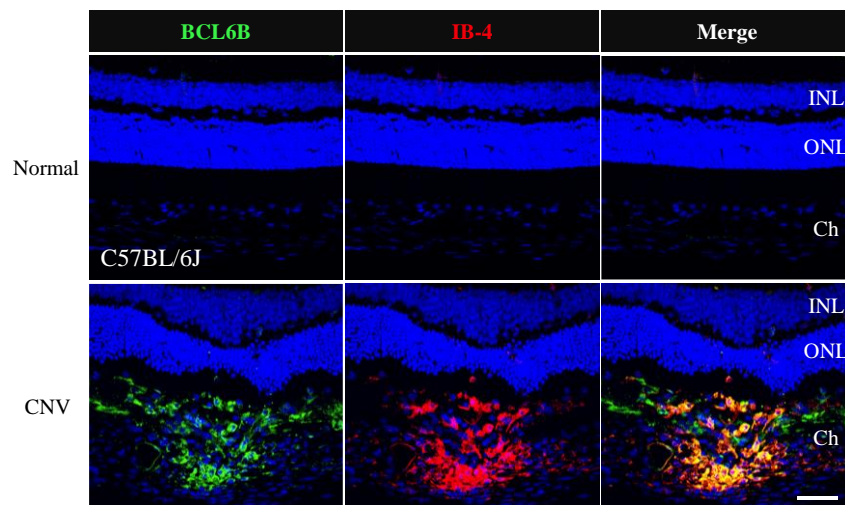
(A) Cell viability assay. HRMEC were transfected with BCL6B, and cell viability was analyzed at 48 h after VEGF treatment. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). \*\* $P < 0.05$  vs. Control siRNA group; N.S., not significant (Tukey's test). (B-D) Western blot analysis of apoptosis-related markers, Bax (C) and Bcl-2 (D), in HRMEC. BCL6B did not affect the expression levels of apoptotic markers. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). N.S., not significant (Student's  $t$ -test).



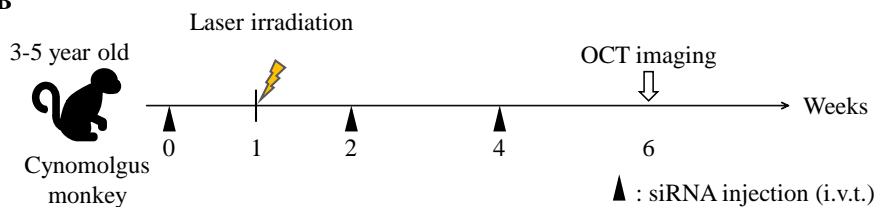
### 3-5 レーザー誘発脈絡膜血管新生モデルにおける BCL6B siRNA の作用

マウスレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルの網膜切片を用いて BCL6B の免疫染色を行った。脈絡膜からの新生血管の形成は、血管マーカである IB-4 により検出した。レーザー照射 3 日後の新生血管発生部における IB-4 発現は、BCL6B と共局在した (Fig. 18A)。つぎに、霊長類における BCL6B siRNA の抗血管新生作用を評価するため、カニクイザルを用いたレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルを作製した。本モデルに対して、BCL6B siRNA を 2 週間おきに 3 回投与した (Fig. 18B)。レーザーは siRNA の最初の投与から 1 週間後に照射した。レーザー照射から 5 週後、光干渉断層計を用いて脈絡膜血管新生を評価した。本試験においては、霊長類に対する免疫反応の軽減を目的に、アテロコラーゲンを用いた核酸投与を行った。アテロコラーゲンは、抗原性の原因となるテロペプチドを除去して精製したコラーゲンであり、その低抗原性から医療用にも用いられている。アテロコラーゲンは、siRNA と複合体を形成することでリポフェクション法と同等の核酸導入が可能であり、マウス脈絡膜血管新生モデルにおける siRNA の作用も既に実証されている (94, 95)。光干渉断層計によって得られた画像を基に脈絡膜血管新生の丈を解析したところ、Control siRNA 投与群と比較して、BCL6B siRNA の投与は脈絡膜血管新生の厚みを有意に抑制した (Fig. 18C, D)。

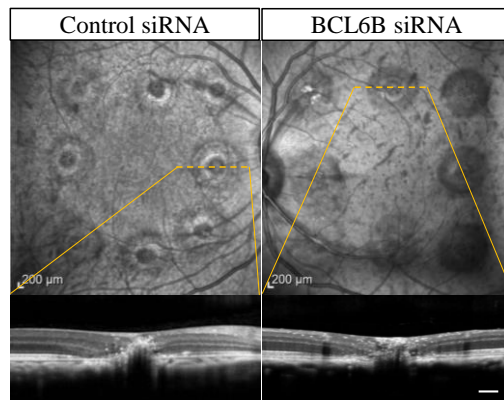
A



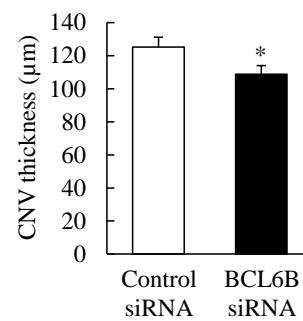
B



C



D

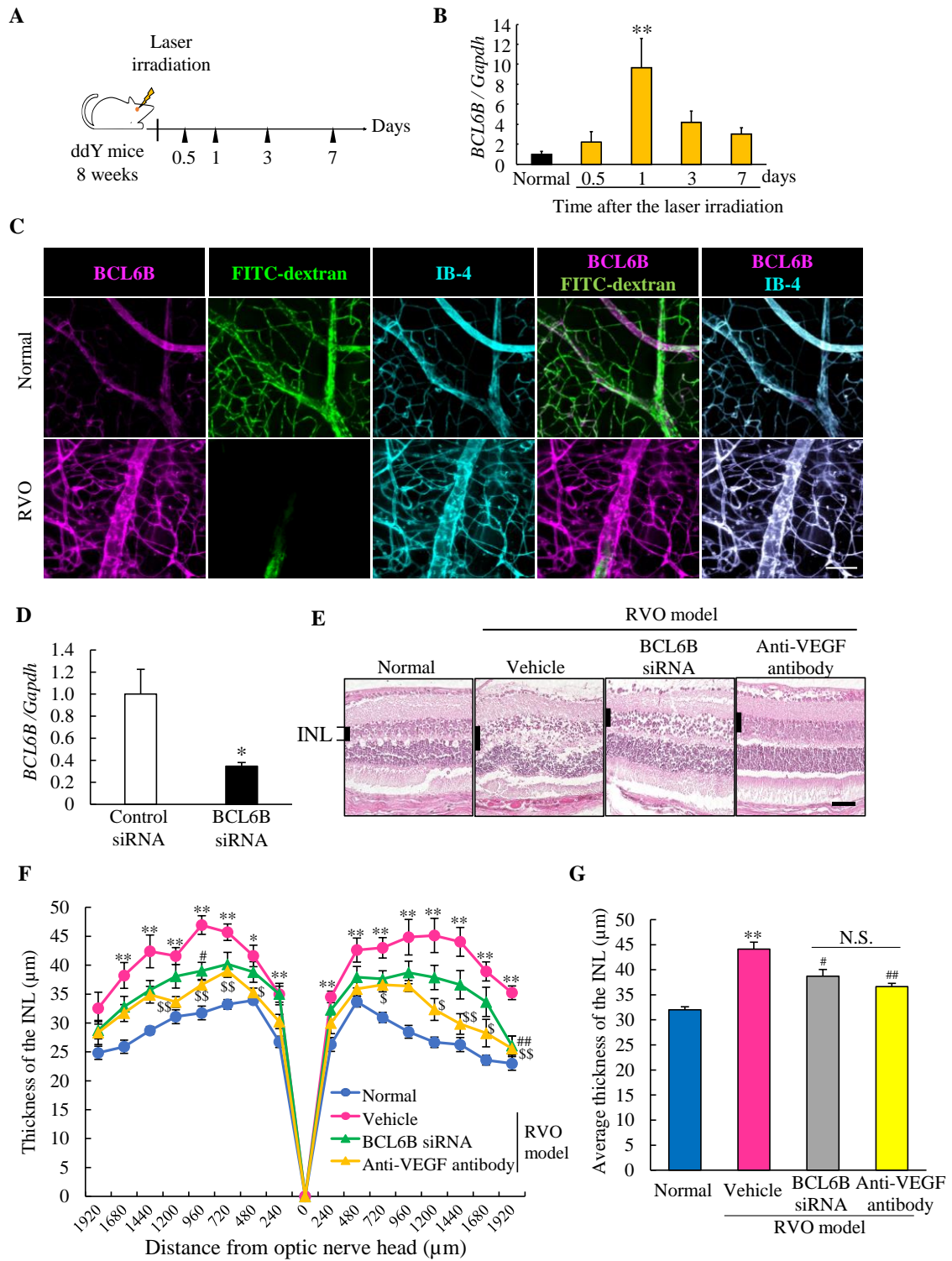


**Fig. 18 BCL6B siRNA suppressed CNV lesion in cynomolgus monkey.**

(A) Immunofluorescent images of BCL6B (green) and endothelial cell marker (IB-4; red) in the retinas of normal and CNV model (C57BL/6J mice). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer; Ch, choroid. Scale bar = 50 μm. (B) Experimental design for the induction of the CNV model. Cynomolgus monkeys were subjected to BCL6B siRNA transfection (3 times/eye) using atelocollagen. Control or BCL6B siRNA were intravitreally injected three times per eye (black arrowheads). Laser photocoagulation was performed to induce laser burns. Finally, retinal images were captured using optical coherence tomography (OCT) device. (C) Representative images of OCT imaging with CNV at 5 weeks after laser irradiation. Scale bar = 200 μm. (D) Quantitative data shows the thickness of the CNV. Data are shown as the mean ± SEM (n = 24). #*P* < 0.05 vs. Control siRNA group (Student's *t*-test).

### 3-6 網膜浮腫形成における BCL6B の役割

網膜虚血に起因した網膜内浮腫を生じるマウス網膜静脈閉塞症モデルを用いて、網膜浮腫形成における BCL6B の役割を検討した。マウス網膜静脈閉塞症モデルの網膜において、レーザー照射から 1 日後に *BCL6B* mRNA の発現量がピークに達し、正常群と比べて約 10 倍に増加した (Fig. 19A, B)。つぎに、網膜フラットマウントを用いた BCL6B の免疫染色を行った。全血管領域は IB-4、血流のある血管領域は FITC-デキストランの灌流により標識した。正常網膜において、BCL6B 発現は網膜血管と共局在を示した (Fig. 19C)。正常マウスと比較して、マウス網膜静脈閉塞症モデルで BCL6B の発現増大を認め、とくに無灌流領域で著明に増加することが明らかになった (Fig. 19C)。正常マウスに BCL6B siRNA を硝子体内投与したところ、網膜における *BCL6B* mRNA 発現量が低下した (Fig. 19D)。BCL6B siRNA の硝子体内投与は、溶媒投与群と比較して網膜内顆粒層の肥厚化を抑制し、その作用は抗 VEGF 抗体と同程度であった (Fig. 19E-G)。



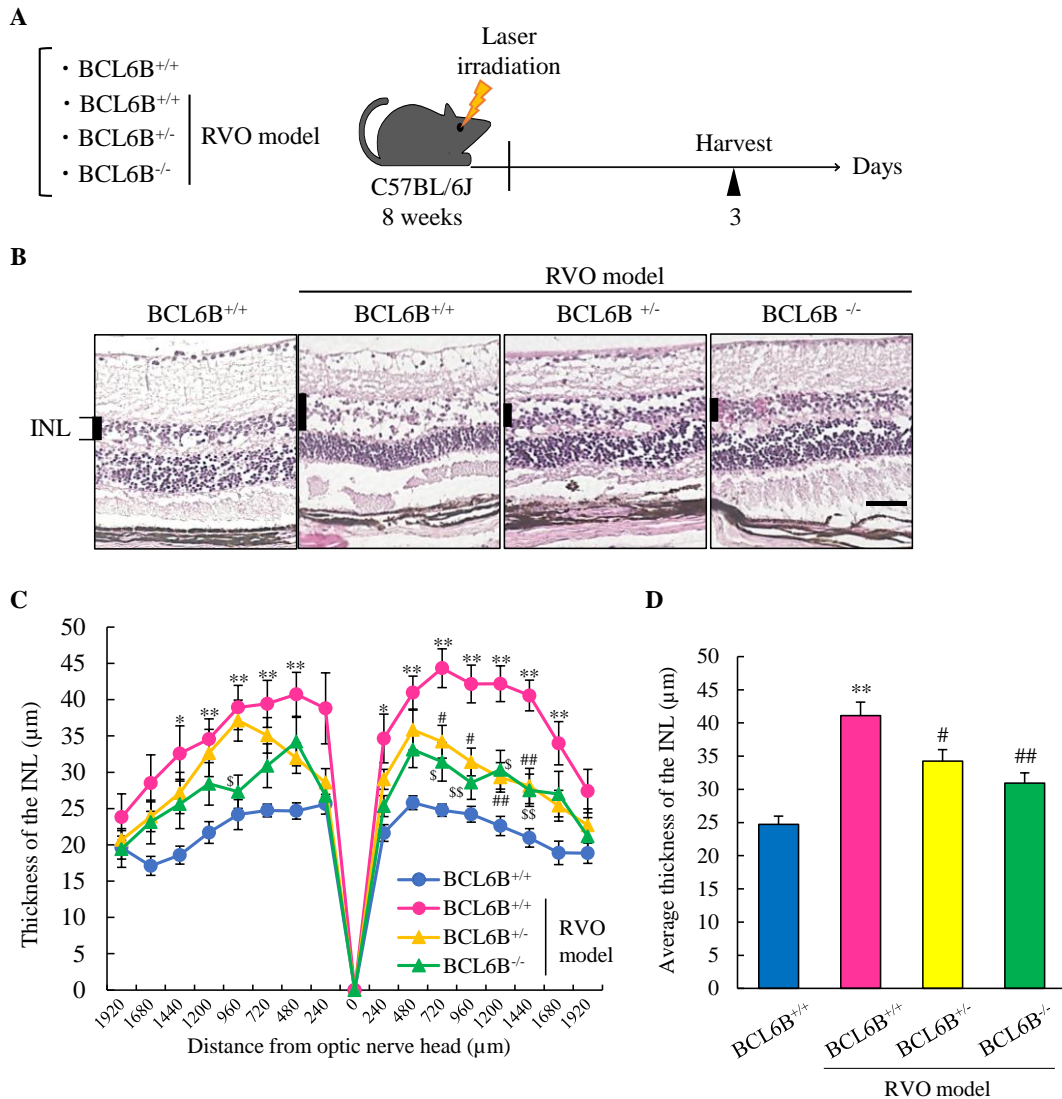
Continued on the next page.

**Fig. 19 BCL6B suppression attenuated the retinal edema in mice.**

(A, B) After laser irradiation, retinal samples were harvested at 12 h, 1, 3, 7 days after laser irradiation. Relative expression of *BCL6B* mRNA was analyzed by RT-qPCR. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 4-5). \*\* $P < 0.01$  vs. Normal group (Dunnett's test). (C) Fluorescent images of *BCL6B* (magenta) in flat-mounted retinas. The vascular endothelial cells were labeled with IB-4 (cyan), and the perfusion of retinal vessels were visualized with FITC-dextran (green). Scale bar = 100  $\mu$ m. (D) Retinal samples were collected to confirm the knockdown efficiency at 1 day after intravitreal injection of control siRNA or *BCL6B* siRNA (25  $\mu$ M/eye) using invivolectamine 3.0 reagent. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 4). \* $P < 0.05$  vs. control siRNA-treated group (Student's *t*-test). (E-G) Representative images of retinal sections with H&E staining at 1 day after laser irradiation. *BCL6B* siRNA (25  $\mu$ M/eye) and anti-VEGF antibody (250  $\mu$ g/mL/eye) was intravitreally injected just after the laser irradiation. Scale bar = 50  $\mu$ m (E). (F) Quantitative data shows the thickness of the INL. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 9-11). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Normal group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs. retinal vein occlusion (RVO)-vehicle treated group; \$ $P < 0.05$ , \$\$ $P < 0.01$  vs. RVO-vehicle treated group (Games-Howell's test). (G) Quantitative data shows the average thickness of the INL (480-960  $\mu$ m from the optic nerve head). Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 9-11). \*\* $P < 0.01$  vs. Normal group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs. RVO-vehicle treated group (Games-Howell's test).

### 3-7 網膜浮腫形成における BCL6B の役割

マウス網膜浮腫形成における BCL6B の役割を検討するため、BCL6B 欠損マウスを用いて網膜静脈閉塞症モデルを作製し、網膜層の変化を解析した (Fig. 20A)。BCL6B 欠損マウスは野生型と比較して、体重やその生存に大きな変化が認められない (90)。本モデルは、血管閉塞 3 日後に網膜浮腫がピークとなることから (96)、血管閉塞 3 日後の網膜組織を評価した。BCL6B<sup>+/+</sup>マウス群の網膜内顆粒層は約 1.7 倍に肥厚したが、BCL6B<sup>+/-</sup>及び BCL6B<sup>-/-</sup>マウスでは肥厚化が有意に抑制された (Fig. 20B-D)。



Continued on the next page.

