

## 目 次

緒論.....	1
本論	
第 1 章 虚血性網膜症の病的血管新生における apelin-APJ system の関与.....	3
実験方法.....	4
実験結果	
1-1. OIR モデルマウスにおける網膜血管の形態変化.....	8
1-2. OIR モデルマウスの網膜における apelin および APJ の発現変化.....	9
1-3. OIR モデルマウスの網膜における APJ の発現分布 .....	11
1-4. 網膜の異常血管新生に対する apelin 遺伝子欠損の影響 .....	13
1-5. Apelin-KO-OIR モデルマウスの網膜における VEGF および VEGFR2 の 発現変化.....	16
1-6. 虚血性網膜症患者の硝子体における apelin 量の増加 .....	17
考察.....	18
第 2 章 Apelin 発現抑制による網膜血管成熟化の促進 .....	21
実験方法.....	22
実験結果	
2-1. Apelin 発現抑制による血管壁細胞遊走因子の発現誘導 .....	25
2-2. Apelin siRNA を導入した血管内皮細胞の培養上清による血管平滑筋細胞の 遊走促進 .....	28
2-3. Apelin siRNA の硝子体内投与による網膜の周皮細胞動員の促進 .....	30

2-4. Apelin siRNA の硝子体内投与による網膜の異常血管新生の抑制 .....	33
考察 .....	35
第3章 虚血性網膜症の新規治療薬としての APJ 阻害薬の有用性 .....	38
実験方法 .....	39
実験結果	
3-1. 血管内皮細胞の増殖に対する APJ 阻害薬の抑制作用 .....	41
3-2. 網膜の異常血管新生に対する APJ 阻害薬の抑制作用 .....	42
考察 .....	45
総括 .....	48
謝辞 .....	50
引用文献 .....	51

## 緒 論

増殖性糖尿病網膜症や未熟児網膜症などの虚血性網膜症は、中途失明を引き起こす眼疾患であり、その原因は、網膜虚血によって惹起される血管新生であることが明らかにされている<sup>1,2</sup>。生理的条件下における血管新生では、組織の需要に応じて組織内に整然と血管が構築されるが、虚血性網膜症で誘導される病的血管新生では、無秩序に血管が形成され、網膜虚血領域だけでなく、網膜組織表面から硝子体中に新生血管が発育する。この硝子体中に伸長した新生血管は、血管壁が脆弱なため、容易に破綻し、硝子体出血をもたらす。さらに、この硝子体に漏出した血液成分が網膜組織を線維化させることで硝子体と網膜の癒着を招き、線維化した組織が収縮すると、牽引性網膜剥離が引き起こされ、最悪の場合、失明をもたらす<sup>2</sup>。これらのことから、現在行われている虚血性網膜症の治療は、この病的な血管新生を阻害することを主眼としている。

虚血性網膜症に対して以前から行われているレーザー照射による網膜凝固術は、虚血部位を凝固して酸素需要量を減らすことで血管新生を未然に防ぐことにより網膜症の進行を阻止する<sup>3</sup>。しかし、本治療法は、網膜組織の破壊に伴う疼痛や、光凝固後の瘢痕拡大および視細胞の不可逆的な損傷により視力低下を招く危険性がある。一方、病的血管新生を誘導する因子として血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) が同定され<sup>4</sup>、レーザー光凝固術に加えて、本因子を標的とした薬物治療が開始されている。現在、虚血性網膜症患者に対して、抗 VEGF 抗体のラニズマブ (ルセンティス) と VEGF トラップ融合タンパクであるアフリベルセプト (アイリール) の硝子体内投与が行われ、これら VEGF 阻害薬は、病的血管新生の消失や血管閉塞に伴う網膜浮腫の改善効果を示すことが報告されている<sup>5</sup>。しかしながら、VEGF 阻害薬は、優れた治療効果を示す一方で、全身性の副作用を起こすことや<sup>6</sup>、治療途中に効果が消失する可能性があること<sup>7</sup>、および奏効しない症例があるなど<sup>8</sup>、様々な問題が報告されている。さらに、VEGF 阻害薬により病的血管新生の阻害効果が一時的に得られるものの、網膜虚血が改善されないため、一定期間後に病的血管新生が再燃する症例が報告されている<sup>9</sup>。また、硝子体内の VEGF 量と病的血管新生の発生が相関しない例が存在することから<sup>10</sup>、VEGF は、病的血管新生に特化した因子ではないことが推測される。これらのことから、虚血性網膜症で生じる病的血管新生に関与する新たな因子の同定とそれを阻害する治療薬の開発が求められている。

APJ は、ヒトゲノム計画により 1993 年に発見された G タンパク質共役型受容体であり、アンジオテンシン II 受容体 (AT1) の膜貫通領域のアミノ酸配列と高い類似性をもつオーファン受容体として見出された<sup>11</sup>。APJ の内因性リガンドとして 1998 年に同定された apelin (APJ endogenous ligand) は、77 アミノ酸残基のプレプロペプチドからペプチダーゼによって切り出される C 末端側の 13、17 または 36 アミノ酸残基の構造をもつ生理活性ペプチドである<sup>12</sup>。これまでに、apelin-APJ system は、循環器系に影響を与えることが多くの研究によって明らかにされており、心収縮力調節作用<sup>13</sup>や血圧降下作用<sup>14</sup>および飲水調節作用<sup>15</sup>などを有することが報告されている。一方、アフリカツメガエルを用いた研究から、胚形成期において新たに形成された血管の内皮細胞に APJ の発現がみられることが報告され<sup>16</sup>、apelin-APJ system の血管形成に対する役割について注目が集まった。これまでに、マウスやアフリカツメガエルの早期胚形成期に apelin-APJ system を阻害すると、脈管形成が抑制されることや<sup>17, 18</sup>、apelin が脂肪組織や癌組織における血管新生を促進させることが明らかにされている<sup>19, 20</sup>。また、アカゲザル脈絡膜網膜由来血管内皮細胞に対して、apelin が増殖、遊走、管腔形成作用を示すことや<sup>21</sup>、網膜において新生血管の内皮細胞に apelin と APJ が発現すること<sup>22</sup>、および apelin 遺伝子を欠損させた (Knockout: KO) マウスでは、網膜血管新生が遅延することから<sup>23</sup>、apelin-APJ system が網膜血管新生の促進シグナルとして機能することが明らかにされている。さらに、apelin 遺伝子上流に位置するプロモーター領域に低酸素誘導因子が結合する低酸素応答配列が存在し、apelin 発現が低酸素により誘導されることや<sup>24</sup>、下肢虚血モデルマウスの虚血領域由来の血管内皮細胞において、apelin および APJ が高発現することが報告されており<sup>25</sup>、apelin-APJ system が低酸素に応答するシグナルとして様々な病態に関与する可能性が示唆されている。これらのことから、虚血性網膜症でみられる病的血管新生に apelin-APJ system が関与すること、および本シグナルの阻害薬が虚血性網膜症の病的血管新生を抑制できる可能性が考えられる。

本研究では、虚血性網膜症の病的血管新生における apelin-APJ system の病態生理学的意義と新規治療薬としての APJ 阻害薬の有用性を明らかにすることを目的として、虚血性網膜症モデルマウス、虚血性網膜症患者の硝子体サンプル、および培養細胞を用いて検討を行った。

## 本 論

### 第 1 章 虚血性網膜症の病的血管新生における apelin-APJ system の関与

網膜虚血を引き起こす網膜血管障害の要因は、虚血性網膜症の種類によって様々であるが、網膜虚血によって病的網膜血管新生が惹起される過程は、いずれの虚血性網膜症においても一致している。この病態を再現できる動物モデルとして、マウスを用いた oxygen-induced retinopathy (OIR) モデルが知られている<sup>26</sup>。

マウスの網膜血管形成は、生後直後から開始される。この過程では、生後約 7 日間で網膜表層の血管網の形成が起き、その後、約 10 日間で網膜内層の血管網が形成され、網膜全体の血管網が完成する<sup>27</sup>。OIR モデルでは、網膜血管形成途中の生後 7 日目 (postnatal day 7) (P7) からマウスを 75%酸素条件下で 5 日間飼育することで未成熟な血管の消失により網膜中心付近に無血管領域が生じる。その後、通常酸素濃度 (20.9%) に飼育環境を急激に変化させることにより無血管領域に向かって血管新生が誘導される。この相対的な低酸素症により誘発される血管新生では、生理的条件下で生じる網膜血管新生とは異なり、硝子体中に伸長する房状形態をした異常血管が多数形成される。このように OIR モデルでは、網膜虚血により誘発される異常血管新生がみられ、この異常血管の性質がヒト虚血性網膜症で生じる病的血管と類似しているため、本モデルが虚血性網膜症の病態解明と治療薬の開発研究に広く用いられている。

疾患への関与が未だ明らかにされていない内因性物質の病態生理学的意義を明らかにするためには、その因子をコードする遺伝子を欠失させた KO 動物を用いて疾患モデルを作製し、その表現型を解析する方法が非常に有用である。そこで本章では、野生型 (wild type: WT) マウスおよび apelin-KO マウス<sup>18</sup>を用いて OIR モデルを作製し、虚血性網膜症で生じる病的血管新生に apelin-APJ system が関与するか否かについて検討を行った。

## 実験方法

### 1-1. 実験動物

C57BL/6N マウス (WT マウス) は、日本エスエルシー株式会社から購入した。C57BL/6N 系を遺伝子背景に持つ apelin-KO マウス<sup>18</sup> は、武田薬品工業株式会社から入手した。マウスは透明ケージで飼育し、室温 22 ± 1°C、照明時間：1日 12 時間（7 時～19 時）の飼育条件下で、餌と水を自由に摂取させた。動物の飼育および実験はすべて日本薬理学会の実験動物に関する指針に基づき、摂南大学の動物実験に関する規定に従って実施した。

### 1-2. マウスの遺伝子型判定

マウスの尾部より採取した 5 μL の血液を 50 mM NaOH 50 μL と混和し、30 分間室温で放置した。その後、1M Tris-HCl (pH 8.0) を 5.5 μL 加えて中和し、遠心後、上清を deoxyribonucleic acid (DNA) サンプルとして用いた。

遺伝子型判定には、polymerase chain reaction (PCR) 法を用いた。DNA ポリメラーゼ試薬として、KOD-FX (TOYOBO) を用いた。PCR 反応は、サーマルサイクラー T100 (Bio-Rad) で行い、94°C で 2 分間 DNA を熱変性させ、その後、98°C で 10 秒、70.3°C で 2 分間を 1 サイクルとして、30 サイクル行った。反応後の PCR 産物は、0.5 μg/mL ethidium bromide を含む 1% agarose gel を用いた電気泳動により分離し、ultraviolet (UV) transilluminator (Upland) により DNA バンドを検出した。用いたプライマー配列は、Table 1 に示す。

**Table 1. Primers used for the mouse genotyping analysis**

Gene	Sequence
Apelin F	5'-CAGGAGGAAATTTTCGCAGACAGC-3'
Apelin R	5'-ACCGGCACCGGGAGGGCACTT-3'
Neomycin F	5'-ATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCT-3'
Neomycin R	5'-CCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAG-3'

### 1-3. OIR モデル

OIR モデルは、P7 のマウスを母親マウスと共に 5 日間 75%の酸素濃度に維持したチャンパー内で飼育し、その後、数日間、通常酸素濃度で飼育することにより作製した。酸素濃度のモニタリングには、JKO-25 II (JIKCO) を用いた。

### 1-4. 網膜血管の解析

マウスを 50 mg/mL 抱水クロラール (500 mg/kg body weight) の腹腔内投与により麻酔し、腹部および胸部を切り開き、右心房を切開後、左心室より生理食塩水に溶解した 40 mg/mL fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (2,000,000 molecular weight, Sigma-Aldrich) を 500  $\mu$ L を灌流した。灌流後に摘出した眼球を 4% paraformaldehyde を含むリン酸緩衝液で 1 時間室温にて浸漬固定した。その後、実体顕微鏡下で眼球から網膜を単離し、切開後、スライドガラス上にカバーガラスと Fluoromount G (Southern Biotech) を用いて封入し、網膜フラットマウントを作製した。網膜血管は、蛍光顕微鏡 (AZ-100M, Nikon) で観察した。網膜血管量の定量は、Image J (National Institutes of Health) を用いて行った<sup>28</sup>。

### 1-5. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (real-time RT-PCR)

安楽死させたマウスから網膜を単離し、ribonucleic acid (RNA) の分解を抑制するため、直ちに RNA later solution (Ambion) に浸漬した。網膜からの RNA の抽出は、SV total RNA Isolation system (Promega) を用いた。抽出した total RNA 1  $\mu$ g を鋳型として、逆転写酵素 Maloney-murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT) (Invitrogen) および random primer を用いて cDNA を作製した。

Real-time RT-PCR 反応は、Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara) で行い、反応酵素溶液として THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いた。PCR 反応は、95°C 30 秒間で DNA の水素結合を解離させ、その後、95°C で 10 秒、60°C で 20 秒、72°C で 20 秒を 1 サイクルとして、40 サイクル行った。PCR 後、dissociation curve analysis により melting temperature ( $T_m$ ) 値を解析し、増幅産物が単一であることを確認した。また、reference gene として  $\beta$ -actin (ACTB) の発現を解析し、サンプル間の補正を行った。用いたプライマーの配列は、Table 2 に示す。

**Table 2. Primers used for real-time RT-PCR**

Gene	Sequence
Apelin F	5'-GTTGCAGCATGAATCTGAGG-3'
Apelin R	5'-CTGCTTTAGAAAGGCATGGG-3'
APJ F	5'-CCACCTGGTGAAGACTCTCTACA-3'
APJ R	5'-TGACATAACTGATGCAGGTGC-3'
VEGF F	5'-GGAGACTCTTCGAGGAGCACTT-3'
VEGF R	5'-GGCGATTTAGCAGCAGATATAAGAA-3'
VEGFR2 F	5'-CGACATAGCCTCCACTGTTTATG-3'
VEGFR2 R	5'-TTTGTCTTGTCTCGGTGATG-3'
ACTB F	5'-AGTGTGACGTTGACATCCGTA-3'
ACTB R	5'-GCCAGAGCAGTAATCTCCTTCT-3'

#### 1-6. 眼球切片を用いた組織解析

マウスを抱水クロラルにより麻酔後、左心室より生理食塩水を灌流し、続いて4% paraformaldehyde を含むリン酸緩衝液で灌流固定を行った。摘出した眼球を同固定液で24時間浸漬固定し、パラフィン包埋した。ミクロトームにより作製した5 $\mu$ mのパラフィン切片をスライドグラスに貼りつけ、キシレンで脱パラフィン後、エタノールおよび水道水により水和化し、Mayer's Hematoxylin 溶液中で10分間反応させ、水道水で洗浄後、0.1% Eosin Y ethanol 溶液中で3分間反応させた。エタノールおよびキシレンによる透徹後、ソフトマウント (Wako) により封入し、顕微鏡 (AZ-100M, Nikon) で観察した。

#### 1-7. 免疫組織化学染色

マウスを灌流固定後、眼球を摘出し、4% paraformaldehyde を含むリン酸緩衝液で1時間浸漬固定し、網膜を単離した。0.1% Triton X-100 を含む Tris-buffered saline (TBS-Tri) で洗浄後、1% fetal bovine serum を含む0.5% TBS-Tri 中で室温にて3時間ブロッキングおよび浸透化を行った。その後、FITC-conjugated Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia isolectin B4 (Vector Laboratories, Inc.) および rabbit anti-APJ polyclonal antibody を4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。抗APJ抗体は、マウスAPJのC末端領域由来の合成ペプチド (C-PGPNMGKGGEQMHEKSIPYSQETLVD) をウサギに免疫させることにより作製した。抗APJ抗体を検出するため、goat anti-rabbit IgG Alexa 568-conjugated

antibody (Molecular probes) を室温で 2 時間反応させた。網膜を切り開き、Fluoromount G (Southern Biotech) で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000-D, Olympus) で観察した。

増殖細胞の検出には、5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (Sigma-Aldrich) を用いた。マウスに BrdU を灌流固定の 48 時間、24 時間および 2 時間前に腹腔内投与 (100 mg/kg body weight) し、眼球パラフィン切片を作製した。脱パラフィン、水和化の後、10 mM citrate buffer (pH 6.0) 中でマイクロウェーブ (500W、10 分間 × 2 回) による抗原賦活化処理を行った。DNA 安定化のため 50% formaldehyde/standard saline citrate 溶液に 65°C で 2 時間インキュベートし、adenine/BrdU の水素結合を解離させるため 2N HCl を 37°C で 30 分間反応させ、さらに 0.1 M Sodium Borate buffer (pH 8.5) で中和させた。Mouse IgG-blocking reagent (Vector Laboratories, Inc.) を含む 0.5% TBS-Tri でブロッキングを行い、mouse anti-BrdU antibody (BD Biosciences) を 4°C で一晩反応させ、続いて、biotinylated anti-mouse IgG (DAKO) および streptavidin-FITC を反応させた。Fluoromount G (Southern Biotech) により封入し、蛍光顕微鏡 (AZ-100M, Nikon) で観察した。

#### 1-8. 虚血性網膜症患者の硝子体における apelin 量の解析

ヒト硝子体サンプルは、匿名性を確保した状態で、大阪大学医学部眼科学教室から入手した。硝子体手術あるいは硝子体内薬剤投与を行う際に、通常は廃棄される硝子体液を採取し、直ちに急速冷凍したものを硝子体サンプルとして用いた。硝子体サンプル中の apelin 量の測定は、Apelin-12 EIA kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc.) を用いて enzyme immunoassay (EIA) 法により行った。本実験に関して、大阪大学大学院医学系研究科の倫理委員会の承認を受け、患者すべてのインフォームドコンセントを得た上で、ヘルシンキ宣言で表明された原則に従って倫理的に行われた。

