

博 士 論 文

網膜異常血管新生の抑制を指向した 既存医薬品の応用に関する研究

Research on application of existing drugs
targeted to suppress pathological retinal angiogenesis

北里大学大学院 薬学研究科 薬学専攻 博士課程

薬物治療学 II (分子薬理学教室)

DP-14201 飯塚 直人

指導 黒山 政一 准教授

中原 努 教授

2018 年度

略語一覽表

α -SMA: α -smooth muscle actin

Ca: calcium

DM: diabetes mellitus

DMSO: dimethyl sulfoxide

DR: diabetic retinopathy

FITC: fluorescein isothiocyanate

GABA: gamma-aminobutyric acid

HDAC: histone deacetylase

HED: human equivalent dose

HUVECs: human umbilical vein endothelial cells

IC₅₀: half maximal (50%) inhibitory concentration

mTOR: mammalian target of rapamycin

Na: sodium

NG2: neuron-glia antigen 2

OIR: oxygen-induced retinopathy

P: postnatal day

pS6: phosphorylated ribosomal protein S6

QOL: quality of life

VEGF: vascular endothelial growth factor

VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor

VHL: von Hippel-Lindau

VPA: valproic acid

目 次

序 論	1
第一章 高酸素曝露による網膜毛細血管の退縮過程及びそれに対す Ca 拮抗薬 (amlodipine 及び nicardipine) の効果	
1-1. 緒言	5
1-2. 実験方法	8
1-2-1. 使用動物	8
1-2-2. 高酸素曝露	8
1-2-3. Amlodipine 及び nicardipine 懸濁液の調製	9
1-2-4. 薬物処置	9
1-2-5. 組織固定	10
1-2-6. 網膜の単離	10
1-2-7. 免疫染色	10
1-2-8. 蛍光画像の取得	11
1-2-9. 血管の定量解析	11
1-2-10. 統計解析	13
1-3. 結果	14
1-3-1. 高酸素曝露による網膜毛細血管の退縮	14
1-3-2. 高酸素曝露が網膜の血管内皮細胞、基底膜及び動静脈に及ぼす影響	17
1-3-3. 高酸素曝露が網膜の血管内皮細胞及びペリサイトに及ぼす影響	19
1-3-4. 高酸素曝露により誘導される網膜血管の変化に対する amlodipine 及び nicardipine の効果	22
1-4. 考察	27
第二章 酸素誘導網膜症モデル (OIR モデル) マウスにおける異常血管新生に対する valproic acid (VPA) の効果	
2-1. 緒言	30
2-2. 実験方法	32
2-2-1. 使用動物	32
2-2-2. OIR モデルの作製	32
2-2-3. 薬液調製	32
2-2-4. 薬物処置	33

2-2-5. 組織固定	33
2-2-6. 網膜の単離	33
2-2-7. 免疫染色	34
2-2-8. 蛍光画像の取得	34
2-2-9. 血管の定量解析	34
2-2-10. 統計解析	35
2-3. 結果	36
2-3-1. OIR モデルマウスにおける網膜の血管新生に対する VPA 及び vorinostat の効果	36
2-3-2. OIR モデルマウスの網膜における mTOR 活性に対する VPA 及び vorinostat の効果	40
2-4. 考察	43
総括	48
謝辞	51
参考文献	53

序 論

日本を含む先進国では、医療の高度化などの要因により、平均寿命が延伸し、高齢化が進んでいる。平成 18 年の厚生労働省による統計では、人口の高齢化に伴い、視覚障害者の数が増加しており、日本の総人口の約 9% が視覚障害を有し、その内の約 70% が 60 歳以上であることが示されている。ヒトの知覚情報の約 80% は、視覚から入力するため (Kato, 2017)、視覚障害を有することは、生活の質 (quality of Life: QOL) に大きな影響を及ぼすと考えられる。平成 28 年度の厚生労働省による調査では、日本人の後天性失明原因は、第 1 位が緑内障 (28.6%)、次いで、網膜色素変性症 (14.0%)、糖尿病網膜症 (diabetic retinopathy: DR) (12.8%)、黄斑変性症 (8.0%)、網膜脈絡膜萎縮 (4.9%) の順であることが示されている (Fig. 1)。

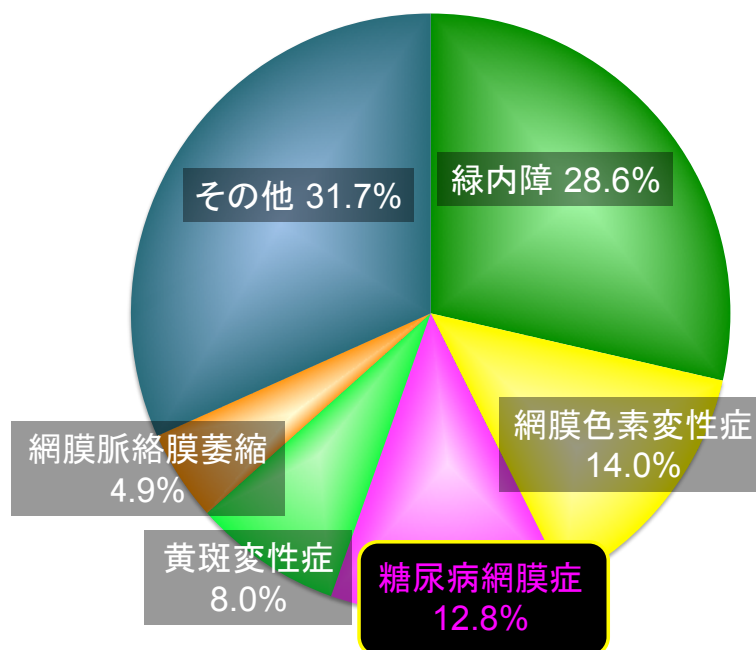


Figure 1 日本人の後天性失明原因

日本人の後天性失明原因の割合を示している。(厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する調査研究 平成 28 年度 総括・分担研究報告書より作成)

DR は、糖尿病 (diabetes mellitus: DM) の三大合併症の 1 つであり、古くから日本人の後天性失明原因の上位に位置している。また、平成 28 年の厚生労働省による国民栄養・健康調査では、日本における DM が強く疑われる者と DM の可能性を否定できない者とを合わせると 2000 万人にも達することが示されている。そのため、合併症である DR は、決して見過ごすことのできない疾患である。DR の発症には DM 罹病期間が大きく関わることが知られている。日本眼科医会では、平均すると DM を発症してから 15 年で約 40% の患者が DR を発症すると報告している。また、厚生省の平成 3 年度の糖尿病調査研究報告書では、2 型 DM 患者において DR の発症率が、DM 罹病期間 5 年未満では 14%、DM 罹病期間 15～19 年では 57% であったことが示されている。

網膜症病期	病態	主な眼底所見
網膜症なし		なし
単純網膜症	血管透過性亢進	<ul style="list-style-type: none"> ・毛細血管瘤 ・網膜点状出血 ・硬性白斑
増殖前網膜症	血管閉塞	<ul style="list-style-type: none"> ・軟性白斑 ・静脈異常 ・微小血管異常
増殖網膜症	血管新生	<ul style="list-style-type: none"> ・新生血管 ・硝子体出血 ・線維血管性増殖膜 ・牽引性網膜剥離

Table 1 DR の病期ごとの病態及び主な眼底所見
(医学出版 月刊 糖尿病 2010 年 2 月号より作成)

DR では、高血糖あるいは高血糖に起因して生じた炎症などにより、網膜血管が障害され、血管透過性が亢進したり、網膜に点状出血が生じたりする (単純網膜症)。その後、ステージが進行すると、炎症は、さらに重症化し、黄斑部に浮腫が生じたり、網膜の毛細血管が閉塞・退縮することによって、軟性白斑と呼ばれる虚血領域が形成される (増殖前網膜症)。網膜虚血は、血管透過性亢進作用や血管新生促進作用を示す血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth

factor: VEGF) の発現を増大させ、網膜異常血管新生を誘導する (増殖網膜症)。異常新生血管は、非常に脆く、破綻すると眼内出血を引き起こし、それが原因となって、著しい視力低下や失明へと至る可能性がある (Alon et al., 1995; Saint-Geniez et al., 2004)。

現在、日本の臨床現場では、DR に関連する治療法として、レーザー光凝固術や硝子体手術などの外科的治療の他、副腎皮質ステロイド薬及び抗 VEGF 薬の硝子体内投与による薬物治療が行われているが (Ogura et al., 2016)、それら薬物治療の適応は、糖尿病黄斑浮腫に限られている。糖尿病黄斑浮腫に対して、上述の薬物治療が良好な治療成績を示す (Ogura et al., 2014; Brown et al., 2015) 一方で、副腎皮質ステロイド薬の硝子体内投与では、白内障 (17.8%)、眼圧上昇 (20.0%) 及び眼内炎 (頻度不明) などが、抗 VEGF 薬の硝子体内投与では、眼圧上昇 (4.4%)、硝子体剥離 (1.3%) 及び脳卒中 (0.3%) などの重大な副作用が報告されている (Table 2)。また、硝子体内投与法は、直接、眼球に注射するため、手術に準ずる侵襲的な治療法であり、繰り返し投与により、眼球がダメージを受けたり、網膜剥離を引き起こす危険性がある。従って、内服などの非侵襲的な投与方法により効果を発揮する、安全性の高い DR の治療薬が必要とされている。

治療薬 (硝子体内投与)	重大な副作用
ステロイド薬 ・ トリアムシノロン	<ul style="list-style-type: none"> ・ 白内障 ・ 眼圧上昇 ・ 眼内炎
抗 VEGF 薬 ・ ラニズマブ ・ アフリベルセプト	<ul style="list-style-type: none"> ・ 眼圧上昇 ・ 硝子体剥離 ・ 脳卒中 <p>など</p>

Table 2 DR に関連する薬物治療法とその問題点
(各薬剤の医薬品添付文書より作成)

新たな治療薬を見出す上では、新規化合物を発見する方法と既に臨床で使用されている医薬品（既存医薬品）から新規薬効を見出す方法がある。後者をドラッグリポジショニングというが (Li and Jones, 2012)、新規化合物の開発と比較すると、臨床応用されるまでに要する期間が短く、費用も抑えることができる。また、既存医薬品には、安全性や薬物動態に関する豊富なデータが存在し、それを有効活用できることも多い (Shim and Liu, 2014; Langedijk et al., 2015)。このように、既存医薬品から新たな薬理作用を見出すという手法には利点が多く、薬物治療学の発展に寄与すると共に、実臨床における意義が大きいものと考えられる。

そこで、本研究では、DR などの眼疾患において視覚障害や失明の原因となる網膜異常血管新生に対する抑制作用を有する既存医薬品を見出すことを目的とした。第一章では、新生仔期のマウスを用いて、高酸素曝露によって引き起こされる網膜の毛細血管の退縮過程と高酸素曝露による網膜血管の変化に対する降圧薬である Ca 拮抗薬 (amlodipine 及び nifedipine) の効果について検討した。次いで、第二章では、近年、血管新生抑制作用が報告されている抗てんかん薬である valproic acid (VPA) (Zhang et al., 2014) が、高酸素曝露後に生じる網膜異常血管新生に及ぼす影響について検討した。そして最後に、第二章において確認された VPA の網膜異常血管新生抑制作用の実臨床における意義を検討した (第三章)。

第一章

高酸素曝露による網膜毛細血管の退縮過程及び

それに対する Ca 拮抗薬 (amlodipine 及び nicardipine) の効果

1-1. 緒言

DR において観察される異常新生血管は、大別すると 2 つの段階、すなわち、1) 高血糖などにより血管が障害され、血流が障害されることで、血管が閉塞・退縮し、低酸素・虚血領域が形成される段階、2) 網膜が虚血状態に陥ることで VEGF などの血管新生促進因子の発現が増大し、異常血管新生が生じる段階、を経て誘導される。これまで、多くの研究者は、網膜異常血管新生が誘導される後半の段階に着目し、VEGF の作用を減弱させることなどにより、異常血管新生を抑制することを目的として研究を行ってきた (Agostini et al., 2005; Maier et al., 2005)。しかしながら、網膜異常血管新生が誘導される前段階、すなわち、網膜血管の退縮及び低酸素・虚血領域の形成を抑制することは、異常血管新生を未然に防ぐことにつながるため、重要な治療戦略の 1 つであると考えられる。そこで、本章では、DR において、網膜血管が退縮する機序とそれを抑制する薬物を見出すことを目的として、網膜血管の研究に広く用いられている新生仔期のマウスにおいて検討を行った。

マウスの網膜血管は、出生直後に視神経乳頭より放射状に新生を開始し、初めの約 1 週間で網膜表層の血管網が形成される。そして、3 層からなる網膜血管網の全体は、生後約 3 週間で構築される (Stone et al., 1995; Dorrell et al., 2002; Stahl et al., 2010)。このように、新生仔期のマウスでは網膜血管は発達期にあり、血管網の形成過程を比較的容易に観察することができる。

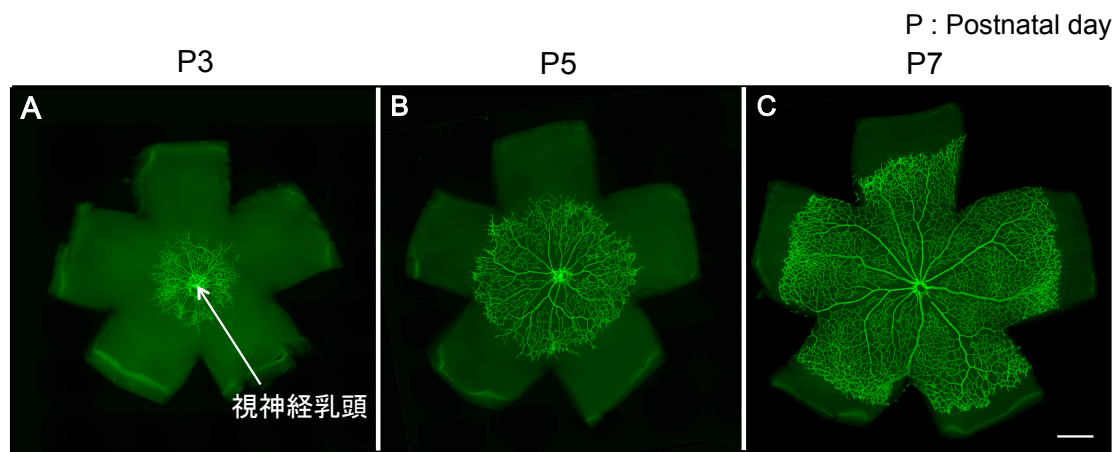


Figure 2 マウス網膜の表層血管網の形成

血管内皮細胞マーカーである抗 CD31 抗体を用いて、3, 5 及び 7 日齢のマウス網膜を蛍光免疫染色した whole-mount 標本を示している。マウスの網膜血管は、出生直後に視神経乳頭より新生を開始し、初めの約 1 週間で網膜表層の血管網が形成される。Scale bar: 500 μ m.