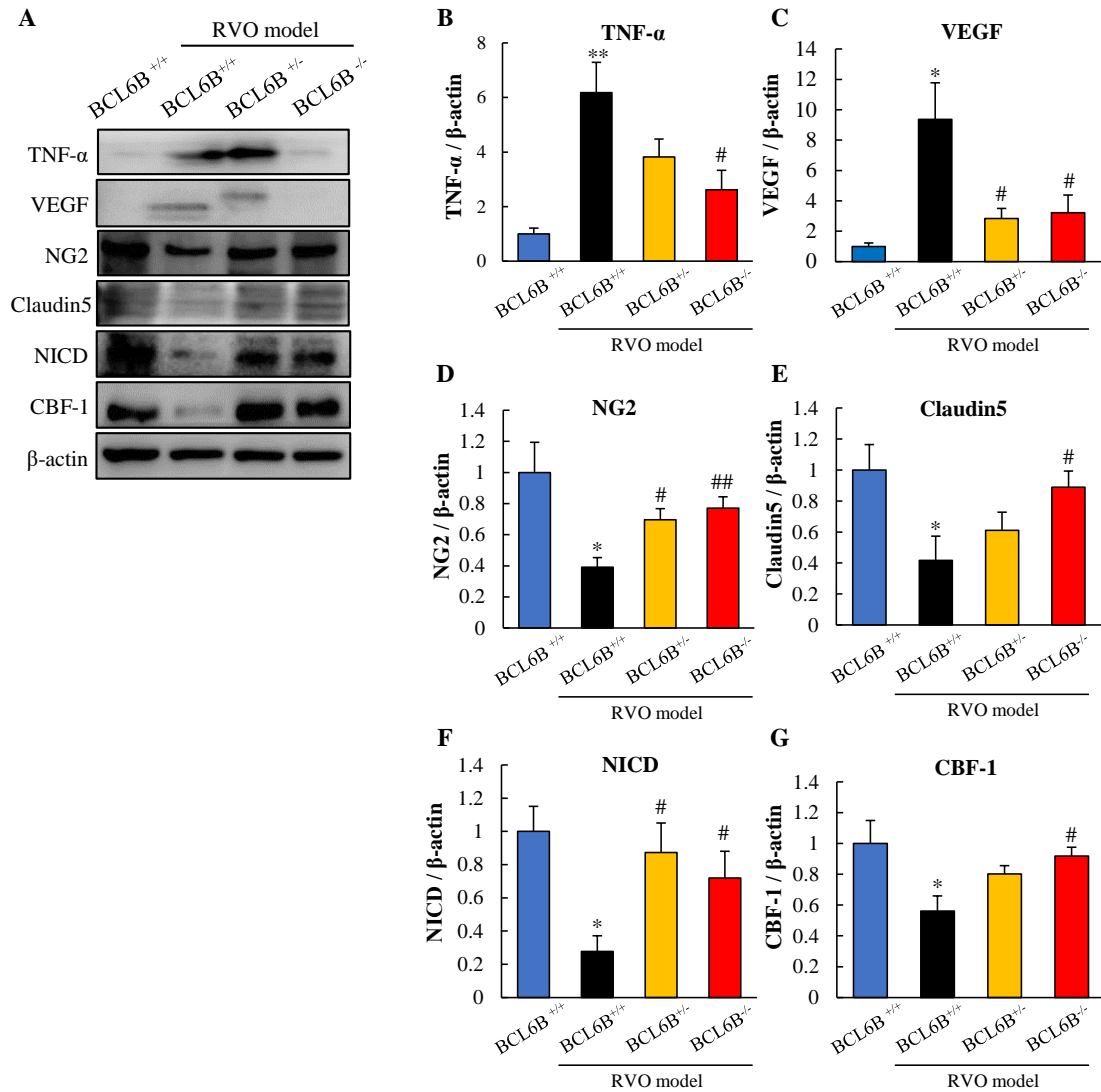
**Fig. 20 Retinal edema was attenuated in BCL6B<sup>-/-</sup> mice.**

(A) Experimental design for the induction of RVO model. Three days after laser irradiation, eyecups were collected for histological analysis. Adult eight-week-old male and female mice were used. (B-D) H&E staining of retina in BCL6B<sup>+/+</sup>, and RVO model of BCL6B<sup>+/+</sup>, BCL6B<sup>+/-</sup>, BCL6B<sup>-/-</sup>. Scale bar = 50  $\mu$ m (B). (C) Quantitative data shows the thickness of the INL. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 7-11). \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 vs. BCL6B<sup>+/+</sup> mice; #*P* < 0.05, ###*P* < 0.01 vs. RVO-BCL6B<sup>+/+</sup> mice; \$*P* < 0.05, \$\$*P* < 0.01 vs. RVO-BCL6B<sup>+/+</sup> mice (Games-Howell's test). (D) Quantitative data shows the average thickness of the INL (480-960  $\mu$ m from the optic nerve head). Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 7-11). \*\**P* < 0.01 vs. BCL6B<sup>+/+</sup> mice; #*P* < 0.05, ###*P* < 0.01 vs. RVO-BCL6B<sup>+/+</sup> mice (Games-Howell's test).

### 3-8 Inner BRB に対する BCL6B の役割

血管内皮細胞やペリサイトから構成される inner BRB は網膜内恒常性の維持に寄与しているため、その破綻は血管透過性亢進や網膜浮腫の形成に繋がる (97-99)。網膜における虚血状態は、TNF- $\alpha$  や VEGF などの発現上昇を介して、inner BRB を破綻させることが知られている (100)。血管閉塞 3 日後の BCL6B<sup>+/+</sup> マウスの網膜では、正常群 (BCL6B<sup>+/+</sup>) と比較して、TNF- $\alpha$  及び VEGF の発現量がそれぞれ約 6.2 倍、約 9.4 倍に増加した。一方、BCL6B<sup>+/-</sup> マウス及び BCL6B<sup>-/-</sup> マウスの網膜における VEGF 及び TNF- $\alpha$  の発現増加は抑制された (Fig. 21A-C)。網膜血管からのペリサイト剥離は、inner BRB の破綻の特徴の一つである (97, 99, 101)。血管閉塞 3 日後の BCL6B<sup>+/+</sup> マウス網膜において、ペリサイトマーカー (NG2) の発現量は 4 割程度に減少したが、BCL6B<sup>+/-</sup> マウス及び BCL6B<sup>-/-</sup> マウスでは、それらの発現低下が抑制された (Fig. 21A, D)。また、inner BRB における主要なタイトジャンクション構成因子である Claudin5 発現量は、血管閉塞後 4 割程度に低下したが、BCL6B<sup>+/-</sup> マウス及び BCL6B<sup>-/-</sup> マウスではそれらの発現低下が抑制された (Fig. 21A, E)。BCL6B は CBF1 を分解し、CBF1/NICD 複合体形成を阻害することが知られている (86)。血管閉塞 3 日後の BCL6B<sup>+/+</sup> マウス網膜において、正常群 (BCL6B<sup>+/+</sup>) と比較して NICD 及び CBF1 の発現量がそれぞれ 3 割、6 割程度に減少した。一方、BCL6B<sup>+/-</sup> マウス及び BCL6B<sup>-/-</sup> マウスでは NICD 及び CBF1 の発現低下が抑制された (Fig. 21A, F, G)。



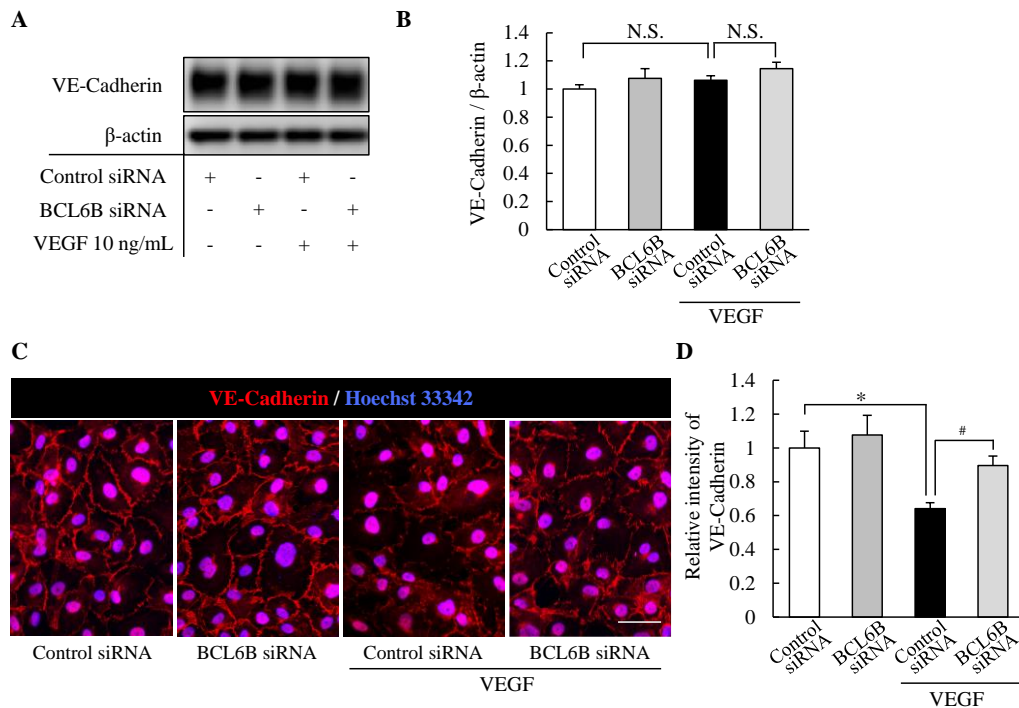


**Fig. 21 BCL6B deficiency suppressed the decrease of vascular permeability-related factors and tight junction-related factors in RVO model.**

(A) Representative blot images showing the expression of TNF- $\alpha$ , VEGF, NG2, Claudin5, NICD and CBF1 at 3 days after laser irradiation. (B-G) Quantitative analysis of TNF- $\alpha$  (B), VEGF (C), NG2 (D), Claudin5 (E), NICD (F) and CBF1 (G) normalized by  $\beta$ -actin. Data are shown as the mean  $\pm$  SEMs (n = 5-7). \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 vs. BCL6B<sup>+/+</sup> mice; # $P$  < 0.05, ## $P$  < 0.01 vs. RVO-BCL6B<sup>+/+</sup> mice (Welch's  $t$ -test).

### 3-9 網膜血管内皮細胞の VE-Cadherin 発現に対する BCL6B siRNA の作用

BCL6B が細胞接着因子 VE-Cadherin の発現量に及ぼす影響を検討するため、BCL6B をノックダウンした HRMEC についてウェスタンブロット及び免疫染色を行った。ウェスタンブロットの結果、可溶化画分 (タンパク質抽出液) における VE-Cadherin 発現量は VEGF 及び BCL6B siRNA 処置による変動を認めなかった (Fig. 22A, B)。一方、免疫染色により検出される VE-Cadherin の蛍光シグナルは VEGF 処置により低下したが、BCL6B siRNA はこの蛍光シグナル低下を抑制した (Fig. 22C, D)。



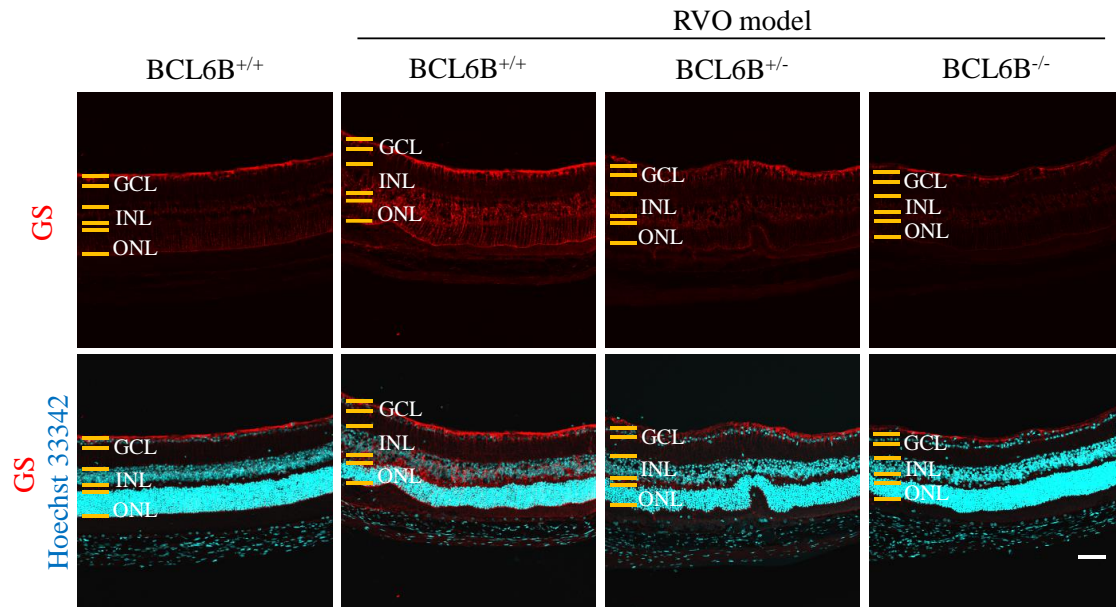
**Fig. 22 BCL6B mediated VEGF-induced disruption of cell adhesion in HRMEC.**

(A-B) Total cell lysate were analyzed by Western blotting. (A) Representative immunoblots of VE-Cadherin and  $\beta$ -actin. (B) Quantitative analysis showed that VEGF stimulation did not affect the expression level of BCL6B in HRMEC. BCL6B knockdown also had no effects on VE-Cadherin protein expression. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). N.S., not significant (Student's  $t$ -test). (C-D) Surface expression of VE-Cadherin was visualized by immunostaining. Cells were fixed at 24 h after VEGF stimulation. (C) Representative images of VE-Cadherin in HRMEC. Scale bar = 50  $\mu$ m. (D) Quantitative data showed relative intensity of VE-Cadherin was decreased by VEGF, in contrast, BCL6B knockdown suppressed the decrease of VE-Cadherin intensity levels. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$  vs. Control siRNA group; # $P < 0.05$  vs. VEGF-treated Control siRNA group (Student's  $t$ -test).

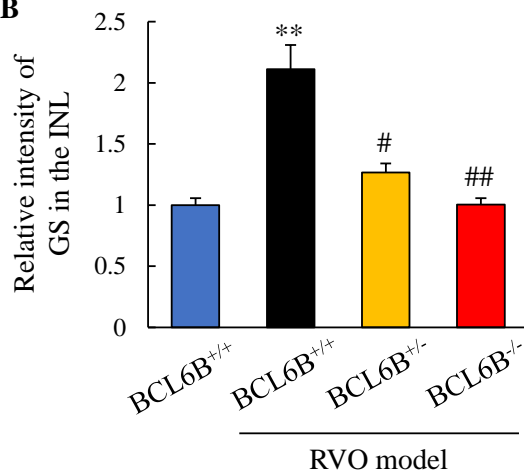
### 3-10 網膜ミュラー細胞活性化に対する BCL6B の役割

Inner BRB の構成細胞である網膜ミュラー細胞は、AQP4 (Aquaporin-4) を介して網膜組織内の水分調節を行う (102)。網膜における虚血はミュラー細胞からの VEGF 産生を促進し、同時に AQP4 発現量を低下させることで inner BRB の破綻を引き起こすと考えられている (103–107)。網膜血管閉塞 3 日後の BCL6B<sup>+/+</sup> マウスでは、網膜内顆粒層においてミュラー細胞マーカー (GS) のシグナル輝度が正常群と比較して 2 倍程度に増加した。一方、BCL6B<sup>+/-</sup> マウス及び BCL6B<sup>-/-</sup> マウスにおいては、正常マウスと同程度まで GS の蛍光輝度が抑制された (Fig. 23A, B)。

**A**



**B**



**Fig. 23 BCL6B deficiency suppressed the activation of Müller glia.**

(A) Immunofluorescent images of GS (red) in normal, and RVO model of BCL6B<sup>+/+</sup>, BCL6B<sup>+/-</sup>, BCL6B<sup>-/-</sup> mice. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). GS; marker for Müller glia. (B, C) The quantification of the fluorescent intensity for GS (B) in BCL6B<sup>+/+</sup>, RVO-BCL6B<sup>+/+</sup>, BCL6B<sup>+/-</sup> and BCL6B<sup>-/-</sup> mice are shown in A. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 4). \**P* < 0.05 vs. BCL6B<sup>+/+</sup> group; #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 vs. RVO-BCL6B<sup>+/+</sup> mice (Tukey's test). GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer. Scale bar = 50  $\mu$ m.

#### 第4節 考察

本章では、BTB タンパク質である BCL6B や ANKFY1 が異常血管新生発生に重要な因子であることを明らかにした。とくに、BCL6B は脈絡膜血管新生や網膜浮腫など失明に繋がる眼血管病変に関与しており、VEGF-Notch シグナルバランスの制御因子であることを解明した。

血管内皮細胞において VEGF の受容体である VEGFR2 の約 60%は細胞膜に局在し、VEGFR2 は細胞膜とエンドソーム間で Rab5 依存的に輸送される (108, 109)。また、静止状態の内皮細胞において、細胞膜上の VEGFR2 をシェディングから保護するために恒常的なエンドサイトーシス機構が働いていることが報告されている (108)。VEGFR2 のシェディングが亢進すると、血管内皮細胞は VEGF 結合ドメインを失い、VEGF による刺激が減弱する (110)。また、エンドサイトーシスの阻害は、VEGF 刺激による細胞内シグナルの減弱に繋がる (111)。したがって、血管内皮細胞における血管新生シグナル活性化には、細胞膜上における VEGFR2 受容体発現量と、VEGF 刺激に伴う VEGFR2 の適切なエンドサイトーシスが必須である (112)。重要なことに、HUVEC において内在化した VEGFR2 は ANKFY1 と共局在しており、ANKFY1 が VEGFR2 の輸送に重要な役割を果たしていることが示唆されている (113)。本研究の結果、ANKFY1 を発現抑制すると細胞膜上の VEGFR2 発現量が低下することを明らかにした (Fig. 15F, G)。想定される網膜血管内皮細胞における ANKFY1 の役割を図 24 に示す。ANKFY1 は HRMEC において、VEGFR2 のトラフィックキング (エンドサイトーシス、リサイクリング、分解) を制御している可能性がある。VEGFR2 の膜輸送の異常は、VEGFR2 の局在異常や分解を引き起こす可能性がある。PI3K 経路の下流シグナルである Akt の活性化は、血管内皮細胞の生存、増殖、血管新生に極めて重要な役割を担う (114)。したがって、ANKFY1 発現抑制による網膜内皮

細胞の血管新生抑制作用は、Akt/eNOS シグナルを介したものであると推測される。

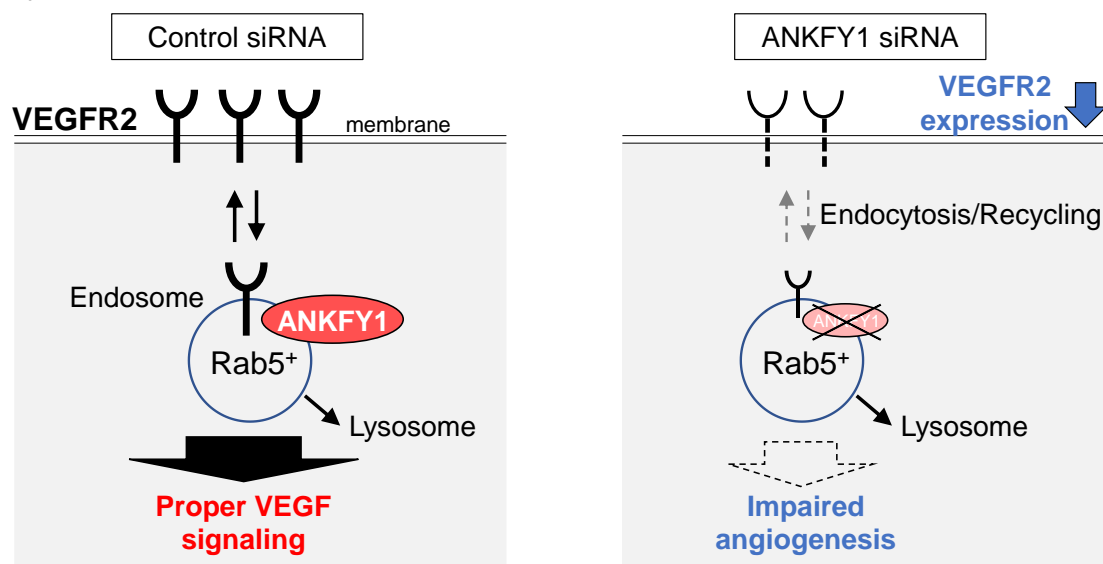


Fig. 24 The roles of ANKFY1 in retinal endothelial cells

網膜浮腫や異常血管新生は、視覚機能を脅かす眼血管病変の共通の特徴である。近年、血管バイオロジーにおける Notch シグナルの重要性が明らかになり (87–89)、VEGF-Notch シグナルのバランスは眼血管病変においても大きな影響を及ぼすことが推測される。網膜血管内皮細胞において、VEGF 刺激により BCL6B の発現が増加した (Fig. 16A)。血管内皮細胞表面では、VEGF によって VEGFR2 受容体が刺激されると、細胞内の血管新生関連シグナルや血管透過性が亢進する。リン酸化された VEGFR2 は、phospholipase C- $\gamma$  (PLC $\gamma$ )、protein kinase D (PKD)、Akt、p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) などの下流シグナルを活性化する (115–118)。先行研究において、BCL6B mRNA は VEGF/PKD2 依存的に安定化することが示されており、PKD2 の活性化はタンパク質シャペロン heat shock protein 90 beta (HSP90 $\beta$ ) を動員し、BCL6B mRNA の安定化を介して BCL6B 転写量を増加させる (93)。HRMEC においては VEGF 刺激