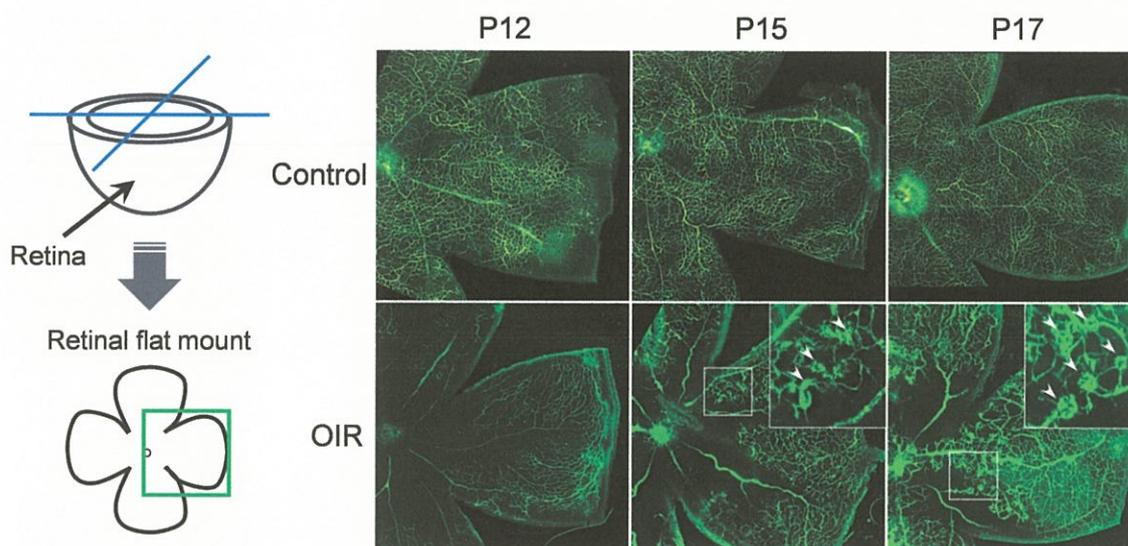
#### 1-9. 統計学的解析

統計解析は、Student's *t*-test または two-way ANOVA を行い、post hoc test として、Bonferroni's test を行った。これらの検定により、 $p < 0.05$  の場合に有意差ありとした。すべての結果を平均値 ± 標準誤差で示した。

## 実験結果

### 1-1. OIR モデルマウスにおける網膜血管の形態変化

WT マウスを用いて OIR モデルマウスを作製し、網膜血管を解析した。P7 から 5 日間高酸素条件下で飼育した P12 のマウスでは、網膜中心部分に広い無血管領域が観察された (Fig. 1, lower panels)。P12 から数日間、通常飼育した OIR モデルマウスの網膜では、経時的に無血管領域へ向かって新生血管の形成がみられ、そのうちの多数の血管が房状形態を示した (Fig. 1, arrowheads in the lower panels)。これらの異常形態をもった血管は、日齢が一致するコントロールマウスの網膜ではまったくみられなかった (Fig. 1, upper panels)。



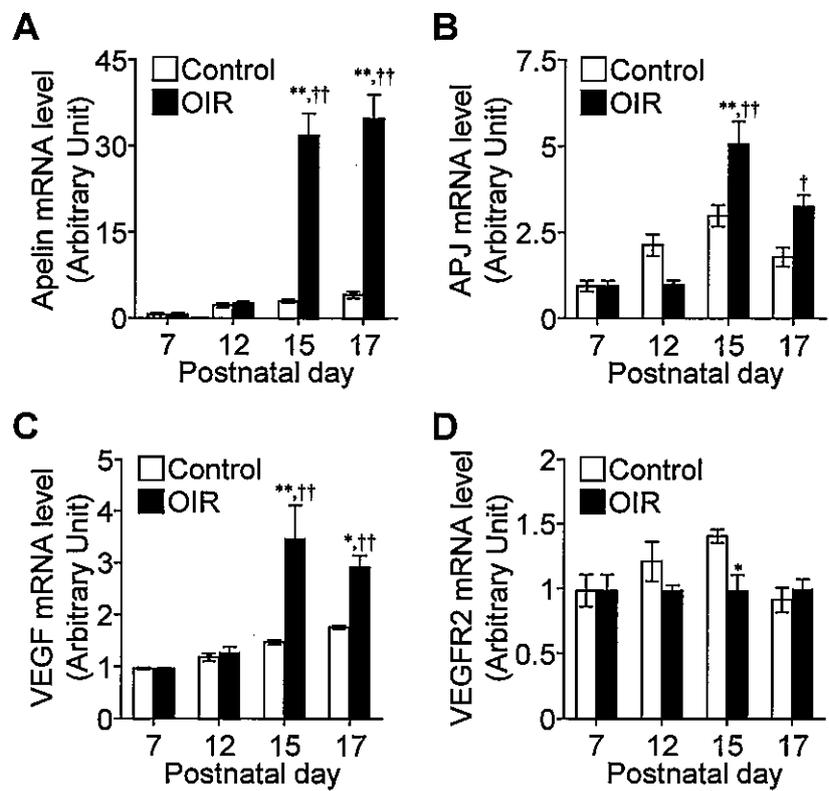
**Figure 1. A mouse model of oxygen-induced retinopathy**

Representative pictures show retinal vessels visualized with FITC-dextran perfusion in the control mice and the OIR model mice. Arrowheads indicate neovascular tufts.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30(11):2182-2187 (2010) から引用 (一部改変)

## 1-2. OIR モデルマウスの網膜における apelin および APJ の発現変化

OIR モデルマウスの網膜における apelin mRNA および APJ mRNA の発現変化について、real-time RT-PCR 法を用いて解析した。以前の報告<sup>23</sup>と一致して、コントロールマウスの網膜における apelin および APJ の mRNA は、P7 と比較して、P12 から P17 にかけて発現上昇がみられた (Fig. 2A and B)。一方、OIR モデルマウスの網膜における apelin mRNA の発現は、高酸素暴露直後の P12 の網膜では、P7 と比較してほとんど変化がみられなかったが、異常血管新生が生じる P15 および P17 の網膜では、P7 と比較して約 30 倍と著明な増加がみられた (Fig. 2A)。APJ mRNA は、P12 の網膜において、コントロールマウスと比較して発現抑制がみられ、P15 および P17 の網膜において、有意な発現上昇がみられた (Fig. 2B)。また、OIR モデルマウスの網膜における VEGF および VEGF の血管新生に関与する受容体である VEGFR2 の mRNA の発現変化を解析した。その結果、VEGF mRNA は、apelin mRNA と同様に病的血管新生に伴い発現上昇がみられたが、apelin mRNA の増加と比べて著明なものではなかった (Fig. 2C)。一方、VEGFR2 mRNA は、病的血管新生に伴う発現上昇はみられなかった (Fig. 2D)。



**Figure 2. Gene expressions in the retinas of OIR model mice**

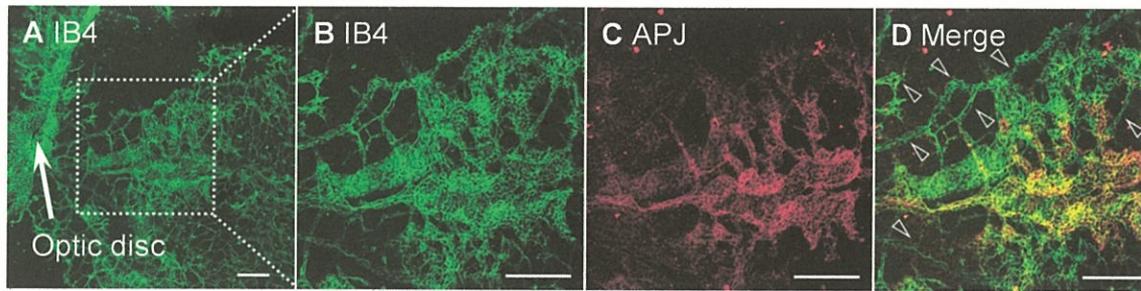
Apelin (A), APJ (B), VEGF (C), and VEGFR2 (D) mRNA expressions in the retinas of the OIR model mice were analyzed by real-time RT-PCR (n = 3 - 4). Data were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test and represent the mean  $\pm$  SEM. \* $p$  < 0.05 and \*\* $p$  < 0.01 vs. control, † $p$  < 0.05 and †† $p$  < 0.01 vs. P7.

*Sci. Rep.* 7(1):15062 (2017) から引用 (一部改変)

### 1-3. OIR モデルマウスの網膜における APJ の発現分布

OIR モデルマウスの網膜の apelin の標的細胞を同定する目的で P17 の OIR モデルマウスから網膜を摘出し、抗 APJ 抗体および血管内皮細胞マーカーである isolectin B4 を用いて二重免疫染色を行った (Fig. 3A-D)。その結果、強い APJ 陽性反応が房状形態の血管の内皮細胞に認められた (Fig. 3D)。一方、正常形態の血管の内皮細胞には、APJ 陽性反応はほとんどみられなかった (Fig. 3D, arrowheads)。

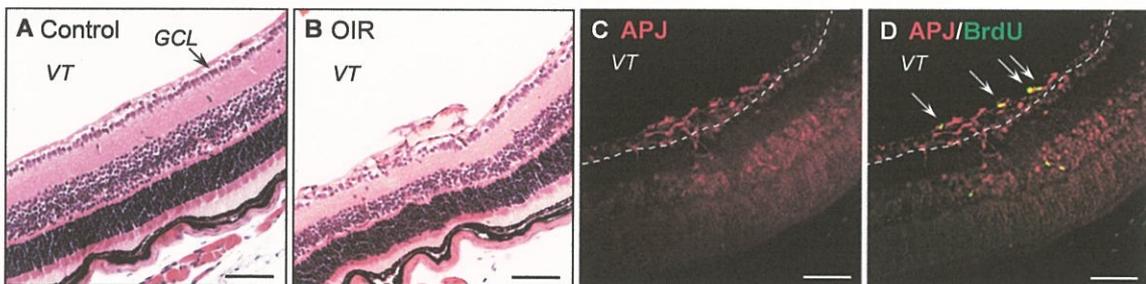
次に、増殖細胞を標識するために BrdU を投与した P17 の OIR モデルマウスの眼球のパラフィン切片を作製し、HE 染色および抗 APJ 抗体と抗 BrdU 抗体を用いて二重免疫染色を行った。HE 染色像において、OIR モデルマウスの網膜では、コントロールマウスではまったくみられない網膜表面から硝子体内に侵入した細胞が多数みられた (Fig. 4 A and B)。この網膜表面から硝子体内に侵入した細胞では強い APJ 陽性反応がみられ (Fig. 4C)、APJ 陽性細胞には BrdU 陽性反応が観察された (Fig. 4D, arrows)。



**Figure 3. APJ is highly expressed in the endothelial cells within neovascular tufts**

(A-D) Representative pictures show double immunofluorescence of isolectin B4 (IB4; green) and APJ (red) in a retinal flat-mount from the OIR model mice at P17. The boxed area in (A) is shown enlarged in (B). Arrowheads indicate APJ-negative normal endothelial cells. These pictures were taken with a confocal laser scanning microscope. Scale bars, 100  $\mu\text{m}$ .

*Sci. Rep.* 7(1):15062 (2017) から引用 (一部改変)



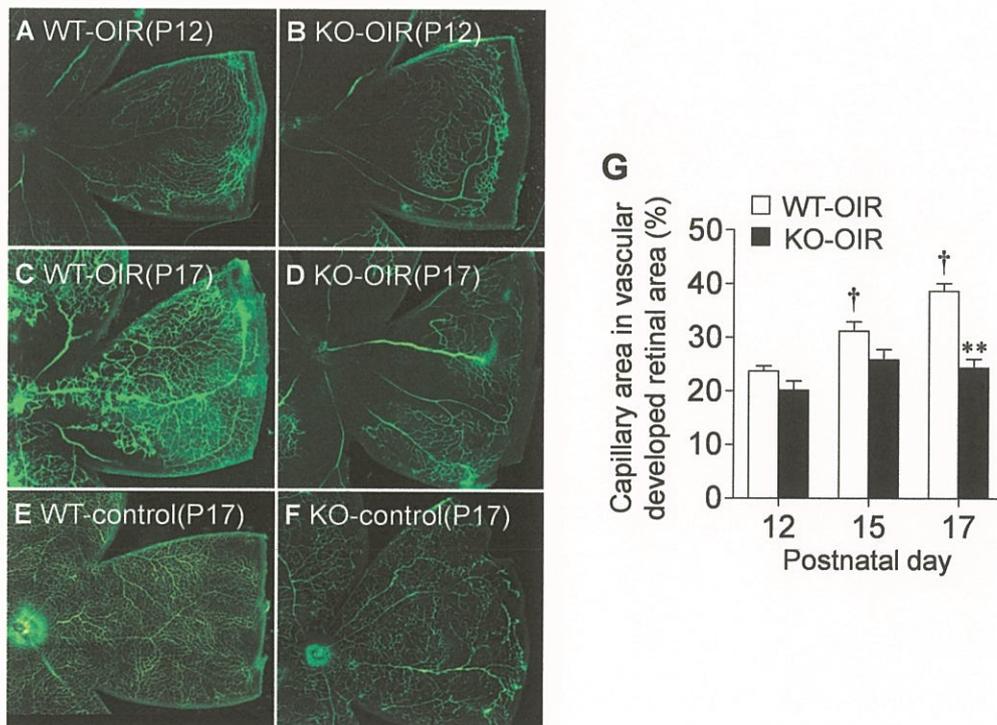
**Figure 4. APJ is robustly expressed in the proliferative cells within the neovessels growing from the retina into the vitreous body**

(A and B) HE-stained retinal sections from the control mice (A) and the OIR model mice (B) at P17 are shown. (C and D) Representative pictures show double immunostaining for APJ (red) and BrdU (green) in the retinal sections from the OIR model mice at P17. VT, vitreous; GCL, ganglion cell layer; dotted line, ganglion cell layer; arrows, double-labeled cells. Scale bars, 50  $\mu\text{m}$ .

*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30(11):2182-2187 (2010) から引用 (一部改変)

#### 1-4. 網膜の異常血管新生に対する apelin 遺伝子欠損の影響

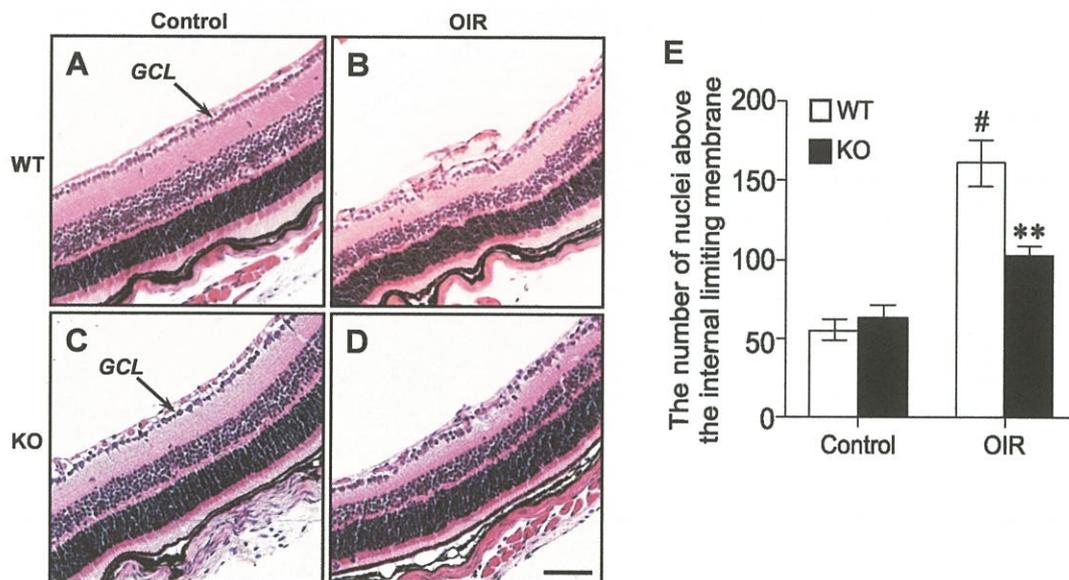
OIR モデルマウスの網膜で生じる異常血管新生に対する内因性 apelin の影響を明らかにするため、apelin-KO マウスを用いて OIR モデル (KO-OIR) を作製した。P12 の KO-OIR モデルマウスの網膜では、WT マウスを用いた OIR モデル (WT-OIR) の P12 と同様に高酸素暴露により網膜中心部分に広い無血管領域がみられ、残存する血管密度も WT-OIR モデルマウスと同程度であった (Fig. 5A, B and G)。しかしながら、P17 の KO-OIR モデルマウスの網膜では、P17 の WT-OIR モデルマウスでみられた房状形態の異常血管はほとんどみられなかった (Fig. 5C and D)。網膜の血管領域を定量化すると、WT-OIR モデルマウスでは P12 から P17 にかけて経時的に血管領域の著明な増加がみられたが、KO-OIR モデルマウスでは血管領域の有意な増加はみられず、P17 において WT-OIR モデルマウスと比較して有意に低下していた (Fig. 5G)。一方、通常飼育した P17 の apelin-KO マウスの網膜血管は、同日齢の WT マウスと比較して、血管密度がやや低いが、網膜全体に形成されていた (Fig. 5E and F)。



**Figure 5. Apelin deficiency in mice reduces pathological retinal angiogenesis induced by OIR**  
(A-F) Representative pictures show retinal vessels visualized with FITC-dextran perfusion in WT and KO mice with or without OIR. (G) The retinal capillary area in the OIR model mice was quantified. Data were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test and represent the mean  $\pm$  SEM.  $**p < 0.01$  vs. WT-OIR,  $†p < 0.05$  vs. P12.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30(11):2182-2187 (2010) から引用 (一部改変)