発達期の網膜血管は、高酸素曝露や VEGF 作用の消失に対し高い感受性を示し、新生仔期のマウスへの高酸素曝露や VEGFR 阻害薬の投与は、網膜における血管内皮細胞死を誘導し、毛細血管を退縮させることが示されている (Ozaki et al., 2000; Gu et al., 2002)。

DR における異常血管新生と類似した、硝子体側へと逸脱した異常新生血管 (血管瘤) が形成される実験モデルとして酸素誘導網膜症モデル (OIR モデル) がある (Smith et al., 1994; Connor et al., 2009; Stahl et al., 2010)。OIR モデルは、網膜異常血管新生の発生機序の解析やそれを抑制する薬物の探索を目的とした研究に世界中で広く用いられている。

OIR モデルでは、2 つの段階、すなわち、1) 新生仔期のマウスに高酸素を曝露し、網膜の毛細血管を退縮させることで、網膜中心部に無血管 (低酸素・虚血)

領域を形成させる段階、2) その後、マウスを通常大気下に戻して飼育することで、相対的な低酸素状態に陥らせ、無血管領域への血管新生と網膜血管瘤の形成を誘導する段階、を経る。OIR モデルにおける網膜血管瘤の形成の程度は、高酸素曝露終了後の網膜の低酸素状態の程度と相関することが示されている (Higgins et al., 1999)。そのため、OIR モデルにおいて、高酸素曝露による網膜毛細血管の退縮を抑制し、無血管領域の拡大を防ぐことにより、その後の異常血管新生の程度が軽減されると考えられる。

そこで本章では、高酸素曝露により網膜毛細血管が退縮し、低酸素・虚血領域が形成され、それが拡大することが異常血管新生を誘導する引き金であることに着目し、網膜毛細血管の退縮過程について詳細に検討した。網膜毛細血管の退縮には一部、血管の収縮による血流障害が関与していることが示されている (Higgins et al., 1999; Lobov et al., 2011)。そこで、強い血管拡張作用を有する Ca 拮抗薬 (amlodipine 及び nicardipine) の高酸素曝露による網膜毛細血管退縮に対する効果についても検討した。

1-2. 実験方法

1-2-1. 使用動物

雌雄の ICR マウス (8 週齢) を Charles river laboratories (Kanagawa, Japan) から購入した。雌マウスと雄マウスを自由摂食・自由飲水可能なケージ内で 12 時間の明暗サイクルで馴化させた後に同居させた。妊娠したマウスは個別のケージへ移し、出生したマウスの 7 日齢 (postnatal day 7, P7) から P8 までのものを使用した。

1-2-2. 高酸素曝露

大気下で飼育していた P7 のマウスを酸素濃度を 80% に保ったチャンバー内で 24 時間、母マウスと共に自由摂食・自由飲水可能なケージで飼育した。チャンバー内の酸素濃度は酸素コントローラー (ProOx; Biospherix, Redfield, NY, USA) で維持した。チャンバーの壁には直径 1 cm 程度の換気口を開け、チャンバー内の二酸化炭素濃度及び温度の上昇を防いだ。そして、チャンバー内にシリカゲルを置いて、チャンバー内の湿度の上昇を防いだ。高酸素曝露前、高酸素曝露開始 6, 12 及び 24 時間後に評価した。

1-2-3. Amlodipine 及び nicardipine 懸濁液の調製

Ca 拮抗薬である amlodipine (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) 及び nicardipine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は、0.5% methylcellulose 水溶液で 1 mg/mL の濃度になるように懸濁した。マウス背部皮下に体重 1 g あたり 10 μ L を投与した。対照には、0.5% methylcellulose 水溶液を同量投与した。

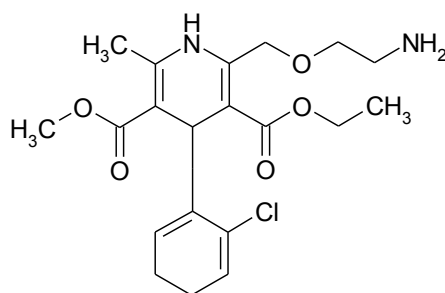


Figure 3 Amlodipine (3-O-ethyl 5-O-methyl 2-(2-aminoethoxymethyl)-4-(2-chlorophenyl)-6-methyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate) の構造式

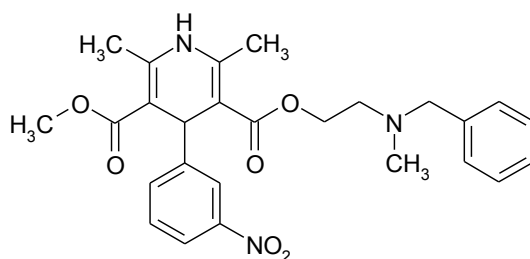


Figure 4 Nicardipine (5-O-[2-[benzyl(methyl)amino]ethyl] 3-O-methyl 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate) の構造式

1-2-4. 薬物処置

高酸素曝露開始 6 時間後にマウスをチャンバー内から取り出し、amlodipine (10 mg/kg, s.c.) 又は nicardipine (10 mg/kg, s.c.) を単回投与した。薬物投与のためにマウスをチャンバー外に置く時間を 30 分間と統一した。その後、高酸素曝露を再開した。高酸素曝露前、薬物投与後に高酸素曝露を再開した 6 及び 18 時間後に網膜血管を評価した。

1-2-5. 組織固定

マウスに pentobarbital sodium (50 mg/kg, i.p.) を投与して麻酔した後、速やかに胸腔を開き、左心室を小さく切開した。そして、1 cm の長さに切断した 22G の金属性注射針を大動脈起始部に保持した。右心耳を切開した後、組織固定液 (1% paraformaldehyde 含有 PBS) を全身性に灌流し、組織を固定した。眼球を摘出した後、30 分から 1 時間、4℃ の 4% paraformaldehyde 含有 PBS 中で更に組織を固定した。

1-2-6. 網膜の単離

1-2-5. 組織固定の項に述べた方法で得た眼球から、角膜、虹彩、水晶体、強膜及び硝子体を除去して網膜を単離した。単離した網膜を更に一晩、4℃ の 4% paraformaldehyde 含有 PBS 中で固定した。翌日、網膜を -20℃ 下で長期保存できるように、methanol 処理を行った。Methanol を、PBTw (0.1% Tween 20 含有 PBS) を用いて、25%、50%、75% の濃度に調製し、網膜を薄い濃度から順に濃い濃度 (25%→50%→75%→100%) で処理して、100% の methanol 中に -20℃ 下で保存した。

1-2-7. 免疫染色

冷凍庫内 (-20℃) で、100% methanol 中に保存してあった網膜を、0.5% TritonX-100 含有 PBS (PBS-T) で 10 分毎に合計 3 回振とうしながら洗浄した。PBS-T により洗浄した網膜を 2 mL チューブに移し、0.22 µm のフィルターで濾過した 5% normal goat serum 含有 PBS-T で 30 分間ブロッキングし、各種一次抗体を所定の濃度になるように 5% normal goat serum 含有 PBS-T で希釈し、網膜と一晩振とう反応させた。

一次抗体は、血管内皮細胞に対して rat monoclonal anti-mouse CD31 antibody (1:500, clone MEC 13.3; BD Biosciences, San Diego, CA, USA)、血管基底膜の構成成分である type IV collagen に対して rabbit polyclonal anti-type IV collagen

antibody (1:8000; Cosmo Bio, Tokyo, Japan)、ペリサイトの構成成分である neuron-glia antigen 2 (NG2) に対して rabbit polyclonal anti-NG2 antibody (1:500; Millipore, Billerica, MA, USA)、血管平滑筋の構成成分である α -smooth muscle actin (α -SMA) に対して Cy3-conjugated monoclonal anti- α -SMA antibody (1:500; Sigma-Aldrich) を用いた。

二次抗体は、抗 CD31 抗体 に対して Fluoresceinisothiocyanate (FITC)-conjugated AffiniPure goat anti-rat IgG (H+L) antibody (1:400; Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA) 又は Cy3-conjugated AffiniPure goat anti-rat IgG (H+L) antibody (1:400; Jackson Immuno Research Labs)、抗 type IV collagen 抗体に対して FITC-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody (1:400; Jackson Immuno Research Labs)、抗 NG2 抗体に対して Alexa Fluor 647-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody (1:400; Jackson Immuno Research Labs) を 5% normal goat serum 含有 PBS-T で希釈して 3 時間反応させた。その後、網膜を 10 分毎に合計 3 回 PBS-T で洗浄し、10 分間 4% paraformaldehyde 含有 PBS に浸漬した。最後に網膜を 10 分毎に 3 回 PBS で洗浄し、スライドガラス上に広げて VECTASHIELD[®] Mounting Medium (Vector laboratories Inc., CA, USA) で封入し whole-mount 標本とした。これらの操作は室温で行った。

1-2-8. 蛍光画像の取得

蛍光顕微鏡 (BZ-9000; KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて蛍光画像を取得した。

1-2-9. 血管の定量解析

取得した蛍光画像を用いて、毛細血管密度、NG2 陽性のペリサイト密度、血管径、血管分岐数、及び無血管領域の評価を行った。それらの解析には、画像解析ソフト ImageJ (version 1.51) (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いた。

毛細血管密度の評価：蛍光顕微鏡の 10 倍の対物レンズで画像 (1449 μm x 1091 μm) を取得し、その後、画像を連結した。そして、Figure 5 のように、視神経乳頭から網膜末端に向かって形成されている血管網を 3 (中心、中間及び末梢) 領域に分けた。各領域において、動静脈間の領域を選択し、CD31 由来である閾値以上の蛍光強度を持つピクセル数を選択領域の総ピクセル数で除して毛細血管密度を算出した。

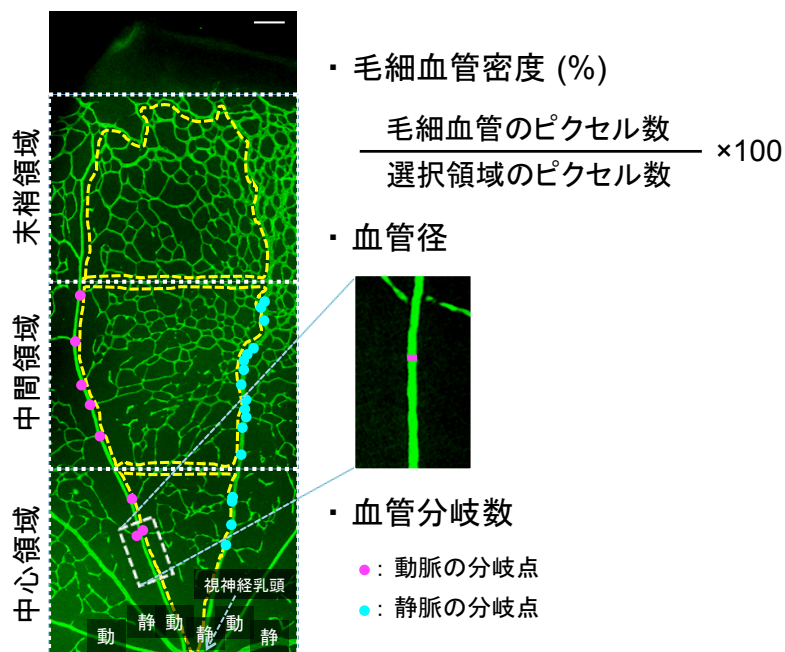


Figure 5 毛細血管密度、血管径及び血管分岐数の評価方法

高酸素曝露前のマウス網膜を血管内皮細胞マーカーである抗 CD31 抗体を用いて蛍光免疫染色した whole-mount 標本を示している。白色の点線で網膜の各領域の境界を、黄色の点線で動静脈間の領域を示している。Scale bar: 100 μm .

NG2 陽性のペリサイト密度の評価：毛細血管密度の評価に準じて画像を取得し、その後、画像を連結した。網膜の中心及び末梢領域において、動静脈間の領域を選択し、NG2 由来である閾値以上の蛍光強度を持つピクセル数を選択領域の総ピクセル数で除して NG2 陽性のペリサイト密度を算出した。

血管径の評価：毛細血管密度の評価において使用した画像を用いて、網膜中心領域に走行する動静脈について、その直径を測定した (Fig. 5)。

血管分岐数の評価：毛細血管密度の評価において使用した画像を用いて、各動静脈について、中間領域と末梢領域の境界辺りまで (視神経乳頭から約 680 μm) の分岐点を計数した (Fig. 5)。各動静脈における分岐点の数を、測定距離で除することで単位長さあたりの血管分岐数を算出した。

無血管領域の評価：蛍光顕微鏡の 10 倍の対物レンズで網膜の全領域が含まれるように画像 (1449 μm x 1091 μm) を 20~35 枚取得した。それらの画像を連結して網膜全体を示す画像を得た (Fig. 6)。網膜表層領域の面積 (ピクセル数) に対する無血管領域の面積 (ピクセル数) の割合から無血管領域 (%) を算出した。

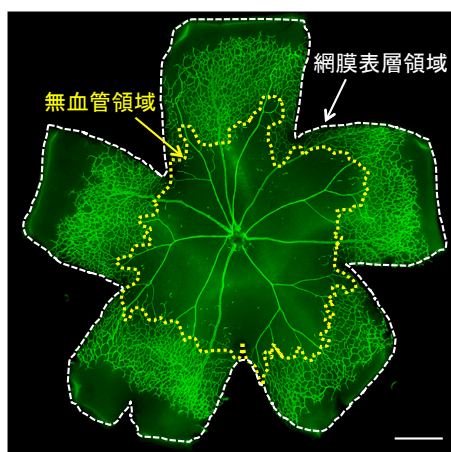


Figure 6 無血管領域の評価方法

高酸素曝露開始 24 時間後 (P8) のマウス網膜を血管内皮細胞マーカーである抗 CD31 抗体で蛍光免疫染色した whole-mount 標本を示している。白色の点線で網膜表層領域を、黄色の点線で無血管領域を示している。Scale bar: 500 μm .