3時間後に *BCL6B* の発現が増加し、*Hes* や *Hey2* などの Notch 標的遺伝子は VEGF 刺激後 3-12 時間で減少した (Fig. 16A-C)。これらのデータは、VEGF 刺激に伴う *BCL6B* の発現誘導が網膜血管内皮細胞における Notch シグナルのサイレンシングに関与することを示唆している。逆に、*BCL6B* 発現を抑制すると、Notch シグナルが活性化し、VEGF 受容体である VEGFR1 発現量の増加や管腔形成の抑制作用に繋がったと考えられる。すなわち、VEGF/PKD2/HSP90 $\beta$  依存的な *BCL6B* mRNA の安定化が、Notch 標的遺伝子の転写を阻害し、血管新生優位な環境へと細胞状態を変化させている可能性がある。

VEGF 阻害は滲出型加齢黄斑変性患者の 78%で脈絡膜血管新生を退縮できないことが示唆されている (119)。また、眼内 VEGF の枯渇は、脈絡膜毛細血管板の変性やミューラー細胞死へと繋がる (79-81)。さらに、脈絡膜血管新生モデルにおいて、抗 VEGF 抗体投与は IgG 投与と比較して脈絡膜血管新生に関連した低酸素領域を増大し、網膜色素上皮細胞死やアポトーシスを促進する (82)。このように、過度な VEGF 枯渇は網膜恒常性の破綻に繋がることが示唆されている。そこで、抗 VEGF 療法とは異なるアプローチの一つとして、*BCL6B* を標的にした治療法を提案したい。*BCL6B* mRNA を標的とする siRNA は、本章で示した *in vitro* 管腔形成試験の結果からも脈絡膜血管新生を伴う滲出型加齢黄斑変性患者に対する有効な新規治療法の開発に繋がる可能性が考えられる。実際、非ヒト霊長類カニクイザル脈絡膜血管新生モデルにおいて、*BCL6B* siRNA の投与が脈絡膜新生血管の形成を抑制したことから (Fig. 18)、臨床応用が期待される。また、4週齢の *BCL6B* 欠損マウスにおいては *BCL6B*<sup>+/+</sup>マウスと比較して網膜内顆粒層厚に差がなく、安全性に対する懸念も低い。さらに、*BCL6B* 阻害は網膜浮腫と血管新生の両方を抑制した (Figs. 18-20)。これらのデータから、*BCL6B* 発現抑制は、抗 VEGF 薬による治療と異なり、網膜機能障害に影響を与えること

なく眼血管病変を治療できることが示唆された。

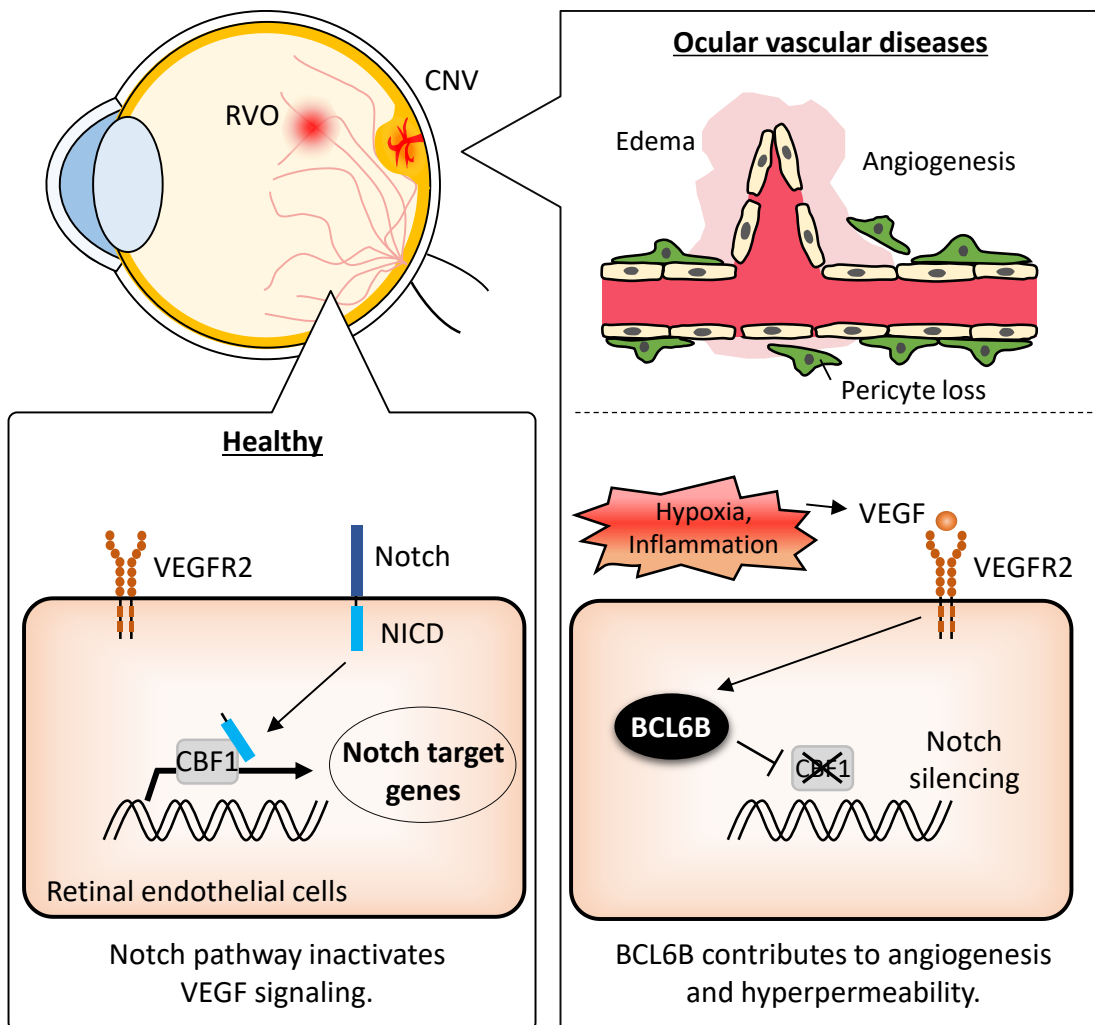
ペリサイトの消失とミューラーの活性化は、BRB の破綻の特徴である(97, 99, 101, 103, 107)。血管を取り巻くペリサイトが喪失すると、血管は漏出性の高い不安定な状態となり、網膜内や網膜下腔に浮腫と血液成分の蓄積を引き起こす(97-99, 101)。ペリサイトと内皮細胞の相互作用は、細胞接着因子である N-カドヘリンが担っている (120)。一方、Notch シグナルが不活性化されると血管内皮細胞の N-カドヘリンが減少し、ペリサイトとの相互作用が消失するため、血管バリア機能が低下する (121)。本章では、網膜静脈閉塞症モデルにおいて、ペリサイトの喪失及び Notch シグナルの不活性化が BCL6B 欠損によって阻害されることを明らかにした (Fig. 21)。以上のことから、網膜静脈閉塞症における網膜浮腫の形成には BCL6B 発現増加を介した Notch シグナルの不活性化と、それに続くペリサイトの剥離が関与することが分かった。そして、BCL6B 発現を抑制することで Notch シグナルを機能させ、BRB の機能を保持できる可能性を示した。

正常な状態では、ミューラー細胞は水チャネルである AQP4 を介して網膜組織中の水分量を制御している (102)。一方、ミューラー細胞は虚血病態下における VEGF 産生源であり、低酸素状態では浸透圧膨張や AQP4 の発現低下を認める (96, 100, 103, 107, 122)。そのため、ミューラー細胞特異的な VEGF 欠損は、網膜血管新生や糖尿病性網膜症などの網膜血管障害の抑制に繋がる (103, 123)。また、TNF- $\alpha$  や VEGF は、内皮細胞間に存在する Claudin-5 や VE-カドヘリンなどのバリア機能調節因子の膜局在低下や発現量減少を惹起し、BRB の破壊をもたらす (124, 125)。重要なことに、ミューラー細胞特異的 VEGF KO マウスでは、TNF- $\alpha$  産生及び nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) 活性化の減少により、炎症状態が緩和される (103)。本章においては、BCL6B 枯渇により虚血網膜における TNF- $\alpha$  や



VEGF の発現量低下が認められた (Fig. 21)。さらに、BCL6B 欠損マウスにおいて網膜静脈閉塞症モデルを作製すると、網膜内顆粒層におけるミューラー細胞マーカー (GS) の蛍光強度が野生型マウスと比較して著しく減少していた (Fig. 22)。これらのデータは、BCL6B の発現抑制が BRB を破綻させる炎症性サイトカインの産生阻害を介して、網膜浮腫を抑制することを示唆している。

本章の研究により、BCL6B は VEGF-Notch シグナルのバランス制御に重要な役割を有しており、網膜浮腫や異常血管新生を誘導する分子スイッチとして機能することが示唆された。想定される BCL6B の眼血管病変の病態形成機構を図 25 に示す。眼内で VEGF が増加すると BCL6B が誘導され、血管安定化作用を有する Notch シグナルを不活性化する。その結果、BRB が破綻し、ペリサイトの脱落や血管透過性の亢進、管腔形成などが惹起されると推測される。以上をまとめると、BCL6B siRNA が滲出型加齢黄斑変性や網膜静脈閉塞症といった視力低下を引き起こす眼血管疾患に対して、新しい治療戦略となる可能性が示された。網膜静脈閉塞症の特徴である網膜虚血は、難治性の血管新生緑内障を合併し得るが、未だ治療効果が十分ではない。そこで第 3 章では、網膜虚血疾患が原因で発生する血管新生緑内障の疾患モデル構築と、その病態解明を目的に検討を行った。

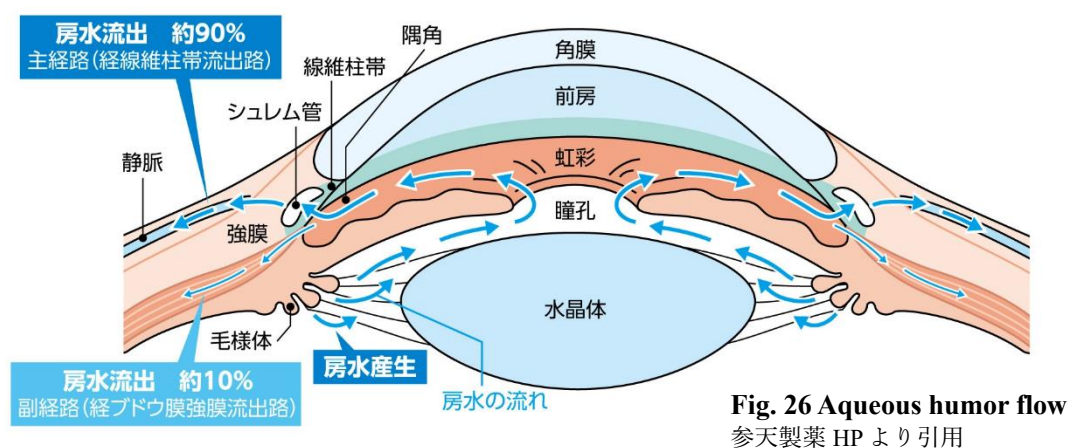


**Fig. 25** The roles of BCL6B in ocular vascular diseases

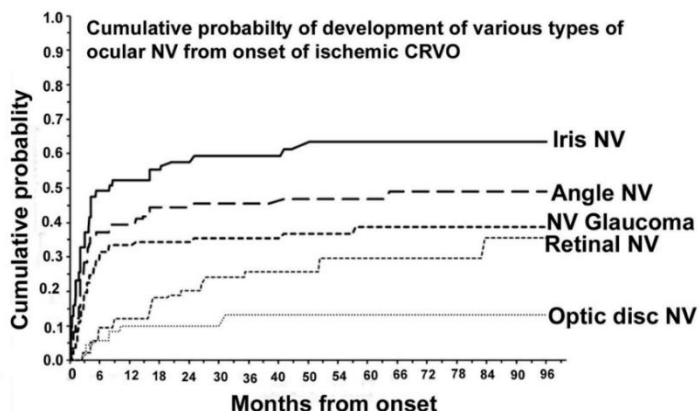
### 第3章 慢性網膜虚血が眼恒常性に及ぼす影響

#### 第1節 緒言

眼の恒常性維持機構の一つとして、眼内の内部圧である眼圧が一定に保持されることが挙げられる。毛様体から産生される房水は、虹彩や水晶体、角膜の間を循環し、産生と排出のバランスにより眼圧を制御している (126) (Fig. 26)。毛様体突起から産生された房水の大半は、後房から瞳孔縁を通過して前房へ移動し、隅角にある線維柱体を通過してシュレム管から静脈へ排出される (126)。したがって、房水流出路の障害は眼圧上昇に繋がり、視神経が圧迫されるため、放置すると視力障害に至る (127)。



血管新生緑内障は、眼虚血疾患に伴う重篤な緑内障疾患である。血管新生緑内障では、眼内へ栄養や酸素を供給する血管が詰まり眼内虚血が進行し、虹彩や隅角に新生血管が発生することで、眼圧を調整する眼房水の流出が阻害され、高眼圧を呈する。血管新生緑内障の原因疾患は、網膜中心静脈閉塞症 (36%) と増殖糖尿病網膜症 (32%) が大半を占める (128)。中でも、網膜中心静脈閉塞症は 100-day glaucoma とも呼ばれ、血管新生緑内障を合併する確立が高い (36, 129) (Fig. 27)。網膜における眼虚血状態が進行すると、過剰に産生された VEGF が硝子体を介して房水へと拡散する (130–132)。房水中に大量の VEGF が存在すると、虹彩や隅角における新生血管が発生し、房水の流出経路が閉塞するという順序

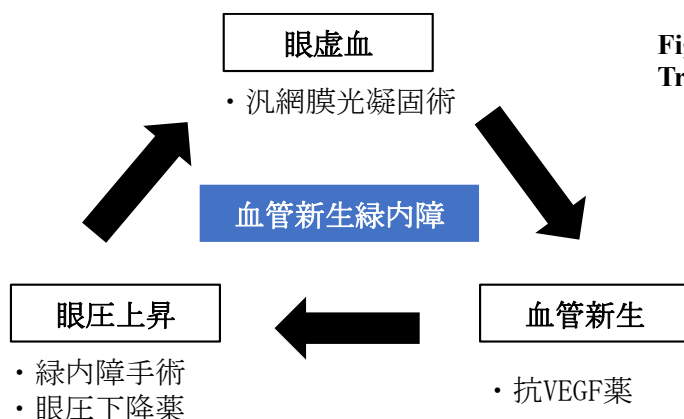


**Fig. 27**  
**Cumulative probability of ocular neovascularization (NV) from the onset of ischemic CRVO**

文献 129 より引用

で血管新生緑内障の病態が進行する (35, 132)。血管新生緑内障病態は、前緑内障期 (第 1 期)、開放隅角緑内障期 (第 2 期)、閉塞隅角緑内障期 (第 3 期) に分類される (133)。第 1 期で虹彩や隅角に新生血管が発生するものの、房水流出は正常であり眼圧の増加は認められないため無症状である。第 2 期では、虹彩や隅角に新生血管が発生し、線維血管膜が線維柱体を塞ぐことで房水流出抵抗が増加し、眼圧が上昇する。第 3 期では周辺虹彩前癒着が生じ、隅角が閉塞することで更に眼圧が上昇する。このように網膜虚血疾患は、浮腫や炎症による直接的な網膜障害に加えて、眼圧上昇に伴う視力障害に注意する必要がある。

血管新生緑内障の治療方法としては、汎網膜光凝固術、眼圧下降薬、緑内障手術などが挙げられる (Fig. 28)。汎網膜光凝固術は、レーザー光によって網膜の広範囲を光凝固し、眼虚血を是正する目的で実施される。さらに眼圧下降を目的に、眼圧下降薬を用いた薬物療法が実施される。薬剤による眼圧管理が不良の場合には、緑内障手術を実施する必要がある。緑内障手術は線維柱体切除術、毛様体凝固術、チューブシャント手術などがあり、房水産生を抑制あるいは房水流出路を改善することで眼圧を低下させる。2020 年には血管新生そのものに作用する抗 VEGF 薬であるアイリーア® (一般名; アフリベルセプト) が血管新生緑内障の治療薬として承認された。血管新生緑内障患者の房水中では、VEGF ファミリーである VEGF-A や placental growth factor (PlGF) 濃度がいずれも



**Fig. 28**  
**Treatment for neovascular glaucoma**

高値を示している (131, 134)。臨床試験においては、血管新生緑内障の第2期及び第3期における高眼圧や新生血管に対して、アイリーア®投与による眼圧下降作用及び新生血管グレードの改善が実証されている (35, 135)。このように、抗VEGF薬の登場により血管新生そのものに対する治療法が提唱されたが、その効果は限定的である。投与1週目における虹彩或いは隅角血管新生の改善が認められた患者の割合は、それぞれ81.3%、50.0%であり、血管新生を完全に退縮させることはできない (135)。とくに、房水流出に関わる隅角での血管新生に対する治療効果が十分でないことが問題である。

近年、VEGF以外の因子が血管新生緑内障の発症に関与していることが示唆されている。網膜中心静脈閉塞症に伴う血管新生緑内障患者では、interleukin (IL)-6発現量が房水で顕著に増加し、新生血管の退縮に伴ってIL-6発現は減少する (136)。一方、TNF- $\alpha$ やIL-2などの炎症性サイトカインの発現は血管新生緑内障の房水で変化しない (136)。これは、血管新生緑内障の病態進展にIL-6が関与する可能性が推察される。また、血管新生緑内障患者ではtransforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1やTGF- $\beta$ 2発現もまた房水中で増加することが分かっている (137, 138)。以上のことから、VEGF以外の因子が血管新生緑内障の発症や病態進展に関与することが推測される。病態の詳細な解析には、疾患モデルを用いた基礎研究が必要であるが、血管新生緑内障の病態を呈する疾患モデルは確立され

ていない。

そこで本章では、網膜虚血を呈するマウス網膜静脈閉塞症モデルを用いて、血管新生緑内障モデルの確立に取り組んだ。まず、網膜虚血後の前眼部や網膜において、血管新生緑内障病態で認められる病態を呈するかについて検証した。さらに、血管新生緑内障の進行と関連する予測因子について検討を行った。

## 第2節 実験材料及び方法

### 2-1 実験材料

マッソントリクローム染色 Kit は Sigma-Aldrich、リバウンド眼圧計は TonoLab (Icare Co. Ltd、Vantaa、Finland) よりそれぞれ購入した。