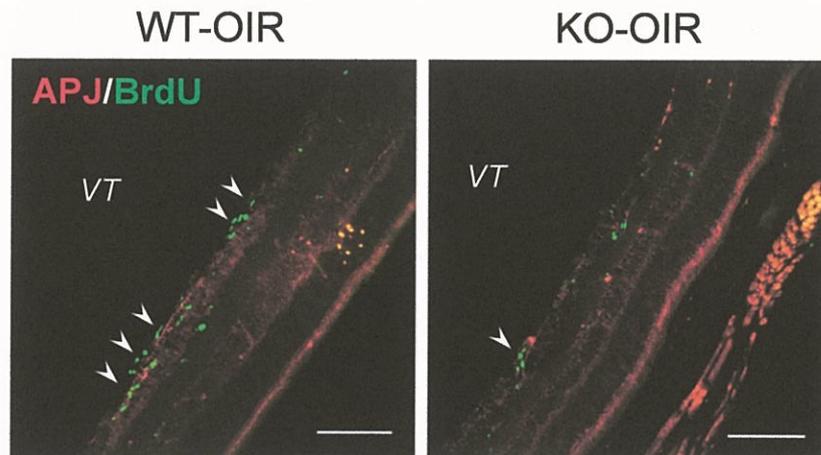
次に硝子体内への血管新生に対する apelin 欠損の影響を検討するため、P17 の WT-OIR モデルマウスと KO-OIR モデルマウスの眼球のパラフィン切片を HE 染色した。P17 の WT-OIR モデルマウスの網膜では、網膜表面から硝子体内に侵入した細胞が多数みられた (Fig. 6B)。また、網膜最内層の神経節細胞層より硝子体側に存在する細胞の核の数は、正常マウスの網膜と比較して WT-OIR モデルマウスの網膜において著明に増加していた (Fig. 6E)。一方、KO-OIR モデルマウスの網膜では、網膜表面の構造がやや乱れているものの、硝子体内に侵入した細胞はほとんどみられず (Fig. 6D)、神経節細胞層より硝子体側に存在する細胞の核の数は、WT-OIR モデルマウスと比較して有意に低値を示した (Fig. 6E)。また、通常飼育した apelin-KO マウスの網膜では、WT マウスと同様に網膜表面から硝子体内に侵入する細胞はまったくみられなかった (Fig. 6A and C)。さらに、P17 の KO-OIR モデルマウスの網膜における BrdU を染色した結果、WT-OIR モデルマウスと比較して、網膜表面に検出される BrdU は少なかった (Fig. 7, arrowheads)。



**Figure 6. Apelin deficiency in mice inhibits intravitreal neovascularization in OIR**

(A-D) HE-stained retinal sections from WT and KO mice with or without OIR at P17 are shown. GCL, ganglion cell layer. (E) The number of the cell nuclei above the retinal ganglion cell layer was counted. Data were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test and represent the mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$  vs. WT, # $p < 0.05$  vs. control. Scale bar, 50  $\mu$ m.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30(11):2182-2187 (2010) から引用 (一部改変)



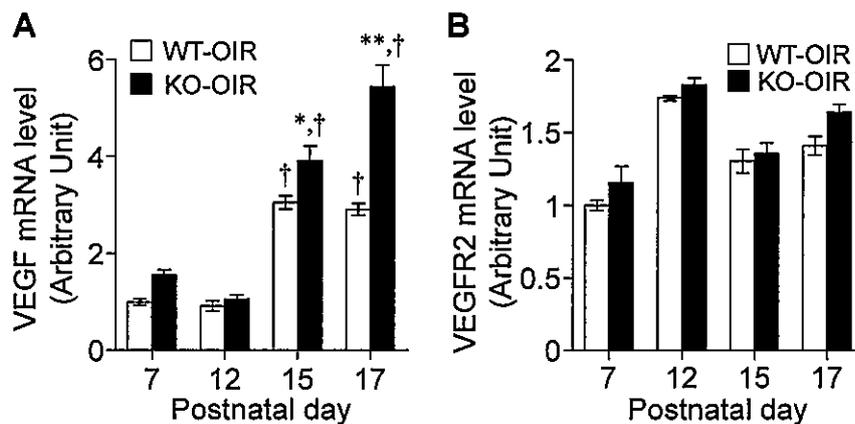
**Figure 7. Apelin deficiency in mice decreases proliferation of the cells at the retinal surface induced by OIR**

Representative pictures show double immunostaining for APJ (red) and BrdU (Green) in the retinal sections from WT-OIR and KO-OIR model mice at P17. VT, vitreous. Scale bars, 50  $\mu$ m. Arrowheads indicate proliferating cells.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30(11):2182-2187 (2010) から引用 (一部改変)

### 1-5. Apelin-KO-OIR モデルマウスの網膜における VEGF および VEGFR2 の発現変化

KO-OIR モデルマウスの網膜における病的血管新生の低下が VEGF および VEGFR2 の発現低下に起因するか否かについて、real-time RT-PCR 法により検討した。その結果、KO-OIR モデルマウスの網膜における VEGF mRNA の発現は、WT-OIR モデルマウスと同様に、高酸素暴露中の P7 から P12 ではほとんど変化がみられず、P15 および P17 において、著明な増加がみられた (Fig. 8A)。さらに、この発現増加は、同日齢の WT-OIR モデルマウスと比較して有意に高かった (Fig. 8A)。また、VEGFR2 mRNA の発現は、WT-OIR モデルマウスと KO-OIR モデルマウスとの間でほとんど差はみられなかった (Fig. 8B)。



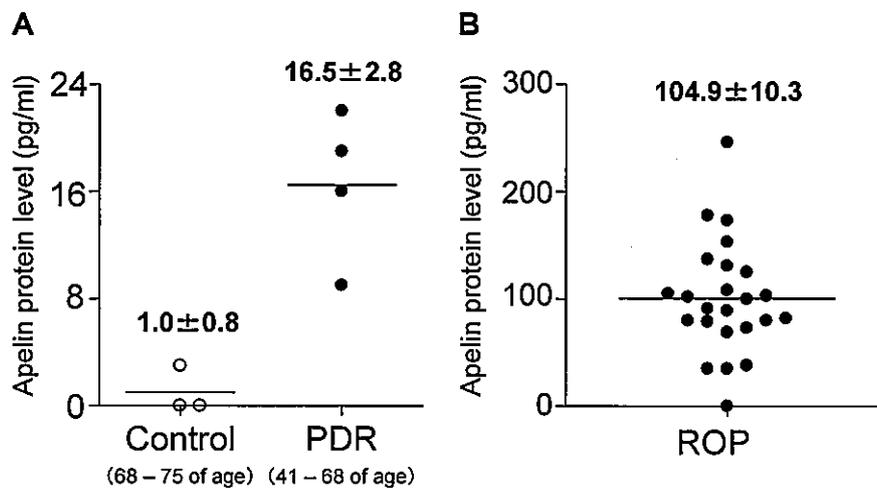
**Figure 8. VEGF and VEGFR2 mRNA expressions in the retinas of the OIR model using apelin-KO mice**

VEGF (A) and VEGFR2 (B) mRNA expressions in the retinas of OIR model mice were analyzed by real-time RT-PCR (n = 4-5). Data were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test and represent the mean  $\pm$  SEM. \* $p$  < 0.05 and \*\* $p$  < 0.01 vs. WT-OIR, † $p$  < 0.05 vs. P7.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30(11):2182-2187 (2010) から引用

### 1-6. 虚血性網膜症患者の硝子体における apelin 量の増加

病的血管新生に伴う apelin 発現の上昇がマウス特有の現象ではなく、ヒトでも起きているか否かを明らかにするため、虚血性網膜症の代表格である増殖性糖尿病網膜症および未熟児網膜症患者の硝子体内 apelin 濃度を解析した。対照群として用いた血管新生を伴わない眼疾患患者の硝子体では、3 例中 2 例で apelin 濃度が検出限界以下であった (Fig. 9A)。一方、増殖性糖尿病網膜症患者の硝子体では、4 例すべてで apelin が検出され、対照群と比較して、有意に高値を示した (対照群:  $1.0 \pm 0.8$  pg/mL、増殖性糖尿病網膜症患者群:  $16.5 \pm 2.8$  pg/mL) (Fig. 9A)。未熟児網膜症患者の硝子体サンプルでは、24 例中 1 例が検出限界以下であったが、その他の例では、すべて高濃度の apelin が検出された ( $104.9 \pm 10.3$  pg/mL) (Fig. 9B)。



**Figure 9. Apelin concentrations in the vitreous body of the patients with ischemic retinopathy**  
Apelin concentrations in the vitreous samples of the patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR) (A) (n = 3 - 4) or retinopathy of prematurity (ROP) (B) (n = 24) were determined by EIA. Data were analyzed by Student's *t* test and represent the mean  $\pm$  SEM.

## 考 察

本章では、虚血性網膜症で生じる病的血管新生に apelin-APJ system が関与するか否かを明らかにすることを目的として、OIR モデルマウスを用いて検討を行った。その結果、OIR モデルマウスの網膜において、異常血管新生が生じる時期に apelin の発現が著明に増加し、この増加は、既存の血管新生促進因子である VEGF の発現増加と比較して、極めて高いものであった。Apelin 受容体 APJ は、網膜において異常血管新生が起こる時期に発現が上昇し、房状形態をした異常血管の増殖性の高い内皮細胞に発現していた。また、apelin-KO マウスを用いた OIR モデルの網膜では、WT-OIR モデルマウスと同様に、高酸素暴露による無血管領域の形成と VEGF の発現誘導がみられたが、異常血管新生はほとんどみられなかった。以上の結果より、虚血性網膜症で生じる病的血管新生には、apelin-APJ system の著明な活性化により引き起こされる血管内皮細胞の過増殖が関与する可能性が示唆された。

これまでの報告と一致して、OIR モデルマウスの網膜では、高酸素暴露により網膜中央部の血管が消失し、その後、通常酸素に戻すことによりヒト虚血性網膜症と類似した房状形態の異常血管が多数形成された。この異常血管の形成機構は完全には明らかにされていないが、P7 から高酸素飼育したマウスを P12 で通常酸素飼育に戻さずに P27 まで高酸素飼育し続けると、異常血管新生が生じることなく正常形態の血管が形成されることが明らかにされている<sup>29</sup>。これは、網膜組織が急激に低酸素症を引き起こすことで病的血管新生が惹起されることを示している。今回、OIR モデルマウスの網膜における apelin の発現は、高酸素暴露中にはほとんど変化しなかったが、通常酸素飼育に戻した後から急激に増加した。Apelin および APJ の発現増加は、生理的な血管新生が起こっている網膜でもみられたが、OIR モデルの異常血管新生が起こる時期の網膜において顕著であった。さらに、KO-OIR モデルマウスでは、高酸素により網膜に無血管領域が生じていたにもかかわらず、異常血管新生はほとんどみられなかった。これらの結果は、網膜組織の低酸素状態により引き起こされる apelin-APJ system の著明な活性化が病的血管新生を引き起こす要因であることを示唆している。

OIR モデルマウスの網膜において、APJ は、房状形態の異常血管を構成する内皮細胞に高発現し、正常形態の血管の内皮細胞にはほとんど発現がみられなかった。この発現パターンは、虚血性心疾患モデルマウスの心虚血領域において、新生リンパ管の内皮細胞特異的に APJ の発現がみられることや<sup>30</sup>、腫瘍組織内の血管内皮細胞に APJ

が高発現している結果と類似している<sup>31</sup>。これらの知見は、虚血組織において血管新生が盛んに起きている内皮細胞で apelin-APJ system が特異的に活性化していることを示唆している。また、生理的な血管新生が起きているマウスの網膜において、APJ が静脈および静脈に付随する毛細血管の内皮細胞に発現すること<sup>22</sup>、および OIR モデルマウスの網膜では、異常網膜血管新生が静脈と静脈に付随する毛細血管から生じることが明らかにされている<sup>32,33</sup>。これらの報告から、P17 の OIR モデルマウスの網膜で異常血管の内皮細胞に強い APJ 陽性反応がみられたのは、著明に発現上昇した apelin によって静脈や静脈に付随する毛細血管の APJ 陽性血管内皮細胞が過増殖した結果によるものである可能性が考えられた。

これまでの研究から、異常網膜血管新生に関わる因子として、insulin-like growth factor-1 (IGF-1)<sup>34</sup>、Leptin<sup>35</sup>、および Adiponectin<sup>36</sup>などが報告されており、これらの因子は、VEGF や tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の発現調節を介して異常網膜血管新生に影響を与えることが明らかにされている。本研究において、KO-OIR モデルマウスの網膜では、WT-OIR モデルマウスと同程度の VEGF および VEGFR2 の発現がみられた。また、異常網膜血管新生に関与する H2AX<sup>37</sup>、Erythropoietin<sup>38</sup>、および TNF- $\alpha$ <sup>39</sup> の発現変化についても KO-OIR モデルマウスと WT-OIR モデルマウスの間で差はみられなかった (data not shown)。これらの結果は、KO-OIR モデルマウスの網膜における異常血管新生の低下には、少なくとも上記の血管新生促進因子は関与しないことを示唆している。

これまでの培養血管内皮細胞を用いた研究から、apelin は、APJ に結合することで extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) や phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt および mammalian Target of Rapamycin (mTOR) のリン酸化を介して p70 ribosomal S6 kinase (p70S6K) のリン酸化を誘導することにより細胞増殖を引き起こすことが明らかにされている<sup>40</sup>。一方、生理的な網膜血管新生が起こる時期のマウスを用いた研究から、apelin は、糸状仮足により新生血管の伸長方向を決定する先端に位置する内皮細胞である tip cells に発現がみられ、APJ は、tip cells に後続する増殖性の内皮細胞の stalk cells に発現がみられることが報告されている<sup>41</sup>。さらに、網膜血管新生期の apelin-KO マウスおよび APJ-KO マウスの網膜では、低酸素条件下において血管内皮細胞の増殖シグナル経路として機能する mTOR のリン酸化の減少がみられることが明らかにされている<sup>41,42</sup>。これらの報告と本実験での KO-OIR モデルマウスの網膜表面で検出された BrdU 陽性細胞数が少なかった結果を合わせて考察すると、

KO-OIR モデルマウスの網膜における異常血管の減少は、血管内皮細胞の増殖低下に起因する可能性が考えられた。

ヒト硝子体内の apelin 量を解析した結果、血管新生を伴わない眼疾患患者の硝子体では、apelin がほとんど検出されなかったが、増殖性糖尿病網膜症患者の硝子体では、apelin が検出された。さらに、未熟児網膜症患者の硝子体では、高濃度の apelin が検出された。これは、病的網膜血管新生に伴う apelin の発現上昇がヒトでも起きていることを示唆しており、apelin-APJ system が虚血性網膜症の新規治療標的となる可能性を示唆している。さらに、これらの試料中の VEGF 発現を解析した結果、apelin 発現との相関はみられず (data not shown)、この現象は、他の研究者らによって得られた結果と一致していた<sup>43</sup>。これらの結果は、VEGF 阻害薬が奏効しない症例に対して apelin-APJ system の阻害薬が効果を示す可能性を示唆している。

以上、本章では、網膜において apelin-APJ system が血管内皮細胞の過増殖を引き起こすことで、虚血性網膜症で生じる病的血管新生を促進させる可能性が示唆された。また、虚血性網膜症患者の硝子体において、apelin が高濃度検出されたことから、apelin-APJ system が虚血性網膜症の新規創薬標的分子となる可能性が示された。

## 第2章 Apelin 発現抑制による網膜血管成熟化の促進

生理的な血管新生では、①既存の血管から血管壁細胞（血管平滑筋細胞、周皮細胞）が離脱し、②その領域から、運動性が許容された血管内皮細胞を先頭に、後続する血管内皮細胞が増殖することにより血管内皮細胞の管腔が形成され、その後、③内皮細胞の管腔に血管壁細胞が動員され、安定した成熟血管が形成される<sup>44</sup>。しかし、虚血性網膜症で生じる病的血管新生では、血管壁細胞の欠落した脆弱な血管が生じること<sup>45</sup>、およびこの異常血管では、血管内皮細胞の過増殖が起きていることが報告されている<sup>46,47</sup>。また、急激な血管内皮細胞の増殖は、血管壁細胞の解離を引き起こし、血管の脆弱性を亢進させることが明らかにされている<sup>48</sup>。したがって、虚血性網膜症の網膜で血管内皮細胞の過増殖を引き起こすシグナルを抑制することによって、安定した成熟血管の形成を誘導できる可能性が考えられる。

第1章では、OIR モデルマウスの網膜において、apelin-APJ system の著明な活性化によって血管内皮細胞の過増殖が引き起こされることが示唆されたことから、apelin-APJ system を阻害することにより、血管成熟化を誘導できる可能性が考えられる。そこで本章では、apelin-APJ シグナルの抑制による網膜血管成熟化に対する影響について、培養細胞および OIR モデルマウスを用いて検討を行った。

## 実験方法

### 2-1. 細胞培養と培養細胞への small interfering RNA (siRNA) の導入

Montesano らによって樹立されたマウス血管内皮細胞株 bEnd.3 細胞<sup>49</sup>は、大阪大学大学院薬学研究科神経薬理学研究室から入手した。マウス血管平滑筋細胞株 p53LMAC01 細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから購入した。これらの細胞は、10% fetal bovine serum (FBS)、100 µg/mL streptomycin、100 IU/mL penicillin および 1 µg/mL amphotericin B を含む high glucose (4.5 g/L) Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) 中にて、5% CO<sub>2</sub>/95% air、37°C で培養した。bEnd.3 細胞への siRNA (20 µM) の導入は、細胞播種 24 時間後に培養上清を Opti-MEM (Invitrogen) に置換し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて行った。Apelin 遺伝子を標的とした siRNA (QIAGEN) の target sequence、sense strand、antisense strand は Table 3 に示す。既知の遺伝子と相同性のない control siRNA として、AllStars Negative Control siRNA (QIAGEN) を用いた。

**Table 3. Information on apelin siRNA**

Target sequence	5'-CAGAAGCTCGATATTCACCTTA-3'
Sense strand	5'-GAAGCUCGAUUAUUCACUUATT-3'
Antisense strand	5'-UAAGUGAAUAUCGAGCUUCTG-3'

### 2-2. Real-time RT-PCR

1-5 に準ずる。本章で用いたプライマーの配列を Table 4 に示す。

**Table 4. Primers used for real-time RT-PCR**

Gene	Sequence
PDGFB F	5'-GAATCAGGCATCGAGAGAGACG-3'
PDGFB R	5'-GCAAGACTGTGGGCAGGGTTAT-3'
TGF-β F	5'-CAGTGGCTGAACCAAGGAGAC-3'
TGF-β R	5'-ATCCCGTTGATTTCCACGTG-3'
MCP-1 F	5'-CCACTCACCTGCTGCTACTCAT-3'
MCP-1 R	5'-TGGTGATCCTCTTGTAGCTCTCC-3'