1-2-10. 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。2 群間の比較には *t*-test を行い、多群間の比較には one-way ANOVA を行った後、Tukey's test を行った。それらの解析には、GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA) を用いた。 $p < 0.05$ のとき、統計学的に有意差有りとした。

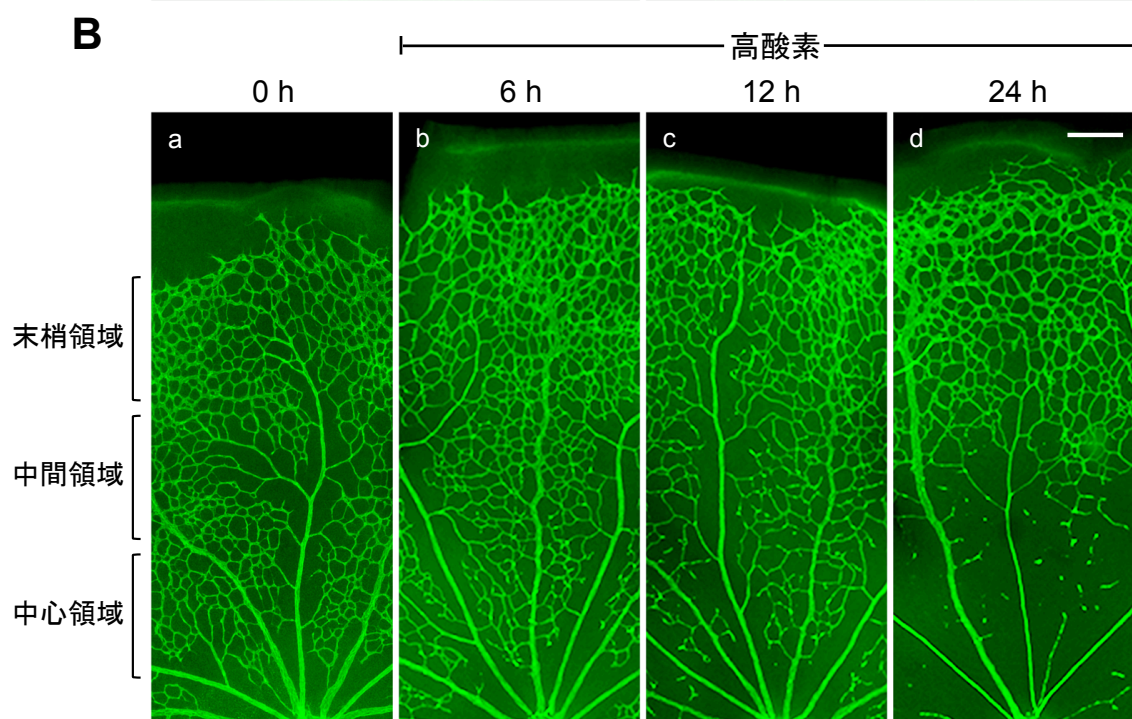
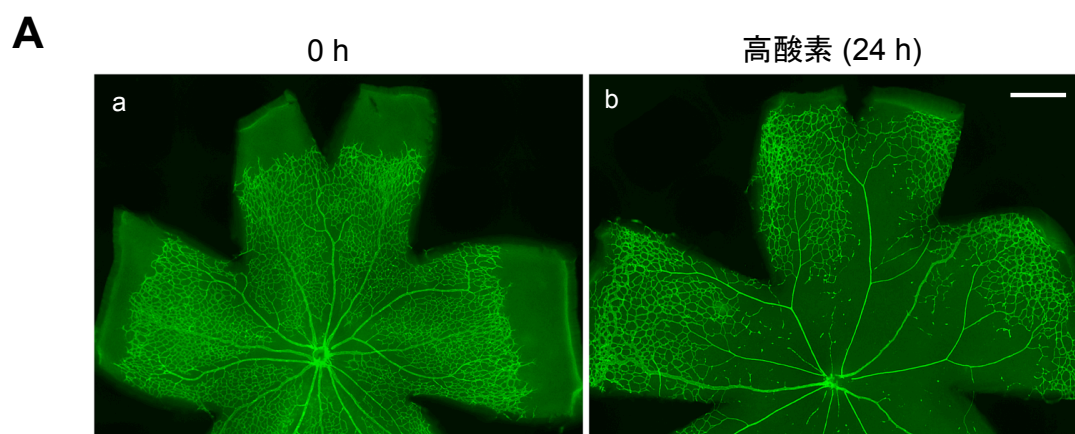
1-3. 結果

1-3-1. 高酸素曝露による網膜毛細血管の退縮

まず、P7 のマウスを高酸素 (80%) 環境下で飼育し、高酸素曝露が網膜血管に及ぼす影響について、血管内皮細胞マーカーである抗 CD31 抗体を用いた蛍光免疫染色により検討した。

高酸素曝露開始 6 時間後より、網膜の中心領域から中間領域にかけて存在する毛細血管が退縮し始め、高酸素曝露開始 24 時間後では、網膜中心領域に顕著な無血管領域が形成された。一方、網膜末梢領域の血管網は、高酸素曝露の影響をほとんど受けなかった (Fig. 7A, B)。

網膜の各領域 (中心、中間及び末梢領域) の毛細血管密度を定量した結果、高酸素曝露により、中心及び中間領域の毛細血管密度は、高酸素の曝露時間に依存して減少するものの、末梢領域の毛細血管密度は、高酸素曝露の影響をほとんど受けないことが示された (Fig. 7C)。



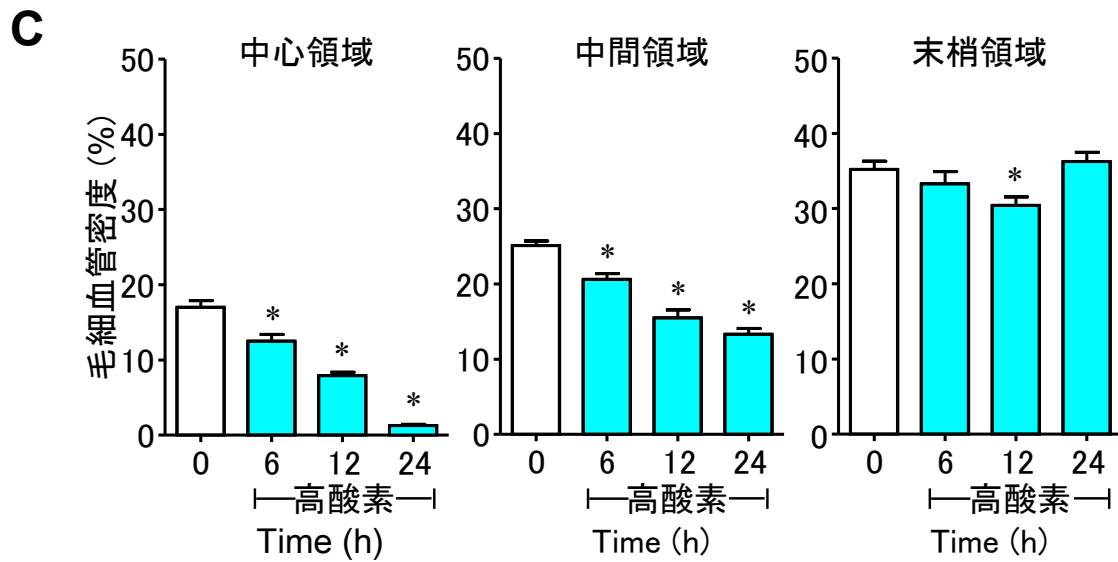


Figure 7 高酸素曝露による網膜毛細血管の退縮

A: 高酸素曝露前 (a) 及び高酸素曝露開始 24 時間後 (b) のマウス網膜を抗 CD31 抗体で蛍光免疫染色した whole-mount 標本を示している。B: 高酸素曝露後の網膜血管の経時変化を示している。C: 高酸素曝露による網膜の各領域 (中心、中間及び末梢領域) における毛細血管密度の変化を示している。高酸素曝露により、網膜の中心及び中間領域における毛細血管密度は減少したが、末梢領域の毛細血管密度は、高酸素曝露の影響をほとんど受けなかった。Scale bars: 500 μ m (Ab), 70 μ m (Bd). * $p < 0.05$ vs. 0 h.

1-3-2. 高酸素曝露が網膜の血管内皮細胞、基底膜及び動静脈に及ぼす影響

次に、高酸素曝露による網膜中心領域の毛細血管の退縮過程について詳細に検討した。

網膜血管は、血管内皮細胞とその周囲を取り囲むペリサイトが基底膜に包まれた構造をしている。血管内皮細胞が傷害されると、血管内皮細胞を欠き、基底膜のみが残存している構造が認められるようになる。そこで、抗 CD31 抗体と基底膜のマーカーである抗 type IV collagen 抗体を用いて蛍光免疫染色を行うことにより、血管内皮細胞の傷害について検討することとした。

高酸素曝露前の網膜では、type IV collagen 陽性の基底膜は、ほぼ全ての CD31 陽性の血管内皮細胞から構成される血管を包むように存在していた (Fig. 8Aa, d, g)。

高酸素曝露開始 6 時間後では、血管内皮細胞を欠いた基底膜のみの血管様構造が観察され始めるようになり (Fig. 8Ab, e, h)、それは、高酸素曝露開始 12 時間後において著しく増加した (Fig. 8Ac, f, i)。

また、高酸素曝露開始 6 時間後より、動脈径の減少が観察されたのに対し、静脈径は、高酸素曝露の影響を受けなかった (Fig. 8Ab, e, h, B)。高酸素曝露開始 12 時間後においても、動脈径の減少は認められた (Fig. 8Ac, f, i, B)。

さらに、高酸素曝露開始 6 時間後では、動脈のみにおいて、分岐数が減少したが (Fig. 8Ab, e, h, C)、高酸素曝露開始 12 時間後になると、動脈及び静脈の両方の分岐数が減少するようになった (Fig. 8Ac, f, i, C)。

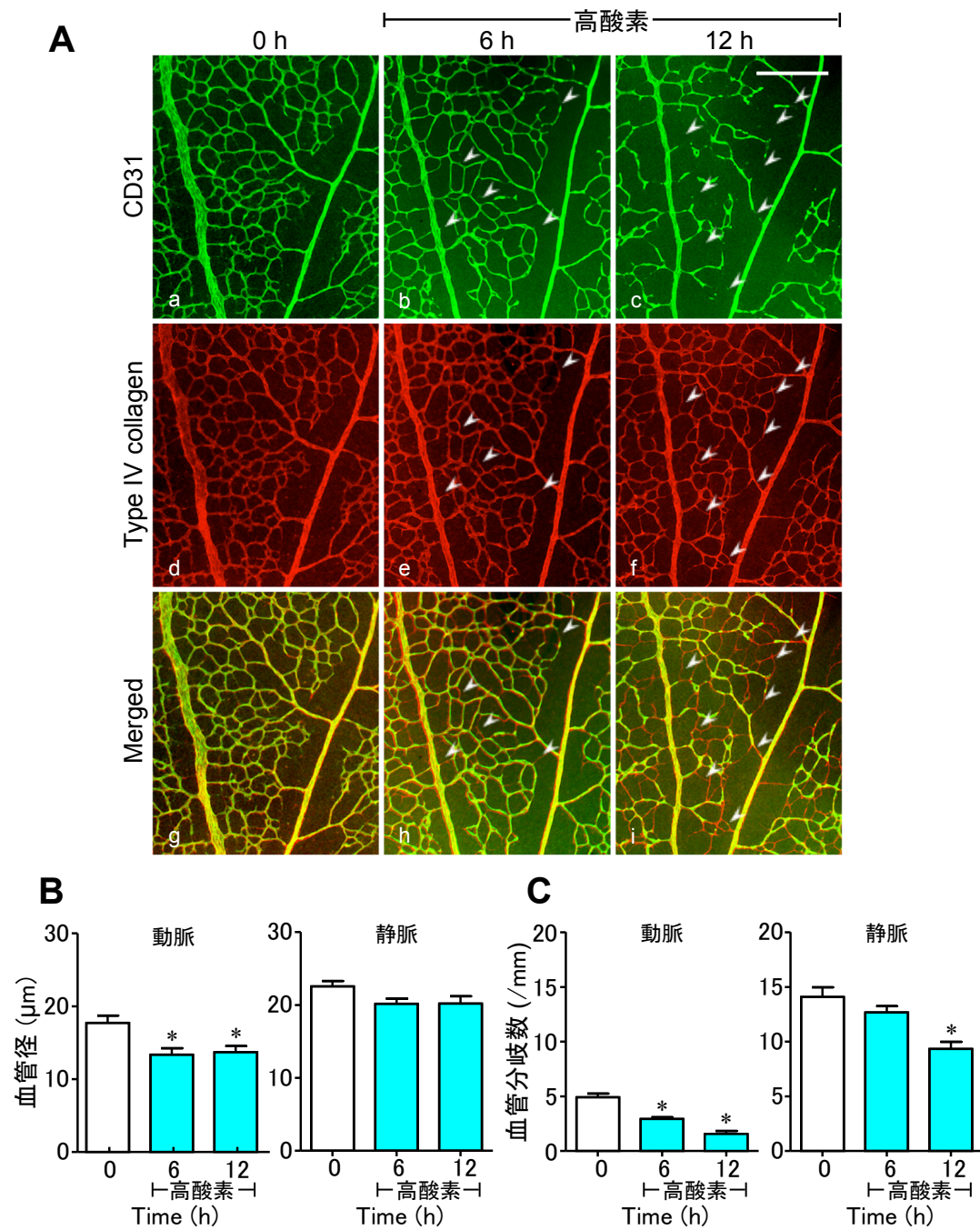


Figure 8 高酸素曝露が網膜の血管内皮細胞、基底膜及び動静脈に及ぼす影響
A: 高酸素曝露前 (a, d, g)、高酸素曝露開始 6 (b, e, h) 及び 12 (c, f, i) 時間後のマウス網膜を抗 CD31 抗体及び抗 type IV collagen 抗体で蛍光免疫染色した whole-mount 標本を示している。白色の矢尻で血管内皮細胞を欠いた基底膜のみの血管様構造を示している。B, C: 動静脈の径 (B) 及び分岐数 (C) の定量結果を示している。高酸素曝露により、動脈径及び動静脈の分岐数が減少した。Scale bar: 200 μm (Ac). * $p < 0.05$ vs. 0 h.