### 2-2 実験方法

#### 2-2-1 実験動物

8週齢雄性非近交系 ddY マウスは日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka、Japan) より購入した。第1章の2-2-1と同様の方法でマウスを飼育した。実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。

#### 2-2-2 マウス網膜静脈閉塞症モデルの作製

第2章2-2-12に従って、マウス網膜静脈閉塞症モデルを作製した。

#### 2-2-3 抗 VEGF 抗体の投与

第2章2-2-13に従って、抗 VEGF 抗体を投与した。溶媒投与群は PBS を硝子体内に投与した。硝子体内投与は、網膜静脈閉塞直後に実施した。

#### 2-2-4 リアルタイム RT-PCR 法

2-2-2 の手順に従ってマウス網膜静脈閉塞症モデルを作製した。その後、第2章2-2-14に従って RNA を抽出し、RT-PCR 法による解析を行った。使用したプライマーの配列は以下の通りである。

### *Vegfa*

Forward, 5'-ACATTGGCTCACTTCCAGAAACAC-3'

Reverse, 5'-GGTTGGAACCGGCATCTTTATC-3'

### *TGF- $\beta$*

Forward, 5'-GCTGCGCTTGCAGAGATTA-3'

Reverse, 5'-TTGCTGTACTGTGTGTCCAG-3'

### *MMP-9*

Forward, 5'-GGTACAGCCTGTTCTGGTGG-3'

Reverse, 5'-ATGCCGTCTATGTCGTCTTTATTCA-3'

### *Snail*

Forward, 5'-GTGACCCCGACTACCTAGGT-3'

Reverse, 5'-TGGCTTCGGATGTGCATCTT-3'

### *Gapdh*

Forward, 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'

Reverse, 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'

すべての反応は *Gapdh* による内部補正を行った後、その平均値を用いた。

#### 2-2-5 免疫染色法による評価

第 2 章 2-2-17 に従って免疫染色による評価を行った。作製した切片は、0.3% Triton X-100 含有 10% goat serum により 1 時間ブロッキングを行った。マウス由来の抗体を用いる際には、PBS に溶解した M.O.M. blocking reagent (PBS: M.O.M. blocking reagent = 250  $\mu$ L: 9  $\mu$ L) により 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、一次抗体 [溶媒:0.3% Triton X-100 含有 10% goat serum で希釈、マウス由来の抗体を用いる際には PBS で溶解した M.O.M. protein concentrate (PBS: M.O.M.



protein concentrate = 250  $\mu$ L: 20  $\mu$ L)] を用いて 4°C で一晩反応させた。その後、PBS で洗浄を行い、二次抗体 (溶媒: 0.3% Triton X-100 含有 10% goat serum で希釈、マウス由来の抗体を用いる際には M.O.M. protein concentrate を PBS で希釈) によって 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、Hoechst 33342 (1:1,000) を用いて核染色を行った。染色後、fluoromount 及びカバーガラスを用いて封入した後、レーザー走査型共焦点蛍光顕微鏡 (Fluoview FV10i) にて撮影を行った。

一次抗体には、mouse anti- $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) antibody (1:100; Abcam)、rabbit anti-collagen I antibody (1:1,000; Abcam) を用いた。二次抗体にはそれぞれ Alexa Fluor<sup>®</sup>488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:1,000; Thermo Fisher Scientific)、Alexa Fluor<sup>®</sup>546-conjugated goat anti-mouse IgG (1:1,000; Thermo Fisher Scientific) を用いた。また、ネガティブコントロールとして、一次抗体を除いた希釈液を用意し、同様の手順で行った。

#### 2-2-6 眼圧測定

眼圧は、リバウンド眼圧計を使用して血管閉塞 1、30、60 及び 150 日後に測定した。ケタミン (100 mg/kg) 及びキシラジン (9 mg/kg) 腹腔内投与による麻酔下で、6 回の測定結果が自動的に平均化され測定値として算出されたものを 3 回記録し、更にそれらの平均値を眼圧とした。麻酔下のマウスの眼圧測定は、麻酔投与の 4~7 分後に行った。

#### 2-2-7 角膜及び網膜の撮影

##### 2-2-7-1 角膜及び網膜眼底撮影

2-2-2 の手順に従ってマウス網膜静脈閉塞症モデルを作製した。血管閉塞 1、30、60 及び 150 日後にケタミン (120 mg/kg) 及びキシラジン (6 mg/kg) の混合麻

酔液を生理食塩液で 10 倍希釈したものを大腿筋肉内へ投与 (10 mL/kg) することで麻酔を施した。数分後、レンズ装着補助剤であるスコピゾル眼科用液を点眼し、マウスをアニマルスタンドに静置し Micron IV を用いて角膜を撮影した。血管閉塞 30 日後では、網膜眼底を撮影し、白斑形成部位の面積について ImageJ を使用して測定した。血管閉塞 150 日後では、麻酔後、PBS で溶解した 20 mg/mL FITC-dextran 溶液 (分子量: 2,000 kDa) をマウスの尾静脈内に 1 mL 投与し、角膜を撮影した。

#### 2-2-7-2 網膜断層撮影

2-2-7-1 の手順に従って、角膜及び網膜眼底を撮影した後、ミドリン<sup>®</sup>P 点眼液及びヒアレイン<sup>®</sup>点眼液 0.1%を点眼し、1 眼につき 20 ヶ所の網膜層断層画像を撮影した。Micron IV に設置可能な網膜断層撮影装置 (Phoenix Research labs) を用いて、光干渉断層撮影 (optical coherence tomography: OCT) を行った。撮影した OCT 画像は専用定量ソフト「In Sight」(Phoenix Research labs) を用いて、自動で網膜層を検出しその厚さを定量し、20 枚の網膜層の厚さの平均をその個体の網膜層厚とした。

#### 2-2-8 組織評価

##### 2-2-8-1 網膜層の組織切片作製

マウスを頸椎脱臼にて安楽死させ、マウス眼球を摘出した。その後、第 1 章 2-2-3 に従って組織切片の作製を行った。

##### 2-2-8-2 マッソントリクローム染色を用いた組織障害評価

パラフィン切片は、キシレンに浸してパラフィンを洗浄した。つづいて段階

的にアルコール濃度を下げた溶液に浸し、蒸留水に浸透した後、ブアン溶液、ワイゲルト鉄ヘマトキシリン溶液、ビーズリッヒスカーレット-酸性フクシン溶液、10%リンタングステン酸と10%リンモリブデン酸等量混合溶液、アニリン青溶液、1%酢酸に浸して、段階的にアルコールで脱水し、キシレンで透徹しマウントクイックを用いて封入した。切片は、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X710) を使用して撮影した。

### 2-2-8-3 組織評価

角膜障害の評価はヘマトキシリン・エオジン染色した標本を用いた。切片は、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X710) を使用して撮影した。各個体につき3切片を任意に抽出し、角膜上皮層または角膜内皮細胞を含む角膜実質層の厚みをImageJ (NIH) を使用して測定した。

### 2-2-9 ウェスタンブロット法

第1章 2-2-12 に従って、サンプルを作製し、ウェスタンブロット法による評価を行った。

一次抗体には、rabbit anti-phospho-VEGFR2 Tyr1175 (1:1000)、rabbit anti-VEGFR2 (1:1000)、rabbit polyclonal anti- $\alpha$ -SMA antibody (1:100; Abcam)、mouse anti- $\beta$ -actin antibody (1:2,000) を用いた。二次抗体には、HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:1,000)、HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (1:1,000) を用いた。

## 2-3 統計学的解析

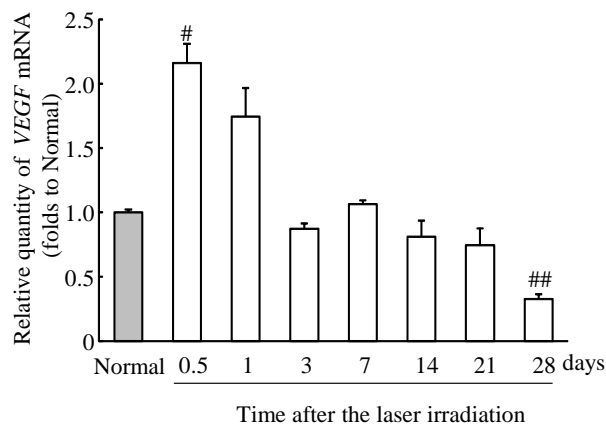
実験成績は平均値 $\pm$ 標準誤差 (standard error of the mean: SEM) で示した。統計

学的な比較は、Statistical Package for the Social Science 15.0 J for Windows software (IBM) を用いて行った。多群間の比較では、one-way analysis of variance (ANOVA) 後に Dunnett's test または Tukey's test を行った。危険率が 5%未満を有意差有りとした。

### 第3節 実験成績

#### 3-1 網膜虚血に伴う VEGF 発現量の変化

マウス網膜静脈閉塞症モデルを用いた検討で、網膜静脈閉塞 1 日後に網膜浮腫が形成され、虚血状態は 30 日まで続くことが明らかになっている (106)。網膜静脈閉塞後の網膜中の *VEGF* mRNA の発現変動を RT-PCR 法を用いて解析した。正常群と比較して、網膜静脈閉塞 12 時間後の網膜の *VEGF* mRNA 量は約 2.2 倍まで増加した。一方、網膜静脈閉塞から 3 日後から 21 日後の網膜では、正常網膜と同程度まで *VEGF* mRNA 発現量が低下した。網膜静脈閉塞 28 日後の網膜では正常群と比較して *VEGF* mRNA 発現量が約 71%減少した (Fig. 29)。



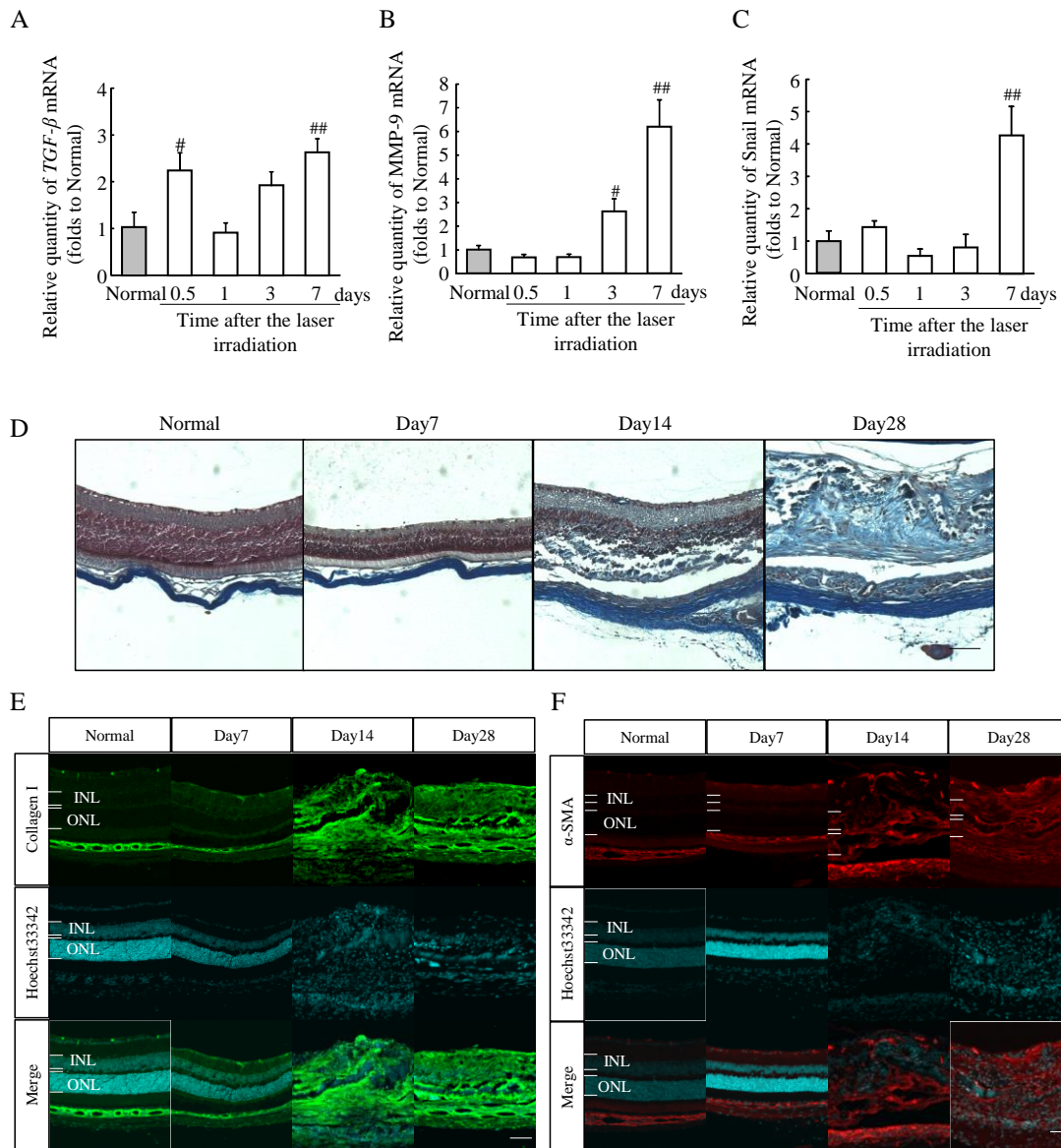
**Fig. 29 The expression of VEGF mRNA in the retinal ischemic murine model.**

The expression level of *VEGF* mRNA was examined in the retina from 0.5 to 28 days post-retinal vein occlusion (RVO) compared to untreated mice (normal). Data are shown as the mean  $\pm$  SEM. (n = 5-6). # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs normal (Tukey's test).

### 3-2 網膜虚血に伴う線維化関連因子の発現及び局在変化

血管新生緑内障の病態進展には VEGF 以外に TGF- $\beta$  の関与が示唆されている。そこで、網膜静脈閉塞後の網膜における TGF- $\beta$  及び線維化関連因子の発現変化について、RT-PCR 法による解析を行った。網膜静脈閉塞から 12 時間後の網膜では、正常群と比較して約 2.2 倍まで TGF- $\beta$  mRNA 発現量が増加した。しかし血管閉塞 1 日後の網膜では正常群と同程度まで TGF- $\beta$  mRNA 発現量は低下した。その後、網膜静脈閉塞 3、7 日後には TGF- $\beta$  mRNA 発現量は増加し、7 日後では発現量が約 2.6 倍まで有意に増加した (Fig. 30A)。つづいて、網膜における MMP-9 mRNA 発現量を解析したところ、網膜静脈閉塞 1 日後までは顕著な変化が認められなかったが、網膜静脈閉塞 3、7 日後の網膜において、MMP-9 mRNA の発現はそれぞれ約 2.6 倍、約 7.1 倍に増加した (Fig. 30B)。また、*Snail* mRNA 発現量は網膜静脈閉塞 3 日後までは正常群と同程度であったが、網膜静脈閉塞 7 日後に約 4 倍に増加した (Fig. 30C)。

つぎに、網膜静脈閉塞 7、14、28 日後の網膜について、マッソントリクローム染色を用いたコラーゲン線維の染色を行った。網膜静脈閉塞 28 日後において、網膜全層で顕著なコラーゲン線維の発現が観察された (Fig. 30D)。さらに、網膜静脈閉塞後の網膜について、線維化マーカーである collagen I 及び  $\alpha$ -SMA の免疫染色を行った。正常群及び網膜静脈閉塞 7 日後の網膜では collagen I と  $\alpha$ -SMA の蛍光シグナルが検出されなかった (Fig. 30E, F)。一方、網膜静脈閉塞 14 日後及び 28 日後では、網膜全層で collagen I 及び  $\alpha$ -SMA の蛍光シグナルが検出された。



**Fig. 30 The expression of fibrosis-related factors in the retinal ischemic murine model.** (A-C) The expression of *TGF-β* (A), *MMP-9* (B), and *Snail* (C) was also measured in the retina at 7 days after RVO. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM. (n = 4-5). <sup>#</sup>*P* < 0.05, <sup>##</sup>*P* < 0.01 vs normal (Dunnett's test). (D) Representative images of retinal sections stained with Masson's trichrome in normal and RVO at 7, 14, and 28 days. Scale bar indicates 50  $\mu$ m. (E-F) Representative photographs show collagen I (green) (E) and  $\alpha$ -SMA (F) in the retinas of normal and RVO murine model at 7, 14, and 28 days. The nuclei are stained sky blue by Hoechst 33342. INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer. Scale bar indicates 50  $\mu$ m.