### 2-3. Western blotting

siRNA 導入後、bEnd.3 細胞を lysis buffer [20 mM Tris-HCl (pH7.5)、2% sodium dodecyl sulfate (SDS)、10 mM NaF、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、100 μM phenylmethylsulfonyl fluoride および 1 μg/mL aprotinin] により溶解した。10 分間煮沸を行い、遠心後、上清をサンプルとした。タンパク質定量後、サンプルに 5×Laemmli buffer (12.5 mM Tris-HCl、25% glycerol、5% SDS、0.2% bromophenol blue および 10% mercaptoethanol、pH 7.5) を加えて、10 分間煮沸した。SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、polyvinylidene difluoride transfer membrane (Millipore) に転写した。転写後、membrane を 0.05% Tween-20 を含む TBS (TBS-Tw) で洗浄後、skim milk を含む TBS-Tw でブロッキングを行った。一次抗体 [rabbit anti-MCP-1 (abcam)、rabbit anti-phospho-Smad3 (Rockland Immunochemicals, Inc.)、rabbit anti-Smad3 (Cell Signaling Technology Inc.)、rabbit anti-phospho-Akt (Cell Signaling Technology Inc.)、rabbit anti-Akt (Cell Signaling Technology Inc.) または horseradish peroxidase (HRP)-conjugated mouse anti-β-actin (abcam) antibodies] を 4°C で一晩反応させ、洗浄後、二次抗体 [HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Cell Signaling Technology Inc.)] を室温で 2 時間反応させた。TBS-Tw で洗浄後、Enhanced Chemi-Luminescence (ECL) 法によりタンパク質バンドを X 線フィルムに検出した。

### 2-4. 免疫細胞染色法

15 mm カバーグラス上で培養した bEnd.3 細胞に siRNA を導入し、4% paraformaldehyde を含むリン酸緩衝液で 10 分間固定した。TBS で洗浄後、0.1% TBS-Tri で希釈した rabbit anti-phospho-Smad3 (Rockland Immunochemicals, Inc.) を 4°C で一晩反応させ、その後、goat anti-rabbit IgG Alexa 568-conjugated antibody (Molecular probes) と Hoechst33342 (Sigma-Aldrich) を室温で 2 時間反応させた。洗浄後、カバーグラスをスライドグラス上に封入し、蛍光顕微鏡 (AZ-100M, Nikon) で観察した。

### 2-5. 細胞遊走能の解析

24 well plate に p53LMAC01 細胞を播種し、24 時間後、1,000 μL ピペットチップの先端で well の底を引っかけて細胞をはがし、約 1 mm の間隙を作製した。p53LMAC01 細胞の培養上清を siRNA 導入 48 時間後の bEnd.3 細胞の培養上清 (1% FBS/DMEM) に置換し、細胞増殖を抑制するため、最終濃度が 5 mM になるように Thymidine (Sigma-Aldrich) を加えた。また、MCP-1 受容体 CCR2 のアンタゴニストである RS102895

(Sigma-Aldrich) を最終濃度 40  $\mu$ M になるように培養上清に添加した。48 時間後、間隙に遊走する細胞を位相差顕微鏡 (TS-100-F, Nikon) で観察した。解析ソフトである Image-J を用いて、遊走距離を撮影した画像の細胞面積から算出した。

## 2-6. 実験動物と OIR モデルの作製

C57BL6/N の WT マウスを実験に用いた。飼育方法は、1-1 に準ずる。OIR モデルの作製は 1-3 に準ずる。

## 2-7. siRNA の硝子体内投与

Apelin siRNA、3'-Alexa488-conjugated apelin siRNA、または AllStars Negative Control siRNA (各 200 pmol)、リポソームとして用いた等量の InvivoFectamine (Invitrogen)、およびグルコース (5%) を室温で 30 分間振盪したものを siRNA 溶液とした。マウスへの硝子体内投与は、33 G 針を装着したマイクロシリンジ (Ito corporation) により行った。抱水クロラルにより麻酔したマウスに散瞳薬のミドリン P 点眼液 (トロピカミド 5 mg/mL、フェニレフリン塩酸塩 5 mg/mL; 参天製薬) および表面麻酔剤のベノキシール点眼液 0.4% (オキシブプロカイン塩酸塩 4 mg/mL; 参天製薬) を点眼した。siRNA 溶液 1  $\mu$ L を P12 および P15 の OIR モデルマウスの硝子体内に投与し、術後感染予防のためにノフロ (ノルフロキサシン 3 mg/mL 萬有製薬) を点眼し、さらにエコリシン眼軟膏 (エリスロマイシンラクトビオン酸塩 5mg/g、コリスチンメタンスルホン酸ナトリウム 5mg/g 参天製薬) を塗布した。

## 2-8. 網膜血管の解析

1-4 に準ずる。網膜における房状形態の血管量は、Banin らの方法に従って定量した<sup>50</sup>。

## 2-9. 組織学的解析

1-6 に準ずる。

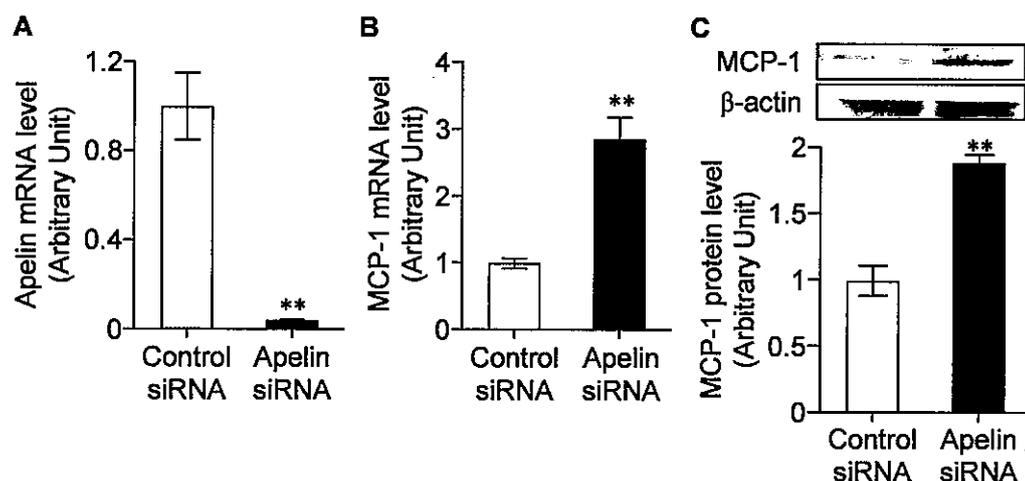
## 2-10. 統計学的解析

1-8 に準ずる。

## 実験結果

### 2-1. Apelin 発現抑制による血管壁細胞遊走因子の発現誘導

血管内皮細胞における apelin-APJ シグナルの抑制による血管成熟化に対する影響を明らかにするため、apelin siRNA を導入したマウス培養血管内皮細胞株 bEnd.3 細胞を用いて検討を行った。Apelin siRNA 導入 24 時間後の bEnd.3 細胞では、既知の遺伝子と相同性のない control siRNA を導入した細胞と比較して、apelin mRNA 発現が著明に抑制されていた (Fig. 10A)。次に、apelin siRNA を導入した bEnd.3 細胞における血管成熟化に関与する因子の遺伝子発現について、real-time RT-PCR 法により解析した。血管壁細胞の動員や接着を引き起こす代表的な因子として、platelet-derived growth factor B (PDGFB)<sup>46</sup>、transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )<sup>51</sup>、angiopoietin-1<sup>52</sup>、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)<sup>53,54</sup> が知られており、angiopoietin-1 以外の 3 つの因子は、血管内皮細胞において産生される。Apelin siRNA 導入細胞と control siRNA 導入細胞の間で PDGFB および TGF- $\beta$  の mRNA の発現に差はみられなかった (PDGFB,  $0.99 \pm 0.04$ ; TGF- $\beta$ ,  $1.20 \pm 0.13$  vs. control siRNA)。一方、MCP-1 mRNA の発現は、apelin siRNA を処置した細胞において有意な増加が認められた (Fig. 10B)。この apelin siRNA による MCP-1 の発現上昇は、タンパク質レベルでも確認された (Fig. 10C)。

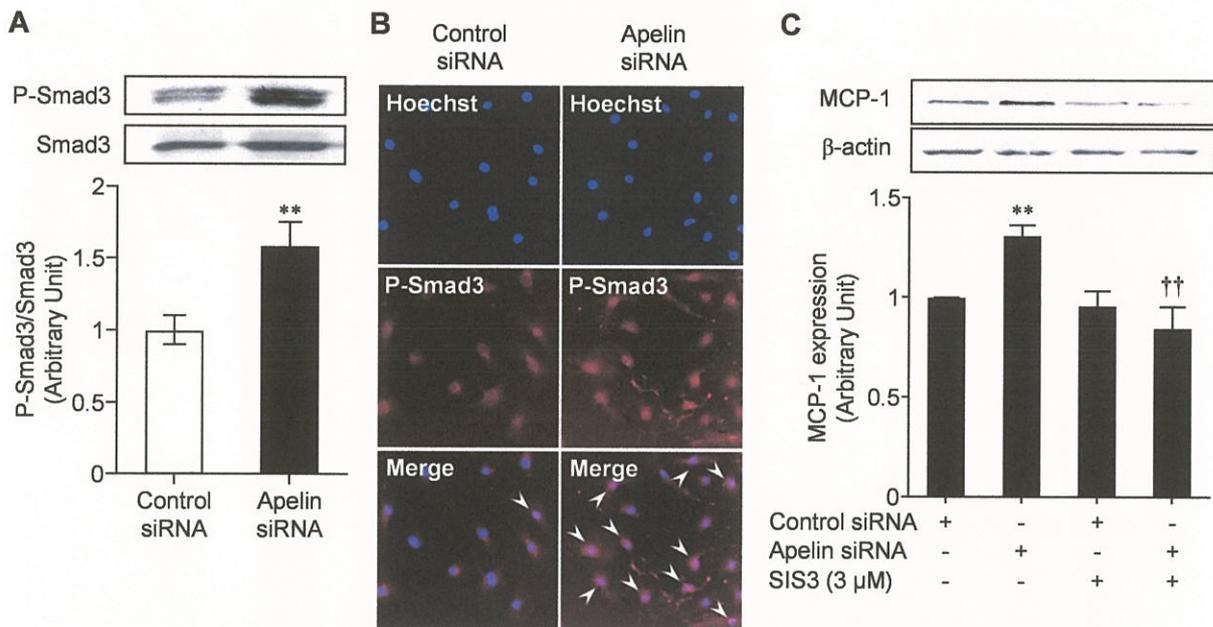


**Figure 10. Apelin siRNA induces MCP-1 expression in the endothelial cells**

(A and B) Apelin (A) and MCP-1 (B) mRNA expressions in bEnd.3 cells transfected with control siRNA or apelin siRNA for 24 h were analyzed by real-time RT-PCR (n = 3). (C) MCP-1 protein expression in bEnd.3 cells exposed to control siRNA or apelin siRNA for 48 h was examined by Western blotting (n = 3). Data were analyzed by Student's *t* test and represent the mean  $\pm$  SEM. \*\**p* < 0.01 vs. control siRNA.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30(11):2182-2187 (2010) および  
*Angiogenesis* 16(3):723-734 (2013) から引用 (一部改変)

MCP-1 の発現を誘導する転写因子として、Smad3<sup>53</sup> および nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)<sup>55</sup> が知られている。Apelin siRNA を導入した bEnd.3 細胞におけるこれらの転写因子のリン酸化および核内移行について、Western blotting により解析した。その結果、apelin siRNA 導入細胞において、NF- $\kappa$ B の核移行や Smad3 以外の Smad ファミリーのリン酸化には影響がみられなかったが (data not shown)、リン酸化 Smad3 量の増加が認められた (Fig. 11A)。総 Smad3 量に対するリン酸化 Smad3 量は、control siRNA 導入細胞と比較して apelin siRNA を処置した細胞において有意な増加がみられた (Fig. 11A)。また、免疫蛍光細胞染色の結果より、apelin siRNA を導入した bEnd.3 細胞の核において、強いリン酸化 Smad3 陽性反応が確認された (Fig. 11B, arrowheads)。さらに、apelin siRNA による MCP-1 タンパク質の発現誘導は、Smad3 阻害剤である SIS3 の前処置により抑制された (Fig. 11C)。

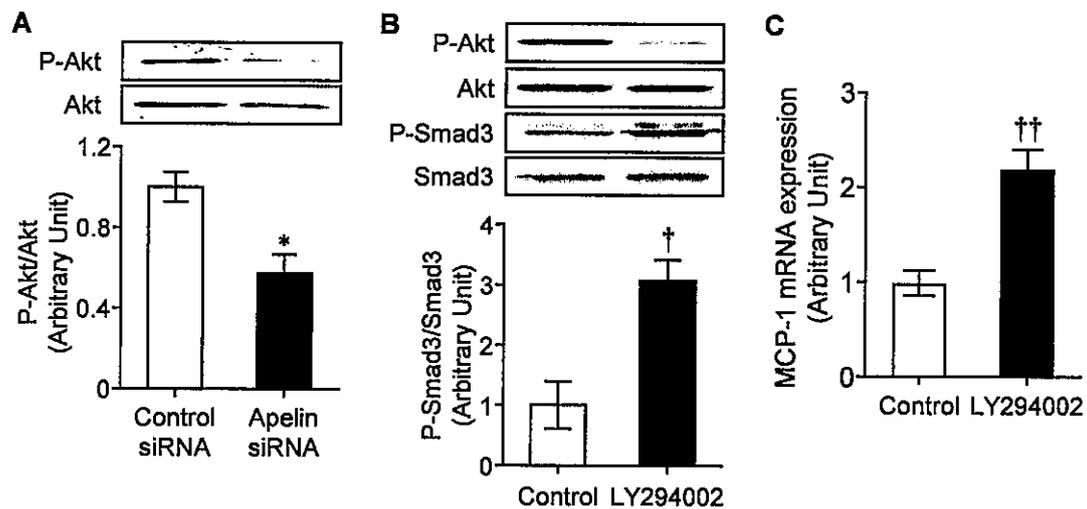


**Figure 11. Apelin siRNA increases MCP-1 expression by activating Smad3 in the endothelial cells**

(A) The phosphorylated-Smad3 in bEnd.3 cells exposed to control siRNA or apelin siRNA for 3 h was examined by Western blotting (n = 3). (B) The translocation of the phosphorylated-Smad3 (red) in bEnd.3 cells treated with control siRNA or apelin siRNA for 6 h was detected by immunocytochemistry. Nuclei were labeled with Hoechst 33342 (blue). Arrowheads indicate p-Smad3 in the nuclei. (C) bEnd.3 cells were incubated with or without SIS3 (3  $\mu$ M) for 1 h. Then, MCP-1 protein expression in the cells exposed to control siRNA or apelin siRNA for 24 h was assessed by Western blotting (n = 3). Data were analyzed by Student's *t* test (A) or two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test (C) and represent the mean  $\pm$  SEM. \*\**p* < 0.01 vs. control siRNA, ††*p* < 0.01 vs. apelin siRNA.

*Angiogenesis* 16(3):723-734 (2013) から引用 (一部改変)

Smad3 のリン酸化は PI3K-Akt シグナルの活性化により阻害されること<sup>56, 57</sup>、および apelin は APJ を介して PI3K-Akt シグナルを活性化することが報告されている<sup>40</sup>。そこで次に、apelin siRNA による Smad3 のリン酸化が PI3K-Akt シグナルの低下を介して起こるか否かについて検討を行った。Apelin siRNA を導入した bEnd.3 細胞では、リン酸化 Akt 量の減少がみられ、総 Akt 量に対するリン酸化 Akt 量は、control siRNA 導入細胞と比較して apelin siRNA を処置した細胞において有意な減少がみられた (Fig. 12A)。また、PI3K 阻害剤である LY294002 を処置した bEnd.3 細胞では、リン酸化 Akt 量の減少に加えて、リン酸化 Smad3 量の増加がみられた (Fig. 12B)。さらに、LY294002 を処置した bEnd.3 細胞では、MCP-1 mRNA の発現上昇がみられた (Fig. 12C)。以上の結果から、血管内皮細胞において apelin-APJ シグナルを抑制すると、Akt シグナルの低下により Smad3 の活性化が生じ、MCP-1 が発現誘導されることが示唆された。



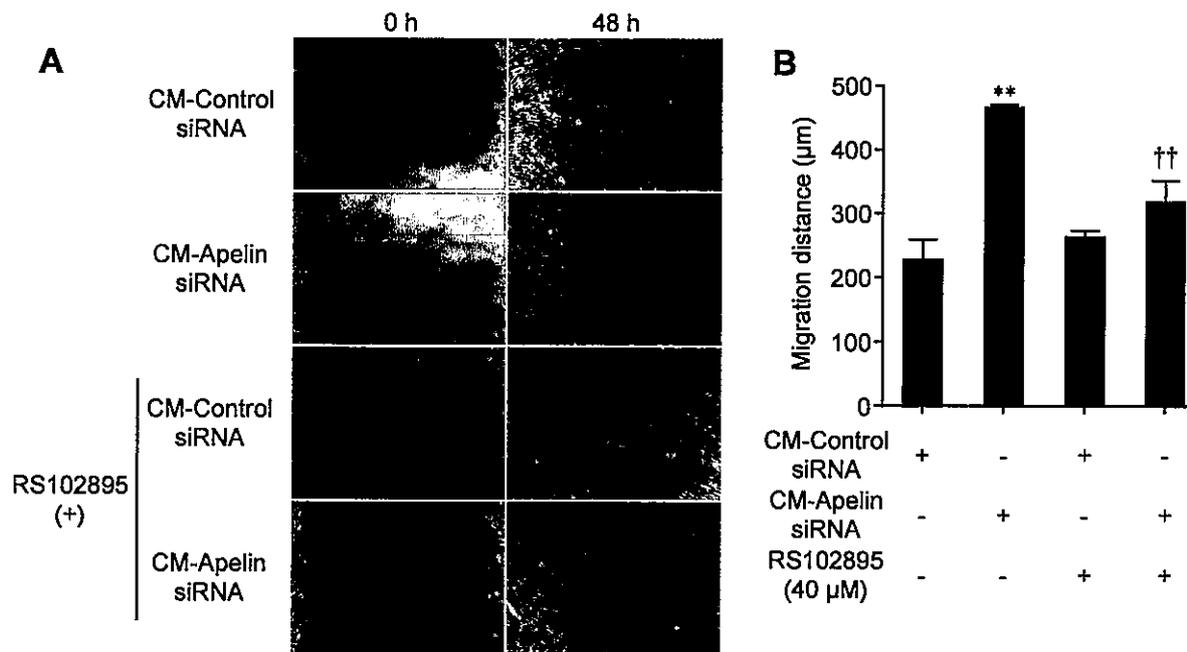
**Figure 12. Apelin siRNA leads to the reduction of Akt phosphorylation and followed by upregulation of MCP-1 mediated via the activation of Smad3 in the endothelial cells**

(A) The phosphorylated-Akt in bEnd.3 cells exposed to control siRNA or apelin siRNA for 3 h was examined by Western blotting (n = 3). (B) The phosphorylated-Akt and -Smad3 in bEnd.3 cells treated with LY294002 (3  $\mu$ M) for 3 h was evaluated by Western blotting (n = 3). (C) MCP-1 mRNA expression in bEnd.3 cells incubated with LY294002 (3  $\mu$ M) for 24 h was assessed by real-time RT-PCR (n = 5). Data were analyzed by Student's *t* test and represent the mean  $\pm$  SEM. \**p* < 0.05 vs. control siRNA, †*p* < 0.05 and ††*p* < 0.01 vs. control.