1-3-3. 高酸素曝露が網膜の血管内皮細胞及びペリサイトに及ぼす影響

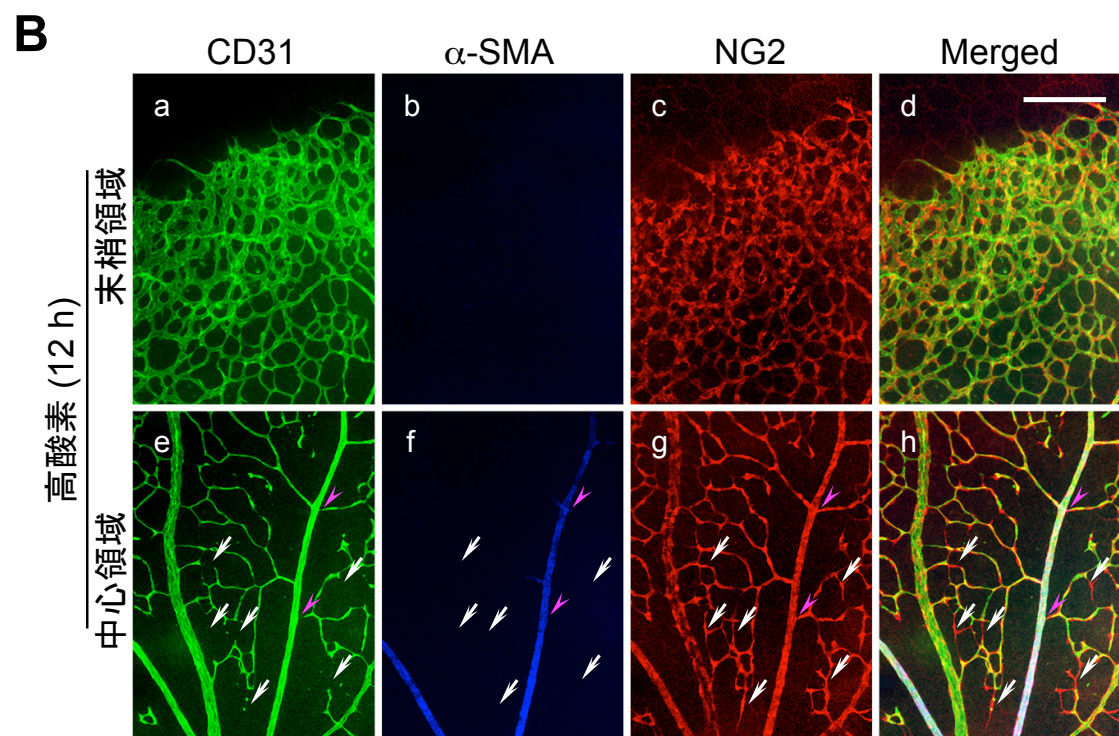
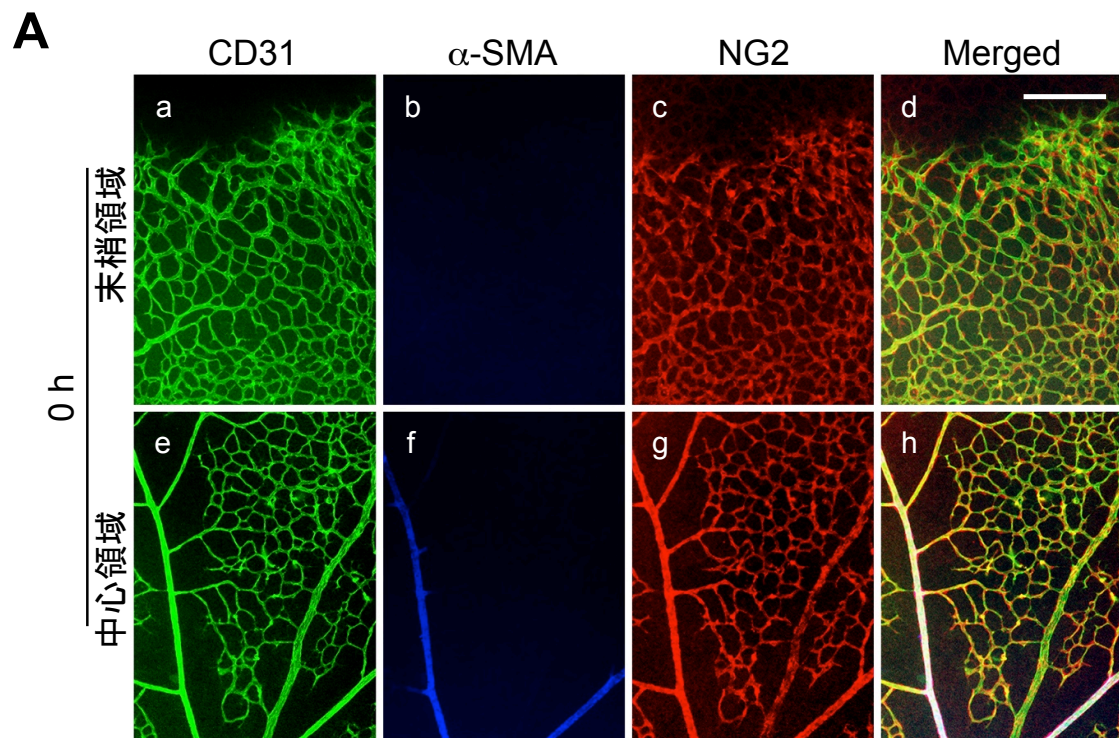
次に、高酸素曝露が網膜の動脈径を減少させた機序を明らかにするために、高酸素曝露がペリサイトに及ぼす影響について検討した。

高酸素曝露前のマウス網膜では、網膜の中心領域から中間領域にかけて走行する動脈において、血管平滑筋の構成成分である α -SMA が顕著に発現している様子が認められたが、静脈及び毛細血管では、 α -SMA の発現は、ほとんど観察されなかった (Fig. 9Ab, f)。一方、NG2 陽性のペリサイトは、ほぼ全ての血管において認められた (Fig. 9Ac, g)。

高酸素曝露開始 12 時間後では、前述したように、網膜中心領域において CD31 陽性の血管内皮細胞が消失した。そして、それに伴い NG2 陽性のペリサイトが消失している様子が観察された。一部の血管様構造において、血管内皮細胞が消失しているものの、NG2 陽性のペリサイトが残存していた (Fig. 9Be-h)。一方、網膜末梢領域においては、血管内皮細胞同様、NG2 陽性のペリサイトにおいても高酸素曝露による大きな変化は生じなかった (Fig. 9Ba-d)。

高酸素曝露開始 12 時間後における CD31 陽性の血管内皮細胞及び NG2 陽性のペリサイトの area density を定量すると、CD31 陽性の血管内皮細胞の方が減少の程度が有意に大きいことが示された (Fig. 9C)。

また、高酸素曝露開始 12 時間後において、 α -SMA 陽性のペリサイトで覆われている動脈の分岐部が収縮している様子が観察された (Fig. 9Be-h)。



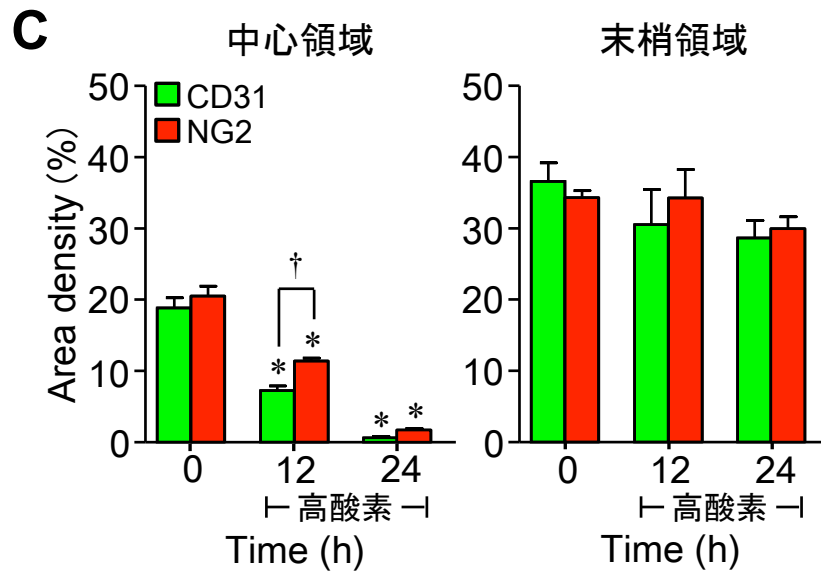


Figure 9 高酸素曝露が網膜の血管内皮細胞及びペリサイトに及ぼす影響

A: 高酸素曝露前、B: 高酸素曝露開始 12 時間後のマウス網膜を抗 CD31 抗体、抗 α -SMA 抗体及び抗 NG2 抗体で蛍光免疫染色した whole-mount 標本を示している。白色の矢印で血管内皮細胞が脱落した後に残存している NG2 陽性のペリサイトを、ピンク色の矢尻で動脈の分岐部が収縮している様子を示している。C: 網膜中心及び末梢領域の CD31 及び NG2 の area density を定量した結果を示している。高酸素曝露開始 12 時間後では、網膜中心領域において、NG2 より先に CD31 の area density が減少した。Scale bars: 200 μ m (Ad, Bd). * p < 0.05 vs. 0 h; † p < 0.05.

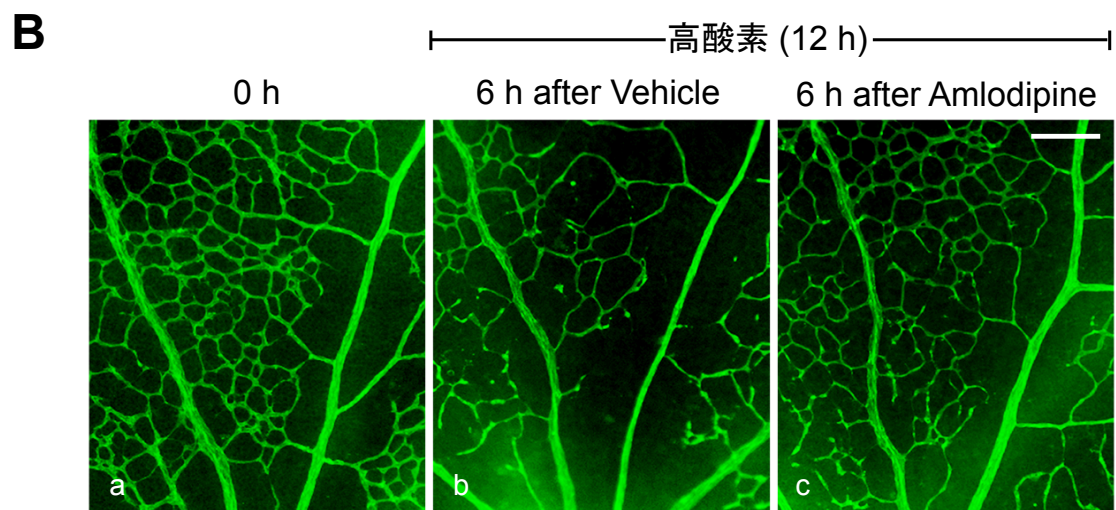
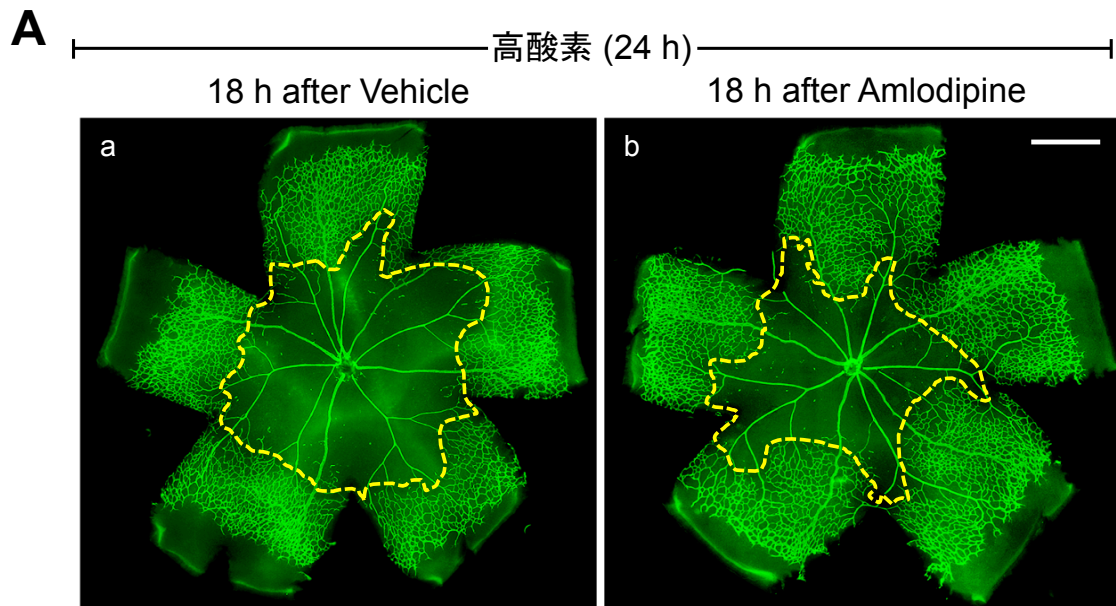
1-3-4. 高酸素曝露により誘導される網膜血管の変化に対する amlodipine 及び nicardipine の効果

次に、高酸素曝露により誘導される網膜血管の変化に対する amlodipine 及び nicardipine の効果について検討した。

Vehicle 投与群及び amlodipine 投与群のどちらにおいても、高酸素曝露開始 24 時間後において、網膜中心領域に顕著な無血管領域が形成された。しかしながら、無血管領域の面積は、vehicle 投与群と比較し、amlodipine 投与群において、有意に小さかった (Fig. 10A, D)。

高酸素曝露開始 12 時間後における網膜中心領域の毛細血管密度の減少は、amlodipine 投与により、小さいながらも有意に抑制されることが示された (Fig. 10C)。また、高酸素曝露による動脈の径及び分岐数の減少も、amlodipine 投与により僅かだが有意に抑制された (Fig. 10B, E, F)。

他の Ca 拮抗薬である nicardipine を用いた場合においても、amlodipine を用いた場合とほぼ同様な結果が得られたが、nicardipine は、無血管領域の形成に対しては影響を及ぼさなかった (Fig. 11)。