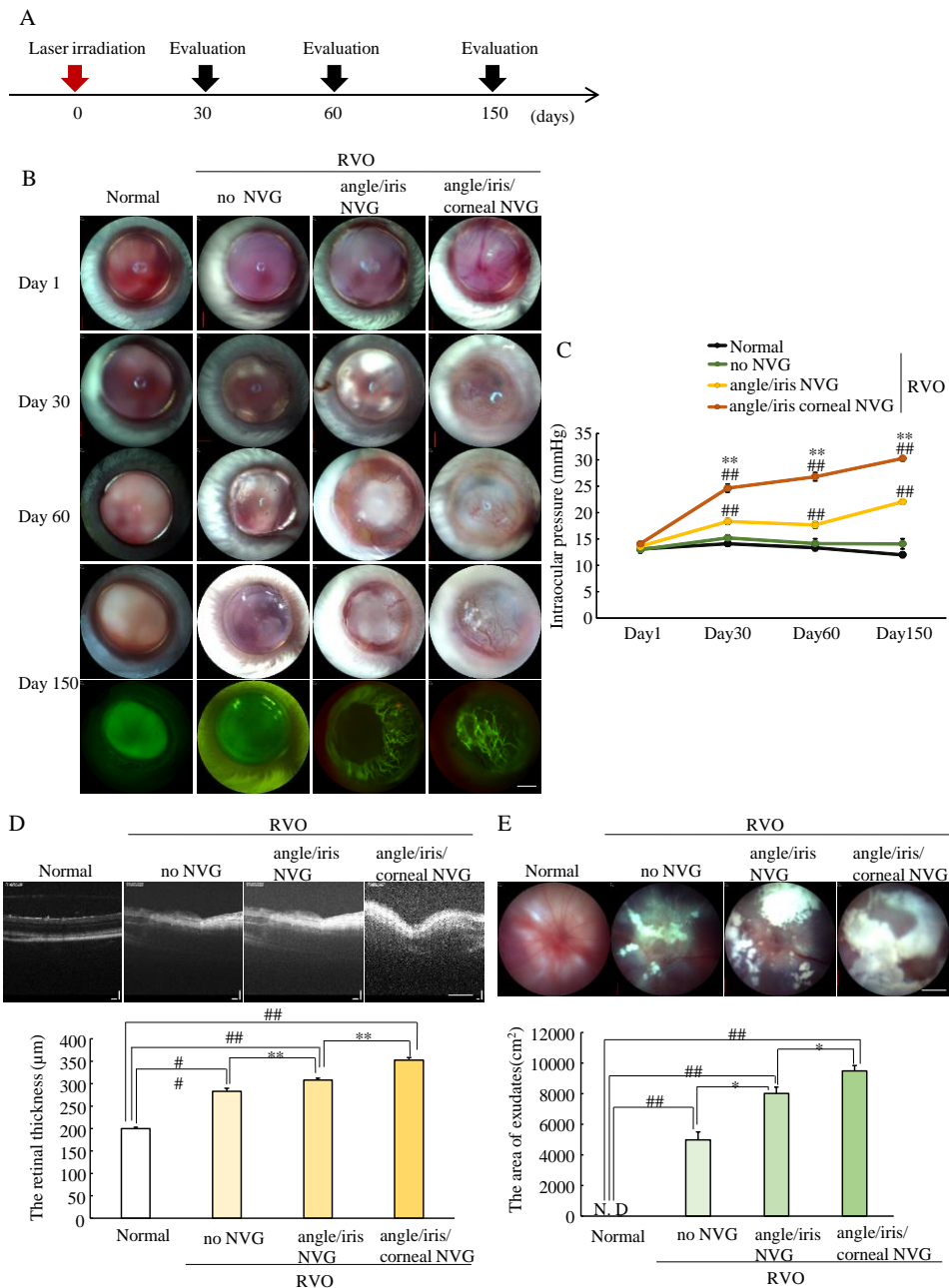
### 3-3 慢性的な網膜虚血が前眼部へ及ぼす影響

眼内の虚血状態は、血管新生緑内障を発症させる重要な病態である (128)。そのため、まず網膜静脈閉塞 30、60、150 日後の前眼部における変化を、フルオレセイン血管造影及び眼圧測定により解析した (Fig. 31A)。血管閉塞 30 日以降、隅角、虹彩、角膜に血管新生を伴う個体が認められた。そこで、新生血管の程度により、血管新生を伴わない (no NVG)、隅角と虹彩に血管新生を伴う (angle/iris NVG)、隅角、虹彩及び角膜に血管新生を伴う (angle/iris/corneal NVG) の 3 群に分けた。Angle/iris NVG 群及び angle/iris/corneal NVG 群ではそれぞれ網膜静脈閉塞 60 日、30 日以降に血管新生が認められた (Fig. 31B)。正常マウス群及び no NVG 群の隅角や虹彩、角膜において新生血管は観察されないが、網膜静脈閉塞 150 日後のフルオレセイン血管造影により、angle/iris NVG 群、angle/iris/corneal NVG 群において、血管新生が発生することを明らかにした (Fig. 31B)。血管閉塞後の眼圧測定の結果、網膜静脈閉塞 1 日後では正常群と比較して全ての群で有意な差は認められなかった (Fig. 31C)。一方、網膜静脈閉塞から 30、60、150 日後では正常群と比較して angle/iris NVG 群及び angle/iris/corneal NVG 群では眼圧が増加した。さらに網膜静脈閉塞から 30、60、150 日後における angle/iris/corneal NVG 群において、angle/iris NVG 群よりもさらに眼圧が上昇した (Fig. 31C)。

血管新生の程度と網膜虚血の関係を明らかにするため、網膜静脈閉塞 1 日後の網膜層の厚みを光干渉断層計により解析した。網膜全層の厚みを測定したところ、網膜静脈閉塞群では正常群と比較して網膜全層厚が有意に増加した。血管閉塞群では、no NVG 群と比較して angle/iris NVG 群で網膜全層が有意に肥厚しており、angle/iris/corneal NVG 群における網膜全層が最も厚かった (Fig. 31D)。マウス網膜静脈閉塞症モデルは、血管閉塞 30 日後の網膜で白斑の形成が認めら



れる (106)。網膜血管のバリア機能が障害されると、血液成分が血管外へ漏出し、血液中のタンパク質や脂質が網膜に沈着することで白斑が形成される。白斑の形成は、網膜の虚血状態が進行し視力が低下することを示している。網膜静脈閉塞 30 日後に認められる白斑形成の面積を解析したところ、no NVG 群と比較して angle/iris NVG 群及び angle/iris/corneal NVG 群ではそれぞれ約 1.6 倍、約 1.9 倍に白斑の面積が増加した (Fig. 31E)。



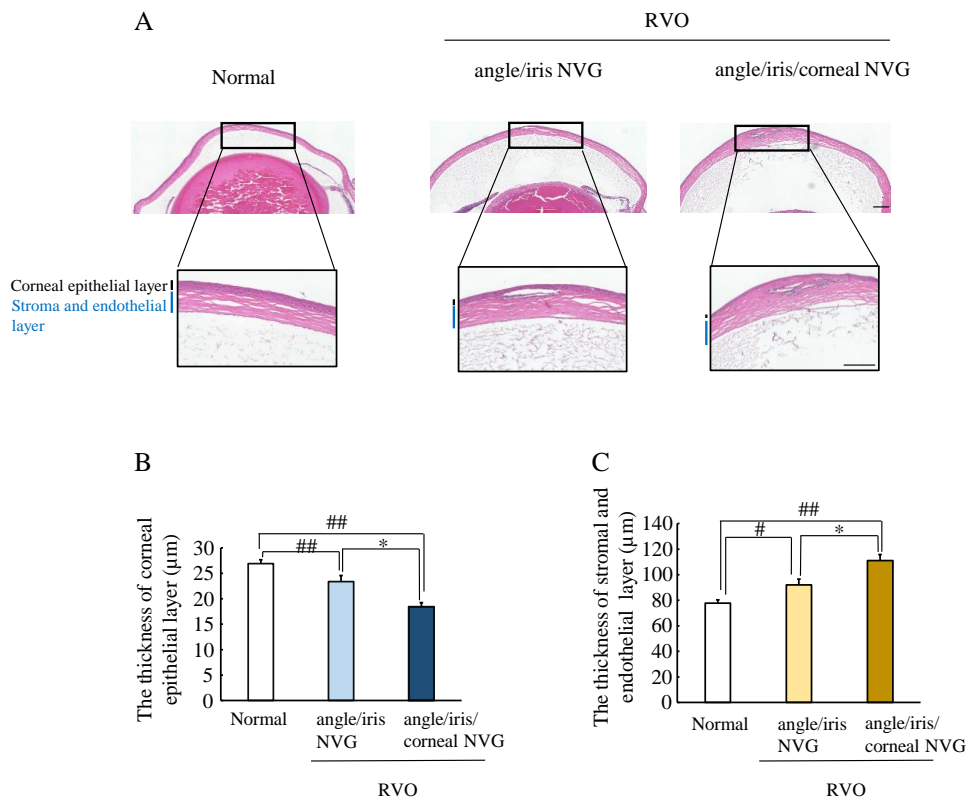
Continued on the next page.

**Fig. 31 The changes of angle, iris, cornea and retina in the neovascular glaucoma (NVG) murine model.**

(A) Experimental protocol used to investigate the changes in the anterior segment and retina in the neovascular glaucoma murine model. (B) Representative images show the angle, iris, and cornea in the normal and RVO groups at 1, 30, 60, and 150 days post-vessel occlusion. At 150 days, it also shows the images of the angle, iris and corneal fluorescein angiography in each group. The RVO murine model was divided into three groups. The mice without observed NVG in the angle, iris, or cornea were defined as the RVO + no NVG group. Mice with observed NVG in the angle and iris were defined as the angle/iris NVG group. Mice in the third group with observed NVG in the angle, iris and cornea were defined as the angle/iris/cornea NVG group. (C) Graphs show the intra ocular pressure (IOP) in the normal (n = 15), no NVG (n = 5), angle/iris NVG (n = 43), and angle/iris/corneal NVG (n = 43) groups at 1, 30, 60, 150 days post-vessel occlusion. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 5-43).  $^{##}P < 0.01$  vs normal,  $^{**}P < 0.01$  vs angle/iris NVG group (Tukey's test). (D) The retinal thickness was measured using the images of optical coherence tomography (OCT) at 1 day after the RVO. (E) The areas of exudates were measured using the images of fundus photography at 30 days after the RVO. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 3-24).  $^{##}P < 0.01$  vs normal,  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  vs angle/iris NVG group (Tukey's test). N. D., not detected. Scale bar indicates 50  $\mu$ m.

3-4 血管新生緑内障を伴うマウス網膜静脈閉塞症モデルにおける角膜厚の変化

網膜静脈の閉塞後、隅角、虹彩及び角膜に血管新生を伴う angle/iris NVG 群及び angle/iris/corneal NVG 群における角膜厚を組織学的評価により解析した。正常群と比較して、angle/iris NVG 群及び angle/iris/corneal NVG 群で角膜上皮層が菲薄化することが分かった (Fig. 32A, B)。なかでも、angle/iris/corneal NVG 群における角膜上皮層が最も菲薄化しており、正常群と比較して 3 割程度の減少がみられた。また、角膜実質及び角膜内皮層は正常群と比較して、angle/iris NVG 群及び angle/iris/corneal NVG 群で肥厚化した (Fig. 32A, C)。Angle/iris/corneal NVG 群における角膜上皮層が最も厚く、正常群と比べて 5 割程度増加した (Fig. 32A, C)。

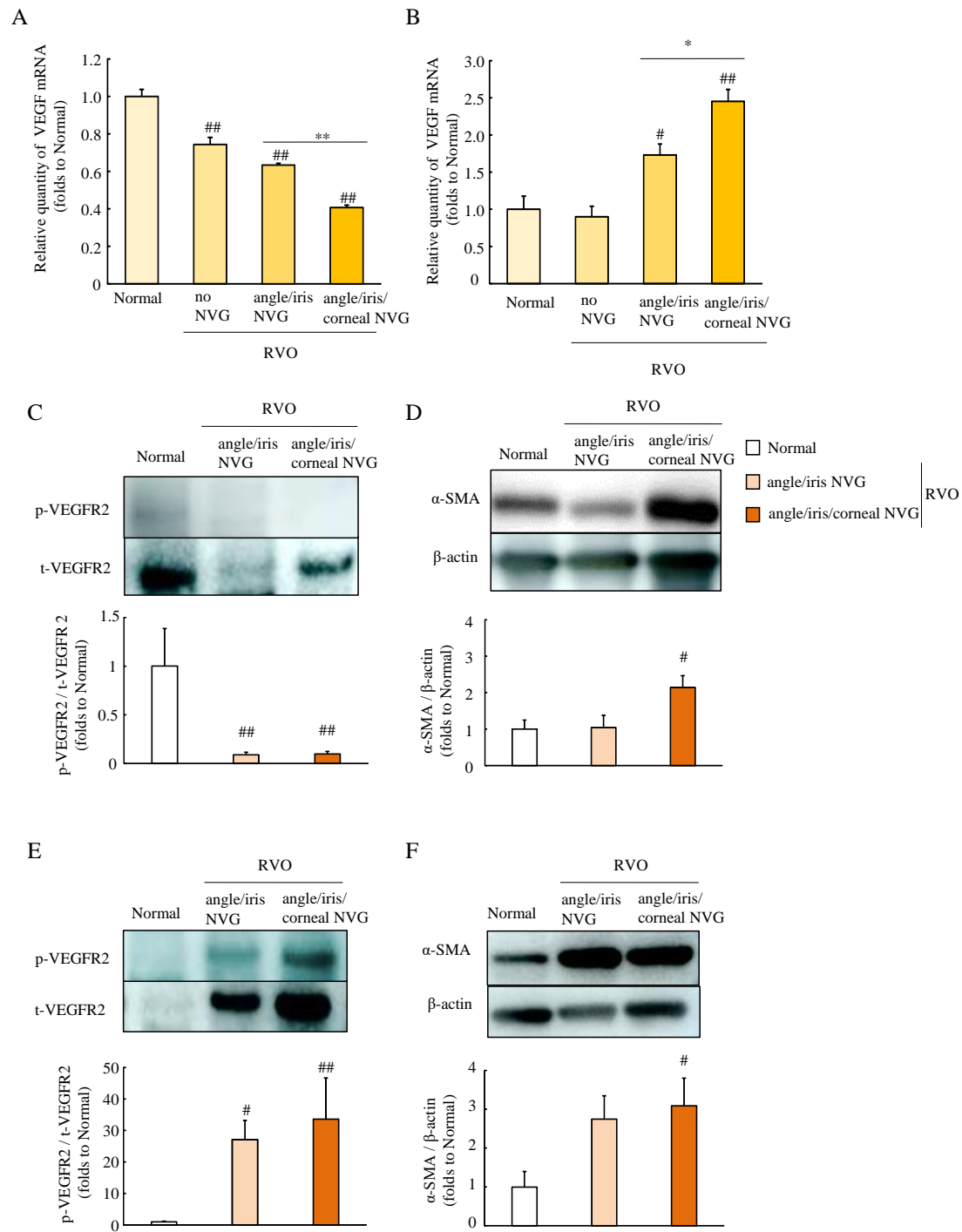


**Fig. 32 Changes in corneal thickness in the NVG murine model.**

(A) Representative images of corneal sections stained with H&E in the normal, angle/iris NVG, and angle/iris/corneal NVG groups. Graphs show the quantified thickness of the corneal epithelial layer (B) and stromal and endothelial layer (C). Data are shown as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 5-10$ ).  $\#P < 0.05$ ,  $\#\#P < 0.01$  vs normal),  $*P < 0.05$  vs angle/iris NVG group (Tukey's test). Scale bar indicates  $50 \mu\text{m}$ .

### 3-5 血管新生緑内障を伴うマウス網膜静脈閉塞症モデルの網膜及び角膜における VEGF 発現量の変化

網膜静脈閉塞から 150 日後の網膜及び角膜における VEGF の発現量について、RT-PCR を用いて解析した。網膜における *VEGF* mRNA 発現量は、正常群と比較して血管閉塞を行ったすべての群において減少した (Fig. 33A)。前眼部に血管新生を伴う angle/iris NVG 群及び angle/iris/corneal NVG 群では、no NVG 群と比較して *VEGF* mRNA 発現量は低値を示した。また、angle/iris/corneal NVG 群でも *VEGF* mRNA 発現量が低く、正常群の 4 割程度であった。つぎに、角膜における *VEGF* mRNA 量について解析したところ、正常群と no NVG 群の間に有意な差が認められなかった (Fig. 33B)。一方、angle/iris NVG 群及び angle/iris/corneal NVG 群の角膜では正常群よりも *VEGF* mRNA 発現量が高く、それぞれ約 2.1 倍、約 3.3 倍まで増加した。つぎに、VEGF シグナルの活性化を検討するために、網膜静脈閉塞 150 日後の網膜及び角膜のウェスタンブロットを行った。網膜における VEGFR2 のリン酸化は正常群と比較して、angle/iris NVG 群及び angle/iris/corneal NVG 群で約 1 割まで低下した (Fig. 33C)。また、網膜静脈閉塞 150 日後の網膜では angle/iris/corneal NVG 群において、線維化マーカーである  $\alpha$ -SMA の発現が約 2.1 倍まで増加した (Fig. 33D)。つぎに、網膜静脈閉塞 150 日後の角膜における VEGFR2 のリン酸化及び  $\alpha$ -SMA の発現量を解析した。VEGFR2 のリン酸化は正常群と比較して、angle/iris NVG 群及び angle/iris/corneal NVG 群でそれぞれ約 27 倍、約 34 倍まで増加した (Fig. 33E)。また、 $\alpha$ -SMA の発現量は angle/iris NVG 群及び angle/iris/corneal NVG 群でそれぞれ約 2.8 倍、約 3.1 倍まで増加した (Fig. 33F)。以上の結果より、血管新生緑内障モデルでは網膜で低下する VEGF シグナルが角膜では亢進すること、また  $\alpha$ -SMA の発現量は網膜、角膜共に発現が亢進することが示された。

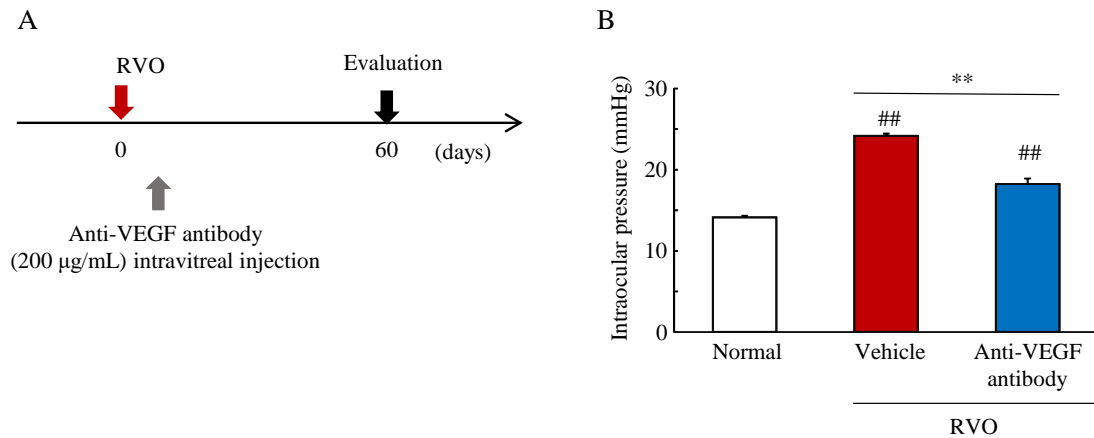


**Fig. 33 The expression of VEGF and fibrosis-related factors in the NVG murine model.**

The expression levels of *VEGF* mRNA in the retina (A) and the cornea (B) at 150 days post-RVO compared to normal mice. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n = 5). <sup>#</sup>*P* < 0.05, <sup>##</sup>*P* < 0.01 vs normal, <sup>\*</sup>*P* < 0.05, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01 vs angle/iris NVG group (Tukey's test). Representative images and quantitative analyses of western blots show the levels of phosphorylated VEGFR2 (p-VEGFR2) and  $\alpha$ -SMA in the retina (C, D) and in the cornea (E, F) at 150 days post-RVO. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n = 5). <sup>#</sup>*P* < 0.05, <sup>##</sup>*P* < 0.01 vs normal (Tukey's test).

### 3-6 慢性虚血に伴う眼圧上昇に対する抗 VEGF 抗体の作用

血管新生緑内障モデルでは、網膜静脈閉塞 30 日以降に眼圧上昇が認められた (Fig. 31C)。そこで、抗 VEGF 抗体の投与が眼圧に及ぼす影響を検討した。網膜静脈閉塞 60 日後の溶媒投与群では、正常群と比較して眼圧の増加が認められた。一方、網膜静脈閉塞直後の抗 VEGF 抗体の投与は、溶媒投与群と比較して眼圧の増加を著明に抑制した (Fig. 34A, B)。



**Fig. 34 The effects of IOP after the anti-VEGF blocking antibody administration in the NVG murine model.**

(A) The RVO murine model was injected intravitreally with an anti-VEGF antibody, immediately post-vessel occlusion. (B) IOP was measured using Icare<sup>®</sup> TonoLab tonometer, 60 days after RVO in treated or vehicle treated mice. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 6-22$ ). ## $P < 0.01$  vs normal, \*\* $P < 0.01$  vs Vehicle (Tukey's test).