*Angiogenesis* 16(3):723-734 (2013) から引用 (一部改変)

## 2-2. Apelin siRNA を導入した血管内皮細胞の培養上清による血管平滑筋細胞の遊走促進

血管内皮細胞における apelin-APJ シグナルの抑制による血管壁細胞の動員への影響を明らかにするため、apelin siRNA を導入した bEnd.3 細胞の培養上清による血管平滑筋細胞の遊走能に対する影響を検討した。Apelin siRNA を導入した bEnd.3 細胞の培養上清は、control siRNA 導入細胞の培養上清と比較して、マウス血管平滑筋細胞株 p53LMAC01 細胞の遊走距離を有意に増加させた (Fig. 13A and B)。この遊走促進作用が MCP-1 を介した効果であるか否かを明らかにするため、MCP-1 受容体 CCR2 の遮断薬である RS102895 の影響を検討した。その結果、RS102895 は、apelin siRNA 導入細胞の培養上清による p53LMAC01 細胞の遊走促進作用を有意に抑制した (Fig. 13A and B)。RS102895 は、CCR2 以外にも  $\alpha_{1A}$  受容体、 $\alpha_{1D}$  受容体および 5-HT<sub>1A</sub> 受容体を阻害することが報告されているが<sup>58</sup>、これらの受容体を介したシグナルが血管壁細胞の遊走能に影響を与える報告は存在しない。これらの結果から、血管内皮細胞において apelin-APJ シグナルの抑制により発現誘導された MCP-1 は、血管壁細胞の CCR2 を介して血管壁細胞の遊走を促進させることが示唆された。



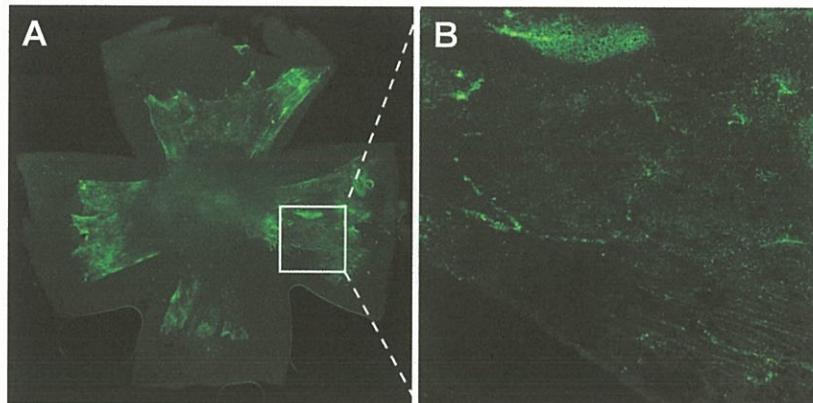
**Figure 13. The conditioned medium (CM) from the endothelial cells pretreated with apelin siRNA accelerates migration of the vascular smooth muscle cells (VSMC)**

(A) Confluent p53LMAC01 cell monolayers were wounded by scraping and treated with CM from bEnd.3 cells exposed to respective siRNAs for 48 h. The CM from siRNA-treated bEnd.3 cells was added RS102895 (40 µM) or DMSO and Thymidine (5 mM). The cell migration to the wound surface was monitored between 0 and 48 h. (B) The migration distance of p53LMAC01 cells into the wound edge was quantitated (n = 3). Data were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test and represent the mean ± SEM. \*\* $p < 0.01$  vs. CM-control siRNA, †† $p < 0.01$  vs. CM-Apelin siRNA.

*Angiogenesis* 16(3):723-734 (2013) から引用 (一部改変)

### 2-3. Apelin siRNA の硝子体内投与による網膜の周皮細胞動員の促進

OIR モデルマウスの網膜における apelin-APJ system の抑制による血管成熟化に対する影響を明らかにするため、OIR モデルマウスの硝子体内に apelin siRNA を投与した。硝子体内投与された siRNA が網膜組織に到達するか否かについて、リポソーム試薬およびグルコースと混合した Alexa488 標識 apelin siRNA 溶液をマウス硝子体内に投与した。その結果、投与 48 時間後の網膜において、Alexa488 の緑色蛍光が網膜表面に観察された (Fig. 14)。一方、Alexa488 標識した apelin siRNA のみを硝子体内投与したマウスの網膜では、緑色蛍光はみられなかったことから (data not shown)、この緑色蛍光は、リポソームによって網膜細胞内に到達した Alexa488 標識 apelin siRNA 由来のものであることが示された。

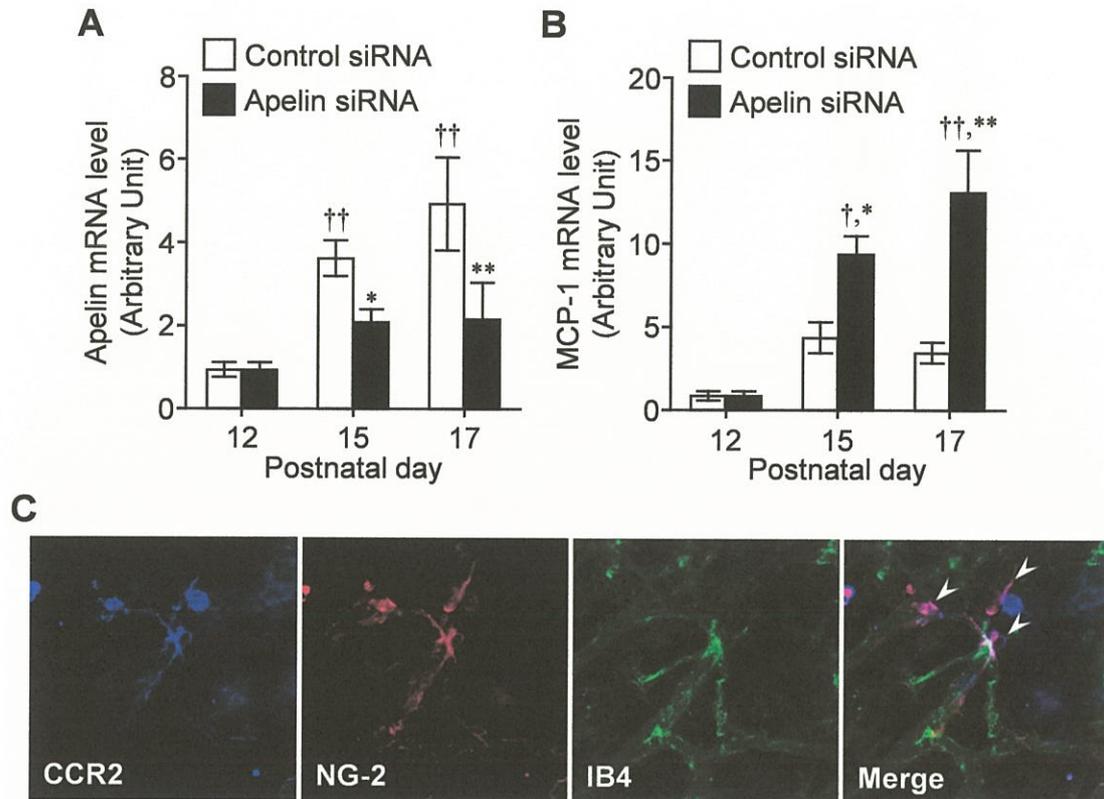


**Figure 14. *In vivo* delivery of siRNA to the retinal tissues by intravitreal injection**

(A and B) Representative pictures show a fluorescence image of the retina at 2 days after intravitreal injection. The boxed area in (A) is shown enlarged in (B).

*Angiogenesis* 16(3):723-734 (2013) から引用 (改変)

OIR モデルマウスの硝子体内への apelin siRNA 投与による網膜の MCP-1 発現誘導について、real-time RT-PCR 法により検討した。OIR モデルマウス網膜の apelin mRNA 発現は、control siRNA 投与群において、P12 と比較して P15 および P17 で発現上昇がみられた (Fig. 15A)。この P15 および P17 でみられる apelin mRNA の発現上昇は、apelin siRNA 投与により有意に抑制された (Fig. 15A)。また、網膜の MCP-1 の発現は、apelin siRNA を投与した OIR モデルマウスにおいて、control siRNA を投与したマウスと比較して有意な発現上昇がみられた (Fig. 15B)。OIR モデルマウスの網膜における CCR2 の発現を免疫組織化学染色により検討した結果、CCR2 は、NG-2 陽性周皮細胞に発現していることが明らかになった (Fig. 15C, arrowheads)。

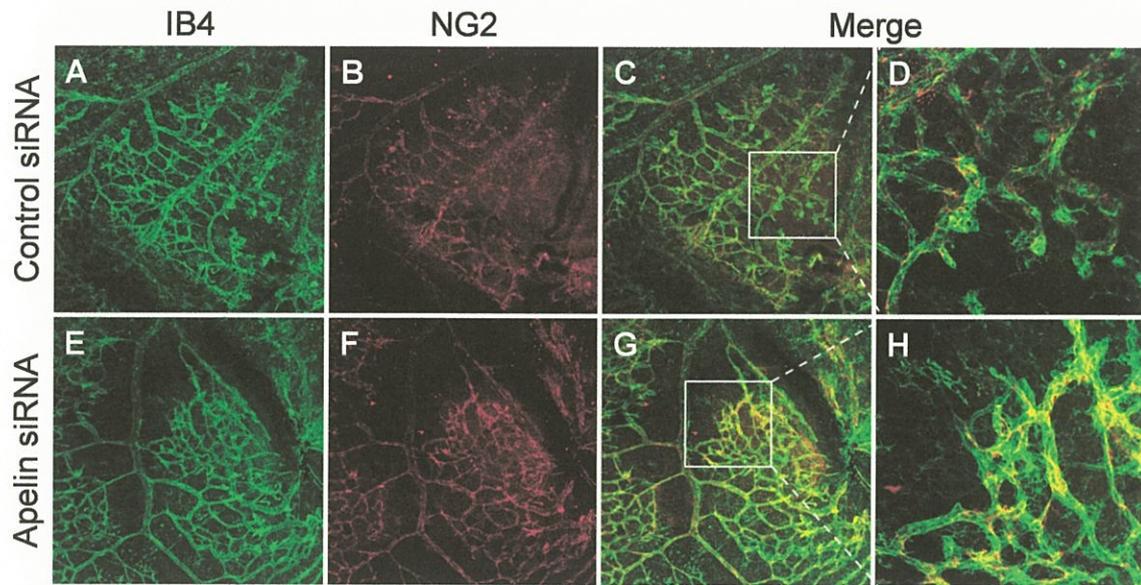


**Figure 15. Apelin siRNA increases MCP-1 expression in the retinas of the OIR model mice**

The effect of apelin siRNA on the expression of apelin (A) and MCP-1 (B) in the retinas of OIR model mice was examined by real-time RT-PCR (n = 7 - 9). (C) Representative pictures show an immunostaining image of CCR2 (blue) and NG-2 (red) combined with isolectin B4 (IB4) (green) in the retinas of the OIR model mice at P17. Arrowheads indicate CCR2 and NG-2 double positive cells. Data were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test and represent the mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$  vs. control siRNA, † $p < 0.05$  and †† $p < 0.01$  vs. P12.

*Angiogenesis* 16(3):723-734 (2013) から引用 (一部改変)

OIR モデルマウスの網膜の apelin 発現抑制による新生血管の内皮細胞周囲への周皮細胞動員に対する影響を明らかにするため、apelin siRNA を投与した P17 の OIR モデルマウスの網膜における血管内皮細胞と周皮細胞の二重免疫蛍光染色を行った。Apelin siRNA を投与した OIR モデルマウスの網膜 (Fig. 16 E-H) では、control siRNA を投与したマウスの網膜 (Fig. 16 A-D) と比較して、無血管領域に向かう血管に多くの NG-2 陽性周皮細胞が観察された (Fig. 16H)。この血管の先端部における isolectin B4 陽性血管内皮細胞に対する NG-2 陽性周皮細胞の割合は、control siRNA 投与群の網膜と比較して、apelin siRNA 投与群の網膜において有意に増加していた [control siRNA,  $42.79 \pm 1.05$  %; apelin siRNA,  $57.01 \pm 2.65$  % ( $p < 0.01$ )] (n = 5)。



**Figure 16. Apelin siRNA enhances pericyte coverage of the newly formed vessels in the OIR model mice**

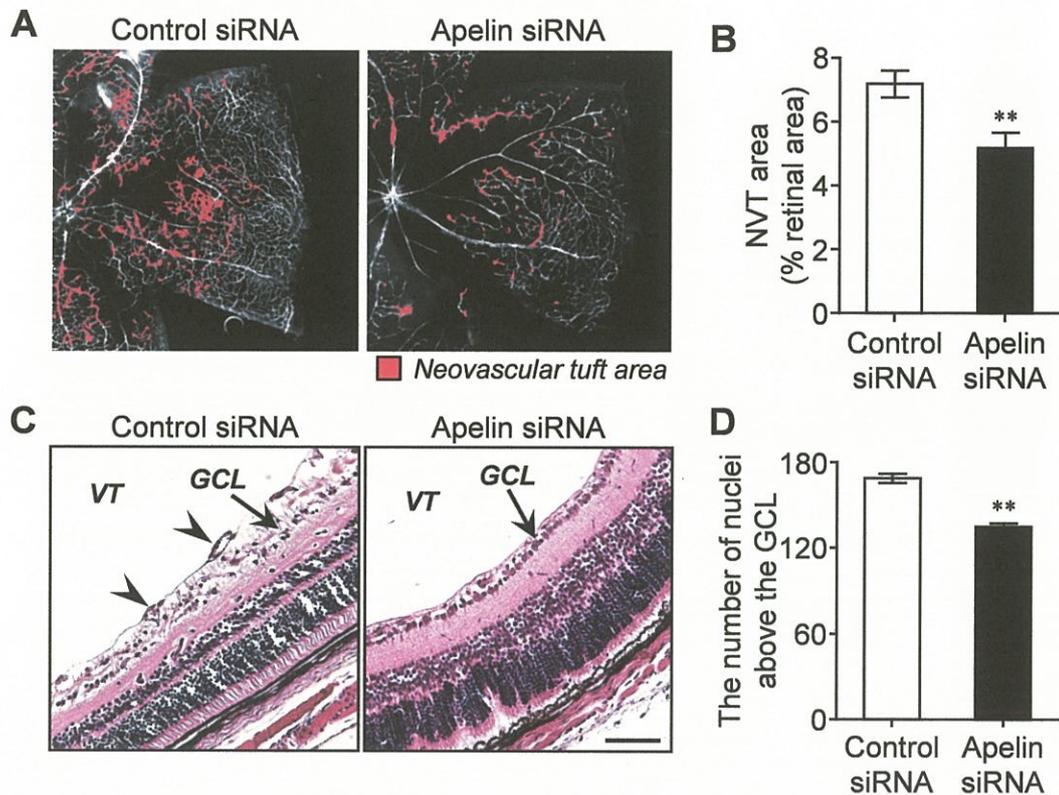
Representative pictures show double immunostaining of isolectin B4 (green) and NG2 (red) in the retinas of the OIR model mice at P17 treated with control siRNA (A-D) or apelin siRNA (E-H). The boxed area in (C) is shown enlarged in (D), and the boxed area in (G) is shown enlarged in (H).

*Angiogenesis* 16(3):723-734 (2013) から引用 (一部改変)

MCP-1 は、単球やマクロファージの動員や活性化を介して炎症反応を惹起させることが多くの研究により明らかにされている<sup>59</sup>。また、OIR モデルの異常血管新生には、マクロファージの活性化が関与することが報告されている<sup>60,61</sup>。そこで、網膜のマクロファージに対する apelin siRNA の硝子体内投与の影響を明らかにするため、抗 integrin- $\alpha$ M 抗体を用いて、マクロファージの免疫組織化学染色を行った。Integrin- $\alpha$ M 陽性マクロファージは、apelin siRNA を投与したマウスの網膜において、control siRNA を投与したマウスと比較して、わずかに増加傾向がみられたが有意な差はみられなかった [control siRNA,  $8.41 \pm 0.54$  %; apelin siRNA,  $10.32 \pm 0.77$  % ( $p = 0.08$ )] ( $n = 5$ )。

#### 2-4. Apelin siRNA の硝子体内投与による網膜の異常血管新生の抑制

周皮細胞による被覆度が低下した新生血管は、房状形態を示すことが知られている<sup>46</sup>。そこで次に、OIR モデルマウスの網膜でみられる房状血管の形成に対する apelin siRNA の硝子体内投与の影響について検討した。FITC-dextran の灌流により造影した網膜血管像を解析した結果、apelin siRNA を投与した P17 の OIR モデルマウスの網膜では、control siRNA を投与したマウスの網膜と比較して、房状形態を示す異常血管が有意に減少していた (Fig. 17A and B)。これらのマウスの眼球切片の HE 染色を行い、硝子体内への血管新生に対する apelin siRNA の影響を評価した。その結果、control siRNA 投与マウスと比較して、apelin siRNA 投与マウスの網膜では、硝子体内に侵入する細胞が減少しており、また、網膜神経節細胞層より硝子体側に存在する細胞の核の数も有意に減少していた (Fig. 17C and D)。



**Figure 17. Apelin siRNA prevents pathological retinal angiogenesis in the retinas of the OIR model mice**

(A) Representative pictures show the retinal flat-mounts from the OIR model mice treated with apelin siRNA (right panel) or control siRNA (left panel). Neovascular tufts (NVT) area is highlighted in red. (B) NVT area was quantified ( $n = 12$ ). (C) Representative pictures show HE staining of the retinal cross-sections from the OIR model mice treated with apelin siRNA (right panel) or control siRNA (left panel). (D) Intravitreal neovascularization was quantified by counting the number of the cell nuclei above the retinal ganglion cell layer ( $n = 6$ ). VT, vitreous body; GCL, ganglion cell layer; arrowheads, vascularlike structures. Data were analyzed by Student's *t* test and represent the mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$  vs. control siRNA. Scale bar, 50  $\mu$ m.