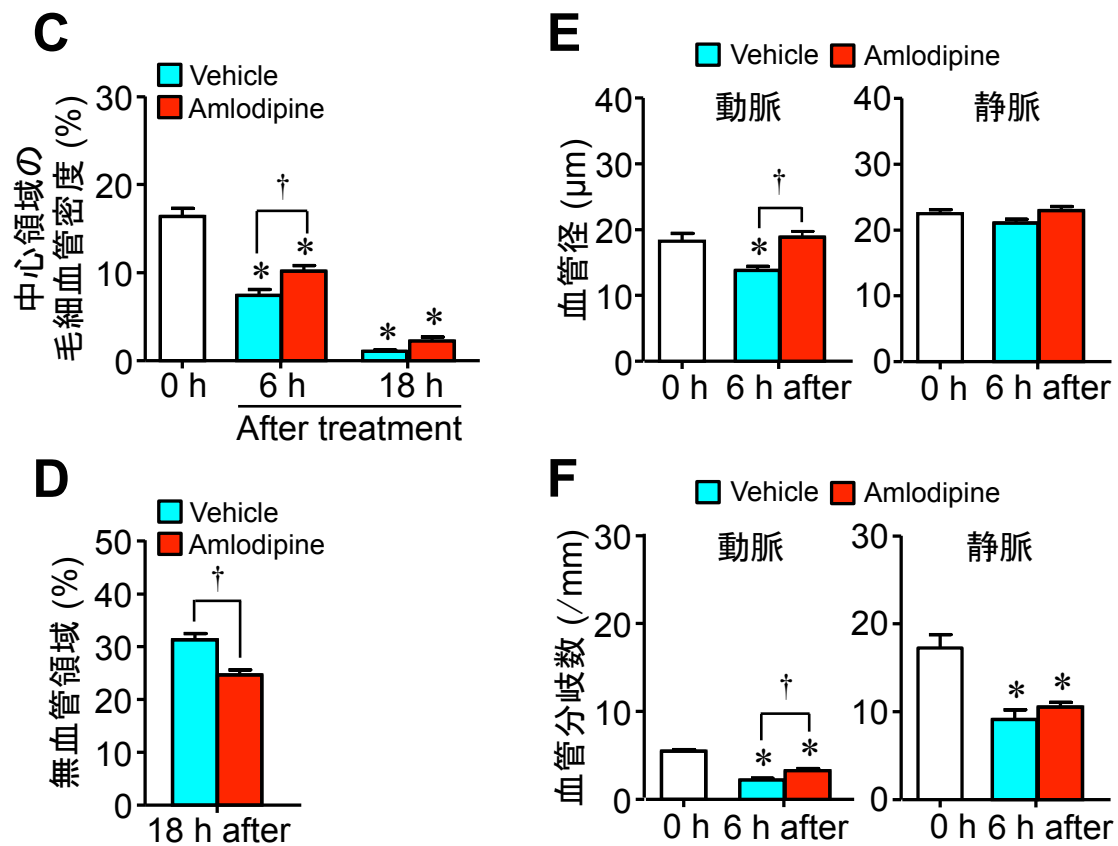
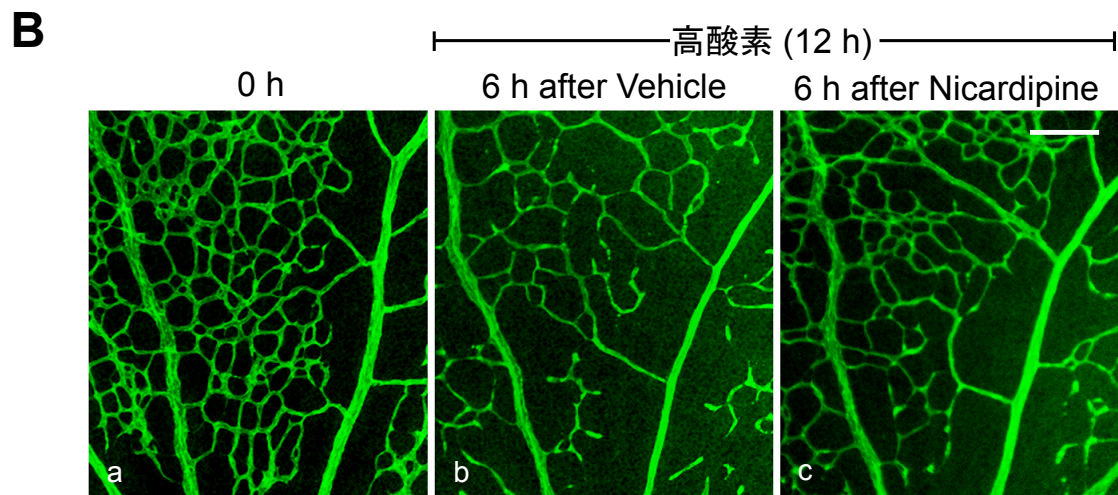
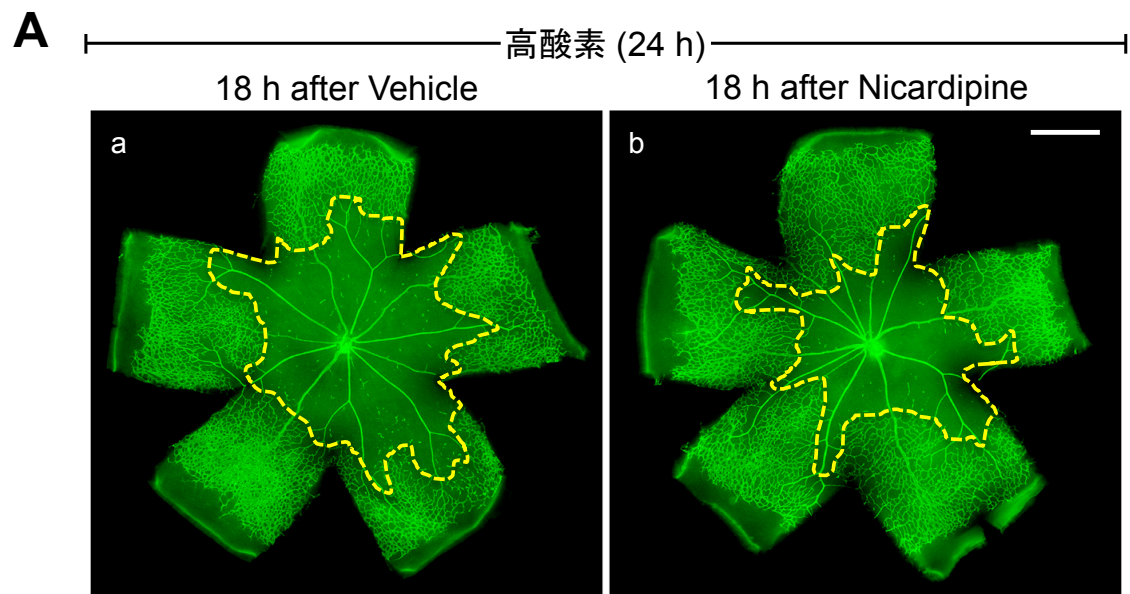


Figure 10 高酸素曝露により誘導される網膜血管の変化に対する amlodipine の効果
A, B: 高酸素曝露前及び高酸素曝露開始 12 時間後 (vehicle 又は amlodipine 投与 6 時間後) におけるマウス網膜を抗 CD31 抗体で蛍光免疫染色した whole-mount 標本の全体像 (A) 及び中心領域の拡大像 (B) を示している。無血管領域を黄色の点線で示している (A)。C-F: 網膜中心領域の毛細血管密度 (C)、無血管領域 (D)、動静脈の径 (E)、動静脈の分岐数 (F) を定量した結果を示している。高酸素曝露による網膜中心領域の毛細血管密度の減少、無血管領域の形成、動脈の径及び分岐数の減少は、amlodipine 投与により抑制された。Scale bars: 500 μm (Ab), 200 μm (Bc). * $p < 0.05$ vs. 0 h; † $p < 0.05$.



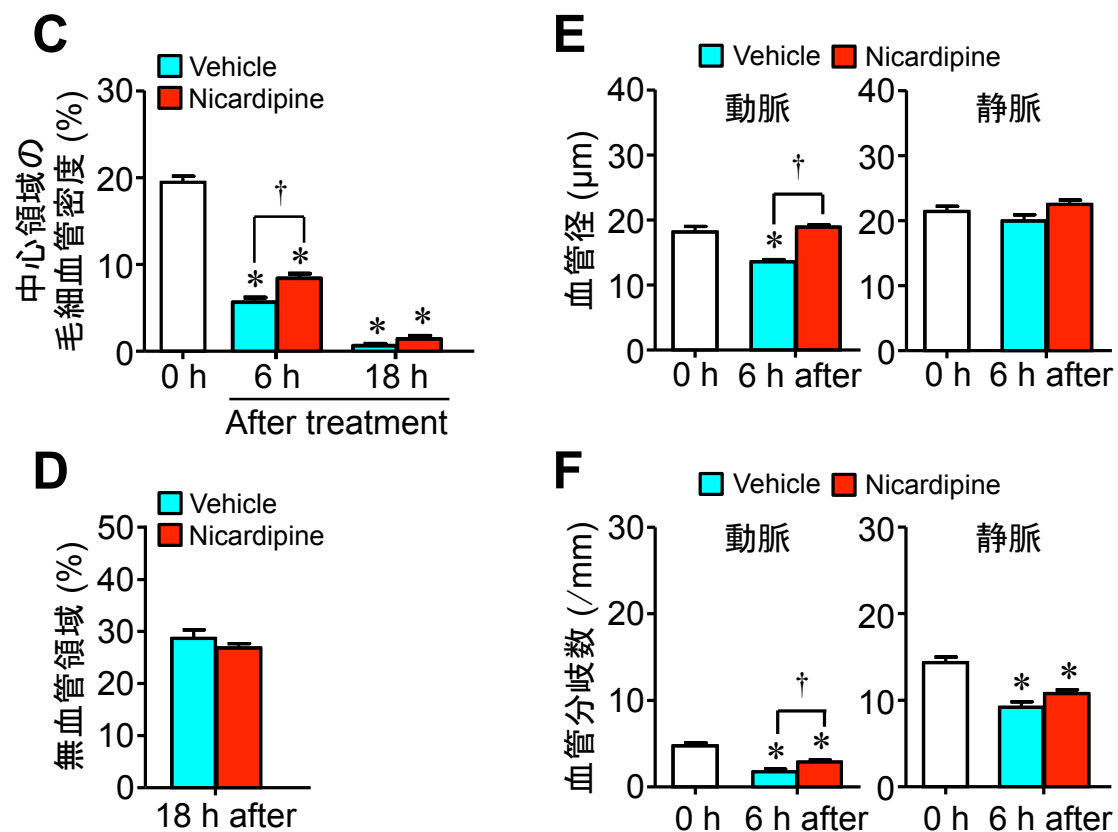


Figure 11 高酸素曝露により誘導される網膜血管の変化に対する nicardipine の効果
A, B: 高酸素曝露前及び高酸素曝露開始 12 時間後 (vehicle 又は nicardipine 投与 6 時間後) におけるマウス網膜を抗 CD31 抗体で蛍光免疫染色した whole-mount 標本の全体像 (A) 及び中心領域の拡大像 (B) を示している。無血管領域を黄色の点線で示している (A)。C-F: 網膜中心領域の毛細血管密度 (C)、無血管領域 (D)、動静脈の径 (E)、動静脈の分岐数 (F) を定量した結果を示している。高酸素曝露による網膜中心領域の毛細血管密度の減少、動脈の径及び分岐数の減少は、nicardipine 投与により抑制された。Scale bars: 500 μm (Ab), 200 μm (Bc). * $p < 0.05$ vs. 0 h; † $p < 0.05$.

1-4. 考察

本章では、次の 3 点、すなわち、1) 高酸素の曝露時間に依存して、網膜の中心領域から中間領域にかけて存在する毛細血管が退縮する一方、末梢領域の血管網は、高酸素曝露の影響をほとんど受けなかった点、2) 高酸素曝露により、網膜の動脈径及び動静脈分岐数が減少した点、及び 3) 高酸素曝露による網膜血管の変化（毛細血管の退縮、動脈の径及び分岐数の減少）が Ca 拮抗薬 (amlodipine 及び nicardipine) の投与により抑制された点、が明らかとなった。

高酸素曝露により網膜中心領域の毛細血管が退縮したことは、過去の報告と一致していた (Claxton et al., 2003; Lobov et al., 2011)。新生仔期のマウスの網膜血管は、高酸素曝露や VEGF の減少に対して高い感受性を示すが、個体の成熟（日齢の増加）に伴い、その感受性は低下し、3 週齢以降のマウスでは、高酸素曝露や VEGF シグナルの阻害による毛細血管の退縮は、ほとんど観察されなくなることが示されている (Ozaki et al., 2000; Gu et al., 2002)。本章では、新生仔期のマウスに高酸素を曝露することによって引き起こされる網膜毛細血管の退縮過程について、網膜表層の血管網を 3 (中心、中間及び末梢) 領域に分けて詳細に解析した。その結果、高酸素曝露により、網膜表層の中心領域から中間領域にかけて存在する毛細血管が顕著に退縮する一方で、末梢領域の血管網は、高酸素曝露の影響をほとんど受けないことが示された。網膜中心及び末梢領域の血管の安定性を比較すると、末梢領域よりも中心領域における血管の方が先行して形成されており、より安定性が高いものと考えられる。実際に、網膜の中心領域から中間領域にかけて走行する動脈のペリサイト／平滑筋には、強い α -SMA 発現が認められ、このことから、その領域に存在する血管の安定性が高まっていることが示唆される。これらの結果は、上述の未熟で不安定な血管の方が高酸素曝露の影響を受け易いことを示唆した報告 (Gu et al., 2002) に矛盾することになる。今回、高酸素曝露が網膜末梢領域の毛細血管を退縮させなかった理由は明らかでない。一方、高酸素曝露が網膜の中心領域から中間領域にかけて存在する毛細血管を退縮させた機序については、2 つの可能性、すな

わち、高酸素曝露により、1) 網膜における VEGF の発現が減少した可能性、及び 2) 網膜の血流障害が生じた可能性、を考えることができる。

まず、高酸素曝露により、網膜における VEGF の発現が減少した可能性については、新生仔期のマウスにおいて、網膜血管の起始部である視神経乳頭付近及び酸素分圧の高い血液が循環する網膜の動脈の周囲では、VEGF mRNA の発現が減少していること、及びその際に VEGF mRNA が減少する領域は、曝露する酸素の濃度上昇 (20, 40 及び 80%) に伴い拡大すること、そして、高酸素曝露による VEGF mRNA の減少は、網膜中心領域から中間領域の間に限られており、毛細血管が退縮する領域と一致していること、が示されている (Claxton et al., 2003)。今回、高酸素曝露が網膜における VEGF mRNA 及びタンパク質の発現に及ぼす影響については検討していないが、新生仔期のマウスに曝露した酸素の濃度は、上述の報告で使用した条件の範囲内であり、網膜の中心領域から中間領域にかけて VEGF 発現が減少したことが、高酸素曝露により、その領域に存在する毛細血管が退縮した機序である可能性が十分に考えられる。

次に、高酸素曝露により、網膜の血流障害が生じた可能性については、ヒト又はラットに高酸素を吸入させると、網膜血管が収縮することが示されている (Frayser and Hickam, 1964; Takagi et al., 1996)。その詳細な機序は不明であるが、血管平滑筋細胞において、高酸素は ATP 産生を増大させ、細胞膜の脱分極を促進し、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを開口させることにより、細胞内 Ca^{2+} 流入を促進、その結果として、血管を収縮させることが示されている (Gu et al., 1993)。今回の検討において、高酸素曝露により、収縮能を有する α -SMA を発現しているペリサイトが存在する動脈の径及び分岐数が著しく減少することが示された。これらの結果は、高酸素曝露により、網膜において、動脈の収縮に起因する血流障害が生じている可能性を示している。また、Ca 拮抗薬である nifedipine 処置により、高酸素曝露による摘出ヒト肺動脈の収縮が抑制されることが示されている (Ariyaratnam et al., 2013)。本研究では、新生仔期のマウスに Ca 拮抗薬 (amlodipine 及び nicardipine) を投与することにより、高酸素曝露による動脈

の径及び分岐数の減少が抑制されること、及び毛細血管の退縮が抑制されることを見出した。これらの結果は、Ca 拮抗薬によって、高酸素曝露による網膜の動脈の収縮に起因する血流障害が改善されることにより、結果として、毛細血管の退縮が抑制された可能性を示唆している。