#### 第4節 考察

本章では、網膜静脈閉塞症モデルを用いて、慢性的な網膜虚血が血管新生緑内障様の症状を呈するか否かを検討した。慢性的な網膜虚血により、隅角や虹彩、角膜における新生血管の発生及び眼圧増加が認められた。網膜虚血を起因として血管新生緑内障病態を示すことを世界で初めて明らかにした。今後、疾患モデルとして病態解明や治療薬探索などの応用が期待できる。

網膜静脈閉塞症や糖尿病網膜症などの網膜虚血病態では、慢性炎症が原因となり線維化のマスターレギュレーターである TGF- $\beta$  の産生増大を伴う (37, 139)。網膜細胞に対して TGF- $\beta$  は MMP-9 や Snail の発現を誘導し (122, 140)、増殖糖尿病網膜症においては網膜前膜の収縮を促進する (141)。さらに TGF- $\beta$  は血管内皮細胞へ作用して内皮間葉転換を誘導し (142)、BRB の破綻を惹起すると考えられている (122)。実際、網膜静脈閉塞症や糖尿病網膜症などの虚血を呈する患者の硝子体中において TGF- $\beta$  の増加が認められている (37, 143)。これらの知見から、線維化関連因子の発現は血管透過性の亢進や網膜虚血状態と相関していることが推測される。血管閉塞による虚血後の網膜では TGF- $\beta$ 、MMP-9、Snail の発現量が増加しており (Fig. 30)、TGF- $\beta$  を介したシグナルが活性化すると考えられる。マウス網膜静脈閉塞症モデルの網膜において、collagen-I、 $\alpha$ -SMA といった線維化マーカーが増加しており、虚血後の網膜における線維化誘導が示唆された (Fig. 30)。眼圧上昇よりも早期のタイミングで TGF- $\beta$  発現量の増加が認められたことを考慮すると、TGF- $\beta$  が網膜虚血病態から血管新生緑内障へ病態進展を予測するバイオマーカーとして応用できる可能性がある。また、線維化マーカーである  $\alpha$ -SMA の発現は慢性虚血後の角膜においても認められた (Fig. 33)。これは網膜で産生された過剰な TGF- $\beta$  が、硝子体、房水を介して角膜へと運ばれ、線維化を誘導したことが推測される。血管新生緑内障患者の房水中に

においても TGF- $\beta$  が高値を示し (137)、房水中で増加した TGF- $\beta$  は線維柱体細胞に作用し、細胞外マトリックスの増加を介して眼圧を上昇させると考えられている (144)。このように、網膜で産生された過剰な TGF- $\beta$  は間葉転換や BRB の破綻により網膜機能を障害すると同時に、房水中に移行することで眼圧にまで影響を与える可能性がある。したがって、TGF- $\beta$  の発現制御に関わるバイオマーカーの探索や TGF- $\beta$  をターゲットにした創薬アプローチが、血管新生緑内障の治療満足度向上に繋がると考えられる。

血管新生緑内障は網膜虚血によって惹起され、近年の研究から、血管新生緑内障の病態形成に IL-6 や TGF- $\beta$  など VEGF 以外のサイトカインの関与が示唆されているが (136–138)、病態の全容解明には至っていない。網膜虚血は網膜組織の酸素不足を誘発し、低酸素誘導性転写因子 hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) により VEGF の産生を著しく亢進させる (100, 145)。通常、血管病変を伴わない黄斑前膜や黄斑円孔などの対照患者の硝子体液における VEGF 濃度は 0.26 ng/mL であるのに対して、網膜静脈分枝閉塞症患者で 2.0 ng/mL、網膜中心静脈閉塞症で 8.6 ng/mL と高値を示す (34)。網膜中心静脈閉塞症では、網膜虚血に伴って VEGF 発現量が増加し、黄斑浮腫の進行度と VEGF レベルが正に相関する (146, 147)。すなわち、虚血の程度が深刻になるほど、VEGF 量が増加し、血管新生緑内障に繋がるリスクが増加すると推察される。本章の検討において、網膜静脈閉塞直後に抗 VEGF 抗体を投与することによって、マウス血管新生緑内障モデルの眼圧上昇を抑えられることが明らかになった (Fig. 34)。マウス網膜静脈閉塞症モデルの網膜で、*VEGF* mRNA 発現量は血管閉塞 12 時間後、VEGF タンパク質は血管閉塞 1 日後に発現のピークを迎える (100)。これに対して、血管閉塞直後の抗 VEGF 抗体の硝子体内投与は VEGF 発現量を正常網膜と同程度まで抑制し、網膜浮腫や虚血領域の形成を抑制する。このことから、抗 VEGF



抗体の投与は血管閉塞 1 日後の過剰な VEGF 分泌を正常レベルまで戻すことで前眼部への VEGF 移行を抑制し、眼圧上昇に繋がる前眼部での新生血管の発生を抑制したと考えられる。したがって、本章で確立したマウス血管新生緑内障モデルは、臨床報告と同様に、血管新生や眼圧上昇に VEGF が関与することが示唆された。さらに、TGF- $\beta$  関連因子が血管新生緑内障の発症を予測する疾患バイオマーカーとして利用できる可能性を示した。今後、本モデルを用いて、血管新生緑内障の病態進展に関わる因子の同定や薬剤評価への応用が期待される。

## 総括及び結論

ヒトは情報の約 8 割を視覚から得ていると言われており、視機能の維持は生活の質を保つうえで非常に重要である。外界の光は角膜や硝子体を通過して、網膜で視細胞が受容することで視覚情報として伝達される。一方、中途失明原因上位を占める疾患では、加齢や環境要因による炎症や酸化ストレスが原因で網膜が障害されることで、視覚障害に至る。また、網膜へ栄養を送る血管からの異常血管新生や血管外漏出は、多くの失明性疾患に共通した特徴である。つまり、失明を克服するためには、網膜視細胞の保護や眼血管の恒常性維持が重要である。そこで、本研究では網膜視細胞保護因子の探索に加えて、網脈絡膜血管疾患の病態解明及び新規治療ターゲットの探索を目的に研究を行った。まず、網膜視細胞保護因子を同定するために光誘発網膜障害モデルを用いて検討した。続いて、網脈絡膜血管疾患の疾患モデルを用いて新規血管病変制御因子を探索した。さらに、慢性的な網膜虚血状態が眼恒常性に及ぼす影響を検討した。

第 1 章では、光障害モデルを用いて、網膜視細胞障害を予防できる保護薬あるいは生理的に分泌される保護因子の探索を行った。

- 1) パーキンソン病治療薬ロピニロールは、過度な光照射による網膜の菲薄化を抑制した。
- 2) 成長因子グラニューリンは、光誘発網膜視細胞障害に対して、PKC シグナルを介した保護作用を示した。
- 3) 光誘発網膜障害モデルにおいて、プログラニューリン及びグラニューリンの発現は増加し、その発現は Iba-1 陽性マクロファージにおいて認められた。

以上より、ロピニロールやプログラニューリン及びグラニューリンの投与により光障害から網膜視細胞を保護できる可能性が示された。

第 2 章では、網膜浮腫や新生血管の発生により著しい視機能障害をもたらす網脈絡膜疾患の病態解明及び新規治療標的の探索を行った。

1) 網膜血管内皮細胞の細胞増殖や細胞遊走は BTB タンパク質である ANKFY1 によって制御されており、ANKFY1 は細胞膜上の VEGFR2 発現量に影響を及ぼすことが示された。

2) 血管内皮細胞特異的に発現する BTB タンパク質である BCL6B は、網膜血管内皮細胞において VEGF 刺激に応答して発現が増加した。

3) BCL6B の発現抑制により、脈絡膜血管新生や網膜静脈閉塞に伴う網膜浮腫の減弱が認められた。

4) BCL6B 欠損マウスは Notch シグナルの活性化を介して、網膜虚血に伴う網膜バリア機能の破綻を抑制することが示唆された。

以上より、BTB タンパク質である ANKFY1 や BCL6B が網脈絡膜血管疾患の病態進展に寄与することを明らかにした。

第 3 章では、網膜静脈閉塞症モデルを用いて、網膜血管閉塞に伴う網膜虚血が前眼部や網膜恒常性に及ぼす影響を検討した。

1) 網膜における VEGF 発現量は、網膜血管閉塞 12 時間後に増加したが、28 日後においては低下した。

2) 網膜血管閉塞後、眼圧上昇よりも早期のタイミングで TGF- $\beta$  及び線維化関連因子の発現亢進が認められた。

3) 慢性的な網膜虚血により、隅角や虹彩、角膜において新生血管が発生し、前眼部で新生血管が発生したマウス群では眼圧が増加した。

4) 抗 VEGF 抗体の投与により、慢性的な血管閉塞に伴う眼圧の亢進が抑制された。

以上より、網膜静脈閉塞症モデルにおける長期的な網膜虚血が、眼圧増加や前眼部における新生血管の発生など、血管新生緑内障に類似した病態形成に繋がることを明らかにした。

本研究では、光曝露による視細胞障害の予防的アプローチとして成長因子グラニューリンが有用であること、また失明性疾患に共通する血管病態に対して BCL6B や ANKFY1 などの BTB タンパク質の発現量制御が有望な治療戦略となる可能性を示した。さらに、網膜静脈閉塞症に伴って発症する血管新生緑内障の診断及び治療標的として TGF- $\beta$  の可能性を明らかにした。今回作製した血管新生緑内障モデルは、未だ明らかになっていない血管新生緑内障の病態形成機序解明や新規治療ターゲット探索への応用が期待できる。

## 謝辞

本稿を終えるに臨み、本研究の遂行にあたり終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師 岐阜薬科大学 学長で生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室前教授 原英彰博士に深甚なる謝意を表します。

本研究に際して終始御懇切なる御指導並びに御助言を賜りました岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室教授 嶋澤雅光博士、同准教授 中村信介博士、岐阜薬科大学 バイオメディカルリサーチ寄附講座 特任講師 大津航博士に深謝致します。また、本研究の遂行にあたり、御協力と御助言を頂きました岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室諸氏に心より感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、有益なる御指導並びにご助言を賜りました岐阜薬科大学 生命薬学大講座 生化学研究室教授 五十里彰博士、岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 免疫生物学研究室教授 田中宏幸博士並びに岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 分子生物学研究室教授 福光秀文博士に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、実験材料の御提供、御助言並びに御協力を賜りました愛媛大学プロテオサイエンスセンター 細胞増殖・腫瘍制御部門/大学院医学系研究科 生化学分子遺伝学 教授 東山繁樹博士、愛媛大学プロテオサイエンスセンター 細胞増殖・腫瘍制御部門/大学院医学系研究科 心臓血管・呼吸器外科学 講師 坂上倫久博士、慶應義塾大学 薬学部 代謝生理化学講座 専任講師 前川大志博士、千葉大学 前学長 徳久剛史博士、千葉大学大学院医学研究院 疾患生命医学 教授 幡野雅彦博士、カルナバイオサイエンス株式会社 吉野公一郎氏、澤

匡明氏、佐藤雄治氏、柚木芳氏、並びに久光製薬株式会社 高橋光一氏、谷田宣文氏、宮本洋平氏に深謝いたします。

本研究は、JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム (JPMJSP2142)、日本薬学会長井記念薬学研究奨励金の支援を受けて実施したものです。

## 引用文献

1. Haupt, C. and Huber, A. B. (2008) How axons see their way--axonal guidance in the visual system. *Front. Biosci.* **13**, 3136–3149.
2. Bekerman, I., Gottlieb, P., and Vaiman, M. (2014) Variations in eyeball diameters of the healthy adults. *J. Ophthalmol.* **2014**, 503645.
3. Wässle, H. (2004) Parallel processing in the mammalian retina. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 747–757.
4. Heavner, W. and Pevny, L. (2012) Eye development and retinogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a008391.
5. Wagstaff, P. E., Berzal, A. H., Boon, C. J. F., Quinn, P. M. J., Ten Asbroek, A. L. M. A., and Bergen, A. A. (2021) The role of small molecules and their effect on the molecular mechanisms of early retinal organoid development. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–50.
6. Buscemi, S., Corleo, D., Di Pace, F., Petroni, M. L., Satriano, A., and Marchesini, G. (2018) The effect of lutein on eye and extra-eye health. *Nutrients* **10**, 1–24.
7. Boned-Murillo, A., Albertos-Arranz, H., Diaz-Barreda, M. D., Orduna-Hospital, E., Sánchez-Cano, A., Ferreras, A., Cuenca, N., and Pinilla, I. (2021) Optical Coherence Tomography Angiography in Diabetic Patients: A Systematic Review. *Biomedicines* **10**, 88.
8. Morizane, Y., Morimoto, N., Fujiwara, A., Kawasaki, R., Yamashita, H., Ogura, Y., and Shiraga, F. (2019) Incidence and causes of visual impairment in Japan: the first nation-wide complete enumeration survey of newly certified visually impaired individuals. *Jpn. J. Ophthalmol.* **63**, 26–33.
9. Chang, M. A., Bressler, S. B., Munoz, B., and West, S. K. (2008) Racial differences and other risk factors for incidence and progression of age-related macular degeneration: Salisbury Eye Evaluation (SEE) Project. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 2395–2402.
10. Khan, J. C., Thurlby, D. A., Shahid, H., Clayton, D. G., Yates, J. R. W., Bradley, M., Moore, A. T., and Bird, A. C. (2006) Smoking and age related macular degeneration: The number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. *Br. J. Ophthalmol.* **90**, 75–80.
11. Narayanan, R., Butani, V., Boyer, D. S., Atilano, S. R., Resende, G. P., Kim, D. S., Chakrabarti, S., Kuppermann, B. D., Khatibi, N., Chwa, M., Nesburn, A. B., and Kenney, M. C. (2007) Complement Factor H Polymorphism in Age-Related

- Macular Degeneration. *Ophthalmology* **114**, 1327–1331.
12. Taylor, H. R., Muñoz, B., West, S., Bressler, N. M., Bressler, S. B., and Rosenthal, F. S. (1990) Visible light and risk of age-related macular degeneration. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **88**, 163–173.
  13. Sui, G.-Y., Liu, G.-C., Liu, G.-Y., Gao, Y.-Y., Deng, Y., Wang, W.-Y., Tong, S.-H., and Wang, L. (2013) Is sunlight exposure a risk factor for age-related macular degeneration? A systematic review and meta-analysis. *Br. J. Ophthalmol.* **97**, 389–394.
  14. Zhang, C.-J., Ma, Y., and Jin, Z.-B. (2021) The road to restore vision with photoreceptor regeneration. *Exp. Eye Res.* **202**, 108283.
  15. Lin, J. M., Tsai, Y. Y., Wan, L., Lin, H. J., Tsai, Y., Lee, C. C., Tsai, C. H., Tsai, F. J., and Tseng, S. H. (2008) Complement factor h variant increases the risk for early age-related macular degeneration. *Retina* **28**, 1416–1420.
  16. Yang, Z., Camp, N. J., Sun, H., Tong, Z., Gibbs, D., Cameron, D. J., Chen, H., Zhao, Y., Pearson, E., Li, X., Chien, J., DeWan, A., Harmon, J., Bernstein, P. S., Shridhar, V., Zabriskie, N. A., Hoh, J., Howes, K., and Zhang, K. (2006) A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science (80-. )*. **314**, 992–993.
  17. Rosenfeld, P. J., Dugel, P. U., Holz, F. G., Heier, J. S., Pearlman, J. A., Novack, R. L., Csaky, K. G., Koester, J. M., Gregory, J. K., and Kubota, R. (2018) Emixustat Hydrochloride for Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration: A Randomized Clinical Trial. *Ophthalmology* **125**, 1556–1567.
  18. Holz, F. G., Sadda, S. R., Busbee, B., Chew, E. Y., Mitchell, P., Tufail, A., Brittain, C., Ferrara, D., Gray, S., Honigberg, L., Martin, J., Tong, B., Ehrlich, J. S., Bressler, N. M., and Chroma and Spectri Study Investigators. (2018) Efficacy and Safety of Lampalizumab for Geographic Atrophy Due to Age-Related Macular Degeneration: Chroma and Spectri Phase 3 Randomized Clinical Trials. *JAMA Ophthalmol.* **136**, 666–677.
  19. Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hiram, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., Terada, M., Nomiya, Y., Tanishima, S., Nakamura, M., Kamao, H., Sugita, S., Onishi, A., Ito, T., Fujita, K., Kawamata, S., Go, M. J., Shinohara, C., Hata, K., Sawada, M., Yamamoto, M., Ohta, S., Ohara, Y., Yoshida, K., Kuwahara, J., Kitano, Y., Amano, N., Umekage, M., Kitaoka, F., Tanaka, A., Okada, C., Takasu, N., Ogawa, S., Yamanaka, S., and Takahashi, M. (2017) Autologous Induced Stem-Cell–



- Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* **376**, 1038–1046.
20. Takagi, S., Mandai, M., Gocho, K., Hirami, Y., Yamamoto, M., Fujihara, M., Sugita, S., Kurimoto, Y., and Takahashi, M. (2019) Evaluation of Transplanted Autologous Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium in Exudative Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmol. Retin.* **3**, 850–859.
  21. Blassberg, R. (2022) Genome Editing of Pluripotent Stem Cells for Adoptive and Regenerative Cell Therapies. *GEN Biotechnol.* **1**, 77–90.
  22. Bastiaans, J., van Meurs, J. C., van Holten-Neelen, C., Nijenhuis, M. S.-T., Koliijn-Couwenberg, M. J., van Hagen, P. M., Kuijpers, R. W. A. M., Hooijkaas, H., and Dik, W. A. (2013) Factor Xa and thrombin stimulate proinflammatory and profibrotic mediator production by retinal pigment epithelial cells: a role in vitreoretinal disorders? *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **251**, 1723–1733.
  23. Ieki, Y., Nishiwaki, H., Miura, S., Hirata, Y., Sakata, I., Nonaka, A., Kiryu, J., and Honda, Y. (2002) Quantitative evaluation for blood-retinal barrier breakdown in experimental retinal vein occlusion produced by photodynamic thrombosis using a new photosensitizer. *Curr. Eye Res.* **25**, 317–323.
  24. Shultz, R. W. and Bakri, S. J. (2011) Treatment for Submacular Hemorrhage Associated with Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Semin. Ophthalmol.* **26**, 361–371.
  25. Krause, T. A., Alex, A. F., Engel, D. R., Kurts, C., and Eter, N. (2014) VEGF-Production by CCR2-Dependent Macrophages Contributes to Laser-Induced Choroidal Neovascularization. *PLoS One* **9**, e94313.
  26. Blaauwgeers, H. G. T., Holtkamp, G. M., Rutten, H., Witmer, A. N., Koolwijk, P., Partanen, T. A., Alitalo, K., Kroon, M. E., Kijlstra, A., Van Hinsbergh, V. W. M., and Schlingemann, R. O. (1999) Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris: Evidence for a trophic paracrine relation. *Am. J. Pathol.* **155**, 421–428.
  27. Suzuki, M., Nagai, N., Izumi-Nagai, K., Shinoda, H., Koto, T., Uchida, A., Mochimaru, H., Yuki, K., Sasaki, M., Tsubota, K., and Ozawa, Y. (2014) Predictive factors for non-response to intravitreal ranibizumab treatment in age-related macular degeneration. *Br. J. Ophthalmol.* **98**, 1186–1191.
  28. Rofagha, S., Bhisitkul, R. B., Boyer, D. S., Sadda, S. R., Zhang, K., and SEVEN-UP Study Group. (2013) Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: a multicenter cohort study (SEVEN-UP).

