

## I. 基本情報

事業名：(日本語) 循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策実用化研究事業  
(英語) Practical Research Project for Life-Style related Diseases including Cardiovascular Diseases and Diabetes Mellitus

研究開発課題名：(日本語) マクロファージを標的とした糖尿病網膜症の抗体医薬開発研究  
(英語) Development of antibody drug targeting macrophage-derived signals for diabetic retinopathy

研究開発担当者 (日本語) 公立大学法人名古屋市立大学大学院医学研究科 教授 植村明嘉  
所属 役職 氏名：(英語) Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Professor, Akiyoshi Uemura

実施期間：平成28年9月1日～平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 網羅遺伝子発現解析、生体イメージング、抗体医薬の開発に関する研究  
開発課題名：(英語) Comprehensive gene expression analysis, intravital imaging, and antibody drug development

研究開発分担者 (日本語) 株式会社カン研究所 研究所長 今井俊夫  
株式会社カン研究所 主幹研究員 池田わたる  
所属 役職 氏名：(英語) KAN Research Institute, Inc., Chief Scientific Officer, Toshio Imai  
KAN Research Institute, Inc., Principal Scientist, Wataru Ikeda

分担研究 (日本語) *In vitro* 血管新生モデルを用いた細胞動態に関する研究  
開発課題名：(英語) Analysis of cell behavioral dynamics using *in vitro* angiogenesis assay

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人熊本大学国際先端医学研究機構 特任准教授 西山功一  
所属 役職 氏名：(英語) International Research Center for Medical Sciences, Kumamoto University, Associate Professor, Koichi Nishiyama

## II. 成果の概要（総括研究報告）

平成 28 年度は糖尿病網膜症において血管壁バリア機能を破綻させるマクロファージ由来の創薬標的候補分子を同定するため、下記の研究を実施した。

### 1. 網羅遺伝子発現解析による創薬標的分子の同定

名古屋市立大学の植村班では、抗 PDGFR $\beta$  抗体を生後 1 日野生型 C57BL/6 マウスに投与して網膜血管壁のペリサイトを消失させ、生後 8 日（急性炎症）および 10 週（慢性炎症）の網膜からフローサイトメトリー法によりマイクログリアおよびマクロファージ画分を分離し、RNA を精製した。その後、カン研究所の池田班にて、RNA サンプルのクオリティーチェック、ライブラリー調製を行い、RNA-Seq 解析で各画分の発現遺伝子をリスト化し、データマイニングを行った。細胞膜上もしくは細胞外のタンパク質をコードする遺伝子についてフィルタリングを実施したところ、11379 遺伝子が候補として絞り込まれた。さらに Fold change[log2]で $>1$  または $<-1$  の条件で、正常網膜、急性炎症網膜、慢性炎症網膜のマイクログリアおよびマクロファージ画分の遺伝子発現差異解析を行い、網膜血管壁バリア機能を破綻させるマクロファージに特異的な新規創薬標的候補分子の選定を行った。

### 2. 創薬標的分子の機能解析を目的とした *in vitro* 血管新生評価系の開発

熊本大学の西山班では、野生型 C57BL/6 マウスの胸部大動脈組織から酵素処理にて血管内膜細胞を採取し、培養増幅後、磁気分離装置を用いて CD31 陽性内皮細胞を精製・増幅した。培養増幅過程では、TGF $\beta$  阻害剤により内皮間葉転換を抑制することで、精製効率を向上させた。さらに内皮細胞採取後の大動脈中外膜由来の細胞を酵素処理および物理的破碎にて採取し、PDGF-BB を添加して培養増幅した後、NG2 陽性のペリサイト画分を単離した。次に、単離した内皮細胞とペリサイトを最適な細胞比で混合後、浮遊培養にてスフェロイド形成を誘導して I 型コラーゲンゲル内に包埋し、VEGF の存在下でマウス胎仔線維芽細胞と共培養すると、管腔を形成する内皮細胞の周囲をペリサイトが取り巻く血管構造を再現できた。さらに蛍光色素により細胞を標識してタイムラプスイメージングを行うことにより、内皮細胞とペリサイトの動態を可視化することに成功した。本 *in vitro* 血管新生モデルにマクロファージ由来シグナル分子を添加して、内皮細胞およびペリサイトの動態変化を解析する予定である。