DM 患者では、DR の発症以前又は発症初期において、網膜の動脈の収縮に起因する血流障害が生じることが示されている (Bursell et al., 1996; Wong et al., 2002)。そして、その後、毛細血管が退縮し、虚血領域が形成され、さらに病態が進行すると、網膜虚血により誘導される VEGF などの血管新生促進因子によって、網膜異常血管新生が引き起こされる (Durham and Herman, 2011)。従って、網膜異常血管新生の引き金となる網膜の血流障害や毛細血管の退縮を未然に防ぐことは、DR の発症及び進行を抑制する上で有用な治療戦略であると考えられる。網膜の血流が維持されることは、毛細血管の生存にとって重要であり、今回示された Ca 拮抗薬のような血流を改善する薬物には、網膜の血流障害や毛細血管の退縮を抑制する効果、ひいては、その後の網膜異常血管新生を抑制する効果が期待できるものと考えられる。

第二章

酸素誘導網膜症モデル (OIR モデル) マウスにおける

異常血管新生に対する valproic acid (VPA) の効果

2-1. 緒言

第一章では、網膜異常血管新生を誘導する重要な因子である網膜毛細血管の退縮及び低酸素・虚血領域の形成過程について検討したが、本章では、網膜毛細血管が退縮した後に誘導される異常血管新生に対して抑制作用を示す薬物を探索することを目的とした。

DR で観察されるような硝子体側へと逸脱した異常新生血管が誘導される OIR モデルを作製するプロトコールについては、Smith ら (1994 年) が考案したものが広く用いられている。すなわち、P7 から P12 までの 5 日間、マウスに 75% 酸素を曝露し、網膜の毛細血管を退縮させ、無血管領域を形成させる。そして、P12 から P17 まで、マウスを通常大気下で飼育することで、相対的な低酸素状態に陥らせ、無血管領域に血管を再形成する正常血管新生と硝子体側へと逸脱した血管瘤を形成する異常血管新生とを生じさせるというものである (Smith et al., 1994; Connor et al., 2009; Stahl et al., 2010)。また、マウスを 5 日間ではなく、3 日間、高酸素に曝露するだけでも、網膜の毛細血管は十分に退縮することが示されている (Lange et al., 2009; Yagasaki et al., 2014; Iizuka et al., 2015)。そこで、本章では、マウスを 3 日間 80% 酸素に曝露し、その後、5 日間、通常大気下で飼育するというプロトコールで OIR モデルを作製した。

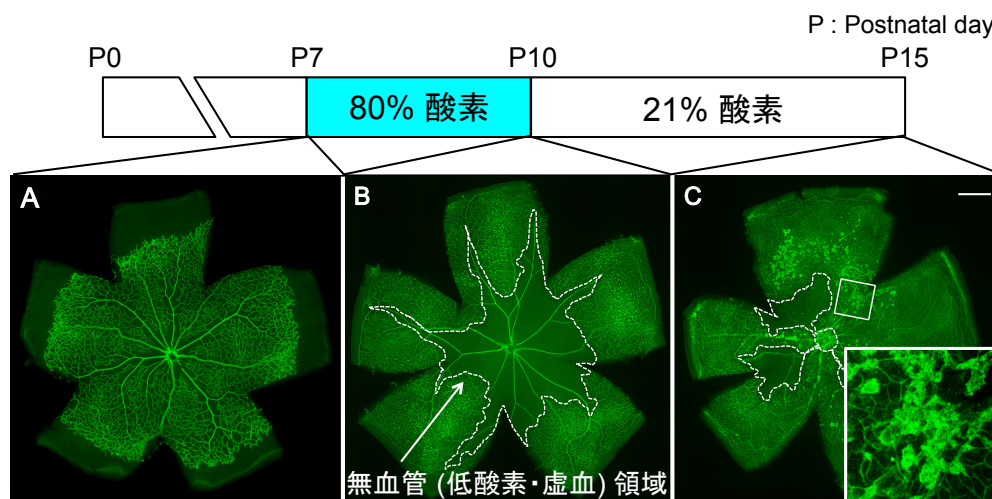


Figure 12 高酸素曝露によるマウス網膜の毛細血管の退縮と、その後の異常血管新生
A: 高酸素曝露前 (P7)、B: 高酸素曝露終了直後 (P10)、C: 高酸素曝露終了 5 日後 (P15)。高酸素曝露により、網膜中心領域に無血管 (低酸素・虚血) 領域が形成された (白色点線領域)。その後、再び、通常大気下で飼育することにより無血管領域への血管新生が生じ、それと共に血管瘤 (C: 白色四角、拡大像) が形成された。血管瘤の形成は、高酸素曝露終了 5 日後において最大となった。Scale bar: 500 μ m (C).

VPA は、代表的な抗てんかん薬であり、GABA トランスアミナーゼ阻害作用や電位依存性 Na^+ チャネル遮断作用などを介して、てんかん発作を抑制すると考えられている (Pinder et al., 1977; Bruni and Wilder, 1979; Van den Berg et al., 1993)。また、近年、VPA には、遺伝子の発現調節に関与するヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase: HDAC) を阻害する作用が見出された (Göttlicher et al., 2001; Phiel et al., 2001)。

VPA は、HDAC 阻害作用を介して、1) 培養血管内皮細胞の増殖・遊走・管形成を抑制すること (Michaelis et al., 2004)、及び 2) マウスの腫瘍における血管新生を抑制することが示されている (Zhang et al., 2014)。さらに、HDAC 阻害薬が網膜及び脈絡膜の異常血管新生を抑制することも示されている (Kim et al., 2009)。しかしながら、VPA が網膜異常血管新生に及ぼす影響については未だ明らかにされていない。

そこで本章では、OIR モデルマウスにおいて生じる網膜異常血管新生に対する VPA の効果を検討すると共に、比較のために HDAC 阻害薬である vorinostat の効果についても検討した。

2-2. 実験方法

2-2-1. 使用動物

雌雄の ICR マウス (8 週齢) を Charles river laboratories から購入した。雌マウスと雄マウスを自由摂食・自由飲水可能なケージ内で 12 時間の明暗サイクルで馴化させた後に同居させた。妊娠したマウスは個別のケージへ移し、出生したマウスの P7 から P15 までのものを使用した。

2-2-2. OIR モデル の作製

通常大気下で飼育していた P7 のマウスを酸素濃度を 80% に保ったチャンバー内で 3 日間母マウスと共に自由摂食・自由飲水可能なケージで飼育した。チャンバー内の酸素濃度は酸素コントローラー (ProOx; Biospherix) で維持した。チャンバーの壁には直径 1 cm 程度の換気口を開け、チャンバー内の二酸化炭素濃度及び温度の上昇を防いだ。そして、チャンバー内にシリカゲルを置いて、チャンバー内の湿度の上昇を防いだ。3 日間の高酸素曝露後 (P10)、通常大気下に戻して P15 まで飼育した。

2-2-3. 薬液調製

1) Valproic acid

Valproic acid (Sigma-Aldrich) は、生理食塩水で 5 mg/mL, 10 mg/mL 及び 15 mg/mL の濃度になるように溶解し、それぞれをマウス背部皮下に体重 1 g あたり 10 μ L を投与した。対照には、生理食塩水を同量投与した。

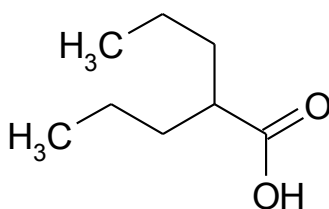


Figure 13 Valproic acid (2-propylpentanoic acid) の構造式

2) Vorinostat

HDAC 阻害薬である vorinostat (LC Laboratories, Woburn, MA, USA) は、100% の DMSO に 30 mg/mL 及び 60 mg/mL の濃度になるように溶解し、0.5% methylcellulose 水溶液で 5 mg/mL 及び 10 mg/mL の濃度になるように希釈した。それぞれをマウス背部皮下に体重 1 g あたり 10 μ L を投与した。対照には、DMSO : 0.5% methylcellulose (1 : 5) 混合液を同量投与した。

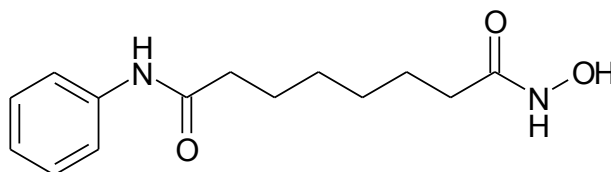


Figure 14 Vorinostat (N'-hydroxy-N-phenyloctanediamide) の構造式

2-2-4. 薬物処置

VPA (5, 10 又は 15 mg/kg/day, s.c.) 及び vorinostat (5 又は 10 mg/kg/day, s.c.) は、通常大気下に戻した P10 から 5 日間投与した。P10 及び P15 に網膜血管を評価した。

2-2-5. 組織固定

1-2-5. 組織固定の項に準じて行った。

2-2-6. 網膜の単離

1-2-6. 網膜の単離の項に準じて行った。

2-2-7. 免疫染色

1-2-7. 免疫染色の項に準じて行った。

一次抗体として、血管内皮細胞に対して rat monoclonal anti-mouse CD31 antibody (1:500, clone MEC 13.3; BD Biosciences)、mammalian target of rapamycin (mTOR) 活性の指標としてのリン酸化 S6 に対して rabbit monoclonal anti-phosphorylated ribosomal protein S6 (pS6) antibody (1:200; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いた。

二次抗体として、抗 CD31 抗体 に対して Cy3-conjugated AffiniPure goat anti-rat IgG (H+L) antibody (1:400; Jackson Immuno Research Labs)、抗 pS6 抗体に対して Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody (1:400; Jackson Immuno Research Labs) を用いた。

2-2-8. 蛍光画像の取得

蛍光顕微鏡 (BZ-9000; KEYENCE) 及び共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710; Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて蛍光画像を取得した。

2-2-9. 血管の定量解析

取得した蛍光画像を用いて、無血管領域への血管新生、及び血管瘤の評価を行った。それらの解析には、画像解析ソフト ImageJ (version 1.51) (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いた。

無血管領域への血管新生の評価： 蛍光顕微鏡の 10 倍の対物レンズで網膜の全領域が含まれるように画像 (1449 μm x 1091 μm) を 35~42 枚取得した。それらの画像を連結して網膜全体を示す画像を得た (Fig. 15)。網膜表層領域の面積 (ピクセル数) に対する、網膜表層領域から無血管領域を除いた面積 (ピクセル数) の割合から血管領域 (%) を算出した。

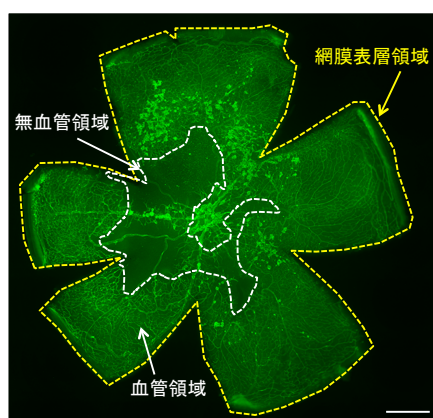


Figure 15 無血管領域への血管新生の評価
高酸素曝露後の P15 のマウス網膜を抗 CD31 抗体で蛍光免疫染色した whole-mount 標本を示している。黄色の点線で網膜表層領域を、白色の点線で無血管領域を示している。Scale bar: 500 μm .

血管瘤の評価： 蛍光顕微鏡で、血管瘤が存在している領域の画像 (1449 μm x 1091 μm) を取得した。画像内の 90 μm x 120 μm の領域を選択し、蛍光強度の違いを指標として、血管瘤を選択し (Fig. 16, 白色点線領域)、そのピクセル数を求めた。選択領域に対する血管瘤領域の割合を算出した。1 網膜あたり 5 カ所で画像を取得して、その平均値を求め、1 網膜の値とした。

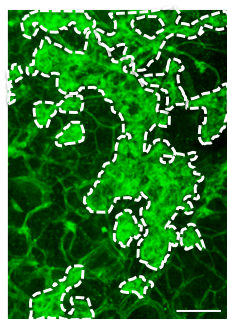


Figure 16 血管瘤の評価
高酸素曝露後の P15 のマウス網膜の拡大像を示している。白色の点線で血管瘤領域を示している。Scale bar: 100 μm .

2-2-10. 統計解析

データは平均値 \pm 標準誤差で示した。多群間の比較には one-way ANOVA を行った後、Tukey's test を行った。それらの解析には、GraphPad Prism 6 を用いた。 $p < 0.05$ のとき、統計学的に有意差有りとした。

2-3. 結果

2-3-1. OIR モデルマウスにおける網膜の血管新生に対する VPA 及び vorinostat の効果

まず、OIR モデルマウスにおける網膜の血管退縮及び血管新生の様子を観察するために、血管内皮細胞のマーカーである抗 CD31 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。