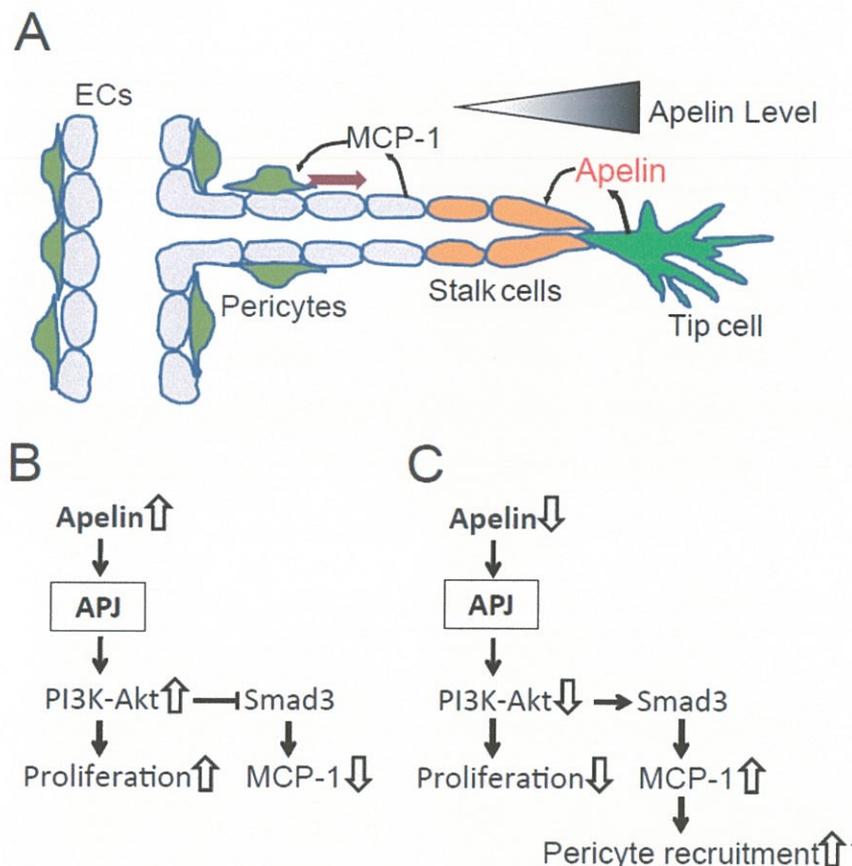
*Angiogenesis* 16(3):723-734 (2013) から引用 (一部改変)

## 考 察

今回、apelin-APJ シグナルの抑制による網膜血管成熟化に対する影響を明らかにするため、培養細胞および OIR モデルマウスを用いて検討を行った。Apelin siRNA を導入した培養血管内皮細胞では、血管壁細胞の遊走促進効果を有する MCP-1 の発現上昇がみられ、この発現誘導には、PI3K-Akt シグナル低下による Smad3 の活性化が関与することが示された。さらに、apelin siRNA を導入した血管内皮細胞の培養上清には、血管平滑筋細胞の遊走促進効果がみられた。また、apelin siRNA を硝子体内投与した OIR モデルマウスの網膜では、新生血管における周皮細胞による被覆度の増加がみられ、房状形態の異常血管の形成が抑制されていた。以上の結果から、虚血性網膜症の網膜において、著明に活性化された apelin-APJ シグナルを阻害することにより、血管内皮細胞の過増殖の抑制による血管壁細胞の動員促進を介して成熟血管の形成を誘導できる可能性が示された。

血管新生の過程では、ガイド役として機能する非増殖性の内皮細胞である tip cells を先頭に、増殖活性を有する内皮細胞である stalk cells が後続して内皮細胞の管腔が形成される<sup>62</sup>。続いて、内皮細胞の管腔に血管壁細胞が動員され、新生血管は成熟化する<sup>63</sup>。この過程において、apelin は、tip cells から遊離され、stalk cells に発現する APJ を介して細胞増殖を誘導することが報告されていることから<sup>41</sup>、apelin-APJ system は、新生血管の先端部特異的に細胞増殖を引き起こすシグナルであることが推測される。したがって、先端から遠ざかった内皮細胞では、apelin-APJ シグナルの低下が徐々に起き、増殖能が低下することが考えられる (Fig. 18A)。血管壁細胞の接着は、管腔が形成された内皮細胞から順に起きることから<sup>63</sup>、apelin-APJ シグナルが入らなくなった内皮細胞では、増殖能の低下に加えて、血管壁細胞の動員機構が働く可能性が考えられる。この仮説に一致して、今回、apelin siRNA を導入した血管内皮細胞および血管新生期の OIR モデルマウスの網膜では、血管壁細胞の遊走促進効果を有する MCP-1 の発現上昇がみられた。Apelin は、APJ を介して PI3K-Akt シグナルを活性化させることによって、細胞増殖を引き起こすことが報告されている<sup>40</sup>。これらのことから、血管新生期の網膜において、apelin の刺激を強く受ける血管内皮細胞では、PI3K-Akt シグナル活性化を介した細胞増殖の促進と Smad3 活性化の抑制が起き (Fig. 18B)、一方、apelin-APJ シグナルが低下した血管内皮細胞では、PI3K-Akt シグナル低下に伴う Smad3 の活性化が起こり、続いて MCP-1 が発現誘導され、血管壁細胞の動

員が起こるとい機構が生じていることが考えられた (Fig. 18 C)。



**Figure 18. Proposed mechanisms for the apelin-APJ system on endothelial cells during angiogenesis**

(A) Endothelial cells moving away from the tip cells receive apelin signals since apelin is selectively secreted from the tip cells. (B) The apelin-APJ system stimulates proliferation of the stalk cells mediated via PI3K-Akt signaling, and inhibits MCP-1 expression by suppression of Smad3 phosphorylation. (C) Reduction of this signaling attenuates proliferation of endothelial cells at a site distant from the tip cells, and releases the inhibition of Smad3 cascade, followed by the release of MCP-1 for maturation of vessels.

*Angiogenesis* 16(3):723-734 (2013) から引用

Apelin siRNA を硝子体内投与した OIR モデルマウスの網膜において MCP-1 の発現上昇がみられたが、この MCP-1 の発現上昇は、マクロファージの数にほとんど影響を与えなかった。この理由は、apelin-APJ system が新生血管の先端において局所的に機能する特性にあると考えられる。この特性から、apelin siRNA を投与した網膜では、新生血管の先端部の内皮細胞で特異的に MCP-1 の発現上昇が起こることが推測され、この局所的な MCP-1 の発現増加は、マクロファージの動員をほとんど引き起こさないものと考えられた。

一方、MCP-1 は、単球遊走作用非依存的に腫瘍の血管新生に影響を与えることや<sup>64</sup>、増殖性糖尿病網膜症患者の網膜において、MCP-1 が血管内皮細胞に限局することが明らかにされている<sup>65</sup>。さらに、血管壁細胞の接着を引き起こす TGF- $\beta$  や angiopoietin-1 の刺激によって血管内皮細胞の MCP-1 が発現誘導され、この MCP-1 が血管平滑筋細胞の動員を促進することが明らかにされている<sup>53, 54</sup>。これらのことから、MCP-1 は、従来知られている単球やマクロファージに対する影響のみならず、血管成熟化を促進する因子であることが示唆されている。また、MCP-1 遺伝子欠損マウスを用いた OIR モデルの網膜では、房状形態の異常血管の消失が遅延することが明らかにされている<sup>66</sup>。この現象は周皮細胞の動員不全により引き起こされることから<sup>48</sup>、MCP-1 欠損マウスの網膜では、周皮細胞の遊走能が低下している可能性が考えられる。これらの知見は、apelin siRNA を投与した OIR モデルマウスの網膜において発現上昇した MCP-1 が新生血管の内皮細胞への周皮細胞の動員を促進させることを支持している。

第 1 章において、OIR モデルマウスの網膜では、apelin-APJ system の著明な活性化により血管内皮細胞の過増殖が誘発され、異常血管新生が引き起こされる可能性を示した。また、apelin-KO マウスを用いた OIR モデルマウスでは、VEGF が発現上昇しているにもかかわらず、異常血管新生がほとんどみられなかった。本章では、OIR モデルマウスに apelin siRNA を投与すると、本モデルマウスの網膜でみられる apelin の発現上昇が抑制され、房状形態の異常血管の形成が阻害された。また、apelin siRNA を投与した OIR モデルマウスの網膜と control siRNA を投与した OIR モデルマウスの網膜では、VEGF 発現に差がないことを明らかにしている (data not shown)。これらのことから、虚血性網膜症の網膜において、apelin 発現を抑制することにより、病的血管新生を阻害できる可能性が示唆された。

以上のことから、虚血性網膜症の網膜において、apelin-APJ シグナルを阻害することにより、血管内皮細胞の過増殖の抑制による血管壁細胞の動員促進を介して成熟血管の形成を誘導できる可能性が考えられた。

### 第3章 虚血性網膜症の新規治療薬としての APJ 阻害薬の有用性

第1章では、OIR モデルマウスの網膜において、著明に発現誘導された apelin が血管内皮細胞に発現する APJ を介して、血管内皮細胞の過増殖を引き起こし、房状形態を示す異常血管の形成を誘導することを明らかにした。さらに、虚血性網膜症患者の硝子体内において apelin 量が増加していることも見出した。また、第2章では、apelin siRNA の硝子体内投与により OIR モデルマウスの網膜の apelin 発現を抑制すると、血管内皮細胞の過増殖が阻害され、成熟血管の形成を誘導できることを見出した。これらのことから、apelin-APJ system を阻害する薬物が病的血管新生を抑制できる新たな虚血性網膜症治療薬となる可能性が考えられる。また、現在、病的血管新生を特異的に抑制できる治療薬は存在しない。APJ が房状形態を示す異常血管の内皮細胞に極めて強く発現し、正常血管にはほとんどみられなかったことから、APJ 阻害薬は、既存の治療薬と比較して、より選択的に病的血管新生を抑制できる可能性が考えられる。

4-oxo-6-((pyrimidin-2-ylthio)methyl)-4H-pyran-3-yl 4-nitrobenzoate (ML221) は、強力な APJ 機能的アンタゴニストとして2012年に発見された低分子化合物である<sup>67</sup>。ML221 は、APJ に対して高い選択性を有し、APJ と配列類似性を持つ AT1 受容体に対してほとんど結合しないことが明らかにされている<sup>67</sup>。一方、ML221 は、他の G タンパク質共役型受容体の中で  $\kappa$  オピオイド受容体およびベンゾジアゼピン受容体に対して阻害作用を示すことが報告されているが<sup>67</sup>、これらの受容体を介したシグナルが OIR モデルマウスの網膜血管新生に影響を与える報告は存在しない。

そこで本章では、虚血性網膜症の新規治療薬としての APJ 阻害薬の有用性を明らかにすることを目的として、ML221 の OIR モデルマウスの異常網膜血管新生に対する効果について検討した。

## 実験方法

### 3-1. 細胞培養と細胞増殖の評価

培養血管内皮細胞には、bEnd.3 細胞を用いた。培養方法は、2-1 に準ずる。細胞増殖能の評価は、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 法と BrdU 取り込み能の解析により行った。MTT 法は、薬物処置後、培養上清に MTT を終濃度 0.5 mg/mL になるように添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2 時間反応させ、培養上清を除去した well に dimethyl sulfoxide (DMSO) を加えて細胞を溶解し、吸光度 ( $\lambda = 570 \text{ nm}$ ) を測定することにより行った。BrdU 取り込み能を解析するため、15 mm カバーガラス上に播種した細胞に薬物処置後、10  $\mu\text{M}$  BrdU を 2 時間暴露し、4% paraformaldehyde を含むリン酸緩衝液で 10 分間固定した。固定液を除去し、DNA を加水分解させるため、2 M HCl に 37°C で 10 分間暴露し、その後、ホウ酸ナトリウム buffer (pH 8.5) を室温で 30 分間処置することにより中和した。0.1% TBS-Tri で希釈した mouse anti-BrdU antibody (BD Biosciences) を 4°C で一晩反応させ、続いて、biotinylated goat anti-mouse IgG antibody (DAKO) および FITC-conjugated streptavidin (BD Biosciences) を室温で 1 時間ずつ反応させた。核を Hoechst33342 (Sigma-Aldrich) で標識し、カバーガラスをスライドガラスに封入した。BrdU 取り込み能は、1 サンプル当たり 9 視野撮影した画像 (563.20  $\mu\text{m} \times 450.56 \mu\text{m}$ ) における Hoechst 陽性細胞あたりの BrdU 陽性細胞の数を算出することにより判定した。培養細胞への siRNA の導入方法は、2-1 に準ずる。

### 3-2. Real-time RT-PCR

1-5 に準ずる。

### 3-3. 実験動物および OIR モデルの作製

1-1 および 1-3 に準ずる。

### 3-4. 網膜血管の解析

FITC-conjugated isolectin B4 染色により網膜血管の内皮細胞を検出した。房状血管領域および無血管領域の定量は、Image J (National Institutes of Health) を用いて、Connorらの方法に従って行った<sup>28,68</sup>。

### 3-5. 薬物の腹腔内投与

滅菌した DMSO に溶解した ML221 (Sigma-Aldrich) (投与量：10 mg/kg body weight/day) および SU1498 (LKT Laboratories, Inc.) (投与量：9 mg/kg body weight/day) を OIR モデルマウスの P12 から P16 まで 1 日 1 回腹腔内に投与した。対照群には、同量の DMSO を投与した。

### 3-6. 免疫組織化学染色

1-7 に準ずる。VEGFR2 の検出は、rabbit anti-VEGFR2 antibody (Cell Signaling Technology Inc.) および goat anti-rabbit IgG Alexa 568-conjugated antibody (Molecular probes) により行った。

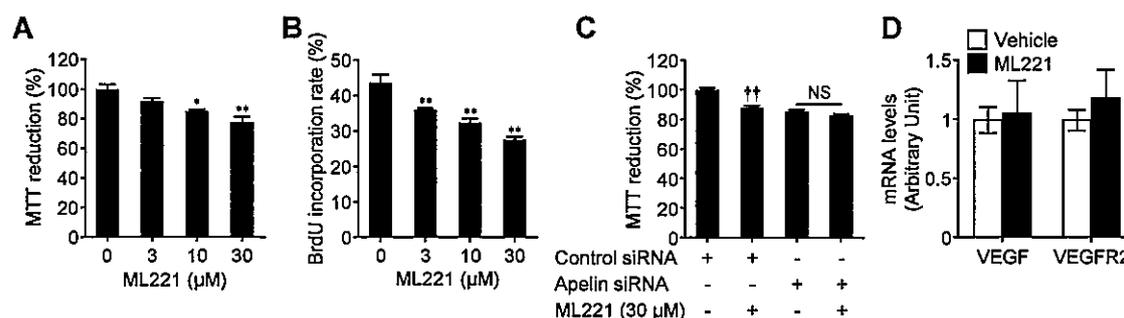
### 3-7. 統計学的解析

統計解析は、Student's *t*-test、one-way ANOVA、または two-way ANOVA を行った。One-way ANOVA の post hoc test として、Dunnett's test を、two-way ANOVA の post hoc test として、Bonferroni's test を行った。その他は 1-8 に準ずる。

## 実験結果

### 3-1. 血管内皮細胞の増殖に対する APJ 阻害薬の抑制作用

虚血性網膜症で生じる病的網膜血管新生には、血管内皮細胞の過増殖が深く関与することから、培養血管内皮細胞を用いて、APJ 阻害薬である ML221 の血管内皮細胞の増殖に対する影響について検討した。培養血管内皮細胞株 bEnd.3 細胞を ML221 で処置すると、MTT 還元能および BrdU 取り込み能が濃度依存的に抑制された (Fig. 19A and B)。この ML221 による細胞増殖抑制効果が apelin-APJ system の阻害によるものか否かを apelin siRNA を導入した bEnd.3 細胞を用いて検討した。その結果、ML221 による bEnd.3 細胞の MTT 還元能の低下は、apelin siRNA を導入した bEnd.3 細胞ではほとんどみられなかった (Fig. 19C)。また、ML221 は、bEnd.3 細胞の VEGF および VEGFR2 の mRNA 発現に影響を与えなかった (Fig. 19D)。これらのことから、APJ 阻害薬は、VEGF および VEGFR2 の発現に影響を与えることなく apelin-APJ system を阻害することにより血管内皮細胞の増殖を抑制できることが示された。



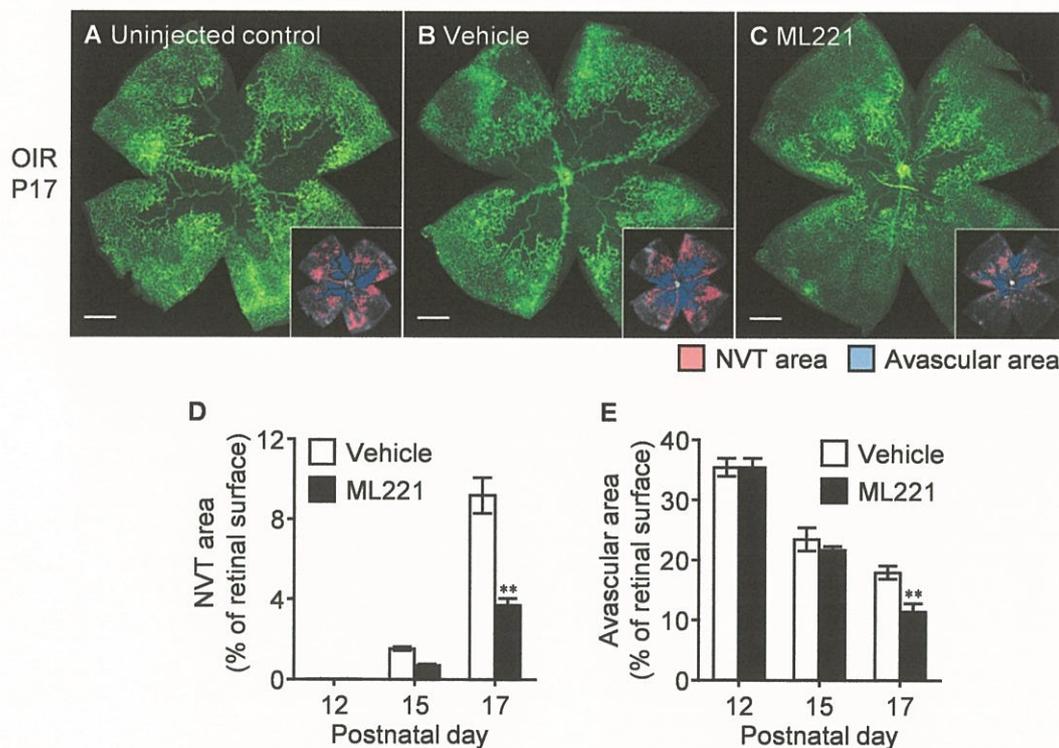
**Figure 19. The APJ antagonist inhibits endothelial cell proliferation**

(A and B) The proliferation of bEnd.3 cells following 24 h incubation with ML221 (0-30 μM) was assessed by the MTT assay (A) (n = 4) and the BrdU incorporation assay (B) (n = 3). (C) bEnd.3 cells were transfected with the apelin siRNA or the control siRNA. After 24 h, the cells were incubated with or without ML221 (30 μM) for 24 h. The cell proliferation was assessed by the MTT assay (n = 3). (D) The expression of VEGF and VEGFR2 in bEnd.3 cells at 24 h after exposure to ML221 (30 μM) was analyzed by real-time RT-PCR (n = 5). Data were analyzed by one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test (A and B), two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test (C) or Student's t test (D) and represent the mean ± SEM. \**p* < 0.05 and \*\**p* < 0.01 vs. 0 μM (ML221), ††*p* < 0.01 vs. control siRNA, NS, not significant.