To identify macrophage-derived signals responsible for the blood-retina barrier breakdown in diabetic retinopathy, we performed the following experimental research:

1. Comprehensive gene expression analysis for the identification of drug targets

In the Nagoya City University, the Uemura group purified RNA samples from microglia and macrophages sorted from retinas of postnatal day (P) 8 and 10-week C57BL/6 wild-type mice by fluorescence-activated cell sorting after injecting an anti-PDGFR $\beta$  blocking antibody (APB5) at P1. The P8 and 10-week retinas injected with APB5 were assumed to represent acute and chronic inflammation, respectively, induced by pericyte depletion. Then, the RNA samples underwent quality-check, library preparation, RNA-Seq analyses, and data mining by the Ikeda group in the KAN Research Institute, Inc. After filtering the genes with annotation “membrane” or “extracellular”, differential expression levels of the 11,379 genes in each cell fraction were analyzed with fold change[log2] > 1 or < -1. Based on these results, a list of genes expressed in macrophages and microglia under acute and chronic inflammation was extracted.

2. Establishment of *in vitro* angiogenesis assay system for the functional analysis of new drug targets

The Nishiyama group in the Kumamoto University established a method to purify and amplify CD31<sup>+</sup> vascular endothelial cells (ECs) from thoracic aorta of C57BL/6 wild-type mice, by exploiting enzyme digestions and magnetic-activated cell sorting. In this process, agents inhibiting the TGF $\beta$  signal improved the purification efficiency by suppressing endothelial-mesenchymal transition. In addition, NG2<sup>+</sup> pericytes were purified from the aortic media and adventitia by exploiting enzyme digestions and mechanical dissociations, in conjunction with their culture with PDGF-BB. Then, spheroids in floating culture of the mixture of purified ECs and pericytes at appropriate proportions were mounted in type I collagen gels, and co-cultured with mouse embryonic fibroblasts in the presence of VEGF, which gave rise to vascular structures comprising lumenized ECs surrounded by pericytes. The time-lapse imaging combined with fluorescence cell labeling further enabled the visualization of the dynamic movements of ECs and pericytes in the *in vitro* angiogenesis model. By utilizing this system, we will evaluate the effects of macrophage-derived signals on the behavioral dynamics of ECs and pericytes.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 1 件）

1. 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, Uemura A. Sustained inflammation after pericyte depletion induces irreversible blood–retina barrier breakdown. JCI Insight. 2017, 2, e90905.

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Blood-Retina Barrier Breakdown in Pericyte-Free Vessels, 口頭, 植村明嘉, 第 70 回日本臨床眼科学会シンポジウム, 2016/11/3, 国内.
2. ペリサイトの一過性消失による血液網膜関門の不可逆的破綻, 口頭, 植村明嘉, 第 39 回日本分子生物学会年会シンポジウム, 2016/11/30, 国内.
3. Pericyte depletion induces sustained inflammation and irreversible blood-retinal barrier breakdown, 口頭, 植村明嘉, 第 24 回日本血管生物医学会シンポジウム, 2016/12/10, 国内.
4. 血管新生におけるペリサイトの役割, 口頭, 西山功一, 第 39 回日本分子生物学会年会シンポジウム, 2016/11/30, 国内.
5. 血管を新生する集団的内皮細胞運動の構成的理解, ポスター, 西山功一, 定量生物学の会第 8 回年会, 2017/01/08, 国内.

#### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. ペリサイト消失網膜症モデルマウスを用いた糖尿病網膜症の創薬開発, 植村明嘉, 2016 年度 AMED4 事業合同成果報告会, 2016/2/24, 国内.

#### (4) 特許出願

該当なし