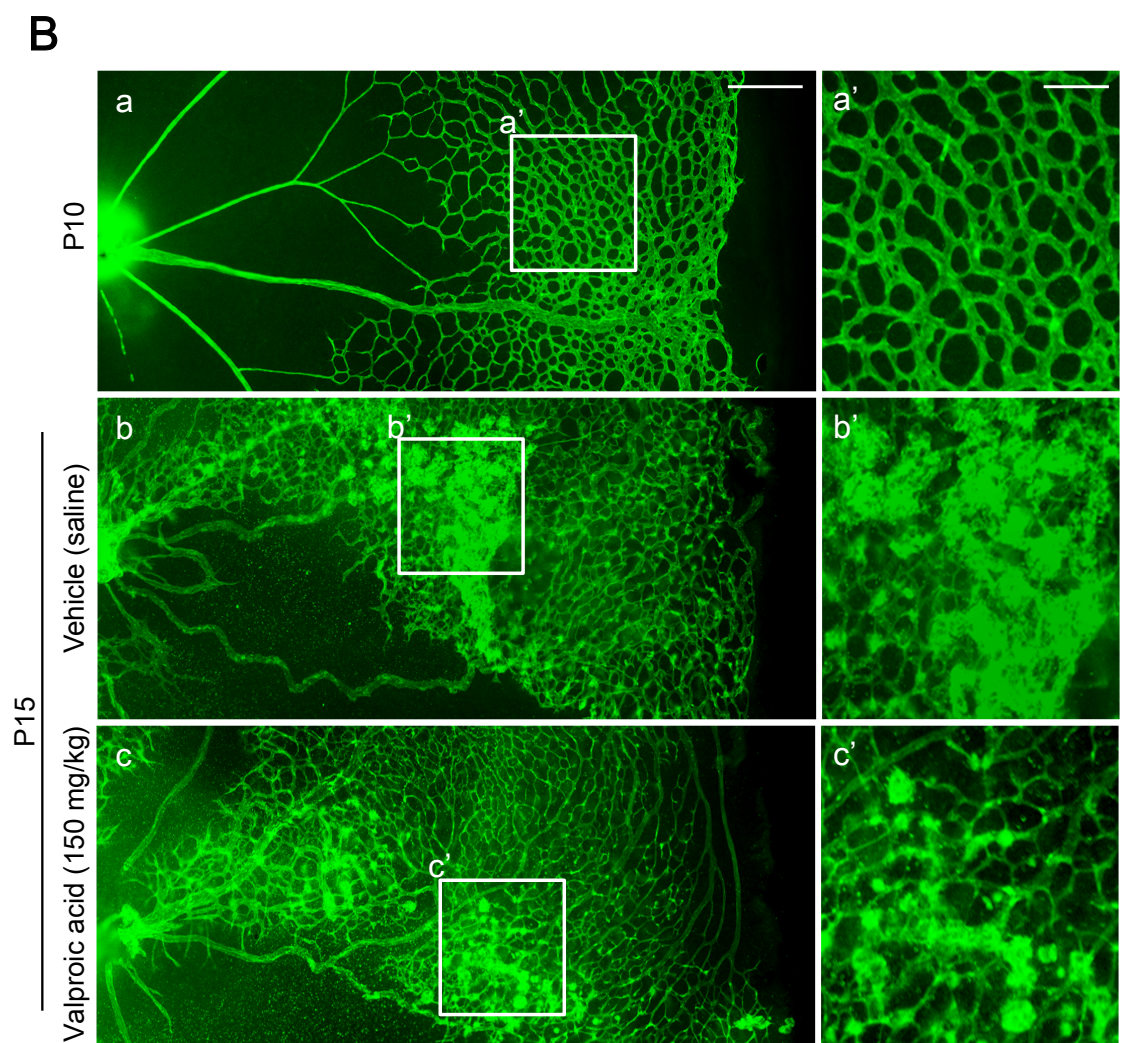
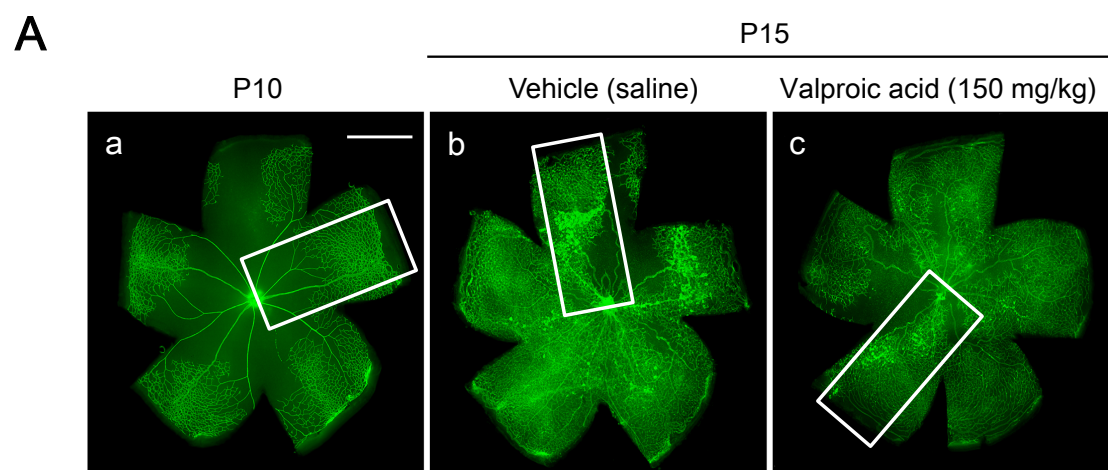
高酸素曝露を終了した直後の P10 では、網膜中心領域において毛細血管が退縮し、顕著な無血管領域が形成された (Fig. 17Aa, Ba)。その後、通常大気下において 5 日間飼育した P15 では無血管領域が小さくなった (Fig. 17Ab, Bb)。

Vehicle を投与された P15 のマウスでは、顕著な網膜血管瘤が観察された (Fig. 17Ab, Bb-b')。一方、VPA を投与された P15 のマウスでは、血管瘤の形成が抑制された (Fig. 17Ac, Bc-c')。

Figure 17C に血管瘤の形成を、Figure 17D に無血管領域への血管新生を定量した結果を示している。VPA は、血管瘤の形成を有意かつ用量依存的に抑制したが、無血管領域への血管新生に対しては高用量においても影響を及ぼさなかった。

HDAC 阻害薬である vorinostat も同様に、血管瘤の形成は抑制したものの、無血管領域への血管新生には影響を及ぼさなかった (Fig. 18)。

血管瘤の形成は、VPA 及び vorinostat の最高用量を投与した場合においても、完全には抑制されなかった (Fig. 17C, Fig. 18B)。



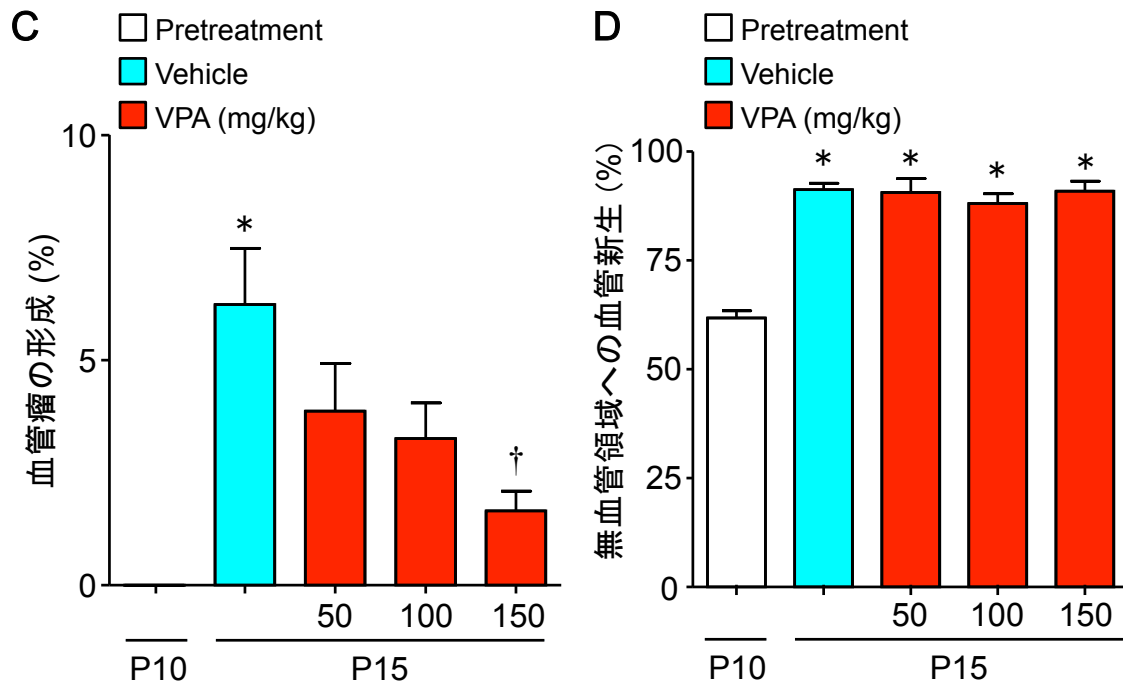


Figure 17 OIR モデルマウスにおける網膜の血管新生に対する VPA の効果
 高酸素曝露終了直後の P10 と P10 から vehicle 又は VPA (150 mg/kg, s.c.) を 5 日間投与されたマウスの網膜を抗 CD31 抗体を用いて蛍光免疫染色した whole-mount 標本 (A, B) と血管瘤の形成 (C) 及び無血管領域への血管新生 (D) に対する VPA の効果について定量した結果を示している。白色の四角で囲まれた範囲の拡大像を右側に示している (B)。血管瘤の形成は、VPA により抑制されたが、無血管領域への血管新生は VPA の影響を受けなかった。Scale bars: 1 mm (Aa), 250 μ m (Ba), 100 μ m (Ba'). * p < 0.05 vs. Pretreatment; † p < 0.05 vs. Vehicle.

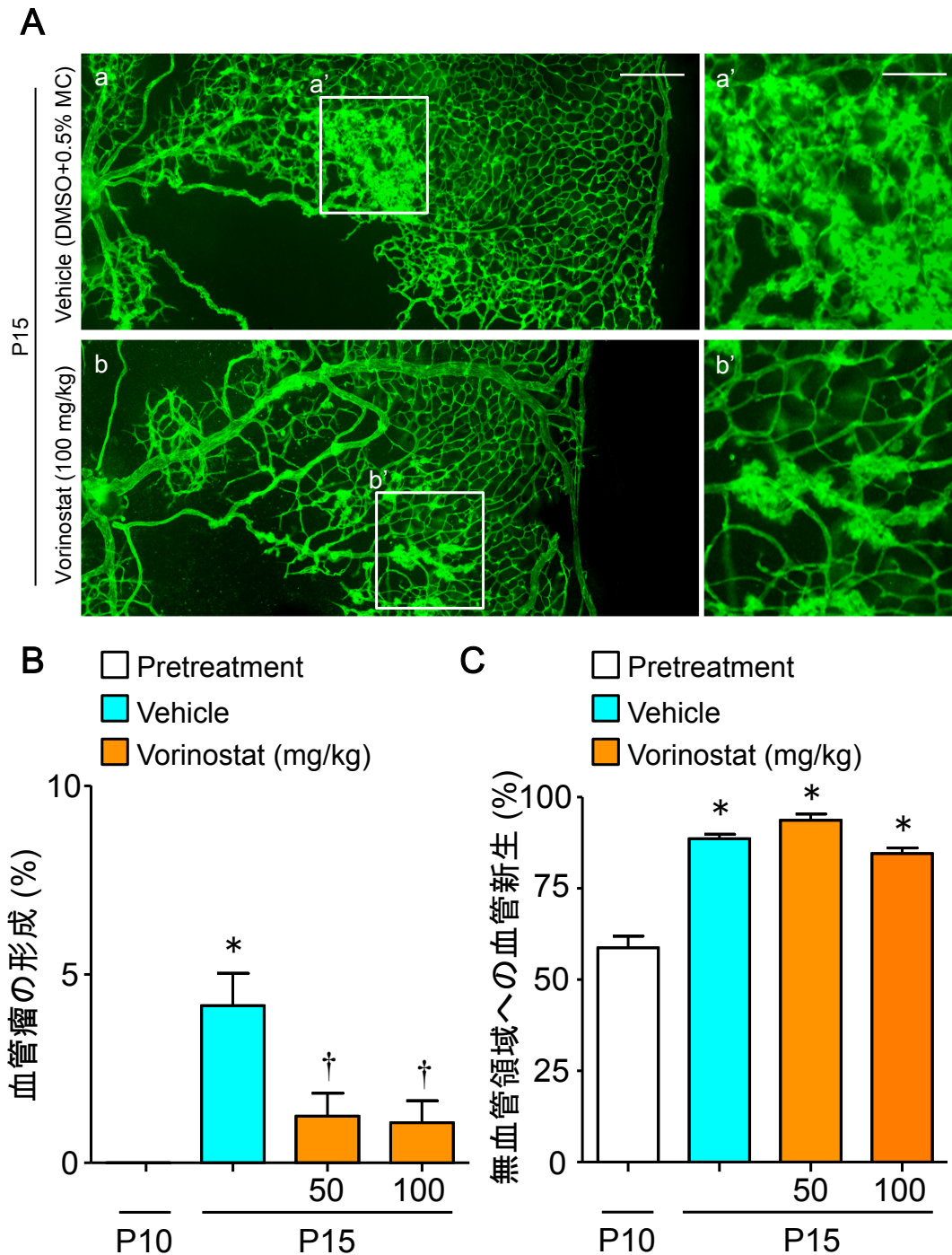


Figure 18 OIR モデルマウスにおける網膜の血管新生に対する vorinostat の効果
高酸素曝露終了直後の P10 から vehicle 又は vorinostat (100 mg/kg, s.c.) を 5 日間投与されたマウスの網膜を抗 CD31 抗体を用いて蛍光免疫染色した whole-mount 標本 (A) と血管瘤の形成 (B) 及び無血管領域への血管新生 (C) に対する vorinostat の効果について定量した結果を示している。白色の四角で囲まれた範囲の拡大像を右側に示している (A)。血管瘤の形成は vorinostat により抑制されたが、無血管領域への血管新生は vorinostat の影響を受けなかった。Scale bars: 250 μ m (Aa), 100 μ m (Aa'). * p < 0.05 vs. Pretreatment; † p < 0.05 vs. Vehicle.

2-3-2. OIR モデルマウスの網膜における mTOR 活性に対する VPA 及び vorinostat の効果

次に、VPA 及び vorinostat の網膜異常血管新生に対する抑制作用の機序を明らかにするために、血管瘤における内皮細胞の VEGF 応答に対する両薬物の効果について検討した。

血管内皮細胞の VEGF 応答の評価には、網膜の新生血管内皮細胞において mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路が VEGF 受容体の刺激により引き起こされるシグナル経路の下流に位置し、増殖に関与している (Yagasaki et al., 2014) ことを利用した。血管内皮細胞が VEGF により刺激されると mTOR 経路が活性化し、下流の S6 タンパク質がリン酸化される (Yagasaki et al., 2014)。

そこで、血管内皮細胞及びリン酸化 S6 (pS6) の抗体を用いて蛍光免疫染色し、それらの共局在領域を VEGF により刺激されている血管内皮細胞であると定義して評価した。