Sci. Rep. 7(1):15062 (2017) から引用 (一部改変)

### 3-2. 網膜の異常血管新生に対する APJ 阻害薬の抑制作用

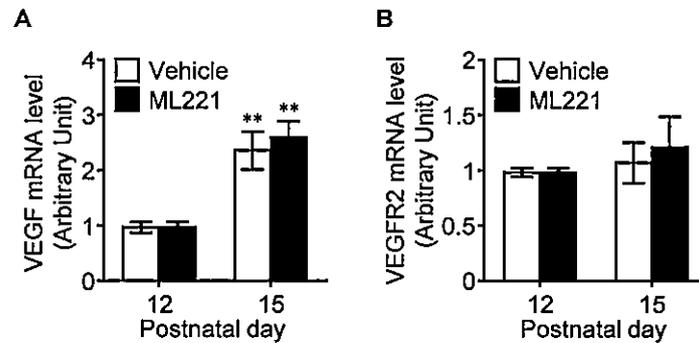
OIR モデルマウスの網膜で生じる異常血管新生に対する APJ 阻害薬の効果を明らかにするため、ML221 を OIR モデルマウスに腹腔内投与した。無処置の P17 の OIR モデルマウスおよび ML221 注射液の調製に使用した溶媒だけを P12 から P16 まで投与した P17 の OIR モデルマウスの網膜では、房状形態の異常血管領域および無血管領域が広く観察された (Fig. 20A and B)。一方、P12 から P16 まで ML221 (10 mg/kg) を 1 日 1 回腹腔内投与した P17 の OIR モデルマウスの網膜では、異常血管領域の著明な減少と (Fig. 20C and D) 無血管領域の減少がみられた (Fig. 20C and E)。また、ML221 を投与した P15 の OIR モデルマウスの網膜における VEGF および VEGFR2 の mRNA の発現を解析した結果、溶媒を投与したマウスの網膜における発現とほとんど差はみられなかった (Fig. 21A and B)。



**Figure 20. The APJ antagonist suppresses pathological retinal angiogenesis in the OIR model mice**

(A-C) Representative pictures show isolectin B4 staining in a retinal flat-mount from the OIR model mice at P17 following intraperitoneal administration of the vehicle or ML221. In the insets, the red area indicates the neovascular tufts (NVT) and the blue area indicates the avascular area. (D and E) NVT (D) and avascular areas (E) were quantified (n = 7). Scale bars, 500  $\mu$ m. Data were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test and represent the mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$  vs. vehicle.

*Sci. Rep.* 7(1):15062 (2017) から引用 (一部改変)

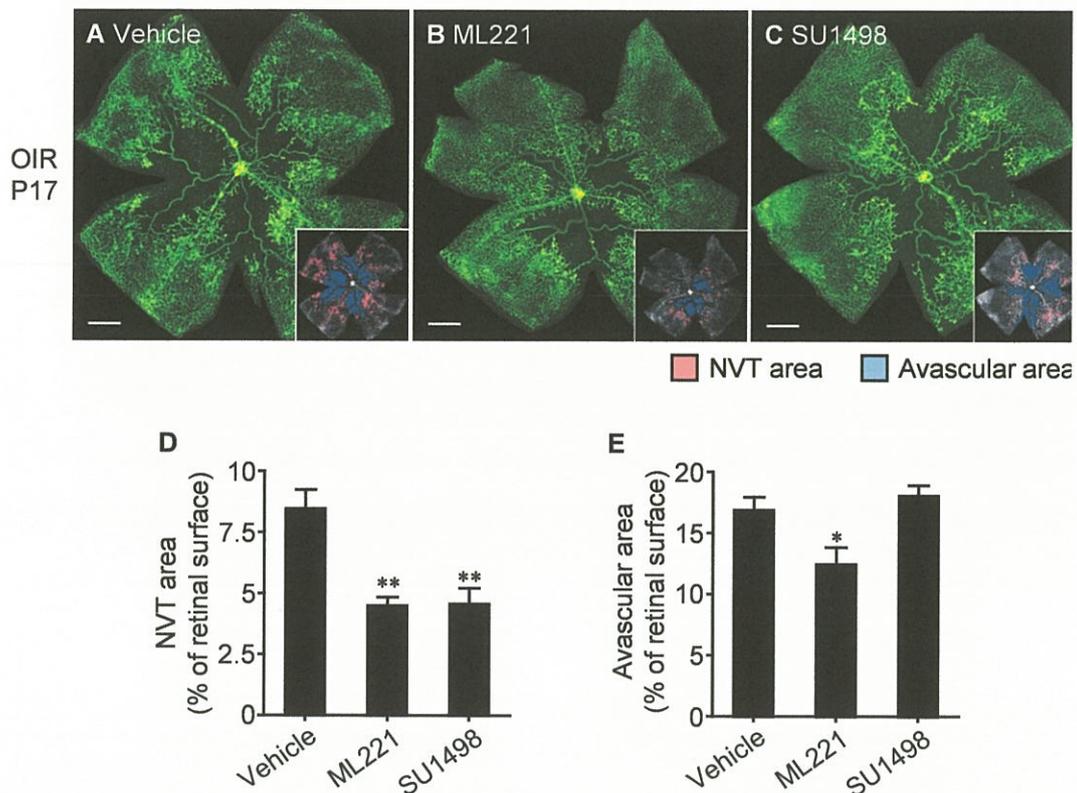


**Figure 21. Influence of the APJ antagonist on VEGF and VEGFR2 expressions during pathological angiogenesis in the retinas of OIR model mice**

The effect of intraperitoneal administration of ML221 on VEGF (A) and VEGFR2 (B) mRNA expression levels in the retinas of the OIR model mice was examined by real-time RT-PCR (n = 4). Data were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test and represent the mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$  vs. P12.

*Sci. Rep.* 7(1):15062 (2017) から引用 (一部改変)

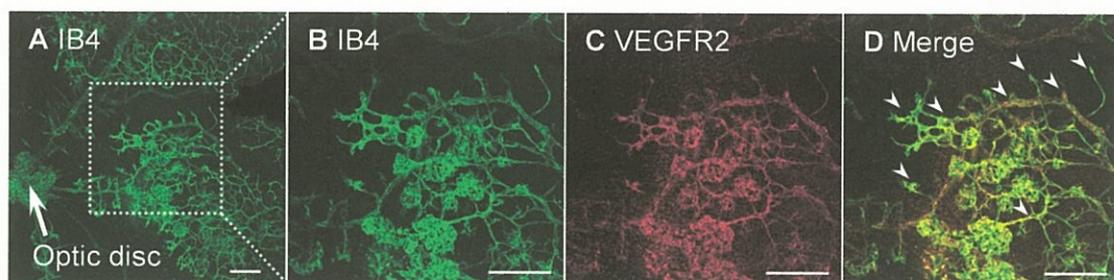
次に、VEGFR2 阻害薬と APJ 阻害薬の OIR モデルマウスの網膜における異常血管新生および無血管領域に対する効果を比較するため、VEGFR2 阻害薬 SU1498 あるいは ML221 を OIR モデルマウスに投与した。P12 から P16 まで SU1498 (9 mg/kg) を 1 日 1 回腹腔内投与した P17 の OIR モデルマウスの網膜では、溶媒を投与したマウス (Fig. 22A) と比較して、ML221 を投与したマウス (Fig. 22B) と同様に房状形態を示す異常血管の著明な減少がみられた (Fig. 22C and D)。一方、OIR モデルマウスでみられる無血管領域に対しては、ML221 は有意に減少させたが、SU1498 はまったく影響を与えなかった (Fig. 22E)。P17 の OIR モデルマウスの網膜における VEGFR2 の発現分布を解析した結果、第 1 章で示した APJ の発現分布とは異なり、VEGFR2 は、房状形態の異常血管だけでなく正常形態の血管を構成する内皮細胞にも高い発現がみられた (Fig. 23, arrowheads)。



**Figure 22. Effects of the APJ antagonist and the VEGFR2 inhibitor on retinal angiogenesis in the OIR model mice**

(A-C) Representative pictures show isolectin B4 staining in a retinal flat-mount from the OIR model mice at P17 treated systemically with vehicle, ML221, or SU1498. In the insets, the red area indicates the neovascular tufts (NVT) and the blue area indicates the avascular area. (D and E) NVT (D) and avascular areas (E) were quantified (n = 5). Scale bars, 500  $\mu$ m. Data were analyzed by one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test and represent the mean  $\pm$  SEM. \* $p$  < 0.05 and \*\* $p$  < 0.01 vs. vehicle.

*Sci. Rep.* 7(1):15062 (2017) から引用 (一部改変)



**Figure 23. VEGFR2 is highly expressed in the endothelial cells within not only neovascular tufts but also normal vessels**

(A-D) Representative pictures show double immunofluorescence of isolectin B4 (IB4; green) and VEGFR2 (red) in a retinal flat-mount from the OIR model mice at P17. The boxed area in (A) is shown enlarged in (B). Arrowheads indicate VEGFR2-positive normal endothelial cells. These pictures were taken with a confocal laser scanning microscope. Scale bars, 100  $\mu$ m.

*Sci. Rep.* 7(1):15062 (2017) から引用 (一部改変)

## 考 察

本章では、虚血性網膜症の新規治療薬としての APJ 阻害薬の有用性について明らかにすることを目的として、OIR モデルマウスの異常血管新生に対する ML221 の効果について検討した。さらに、VEGFR2 阻害薬と APJ 阻害薬の効果について比較検討を行った。ML221 を投与した OIR モデルマウスの網膜では、異常血管新生が著明に抑制され、さらに、無血管領域の減少がみられた。これは、APJ 阻害薬が虚血性網膜症で生じる病的血管新生を特異的に抑制できることに加えて、網膜虚血を解消できることを示唆している。一方、VEGFR2 阻害薬 SU1498 は、OIR モデルマウスの網膜の異常血管新生を抑制したが、無血管領域を減少させなかった。VEGF は、血管内皮細胞の増殖を引き起こすことに加えて、VEGFR2 を発現する tip cells のガイダンス因子として機能することや新生血管の内皮細胞の生存に必須の因子であることが明らかにされている<sup>62, 69</sup>。これらのことから、SU1498 を投与した OIR モデルマウスの網膜では、異常血管の形成だけでなく正常血管の伸長や内皮細胞の生存も阻害された可能性が考えられ、これらの影響により、無血管領域の減少がみられなかった可能性が考えられる。また、本研究結果より、VEGFR2 は、異常血管だけでなく正常血管にも高い発現がみられ、一方、APJ は、異常血管には高い発現がみられたが、正常血管にはほとんど発現がみられなかった。これらの結果は、APJ 阻害薬が VEGFR2 阻害薬と比較して、虚血性網膜症で生じる病的血管新生をより選択的に阻害できる可能性を示唆している。

血管内皮細胞の過増殖は、硝子体内への房状の異常血管の形成をもたらし、網膜内での正常な血管新生を妨げる<sup>33</sup>。血管新生期の網膜において APJ は、増殖性の内皮細胞に発現していることから<sup>41</sup>、apelin-APJ system の著明な活性化は、血管内皮細胞の過増殖を引き起こすことが考えられる。一方、apelin または APJ 欠損マウスでは、生理的な網膜血管形成が遅延することが明らかにされている<sup>23, 41</sup>。これは、apelin-APJ シグナルが生理的レベルにおいて正常血管新生を促進させることを示している。したがって、ML221 を投与した OIR モデルマウスの網膜において、異常血管新生の抑制に加えて、無血管領域の減少が認められたのは、ML221 が著明に活性化された apelin-APJ シグナルを正常レベルまで低下させたことに起因する可能性が考えられた。

これまでの多くの臨床研究や基礎研究によって示されているように、虚血性網膜症の病状を改善するための最も確立された治療法は、VEGF 阻害療法である。しかしな

がら、抗 VEGF 中和抗体が奏効しない症例が存在することや<sup>8</sup>、抗 VEGF 治療による新生血管消失効果や血管新生阻害効果が病態進行に伴い低下することから<sup>7</sup>、VEGF 非依存的な血管新生誘導機構や VEGF による他の因子の機能や発現調節を介した病的血管新生誘導機構の存在が考えられる。本研究において、ML221 は VEGF および VEGFR2 の発現に影響を与えることなく、血管内皮細胞増殖抑制作用および異常血管新生の抑制作用を示した。この結果は、第 2 章で示した apelin siRNA が VEGF の発現を抑制することなく網膜の異常血管新生を阻害したことや、apelin siRNA または APJ siRNA が VEGFR2 阻害薬の存在下・非存在下にかかわらず、血管内皮細胞の増殖を抑制することを明らかにした報告<sup>24</sup>からも支持される。最近の臨床研究により、虚血性網膜症患者の硝子体や線維性増殖膜において、apelin 発現量と VEGF 発現量に相関がないことや<sup>43, 70</sup>、VEGF 中和抗体非応答性の大腸癌患者の癌組織において、apelin 発現量の増加が認められることが明らかにされている<sup>71</sup>。これらの知見は、VEGF 阻害薬に抵抗性を示す血管新生性疾患に対する二次療法として、APJ 阻害療法が有用である可能性を示唆している。

現在、抗 VEGF 中和抗体やステロイドなどの虚血性網膜症治療薬は、硝子体内注射により投与される。硝子体内投与は、薬物を迅速に網膜に到達できる優れた局所投与方法であるが、手術に準ずる侵襲的な治療手段であり、痛みを伴うだけでなく、眼内炎や網膜剥離、硝子体出血、および白内障などの重篤な合併症を引き起こす危険性がある<sup>72</sup>。さらに、抗 VEGF 抗体の生物学的活性が数週間と限定的であることから<sup>73</sup>、複数回の硝子体内注射が必要であり、患者の負担が大きい。したがって、より低侵襲的な投与方法により治療効果を示し、かつ副作用の少ない薬物を同定する必要がある。本研究では、ML221 を OIR モデルマウスに腹腔内投与することにより、網膜において病的血管新生の抑制効果がみられることを明らかにした。この結果は、末梢から APJ 阻害薬を投与することにより、網膜の病的血管新生を抑制できる可能性を示唆するものである。しかしながら、末梢からの薬物の投与は、硝子体内投与と比較して、全身に薬物が分布しやすい投与方法であることから、網膜以外の組織に対する薬物の影響が懸念される。これまでに APJ 阻害薬による全身症状は明らかにされていないが、apelin または APJ を欠損させても、胎生致死は起きない<sup>14, 18</sup>。また、血管新生を伴わない血管の内皮細胞では、APJ の発現がほとんどみられないことが明らかにされている<sup>25, 31</sup>。これらのことから、APJ 阻害薬による全身性の重篤な副作用の発現は比較的少ないと思われるが、APJ 阻害薬の全身投与による安全性を見極めるためには、長期

投与試験による評価が必要である。

以上の結果より、APJ 阻害薬が虚血性網膜症の病的血管新生を選択的に抑制できることが示され、虚血性網膜症の新たな治療薬としての APJ 阻害薬の有用性が明らかになった。

## 総 括

虚血性網膜症の病的血管新生における apelin-APJ system の病態生理学的意義と新規治療薬としての APJ 阻害薬の有用性を明らかにすることを目的として、OIR モデルマウス、虚血性網膜症患者の硝子体サンプル、および培養細胞を用いて解析を行い、以下に示す結論を得た。