- Ophthalmology* **120**, 2292–2299.
29. Rogers, S., McIntosh, R. L., Cheung, N., Lim, L., Wang, J. J., Mitchell, P., Kowalski, J. W., Nguyen, H., and Wong, T. Y. (2010) The Prevalence of Retinal Vein Occlusion: Pooled Data from Population Studies from the United States, Europe, Asia, and Australia. *Ophthalmology* **117**, 1–14.
  30. Karia, N. (2010) Retinal vein occlusion: Pathophysiology and treatment options. *Clin. Ophthalmol.* **4**, 809–816.
  31. Au, A., Hilely, A., Scharf, J., Gunnemann, F., Wang, D., Chehaibou, I., Iovino, C., Grondin, C., Farecki, M.-L., Falavarjani, K. G., Phasukkijwatana, N., Battista, M., Borrelli, E., Sacconi, R., Powell, B., Hom, G., Greenlee, T. E., Conti, T. F., Ledesma-Gil, G., Teke, M. Y., Choudhry, N., Fung, A. T., Krivosic, V., Baek, J., Lee, M. Y., Sugiura, Y., Querques, G., Peiretti, E., Rosen, R., Lee, W. K., Yannuzzi, L. A., Zur, D., Loewenstein, A., Pauleikhoff, D., Singh, R., Modi, Y., Hubschman, J. P., Ip, M., Sadda, S., Freund, K. B., and Sarraf, D. (2020) Relationship Between Nerve Fiber Layer Hemorrhages and Outcomes in Central Retinal Vein Occlusion. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **61**, 54.
  32. Yoshimura, T., Sonoda, K., Sugahara, M., Mochizuki, Y., Enaida, H., Oshima, Y., Ueno, A., Hata, Y., Yoshida, H., and Ishibashi, T. (2009) Comprehensive Analysis of Inflammatory Immune Mediators in Vitreoretinal Diseases. *PLoS One* **4**, e8158.
  33. Sophie, R., Hafiz, G., Scott, A. W., Zimmer-Galler, I., Nguyen, Q. D., Ying, H., Do, D. V., Solomon, S., Sodhi, A., Gehlbach, P., Duh, E., Baranano, D., and Campochiaro, P. A. (2013) Long-term outcomes in ranibizumab-treated patients with retinal vein occlusion; the role of progression of retinal nonperfusion. *Am. J. Ophthalmol.* **156**, 693–705.
  34. Ehlken, C., Rennel, E. S., Michels, D., Grundel, B., Pielen, A., Junker, B., Stahl, A., Hansen, L. L., Feltgen, N., Agostini, H. T., and Martin, G. (2011) Levels of VEGF but not VEGF(165b) are increased in the vitreous of patients with retinal vein occlusion. *Am. J. Ophthalmol.* **152**, 298–303.
  35. Inatani, M., Higashide, T., Matsushita, K., Miki, A., Ueki, M., Iwamoto, Y., Kobayashi, M., Leal, S., Inatani, M., Sotozono, C., Kinoshita, S., Takahashi, K., Kubota, T., Koto, T., Takai, Y., Teranishi, S., Suzuki, K., Nakazawa, T., Shiraya, T., Oshiro, T., Takagi, H., Nagasato, D., and Oh, H. (2021) Intravitreal Aflibercept in Japanese Patients with Neovascular Glaucoma: The VEGA Randomized Clinical Trial. *Adv. Ther.* **38**, 1116–1129.
  36. Rong, A. J., Swaminathan, S. S., Vanner, E. A., and Parrish, R. K. (2019)

- Predictors of Neovascular Glaucoma in Central Retinal Vein Occlusion. *Am. J. Ophthalmol.* **204**, 62–69.
37. Tuuminen, R. and Loukovaara, S. (2014) High intravitreal TGF- $\beta$ 1 and MMP-9 levels in eyes with retinal vein occlusion. *Eye* **28**, 1095–1099.
  38. Yasuda, M., Kiyohara, Y., Hata, Y., Arakawa, S., Yonemoto, K., Doi, Y., Iida, M., and Ishibashi, T. (2009) Nine-year incidence and risk factors for age-related macular degeneration in a defined Japanese population the Hisayama study. *Ophthalmology* **116**, 2135–2140.
  39. Junghans, A., Sies, H., and Stahl, W. (2001) Macular pigments lutein and zeaxanthin as blue light filters studied in liposomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **391**, 160–164.
  40. Cantrell, A., McGarvey, D. J., Truscott, T. G., Rancan, F., and Böhm, F. (2003) Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment. *Arch. Biochem. Biophys.* **412**, 47–54.
  41. Höglinger, G. U., Rizk, P., Muriel, M. P., Duyckaerts, C., Oertel, W. H., Caille, I., and Hirsch, E. C. (2004) Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat. Neurosci.* **7**, 726–735.
  42. Iida, M., Miyazaki, I., Tanaka, K., Kabuto, H., Iwata-Ichikawa, E., and Ogawa, N. (1999) Dopamine D2 receptor-mediated antioxidant and neuroprotective effects of ropinirole, a dopamine agonist. *Brain Res.* **838**, 51–59.
  43. Fujimori, K., Ishikawa, M., Otomo, A., Atsuta, N., Nakamura, R., Akiyama, T., Hadano, S., Aoki, M., Saya, H., Sobue, G., and Okano, H. (2018) Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent. *Nat. Med.* **24**, 1579–1589.
  44. Selva, P. and Srinivasan, V. (2016) Antioxidant activities of ropinirole and pramipexole novel drugs used in treatment of parkinsonism: An in vitro approach. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **9**, 105–107.
  45. Chen, S., Zhang, X., Yang, D., Du, Y., Li, L., Li, X., Ming, M., and Le, W. (2008) D2/D3 receptor agonist ropinirole protects dopaminergic cell line against rotenone-induced apoptosis through inhibition of caspase- and JNK-dependent pathways. *FEBS Lett.* **582**, 603–610.
  46. Bhandari, V. and Bateman, A. (1992) Structure and chromosomal location of the human granulin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 57–63.
  47. Zhu, J., Nathan, C., Jin, W., Sim, D., Ashcroft, G. S., Wahl, S. M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wright, C. D., and Ding, A. (2002) Conversion of proepithelin to epithelins: Roles of SLPI and elastase in host

- defense and wound repair. *Cell* **111**, 867–878.
48. Suh, H.-S., Choi, N., Tarassishin, L., and Lee, S. C. (2012) Regulation of Progranulin Expression in Human Microglia and Proteolysis of Progranulin by Matrix Metalloproteinase-12 (MMP-12). *PLoS One* **7**, e35115.
  49. Butler, G. S., Dean, R. A., Tam, E. M., and Overall, C. M. (2008) Pharmacoproteomics of a Metalloproteinase Hydroxamate Inhibitor in Breast Cancer Cells: Dynamics of Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase-Mediated Membrane Protein Shedding. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 4896–4914.
  50. Kessenbrock, K., Fröhlich, L., Sixt, M., Lämmermann, T., Pfister, H., Bateman, A., Belaouaj, A., Ring, J., Ollert, M., Fässler, R., and Jenne, D. E. (2008) Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin. *J. Clin. Invest.* **118**, 2438–2447.
  51. Bai, X.-H., Wang, D.-W., Kong, L., Zhang, Y., Luan, Y., Kobayashi, T., Kronenberg, H. M., Yu, X.-P., and Liu, C.-J. (2009) ADAMTS-7, a direct target of PTHrP, adversely regulates endochondral bone growth by associating with and inactivating GEP growth factor. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4201–4219.
  52. Lee, C. W., Stankowski, J. N., Chew, J., Cook, C. N., Lam, Y., Almeida, S., Carlomagno, Y., Lau, K., Prudencio, M., Gao, F., Bogyo, M., Dickson, D. W., and Petrucelli, L. (2017) The lysosomal protein cathepsin L is a progranulin protease. *Mol. Neurodegener.* **12**, 55.
  53. Okura, H., Yamashita, S., Ohama, T., Saga, A., Yamamoto-Kakuta, A., Hamada, Y., Sougawa, N., Ohyama, R., Sawa, Y., and Matsuyama, A. (2010) HDL/apolipoprotein A-I binds to macrophage-derived progranulin and suppresses its conversion into proinflammatory granulins. *J. Atheroscler. Thromb.* **17**, 568–577.
  54. Petkau, T. L., Neal, S. J., Orban, P. C., MacDonald, J. L., Hill, A. M., Lu, G., Feldman, H. H., Mackenzie, I. R. A., and Leavitt, B. R. (2010) Progranulin expression in the developing and adult murine brain. *J. Comp. Neurol.* **518**, 3931–3947.
  55. Baker, M., Mackenzie, I. R., Pickering-Brown, S. M., Gass, J., Rademakers, R., Lindholm, C., Snowden, J., Adamson, J., Sadovnick, A. D., Rollinson, S., Cannon, A., Dwosh, E., Neary, D., Melquist, S., Richardson, A., Dickson, D., Berger, Z., Eriksen, J., Robinson, T., Zehr, C., Dickey, C. A., Crook, R., McGowan, E., Mann, D., Boeve, B., Feldman, H., and Hutton, M. (2006) Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* **442**, 916–919.

56. Cruts, M., Gijselinck, I., Van Der Zee, J., Engelborghs, S., Wils, H., Pirici, D., Rademakers, R., Vandenberghe, R., Dermaut, B., Martin, J. J., Van Duijn, C., Peeters, K., Sciot, R., Santens, P., De Pooter, T., Mattheijssens, M., Van Den Broeck, M., Cuijt, I., Vennekens, K., De Deyn, P. P., Kumar-Singh, S., and Van Broeckhoven, C. (2006) Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* **442**, 920–924.
57. Van Damme, P., Van Hoecke, A., Lambrechts, D., Vanacker, P., Bogaert, E., Van Swieten, J., Carmeliet, P., Van Den Bosch, L., and Robberecht, W. (2008) Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival. *J. Cell Biol.* **181**, 37–41.
58. Minami, S. S., Min, S. W., Krabbe, G., Wang, C., Zhou, Y., Asgarov, R., Li, Y., Martens, L. H., Elia, L. P., Ward, M. E., Mucke, L., Farese, R. V., and Gan, L. (2014) Progranulin protects against amyloid  $\beta$  2 deposition and toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Nat. Med.* **20**, 1157–1164.
59. Tsuruma, K., Yamauchi, M., Sugitani, S., Otsuka, T., Ohno, Y., Nagahara, Y., Ikegame, Y., Shimazawa, M., Yoshimura, S., Iwama, T., and Hara, H. (2014) Progranulin, a Major Secreted Protein of Mouse Adipose-Derived Stem Cells, Inhibits Light-Induced Retinal Degeneration. *Stem Cells Transl. Med.* **3**, 42–53.
60. Kuse, Y., Tsuruma, K., Mizoguchi, T., Shimazawa, M., and Hara, H. (2017) Progranulin deficiency causes the retinal ganglion cell loss during development. *Sci. Rep.* **7**, 1679.
61. Takahashi, K., Nakamura, S., Shimazawa, M., and Hara, H. (2021) Retinal Degeneration and Microglial Dynamics in Mature Progranulin-Deficient Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 11557.
62. Takahashi, K., Nakamura, S., Shimazawa, M., and Hara, H. Progranulin Insufficiency Affects Lysosomal Homeostasis in Retinal Pigment Epithelium. *In Vivo* **36**, 610–617.
63. Tang, W., Lu, Y., Tian, Q.-Y., Zhang, Y., Guo, F.-J., Liu, G.-Y., Syed, N. M., Lai, Y., Lin, E. A., Kong, L., Su, J., Yin, F., Ding, A.-H., Zanin-Zhorov, A., Dustin, M. L., Tao, J., Craft, J., Yin, Z., Feng, J. Q., Abramson, S. B., Yu, X.-P., and Liu, C. (2011) The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science* **332**, 478–484.
64. Salazar, D. A., Butler, V. J., Argouarch, A. R., Hsu, T.-Y., Mason, A., Nakamura, A., McCurdy, H., Cox, D., Ng, R., Pan, G., Seeley, W. W., Miller, B. L., and Kao, A. W. (2015) The Progranulin Cleavage Products, Granulins, Exacerbate TDP-43 Toxicity and Increase TDP-43 Levels. *J. Neurosci.* **35**,

- 9315–9328.
65. Kojima, Y., Ono, K., Inoue, K., Takagi, Y., Kikuta, K. ichiro, Nishimura, M., Yoshida, Y., Nakashima, Y., Matsumae, H., Furukawa, Y., Mikuni, N., Nobuyoshi, M., Kimura, T., Kita, T., and Tanaka, M. (2009) Progranulin expression in advanced human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* **206**, 102–108.
  66. Beel, S., Herdewyn, S., Fazal, R., De Decker, M., Moisse, M., Robberecht, W., Van Den Bosch, L., and Van Damme, P. (2018) Progranulin reduces insoluble TDP-43 levels, slows down axonal degeneration and prolongs survival in mutant TDP-43 mice. *Mol. Neurodegener.* **13**, 55.
  67. Beel, S., Moisse, M., Damme, M., De Muynck, L., Robberecht, W., Van Den Bosch, L., Saftig, P., and Van Damme, P. (2017) Progranulin functions as a cathepsin D chaperone to stimulate axonal outgrowth in vivo. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 2850–2863.
  68. Datta, S., Cano, M., Ebrahimi, K., Wang, L., and Handa, J. T. (2017) The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Prog. Retin. Eye Res.* **60**, 201–218.
  69. Age-Related Eye Disease Study Research Group. (2001) A Randomized, Placebo-Controlled, Clinical Trial of High-Dose Supplementation With Vitamins C and E, Beta Carotene, and Zinc for Age-Related Macular Degeneration and Vision Loss. *Arch. Ophthalmol.* **119**, 1417.
  70. Age-Related Eye Disease Study 2 Research Group. (2013) Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *JAMA* **309**, 2005–2015.
  71. Inoue, Y., Shimazawa, M., Noda, Y., Nagano, R., Otsuka, T., Kuse, Y., Nakano, Y., Tsuruma, K., Nakagami, Y., and Hara, H. (2017) RS9, a novel Nrf2 activator, attenuates light-induced death of cells of photoreceptor cells and Müller glia cells. *J. Neurochem.* **141**, 750–765.
  72. Perrie, Y., Badhan, R. K. S., Kirby, D. J., Lowry, D., Mohammed, A. R., and Ouyang, D. (2012) The impact of ageing on the barriers to drug delivery. *J. Control. Release* **161**, 389–398.
  73. Ashok, A., Singh, N., Chaudhary, S., Bellamkonda, V., Kritikos, A. E., Wise, A. S., Rana, N., McDonald, D., and Ayyagari, R. (2020) Retinal degeneration and alzheimer’s disease: An evolving link. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–17.
  74. Van Kampen, J. M., Baranowski, D., and Kay, D. G. (2014) Progranulin gene

- delivery protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *PLoS One* **9**, e97032.
75. Egashira, Y., Suzuki, Y., Azuma, Y., Takagi, T., Mishiro, K., Sugitani, S., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Yoshimura, S., Kashimata, M., Iwama, T., and Hara, H. (2013) The growth factor progranulin attenuates neuronal injury induced by cerebral ischemia-reperfusion through the suppression of neutrophil recruitment. *J. Neuroinflammation* **10**, 105.
  76. Sennlaub, F., Auvynet, C., Calippe, B., Lavalette, S., Poupel, L., Hu, S. J., Dominguez, E., Camelo, S., Levy, O., Guyon, E., Saederup, N., Charo, I. F., Rooijen, N. Van, Nandrot, E., Bourges, J.-L., Behar-Cohen, F., Sahel, J.-A., Guillonnet, X., Raoul, W., and Combadiere, C. (2013) CCR2(+) monocytes infiltrate atrophic lesions in age-related macular disease and mediate photoreceptor degeneration in experimental subretinal inflammation in Cx3cr1 deficient mice. *EMBO Mol. Med.* **5**, 1775–1793.
  77. Moriguchi, M., Nakamura, S., Inoue, Y., Nishinaka, A., Nakamura, M., Shimazawa, M., and Hara, H. (2018) Irreversible photoreceptors and RPE cells damage by intravenous sodium iodate in mice is related to macrophage accumulation. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **59**, 3476–3487.
  78. Takahashi, K., Nakamura, S., Otsu, W., Shimazawa, M., and Hara, H. (2021) Progranulin deficiency in Iba-1+ myeloid cells exacerbates choroidal neovascularization by perturbation of lysosomal function and abnormal inflammation. *J. Neuroinflammation* **18**, 164.
  79. Saint-Geniez, M., Kurihara, T., Sekiyama, E., Maldonado, A. E., and D'Amore, P. A. (2009) An essential role for RPE-derived soluble VEGF in the maintenance of the choriocapillaris. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 18751–18756.
  80. Kurihara, T., Westenskow, P. D., Bravo, S., Aguilar, E., and Friedlander, M. (2012) Targeted deletion of Vegfa in adult mice induces vision loss. *J. Clin. Invest.* **122**, 4213–4217.
  81. Saint-Geniez, M., Maharaj, A. S. R., Walshe, T. E., Tucker, B. A., Sekiyama, E., Kurihara, T., Darland, D. C., Young, M. J., and D'Amore, P. A. (2008) Endogenous VEGF Is Required for Visual Function: Evidence for a Survival Role on Müller Cells and Photoreceptors. *PLoS One* **3**, e3554.
  82. Kim, J., Park, J. R., Choi, J., Park, I., Hwang, Y., Bae, H., Kim, Y., Choi, W. J., Yang, J. M., Han, S., Chung, T. Y., Kim, P., Kubota, Y., Augustin, H. G., Oh, W. Y., and Koh, G. Y. (2019) Tie2 activation promotes choriocapillary regeneration for alleviating neovascular age-related macular degeneration. *Sci. Adv.* **5**, 1–17.