1. OIR モデルマウスの網膜において、異常血管新生に伴い apelin が著明に発現上昇すること、および APJ が異常血管を構成する増殖性の内皮細胞に高発現することを明らかにした。Apelin-KO マウスを用いた OIR モデルの網膜では、VEGF が発現上昇しているにもかかわらず、異常血管新生がほとんど起きないことを明らかにした。また、虚血性網膜症患者の硝子体内において、apelin 量が著明に増加していることを見出した。これらのことから、虚血性網膜症で生じる病的網膜血管新生は、apelin-APJ system の著明な活性化により引き起こされる可能性が示された。
2. OIR モデルマウスの網膜において、apelin-APJ system を阻害すると、新生血管の内皮細胞周囲への周皮細胞の動員が起り、異常血管新生を抑制できることを見出した。この作用は、血管内皮細胞における apelin-APJ シグナルの阻害によって引き起こされる PI3K-Akt シグナル抑制が、Smad3 の活性化を介して血管壁細胞遊走促進因子 MCP-1 を発現誘導した結果によるものであることを明らかにした。これらのことから、虚血性網膜症の網膜において、apelin-APJ シグナルを阻害することにより、血管内皮細胞の過増殖の抑制による血管壁細胞の動員促進を介して成熟血管の形成を誘導できる可能性が示された。
3. APJ 阻害薬は、OIR モデルマウスの網膜において、異常血管新生を著明に抑制するとともに正常血管新生を促進させた。一方、VEGFR2 阻害薬には、異常血管新生の抑制効果はみられたが、正常血管新生促進効果はみられなかった。これらのことから、APJ 阻害薬は、既存の虚血性網膜症治療薬である VEGF 阻害薬と比較して、より選択的に病的血管新生を抑制できることが示唆され、虚血性網膜症の新規治療薬としての APJ 阻害薬の有用性が示された。

以上、本研究において、OIR モデルマウスでは、apelin-APJ system の著明な活性化が起こり、血管内皮細胞の過増殖が誘導され、異常網膜血管新生が引き起こされることを明らかにした。また、虚血性網膜症患者の網膜においても同様の機構が生じている可能性を示した。さらに、apelin-APJ system を阻害することにより、血管内皮細胞の過増殖の抑制を介して正常血管の形成を誘導できること、および異常血管新生を選択的に抑制できることを示した。現在、虚血性網膜症治療法として用いられているレーザー光凝固術や抗 VEGF 抗体の硝子体内投与は、優れた治療効果を示すものの、根本的に虚血を解消できない。また、虚血性網膜症の中には、抗 VEGF 抗体の効果が得られない症例や、治療後に病的血管新生が再燃する症例が存在する。本研究で得られた結果より、APJ 阻害薬は、これら既存の治療法の問題点を解消できる新たな虚血性網膜症治療薬として期待される。今後、本研究成果が、apelin-APJ system を標的とした新たな虚血性網膜症治療法の開発に役立てられることを期待する。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました恩師 摂南大学大学院薬学研究科教授 前田定秋先生に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、数多くの御指導と御助言を賜りました大阪大学大学院薬学研究科助教 笠井淳司先生に深甚なる感謝の意を表します。

種々御討論、御指導いただきました摂南大学大学院薬学研究科准教授 吉岡靖啓先生、同助手 山室晶子先生、同助教 金城俊彦先生に深謝致します。

Apelin 遺伝子欠損マウスを御供与下さいました武田薬品工業株式会社の皆様に深謝致します。

硝子体サンプルを御供与下さいました大阪大学医学部眼科学教室講師（現兵庫医科大学眼科学教室主任教授）五味文先生に深謝致します。

本研究に御協力いただきました摂南大学薬学部薬物治療学研究室の修了生、卒業生ならびに在校生に感謝致します。

最後に、いつも陰ながら支えてくれた家族をはじめ、親族、友人知人一同に心から感謝致します。

2018年3月

石丸 侑希

## 引用文献

1. Gilbert C, Foster A. Childhood blindness in the context of vision 2020--the right to sight. *Bull. World Health Organ.* 2001;79:227-232
2. Dorrell M, Uusitalo-Jarvinen H, Aguilar E, Friedlander M. Ocular neovascularization: Basic mechanisms and therapeutic advances. *Surv. Ophthalmol.* 2007;52 Suppl 1:S3-19
3. Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy. Clinical application of diabetic retinopathy study (drs) findings, drs report number 8. The diabetic retinopathy study research group. *Ophthalmology.* 1981;88:583-600
4. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989;161:851-858
5. Campochiaro PA, Wykoff CC, Shapiro H, Rubio RG, Ehrlich JS. Neutralization of vascular endothelial growth factor slows progression of retinal nonperfusion in patients with diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 2014;121:1783-1789
6. Simo R, Hernandez C. Intravitreal anti-vegf for diabetic retinopathy: Hopes and fears for a new therapeutic strategy. *Diabetologia.* 2008;51:1574-1580
7. Bradley J, Ju M, Robinson GS. Combination therapy for the treatment of ocular neovascularization. *Angiogenesis.* 2007;10:141-148
8. Gomi F, Sawa M, Sakaguchi H, Tsujikawa M, Oshima Y, Kamei M, Tano Y. Efficacy of intravitreal bevacizumab for polypoidal choroidal vasculopathy. *Br. J. Ophthalmol.* 2008;92:70-73
9. Jardeleza MS, Miller JW. Review of anti-vegf therapy in proliferative diabetic retinopathy. *Semin. Ophthalmol.* 2009;24:87-92
10. Patel JJ, Tombran-Tink J, Hykin PG, Gregor ZJ, Cree IA. Vitreous and aqueous concentrations of proangiogenic, antiangiogenic factors and other cytokines in diabetic retinopathy patients with macular edema: Implications for structural differences in macular profiles. *Exp. Eye Res.* 2006;82:798-806
11. O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HH, Tsui LC, Kennedy JL, Shi X, Petronis A, George SR, Nguyen T. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene.* 1993;136:355-360
12. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S,

- Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human apj receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;251:471-476
13. Kuba K, Zhang L, Imai Y, Arab S, Chen M, Maekawa Y, Leschnik M, Leibbrandt A, Markovic M, Schwaighofer J, Beetz N, Musialek R, Neely GG, Komnenovic V, Kolm U, Metzler B, Ricci R, Hara H, Meixner A, Nghiem M, Chen X, Dawood F, Wong KM, Sarao R, Cukerman E, Kimura A, Hein L, Thalhammer J, Liu PP, Penninger JM. Impaired heart contractility in apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circ. Res.* 2007;101:e32-42
  14. Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, Nishiwaki S, Iguchi T, Harada S, Sugaya T, Matsuzaki H, Yamamoto R, Shiota N, Okunishi H, Kihara M, Umemura S, Sugiyama F, Yagami K, Kasuya Y, Mochizuki N, Fukamizu A. Regulatory roles for apj, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J. Biol. Chem.* 2004;279:26274-26279
  15. Lee DK, Cheng R, Nguyen T, Fan T, Kariyawasam AP, Liu Y, Osmond DH, George SR, O'Dowd BF. Characterization of apelin, the ligand for the apj receptor. *J. Neurochem.* 2000;74:34-41
  16. Devic E, Paquereau L, Vernier P, Knibiehler B, Audigier Y. Expression of a new g protein-coupled receptor x-msr is associated with an endothelial lineage in xenopus laevis. *Mech. Dev.* 1996;59:129-140
  17. Cox CM, D'Agostino SL, Miller MK, Heimark RL, Krieg PA. Apelin, the ligand for the endothelial g-protein-coupled receptor, apj, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev. Biol.* 2006;296:177-189
  18. Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, Mochizuki N, Nakata M, Yano T, Fujii R, Takakura N. Spatial and temporal role of the apelin/apj system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J.* 2008;27:522-534
  19. Kunduzova O, Alet N, Delesque-Touchard N, Millet L, Castan-Laurell I, Muller C, Dray C, Schaeffer P, Herault JP, Savi P, Bono F, Valet P. Apelin/apj signaling system: A potential link between adipose tissue and endothelial angiogenic processes. *FASEB J.* 2008;22:4146-4153
  20. Sorli SC, Le Gonidec S, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis. *Oncogene.* 2007;26:7692-7699
  21. Kasai A, Shintani N, Oda M, Kakuda M, Hashimoto H, Matsuda T, Hinuma S, Baba A. Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;325:395-400

22. Saint-Geniez M, Argence CB, Knibiehler B, Audigier Y. The *msr/apj* gene encoding the apelin receptor is an early and specific marker of the venous phenotype in the retinal vasculature. *Gene Expr Patterns*. 2003;3:467-472
23. Kasai A, Shintani N, Kato H, Matsuda S, Gomi F, Haba R, Hashimoto H, Kakuda M, Tano Y, Baba A. Retardation of retinal vascular development in apelin-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2008;28:1717-1722
24. Eyries M, Siegfried G, Ciumas M, Montagne K, Agrapart M, Lebrin F, Soubrier F. Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ. Res*. 2008;103:432-440
25. Kidoya H, Naito H, Takakura N. Apelin induces enlarged and nonleaky blood vessels for functional recovery from ischemia. *Blood*. 2010;115:3166-3174
26. Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, D'Amore PA. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 1994;35:101-111
27. Stahl A, Connor KM, Sapieha P, Chen J, Dennison RJ, Krah NM, Seaward MR, Willett KL, Aderman CM, Guerin KI, Hua J, Lofqvist C, Hellstrom A, Smith LE. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2010;51:2813-2826
28. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. Nih image to imagej: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:671-675
29. Gu X, Samuel S, El-Shabrawey M, Caldwell RB, Bartoli M, Marcus DM, Brooks SE. Effects of sustained hyperoxia on revascularization in experimental retinopathy of prematurity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2002;43:496-502
30. Tatin F, Renaud-Gabardos E, Godet AC, Hantelys F, Pujol F, Morfoisse F, Calise D, Viars F, Valet P, Masri B, Prats AC, Garmy-Susini B. Apelin modulates pathological remodeling of lymphatic endothelium after myocardial infarction. *JCI Insight*. 2017;2
31. Kidoya H, Kunii N, Naito H, Muramatsu F, Okamoto Y, Nakayama T, Takakura N. The apelin/apj system induces maturation of the tumor vasculature and improves the efficiency of immune therapy. *Oncogene*. 2012;31:3254-3264
32. Guaiquil VH, Hewing NJ, Chiang MF, Rosenblatt MI, Chan RV, Blobel CP. A murine model for retinopathy of prematurity identifies endothelial cell proliferation as a potential mechanism for plus disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2013;54:5294-5302
33. Scott A, Fruttiger M. Oxygen-induced retinopathy: A model for vascular pathology in the retina.

- Eye (Lond).* 2010;24:416-421
34. Ruberte J, Ayuso E, Navarro M, Carretero A, Nacher V, Haurigot V, George M, Llombart C, Casellas A, Costa C, Bosch A, Bosch F. Increased ocular levels of igf-1 in transgenic mice lead to diabetes-like eye disease. *J. Clin. Invest.* 2004;113:1149-1157
  35. Suganami E, Takagi H, Ohashi H, Suzuma K, Suzuma I, Oh H, Watanabe D, Ojima T, Suganami T, Fujio Y, Nakao K, Ogawa Y, Yoshimura N. Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization: Possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells. *Diabetes.* 2004;53:2443-2448
  36. Higuchi A, Ohashi K, Kihara S, Walsh K, Ouchi N. Adiponectin suppresses pathological microvessel formation in retina through modulation of tumor necrosis factor-alpha expression. *Circ. Res.* 2009;104:1058-1065
  37. Economopoulou M, Langer HF, Celeste A, Orlova VV, Choi EY, Ma M, Vassilopoulos A, Callen E, Deng C, Bassing CH, Boehm M, Nussenzweig A, Chavakis T. Histone h2ax is integral to hypoxia-driven neovascularization. *Nat. Med.* 2009;15:553-558
  38. Watanabe D, Suzuma K, Matsui S, Kurimoto M, Kiryu J, Kita M, Suzuma I, Ohashi H, Ojima T, Murakami T, Kobayashi T, Masuda S, Nagao M, Yoshimura N, Takagi H. Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *N. Engl. J. Med.* 2005;353:782-792
  39. Gardiner TA, Gibson DS, de Gooyer TE, de la Cruz VF, McDonald DM, Stitt AW. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha improves physiological angiogenesis and reduces pathological neovascularization in ischemic retinopathy. *Am. J. Pathol.* 2005;166:637-644
  40. Masri B, Morin N, Cornu M, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin (65-77) activates p70 s6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J.* 2004;18:1909-1911
  41. del Toro R, Prahst C, Mathivet T, Siegfried G, Kaminker JS, Larrivee B, Breant C, Duarte A, Takakura N, Fukamizu A, Penninger J, Eichmann A. Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood.* 2010;116:4025-4033
  42. Humar R, Kiefer FN, Berns H, Resink TJ, Bategay EJ. Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR)-dependent signaling. *FASEB J.* 2002;16:771-780
  43. Tao Y, Lu Q, Jiang YR, Qian J, Wang JY, Gao L, Jonas JB. Apelin in plasma and vitreous and in fibrovascular retinal membranes of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010;51:4237-4242

44. Saint-Geniez M, D'Amore PA. Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int. J. Dev. Biol.* 2004;48:1045-1058
45. Stitt AW, Gardiner TA, Archer DB. Histological and ultrastructural investigation of retinal microaneurysm development in diabetic patients. *Br. J. Ophthalmol.* 1995;79:362-367
46. Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in pdgf-b-deficient mice. *Science.* 1997;277:242-245
47. Hammes HP, Lin J, Renner O, Shani M, Lundqvist A, Betsholtz C, Brownlee M, Deutsch U. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes.* 2002;51:3107-3112
48. Ballabh P, Xu H, Hu F, Braun A, Smith K, Rivera A, Lou N, Ungvari Z, Goldman SA, Csiszar A, Nedergaard M. Angiogenic inhibition reduces germinal matrix hemorrhage. *Nat. Med.* 2007;13:477-485
49. Montesano R, Pepper MS, Mohle-Steinlein U, Risau W, Wagner EF, Orci L. Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle t oncogene. *Cell.* 1990;62:435-445
50. Banin E, Dorrell MI, Aguilar E, Ritter MR, Aderman CM, Smith AC, Friedlander J, Friedlander M. T2-trprs inhibits preretinal neovascularization and enhances physiological vascular regrowth in oir as assessed by a new method of quantification. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006;47:2125-2134
51. Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA. An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989;86:4544-4548
52. Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate vegf-induced postnatal neovascularization. *Circ. Res.* 1998;83:233-240
53. Ma J, Wang Q, Fei T, Han JD, Chen YG. Mcp-1 mediates tgf-beta-induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration. *Blood.* 2007;109:987-994
54. Aplin AC, Fogel E, Nicosia RF. Mcp-1 promotes mural cell recruitment during angiogenesis in the aortic ring model. *Angiogenesis.* 2010;13:219-226
55. Caselli E, Fiorentini S, Amici C, Di Luca D, Caruso A, Santoro MG. Human herpesvirus 8 acute infection of endothelial cells induces monocyte chemoattractant protein 1-dependent capillary-like structure formation: Role of the ikk/nf-kappab pathway. *Blood.*

- 2007;109:2718-2726
56. Song K, Cornelius SC, Reiss M, Danielpour D. Insulin-like growth factor-i inhibits transcriptional responses of transforming growth factor-beta by phosphatidylinositol 3-kinase/akt-dependent suppression of the activation of smad3 but not smad2. *J. Biol. Chem.* 2003;278:38342-38351
  57. Remy I, Montmarquette A, Michnick SW. Pkb/akt modulates tgf-beta signalling through a direct interaction with smad3. *Nat. Cell Biol.* 2004;6:358-365
  58. Mirzadegan T, Diehl F, Ebi B, Bhakta S, Polsky I, McCarley D, Mulkins M, Weatherhead GS, Lapierre JM, Dankwardt J, Morgans D, Jr., Wilhelm R, Jarnagin K. Identification of the binding site for a novel class of ccr2b chemokine receptor antagonists: Binding to a common chemokine receptor motif within the helical bundle. *J. Biol. Chem.* 2000;275:25562-25571
  59. Rollins BJ. Chemokines. *Blood.* 1997;90:909-928
  60. Kubota Y, Takubo K, Shimizu T, Ohno H, Kishi K, Shibuya M, Saya H, Suda T. M-csf inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. *J. Exp. Med.* 2009;206:1089-1102
  61. Ritter MR, Banin E, Moreno SK, Aguilar E, Dorrell MI, Friedlander M. Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy. *J. Clin. Invest.* 2006;116:3266-3276
  62. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C. Vegf guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* 2003;161:1163-1177
  63. Gaengel K, Genove G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009;29:630-638
  64. Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ. Human endothelial cells express ccr2 and respond to mcp-1: Direct role of mcp-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood.* 2000;96:34-40
  65. Abu El-Asrar AM, Struyf S, Kangave D, Geboes K, Van Damme J. Chemokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. *Eur. Cytokine Netw.* 2006;17:155-165
  66. Davies MH, Stempel AJ, Powers MR. Mcp-1 deficiency delays regression of pathologic retinal neovascularization in a model of ischemic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008;49:4195-4202

67. Maloney PR, Khan P, Hedrick M, Gosalia P, Milewski M, Li L, Roth GP, Sergienko E, Suyama E, Sugarman E, Nguyen K, Mehta A, Vasile S, Su Y, Stonich D, Nguyen H, Zeng FY, Novo AM, Vicchiarelli M, Diwan J, Chung TD, Smith LH, Pinkerton AB. Discovery of 4-oxo-6-((pyrimidin-2-ylthio)methyl)-4h-pyran-3-yl 4-nitrobenzoate (ml221) as a functional antagonist of the apelin (apj) receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012;22:6656-6660
68. Connor KM, Krah NM, Dennison RJ, Aderman CM, Chen J, Guerin KI, Sapiha P, Stahl A, Willett KL, Smith LE. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: A model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nat. Protoc.* 2009;4:1565-1573
69. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat. Med.* 1995;1:1024-1028
70. Zhang Y, Jiang YR, Lu Q, Yin H, Tao Y. Apelin in epiretinal fibrovascular membranes of patients with retinopathy of prematurity and the changes after intravitreal bevacizumab. *Retina.* 2013;33:613-620
71. Zuurbier L, Rahman A, Cordes M, Scheick J, Wong TJ, Rustenburg F, Joseph JC, Dynoodt P, Casey R, Drillenburger P, Gerhards M, Barat A, Klinger R, Fender B, O'Connor DP, Betge J, Ebert MP, Gaiser T, Prehn JHM, Griffioen AW, van Grieken NCT, Ylstra B, Byrne AT, van der Flier LG, Gallagher WM, Postel R. Apelin: A putative novel predictive biomarker for bevacizumab response in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017;8:42949-42961
72. Falavarjani KG, Nguyen QD. Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-vegf agents: A review of literature. *Eye (Lond.)*. 2013;27:787-794
73. Stewart MW, Rosenfeld PJ. Predicted biological activity of intravitreal vegf trap. *Br. J. Ophthalmol.* 2008;92:667-668