83. Sakaue, T., Sakakibara, I., Uesugi, T., Fujisaki, A., Nakashiro, K. I., Hamakawa, H., Kubota, E., Joh, T., Imai, Y. K., Izutani, H., and Higashiyama, S. (2017) The CUL3-SPOP-DAXX axis is a novel regulator of VEGFR2 expression in vascular endothelial cells. *Sci. Rep.* **7**, 1–16.
84. Kovačević, I., Sakaue, T., Majoleć, J., Pronk, M. C., Maekawa, M., Geerts, D., Fernandez-Borja, M., Higashiyama, S., and Hordijk, P. L. (2018) The Cullin-3-Rbx1-KCTD10 complex controls endothelial barrier function via K63 ubiquitination of RhoB. *J. Cell Biol.* **217**, 1015–1032.
85. Maekawa, M., Tanigawa, K., Sakaue, T., Hiyoshi, H., Kubota, E., Joh, T., Watanabe, Y., Taguchi, T., and Higashiyama, S. (2017) Cullin-3 and its adaptor protein ANKFY1 determine the surface level of integrin  $\beta$ 1 in endothelial cells. *Biol. Open* **6**, 1707–1719.
86. Ohnuki, H., Inoue, H., Takemori, N., Nakayama, H., Sakaue, T., Fukuda, S., Miwa, D., Nishiwaki, E., Hatano, M., Tokuhisa, T., Endo, Y., Nose, M., and Higashiyama, S. (2012) BAZF, a novel component of cullin3-based E3 ligase complex, mediates VEGFR and Notch cross-signalling in angiogenesis. *Blood* **119**, 3–5.
87. Ahmad, I., Balasubramanian, S., del Debbio, C. B., Parameswaran, S., Katz, A. R., Toris, C., and Fariss, R. N. (2011) Regulation of ocular angiogenesis by notch signaling: Implications in neovascular age-related macular degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 2868–2878.
88. Lobov, I. B., Renard, R. A., Papadopoulos, N., Gale, N. W., Thurston, G., Yancopoulos, G. D., and Wiegand, S. J. (2007) Delta-like ligand 4 (DII4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 3219–3224.
89. Zhang, S., Kim, J. Y., Xu, S., Liu, H., Yin, M., Koroleva, M., Guo, J., Pei, X., and Jin, Z. G. (2020) Endothelial-specific YY1 governs sprouting angiogenesis through directly interacting with RBPJ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 4792–4801.
90. Takamori, M., Hatano, M., Arima, M., Sakamoto, A., Fujimura, L., Hartatik, T., Kuriyama, T., and Tokuhisa, T. (2004) BAZF is required for activation of naive CD4 T cells by TCR triggering. *Int. Immunol.* **16**, 1439–1449.
91. Shen, Y., Zhuang, P., and Chiou, G. C. Y. (2011) Effect of Guanabenz on rat AMD models and rabbit choroidal blood flow. *Open Org. Chem. J.* **5**, 27–31.
92. Nehru, V., Voytyuk, O., Lennartsson, J., and Aspenström, P. (2013) Rhod binds the rab5 effector rabankyrin-5 and has a role in trafficking of the platelet-derived



- growth factor receptor. *Traffic* **14**, 1242–1254.
93. Miwa, D., Sakaue, T., Inoue, H., Takemori, N., Kurokawa, M., Fukuda, S., Omi, K., Goishi, K., and Higashiyama, S. (2013) Protein kinase D2 and heat shock protein 90 beta are required for BCL6-associated zinc finger protein mRNA stabilization induced by vascular endothelial growth factor-A. *Angiogenesis* **16**, 675–688.
  94. Minakuchi, Y., Takeshita, F., Kosaka, N., Sasaki, H., Yamamoto, Y., Kouno, M., Honma, K., Nagahara, S., Hanai, K., Sano, A., Kato, T., Terada, M., and Ochiya, T. (2004) Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo. **32**
  95. Ito, Y., Nozaki, M., Sugitani, K., Ashikari, M., Hirano, Y., and Ogura, Y. (2013) Efficient delivery of siRNA by atelocollagen in a murine laser-induced choroidal neovascularization model. *Ophthalmologica* **230**, 215–221.
  96. Miyagi, S., Nishinaka, A., Yamamoto, T., Otsu, W., Nakamura, S., Shimazawa, M., Kitaoka, T., and Hara, H. (2021) Establishment of a pigmented murine model abundant with characteristics of retinal vein occlusion. *Exp. Eye Res.* **204**, 108441.
  97. Ogura, S., Kurata, K., Hattori, Y., Takase, H., Ishiguro-Oonuma, T., Hwang, Y., Ahn, S., Park, I., Ikeda, W., Kusuhara, S., Fukushima, Y., Nara, H., Sakai, H., Fujiwara, T., Matsushita, J., Ema, M., Hirashima, M., Minami, T., Shibuya, M., Takakura, N., Kim, P., Miyata, T., Ogura, Y., and Uemura, A. (2017) Sustained inflammation after pericyte depletion induces irreversible blood-retina barrier breakdown. *JCI Insight* **2**, 1–22.
  98. Dominguez, E., Raoul, W., Calippe, B., Sahel, J. A., Guillonnet, X., Paques, M., and Sennlaub, F. (2015) Experimental branch retinal vein occlusion induces upstream pericyte loss and vascular destabilization. *PLoS One* **10**, 1–14.
  99. Nishinaka, A., Nakamura, S., Tanaka, M., Masuda, T., Inoue, Y., Yamamoto, T., Imai, T., Hidaka, Y., Shimazawa, M., and Hara, H. (2021) Excess adiponectin in eyes with progressive ocular vascular diseases. *FASEB J.* **35**, 1–19.
  100. Nishinaka, A., Inoue, Y., Fuma, S., Hida, Y., Nakamura, S., Shimazawa, M., and Hara, H. (2018) Pathophysiological role of VEGF on retinal edema and nonperfused areas in mouse eyes with retinal vein occlusion. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **59**, 4701–4713.
  101. Park, D. Y., Lee, J., Kim, J., Kim, K., Hong, S., Han, S., Kubota, Y., Augustin, H. G., Ding, L., Kim, J. W., Kim, H., He, Y., Adams, R. H., and Koh, G. Y. (2017) Plastic roles of pericytes in the blood-retinal barrier. *Nat. Commun.* **8**, 1–

- 16.
102. Nagelhus, E. A., Horio, Y., Inanobe, A., Fujita, A., Haug, F. M., Nielsen, S., Kuhachi, Y., and Ottersen, O. P. (1999) Immunogold evidence suggests that coupling of K<sup>+</sup> siphoning and water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* **26**, 47–54.
103. Wang, J., Xu, E., Elliott, M. H., Zhu, M., and Le, Y. Z. (2010) Müller cell-derived VEGF is essential for diabetes-induced retinal inflammation and vascular leakage. *Diabetes* **59**, 2297–2305.
104. Xin, X., Rodrigues, M., Umapathi, M., Kashiwabuchi, F., Ma, T., Babapoor-Farrokhran, S., Wang, S., Hu, J., Bhutto, I., Welsbie, D. S., Duh, E. J., Handa, J. T., Eberhart, C. G., Lutty, G., Semenza, G. L., Montaner, S., and Sodhi, A. (2013) Hypoxic retinal Müller cells promote vascular permeability by HIF-1-dependent up-regulation of angiopoietin-like 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**
105. Rodrigues, M., Xin, X., Jee, K., Babapoor-Farrokhran, S., Kashiwabuchi, F., Ma, T., Bhutto, I., Hassan, S. J., Daoud, Y., Baranano, D., Solomon, S., Lutty, G., Semenza, G. L., Montaner, S., and Sodhi, A. (2013) VEGF secreted by hypoxic Müller cells induces MMP-2 expression and activity in endothelial cells to promote retinal neovascularization in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes* **62**, 3863–3873.
106. Fuma, S., Nishinaka, A., Inoue, Y., Tsuruma, K., and Shimazawa, M. (2017) A pharmacological approach in newly established retinal vein occlusion model. *Nat. Publ. Gr.* 1–14.
107. Rehak, M., Hollborn, M., Iandiev, I., Pannicke, T., Karl, A., Wurm, A., Kohen, L., Reichenbach, A., Wiedemann, P., and Bringmann, A. (2009) Retinal gene expression and müller cell responses after branch retinal vein occlusion in the rat. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 2359–2367.
108. Jopling, H. M., Howell, G. J., Gamper, N., and Ponnambalam, S. (2011) The VEGFR2 receptor tyrosine kinase undergoes constitutive endosome-to-plasma membrane recycling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **410**, 170–176.
109. Jopling, H. M., Odell, A. F., Hooper, N. M., Zachary, I. C., Walker, J. H., and Ponnambalam, S. (2009) Rab GTPase regulation of VEGFR2 trafficking and signaling in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1119–1124.
110. Basagiannis, D. and Christoforidis, S. (2016) Constitutive Endocytosis of VEGFR2 Protects the Receptor against Shedding. *J. Biol. Chem.* **291**, 16892–

- 16903.
111. Zhu, W., Shi, D. S., Winter, J. M., Rich, B. E., Tong, Z., Sorensen, L. K., Zhao, H., Huang, Y., Tai, Z., Mleynek, T. M., Yoo, J. H., Dunn, C., Ling, J., Bergquist, J. A., Richards, J. R., Jiang, A., Lesniewski, L. A., Hartnett, M. E., Ward, D. M., Mueller, A. L., Ostanin, K., Thomas, K. R., Odelberg, S. J., and Li, D. Y. (2017) Small GTPase ARF6 controls VEGFR2 trafficking and signaling in diabetic retinopathy. *J. Clin. Invest.* **127**, 4569–4582.
  112. Jopling, H. M., Odell, A. F., Pellet-Many, C., Latham, A. M., Frankel, P., Sivaprasadarao, A., Walker, J. H., Zachary, I. C., and Ponnambalam, S. (2014) Endosome-to-Plasma Membrane Recycling of VEGFR2 Receptor Tyrosine Kinase Regulates Endothelial Function and Blood Vessel Formation. *Cells* **3**, 363–385.
  113. Basagiannis, D., Zografou, S., Murphy, C., Fotsis, T., Morbidelli, L., Ziche, M., Bleck, C., Mercer, J., and Christoforidis, S. (2016) VEGF induces signalling and angiogenesis by directing VEGFR2 internalisation through macropinocytosis. *J. Cell Sci.* **129**, 4091–4104.
  114. Matsunaga, N., Chikaraishi, Y., Shimazawa, M., Yokota, S., and Hara, H. (2010) Vaccinium myrtillus (bilberry) extracts reduce angiogenesis in vitro and in vivo. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **7**, 47–56.
  115. Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., and Shibuya, M. (2001) A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC- $\gamma$  and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* **20**, 2768–2778.
  116. Wong, C. and Jin, Z. G. (2005) Protein kinase C-dependent protein kinase D activation modulates ERK signal pathway and endothelial cell proliferation by vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* **280**, 33262–33269.
  117. Fujio, Y. and Walsh, K. (1999) Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **274**, 16349–16354.
  118. Icli, B., Wu, W., Ozdemir, D., Li, H., Cheng, H. S., Haemmig, S., Liu, X., Giatsidis, G., Avci, S. N., Lee, N., Guimaraes, R. B., Manica, A., Marchini, J. F., Rynning, S. E., Risnes, I., Hollan, I., Croce, K., Yang, X., Orgill, D. P., and Feinberg, M. W. (2019) MicroRNA-615-5p Regulates Angiogenesis and Tissue Repair by Targeting AKT/eNOS (Protein Kinase B/Endothelial Nitric Oxide Synthase) Signaling in Endothelial Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39**, 1458–1474.

119. Framme, C., Panagakis, G., and Birngruber, R. (2010) Effects on choroidal neovascularization after anti-VEGF upload using intravitreal ranibizumab, as determined by spectral domain-optical coherence tomography. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 1671–1676.
120. Tillet, E., Vittet, D., Féraud, O., Moore, R., Kemler, R., and Huber, P. (2005) N-cadherin deficiency impairs pericyte recruitment, and not endothelial differentiation or sprouting, in embryonic stem cell-derived angiogenesis. *Exp. Cell Res.* **310**, 392–400.
121. Li, F., Lan, Y., Wang, Y., Wang, J., Yang, G., Meng, F., Han, H., Meng, A., Wang, Y., and Yang, X. (2011) Endothelial Smad4 Maintains Cerebrovascular Integrity by Activating N-Cadherin through Cooperation with Notch. *Dev. Cell* **20**, 291–302.
122. Behzadian, M. A., Wang, X. L., Windsor, L. J., Ghaly, N., and Caldwell, R. B. (2001) TGF- $\beta$  increases retinal endothelial cell permeability by increasing MMP-9: Possible role of glial cells in endothelial barrier function. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**, 853–859.
123. Bai, Y., Ma, J., Guo, J., Wang, J., Zhu, M., Chen, Y., and Le, Y.-Z. (2009) Müller cell-derived VEGF is a significant contributor to retinal neovascularization. *J. Pathol.* **219**, 446–454.
124. Aslam, M., Ahmad, N., Srivastava, R., and Hemmer, B. (2012) TNF- $\alpha$  induced NF $\kappa$ B signaling and p65 (RelA) overexpression repress Cldn5 promoter in mouse brain endothelial cells. *Cytokine* **57**, 269–275.
125. Argaw, A. T., Gurfein, B. T., Zhang, Y., Zameer, A., and John, G. R. (2009) VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 1977–1982.
126. McLaren, N. C. and Moroi, S. E. (2003) Clinical implications of pharmacogenetics for glaucoma therapeutics. *Pharmacogenomics J.* **3**, 197–201.
127. Morrison, J. C., Johnson, E. C., Cepurna, W., and Jia, L. (2005) Understanding mechanisms of pressure-induced optic nerve damage. *Prog. Retin. Eye Res.* **24**, 217–240.
128. Vancea, P. P. and Abu-Taleb, A. (2005) Current trends in neovascular glaucoma treatment. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi* **109**, 264–268.
129. Hayreh, S. S. (2021) Photocoagulation for retinal vein occlusion. *Prog. Retin. Eye Res.* **85**, 100964.
130. Miller, J. W., Adamis, A. P., Shima, D. T., D'Amore, P. A., Moulton, R. S., O'Reilly, M. S., Folkman, J., Dvorak, H. F., Brown, L. F., Berse, B., Yeo, T. K.,

- and Yeo, K. T. (1994) Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am. J. Pathol.* **145**, 574–584.
131. Kuzmin, A., Lipatov, D., Chistyakov, T., Smirnova, O., Arbuzova, M., Ilin, A., Shestakova, M., and Dedov, I. (2013) Vascular Endothelial Growth Factor in Anterior Chamber Liquid Patients with Diabetic Retinopathy, Cataract and Neovascular Glaucoma. *Ophthalmol. Ther.* **2**, 41–51.
  132. Selim, K. M., Sahan, D., Muhittin, T., Osman, C., and Mustafa, O. (2010) Increased levels of vascular endothelial growth factor in the aqueous humor of patients with diabetic retinopathy. *Indian J. Ophthalmol.* **58**, 375–379.
  133. Dumbrăveanu, L., Cuşnir, V., and Bobescu, D. (2022) A review of neovascular glaucoma. Etiopathogenesis and treatment. *Rom. J. Ophthalmol.* **65**, 315–329.
  134. Ando, R., Noda, K., Namba, S., Saito, W., Kanda, A., and Ishida, S. (2014) Aqueous humour levels of placental growth factor in diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol.* **92**, 245–246.
  135. Inatani, M., Higashide, T., Matsushita, K., Nagasato, D., Takagi, H., Ueki, M., Takai, Y., Miyazaki, K., Iwamoto, Y., Kobayashi, M., and Leal, S. (2021) Efficacy and Safety of Intravitreal Aflibercept Injection in Japanese Patients with Neovascular Glaucoma: Outcomes from the VENERA Study. *Adv. Ther.* **38**, 1106–1115.
  136. Chen, K. H., Wu, C. C., Roy, S., Lee, S. M., and Liu, J. H. (1999) Increased interleukin-6 in aqueous humor of neovascular glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 2627–2632.
  137. Yu, X.-B., Sun, X.-H., Dahan, E., Guo, W.-Y., Qian, S.-H., Meng, F.-R., Song, Y.-L., and Simon, G. J. Ben. Increased levels of transforming growth factor-beta1 and -beta2 in the aqueous humor of patients with neovascular glaucoma. *Ophthalmic Surg. Lasers Imaging* **38**, 6–14.
  138. Min, S. H., Lee, T. Il, Chung, Y. S., and Kim, H. K. (2006) Transforming growth factor-beta levels in human aqueous humor of glaucomatous, diabetic and uveitic eyes. *Korean J. Ophthalmol.* **20**, 162–165.
  139. Khuu, L.-A., Tayyari, F., Sivak, J. M., Flanagan, J. G., Singer, S., Brent, M. H., Huang, D., Tan, O., and Hudson, C. (2017) Aqueous humour concentrations of TGF- $\beta$ , PLGF and FGF-1 and total retinal blood flow in patients with early non-proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol.* **95**, e206–e211.
  140. Li, H., Wang, H., Wang, F., Gu, Q., and Xu, X. (2011) Snail Involves in the Transforming Growth Factor  $\beta$ 1-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition of

- Retinal Pigment Epithelial Cells. *PLoS One* **6**, e23322.
141. Kita, T., Hata, Y., Arita, R., Kawahara, S., Miura, M., Nakao, S., Mochizuki, Y., Enaida, H., Goto, Y., Shimokawa, H., Hafezi-Moghadam, A., and Ishibashi, T. (2008) Role of TGF- $\beta$  in proliferative vitreoretinal diseases and ROCK as a therapeutic target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 17504–17509.
  142. Cao, Y., Feng, B., Chen, S., Chu, Y., and Chakrabarti, S. (2014) Mechanisms of endothelial to mesenchymal transition in the retina in diabetes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, 7321–7331.
  143. Connor, T. B., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Danielpour, D., Dart, L. L., Michels, R. G., De Bustros, S., Enger, C., Kato, H., Lansing, M., Hayashi, H., and Glaser, B. M. (1989) Correlation of fibrosis and transforming growth factor- $\beta$  type 2 levels in the eye. *J. Clin. Invest.* **83**, 1661–1666.
  144. Fleenor, D. L., Shepard, A. R., Hellberg, P. E., Jacobson, N., Pang, I. H., and Clark, A. F. (2006) TGF $\beta$ 2-induced changes in human trabecular meshwork: Implications for intraocular pressure. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **47**, 226–234.
  145. Ozaki, H., Yu, A. Y., Della, N., Ozaki, K., Luna, J. D., Yamada, H., Hackett, S. F., Okamoto, N., Zack, D. J., Semenza, G. L., and Campochiaro, P. A. (1999) Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  is increased in ischemic retina: Temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 182–189.
  146. Noma, H., Funatsu, H., Mimura, T., Harino, S., Sone, T., and Hori, S. (2010) Increase of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in the aqueous humour of patients with macular oedema and central retinal vein occlusion. *Acta Ophthalmol.* **88**, 646–651.
  147. Noma, H., Funatsu, H., Mimura, T., Harino, S., and Hori, S. (2010) Aqueous humor levels of vasoactive molecules correlate with vitreous levels and macular edema in central retinal vein occlusion. *Eur. J. Ophthalmol.* **20**, 402–409.

## 略語一覽表

Akt	protein kinase B
ANKFY1	ankyrin repeat and FYVE domain containing 1
AQP4	aquaporin 4
BCL6B	B-cell CLL/lymphoma 6 member B protein
BRB	blood-retinal barrier
BTB	Bric-a-brac, Tramtrack and Broad Complex
CBF1	C promotor-binding factor 1
CNV	choroidal neovascularization
CRVO	central retinal vein occlusion
CUL3	Cullin 3
DCP	deep capillary plexus
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
ERG	electroretinogram
FITC	fluorescein isothiocyanate
GCL	ganglion cell layer
GS	glutamine synthetase
H&E	Hematoxylin and Eosin
HIF-1 $\alpha$	hypoxia inducible factor-1 $\alpha$
HRMEC	human retinal microvascular endothelial cell
HSP90 $\beta$	heat shock protein 90 beta
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
Iba-1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
IB-4	isolectin B4

ICP	intermediate capillary plexus
IL	interleukin
INL	inner nuclear layer
MAPK	p38 mitogen-activated protein kinases
MMP	matrix metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
NF- $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B
NG2	neuron-glia antigen 2
NICD	notch intracellular domain
NVG	neovascular glaucoma
OCT	optical coherence tomography
ONL	outer nuclear layer
PI	propidium iodide
PLC $\gamma$	phospholipase C- $\gamma$
PIGF	placental growth factor
ROS	reactive oxygen species
RPCP	radial peripapillary capillary plexus
RVO	retinal vein occlusion
SCP	superficial capillary plexus
TGF- $\beta$	transforming growth factor
TNFR2	tumor necrosis factor receptor 2
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR2	vascular endothelial growth factor receptor 2