CD31 陽性の血管瘤において、pS6 が顕著に認められたが、これは増殖能の旺盛な血管内皮細胞において mTOR 経路が活性化していることを示している (Fig. 19A)。

pS6 は、網膜実質の非血管細胞においても観察されたが、これらは、VPA の影響を受けなかった (Fig. 19Ac, Bc)。

一方、VPA は、血管瘤の形成を抑制すると共に、血管瘤における pS6 陽性領域を減少させた (Fig. 19B)。

しかしながら、vorinostat の場合は、血管瘤の形成を抑制したものの、血管瘤における pS6 陽性領域には影響を及ぼさなかった (Fig. 20)。

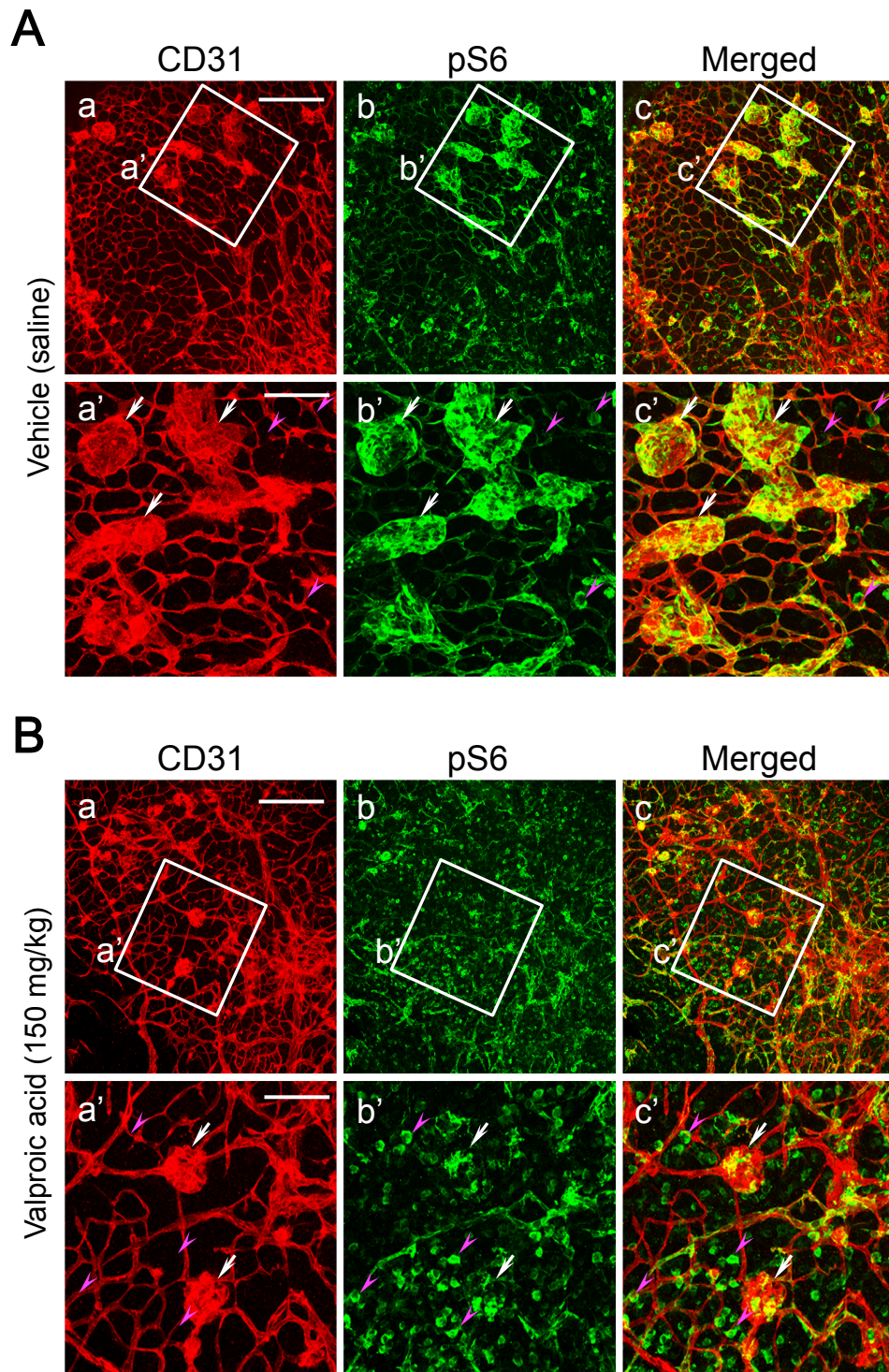


Figure 19 OIR モデルマウスの網膜における mTOR 活性に対する VPA の効果
 Vehicle (A) 又は VPA (150 mg/kg, s.c.) (B) を 5 日間投与された OIR モデルマウスの網膜を抗 CD31 抗体及び抗 pS6 抗体を用いて蛍光免疫染色した whole-mount 標本を示している。下段に上段の白色の四角で囲まれた範囲の拡大像を示している。白色の矢印で血管瘤を、ピンク色の矢尻で pS6 陽性の非血管細胞を示している。Vehicle 投与群と比較し、VPA 投与群において、血管瘤における pS6 陽性領域が減少することが示された。Scale bars: 200 μ m (Aa, Ba), 80 μ m (Aa', Ba').

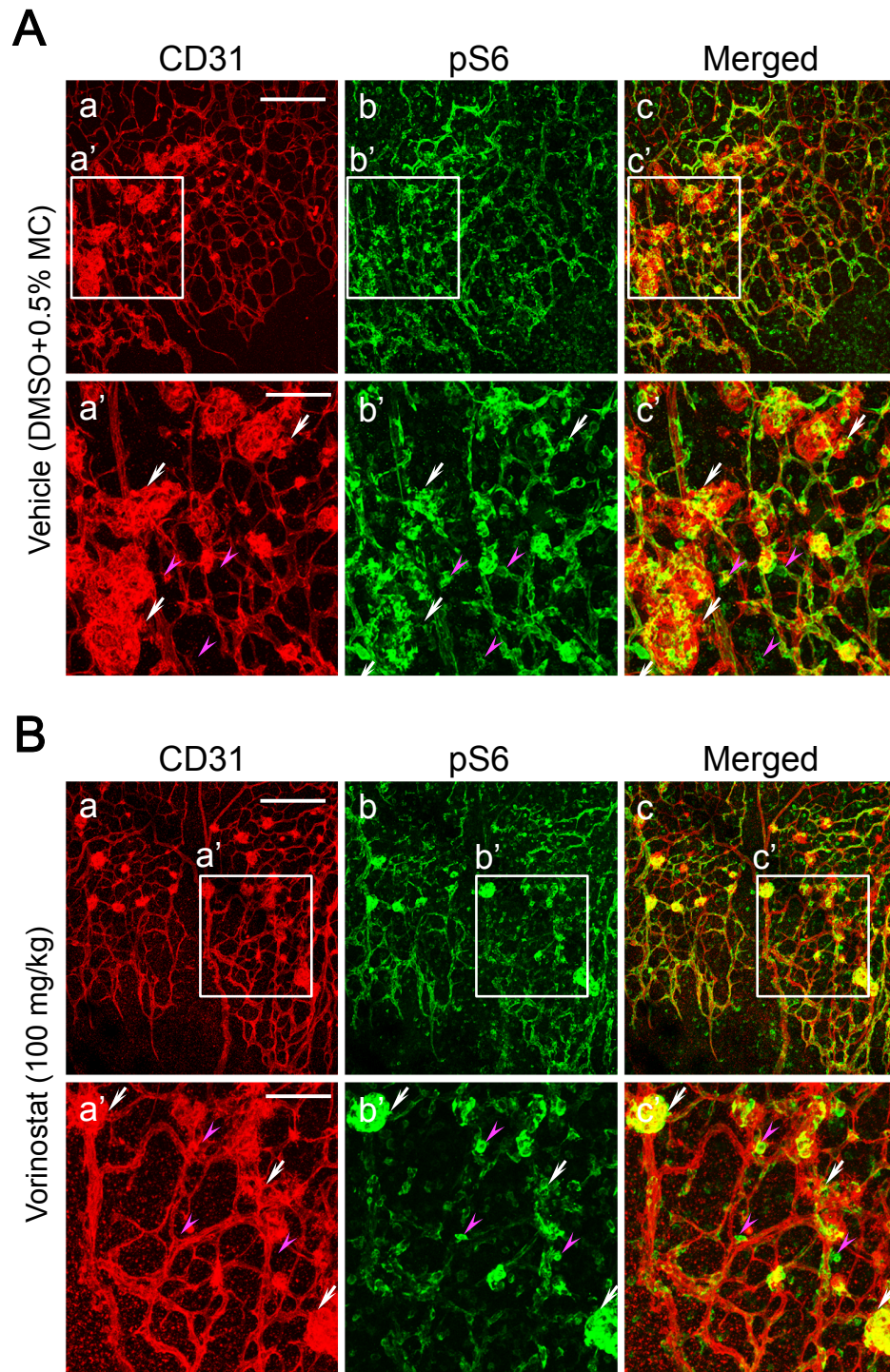


Figure 20 OIR モデルマウスの網膜における mTOR 活性に対する vorinostat の効果

Vehicle (A) 又は vorinostat (100 mg/kg, s.c.) (B) を 5 日間投与された OIR モデルマウスの網膜を抗 CD31 抗体及び抗 pS6 抗体を用いて蛍光免疫染色した whole-mount 標本を示している。下段に上段の白色の四角で囲まれた範囲の拡大像を示している。白色の矢印で血管瘤を、ピンク色の矢印で pS6 陽性の非血管細胞を示している。Vehicle 投与群及び vorinostat 投与群のどちらにおいても、血管瘤における強い pS6 由来の蛍光が認められた。Scale bars: 200 μ m (Aa, Ba), 80 μ m (Aa', Ba').

2-4. 考察

本章では、次の 2 点、すなわち、OIR モデルマウスの網膜における 1) 異常血管新生が VPA 及び HDAC 阻害薬である vorinostat の投与により抑制された点、及び 2) 異常新生血管の内皮細胞における S6 タンパク質のリン酸化が VPA により抑制された点、が明らかとなった。

OIR モデルマウスの網膜において異常血管新生が誘導される過程には、網膜における VEGF mRNA 及びタンパク質の発現増大が関与していること (Pierce et al., 1995)、そして、OIR モデルマウスにおける異常血管新生は、VEGFR チロシンキナーゼ阻害薬の硝子体内投与により、ほぼ完全に抑制されることが示されている (Kim and Suh, 2017)。北里大学薬学部分子薬理学教室において、VEGFR チロシンキナーゼ阻害薬である KRN633 及び mTOR 阻害薬である rapamycin が新生仔期のマウスの網膜新生血管内皮細胞における S6 タンパク質のリン酸化を抑制し、血管新生を抑制することが示されている (Yagasaki et al., 2014)。従って、網膜の新生血管内皮細胞の増殖は VEGF に大きく依存していること、及び血管内皮細胞における S6 タンパク質のリン酸化は、VEGF-mTOR 経路の活性化の指標となること、が考えられる。今回、VPA は、網膜の異常血管新生を抑制したが、正常血管新生には影響を及ぼさなかった。これらの結果から、網膜の異常血管新生は VEGF に大きく依存しており、そして、そのため VPA により VEGF-mTOR 経路の活性化が抑制されると、異常血管新生が選択的に抑制されたと考えられた。

VPA が網膜の血管内皮細胞における VEGF-mTOR 経路の活性化を抑制し、異常血管新生を抑制した機序として、3 つの可能性、すなわち、VPA が 1) 網膜血管内皮細胞における VEGFR-2 の発現を減少させた可能性、2) 網膜血管内皮細胞の VEGF への応答を減弱させた可能性、及び 3) 網膜における VEGF の産生細胞である神経節細胞、アストロサイト及びミューラー細胞に作用し、VEGF の産生量を減少させた可能性、が考えられる。

VPA を含む HDAC 阻害薬がヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein

endothelial cells: HUVECs) における VEGFR-2 タンパク質の発現を抑制することが示されている (Hrgovic et al., 2017)。また、我々は、VPA 及び vorinostat が VEGF の有無に関わらず、HUVECs の細胞生存率を減少させることを見出している (データは示していない)。そして、VPA は、各種腫瘍細胞 (神経膠腫細胞、急性骨髄性白血病細胞、及び子宮頸癌細胞) における VEGF などの血管新生促進因子の発現を抑制することも示されている (Osuka et al., 2012; Zhang et al., 2014; Zhao et al., 2016)。現在のところ、VPA が網膜異常血管新生を抑制する明確な機序は明らかでないが、これらの結果は、VPA が直接、血管内皮細胞に影響を及ぼして血管新生を抑制した可能性、及び網膜における VEGF の産生細胞である神経節細胞やグリア細胞を介して、間接的に血管新生を抑制した可能性があることを示唆している。

網膜では、血管内皮細胞の他に、神経節細胞、アストロサイト及びミュラー細胞においても S6 タンパク質がリン酸化されることが確認されており (Leibinger et al., 2012; Ichikawa et al., 2014)、これらの細胞は、血管新生に関与することが示されている (Stone et al., 1995; Checchin et al., 2006; Sapieha et al., 2008)。新生仔期のマウスに mTOR 阻害薬である rapamycin を投与すると、網膜における血管及び非血管細胞の両方において、S6 タンパク質のリン酸化が抑制されるが、一方で、VEGFR チロシンキナーゼ阻害薬である KRN633 は、網膜の非血管細胞における S6 タンパク質のリン酸化には影響を及ぼさないことが示されている (Yagasaki et al., 2014)。これらの結果は、網膜の非血管細胞における S6 タンパク質のリン酸化は、VEGF に非依存적であることを示している。今回、VPA は、網膜血管腫における S6 タンパク質のリン酸化を抑制したが、一方で、非血管細胞における S6 タンパク質のリン酸化には影響を及ぼさなかった。これらの結果から、網膜では、細胞の種類によって、mTOR 経路の活性化に関与する因子が異なるという可能性が考えられた。

VPA は、HDAC 阻害作用を有するため (Göttlicher et al., 2001; Phiel et al., 2001)、ヒストンタンパク質のアセチル化が促進されることによって、VEGF の

転写に影響が生じた結果として、網膜異常血管新生が抑制された可能性も考えられる。ヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞を低酸素環境下で培養すると、HDAC 活性及び HDAC1 タンパク質の発現が増加すること、及び癌抑制遺伝子である p53 及び von Hippel-Lindau (VHL) タンパク質の発現が減少すること、そして、HDAC 阻害薬を処置すると p53 及び VHL タンパク質の発現減少が抑制されることが示されている (Kim et al., 2001)。また、p53 及び VHL の発現が増加すると、VEGF の発現に関わる転写因子である低酸素誘導因子の発現が抑制されることが示されている (Krieg et al., 2000; Ravi et al., 2000)、及び p53 の発現を増加させると、マウス網膜の血管新生が抑制されることが示されている (Chavala et al., 2013)、そして、アストロサイト特異的に VHL をノックアウトすると、マウス網膜において異常血管新生が誘導されることも示されている (Weidemann et al., 2010)。これらの結果は、本章における高酸素曝露後の相対的に低酸素状態である網膜においても、p53 や VHL などの癌抑制遺伝子の発現が減少しており、その減少を VPA が HDAC 阻害作用を介して抑制した結果として、異常血管新生が抑制された可能性が考えられる。

VPA と vorinostat の HDAC 阻害作用の強さを比較してみると、HDAC1 に対する IC₅₀ は、VPA では 170 μ M、vorinostat では 14 nM であり、vorinostat の方が HDAC1 に対する阻害活性が強いことが示されている (Huber et al., 2011)。この報告と一致するように、VPA と比較して vorinostat は、HUVECs の細胞生存率を減少させる程度が大きいことが示されている (Michaelis et al., 2004; Kim et al., 2009)。一方、今回の検討においては、VPA と vorinostat の OIR モデルマウスにおける網膜異常血管新生に対する抑制作用の程度に、大きな違いは認められず、VPA を投与されたマウスの網膜においてのみ、異常新生血管の内皮細胞における VEGF-mTOR 経路の活性化が抑制されていること (S6 タンパク質のリン酸化の抑制) が観察された。これらの *in vivo* と *in vitro* の実験系で認められた薬物間の効力差が生じた機序は不明であるが、その可能性の 1 つとして、生物学的半減期の違いを挙げることができる。すなわち、VPA の生物学的

半減期は約 16 時間、一方、vorinostat のそれは約 2 時間である (Kelly et al., 2005; Ibarra et al., 2013)。従って、新生仔期のマウスの背部皮下に VPA を投与した場合、vorinostat を投与した場合よりも薬物の作用持続時間が長いと考えられる。今回の検討では、薬物の最終投与の翌日 (24 時間後) に評価を行った。そのため、vorinostat を投与した場合の評価時点では、既に薬物が体内から消失して、VEGF-mTOR 経路に対する抑制作用が消失していたのかもしれない。一方で、VPA を投与した場合には、評価時点においても体内に薬物が残存しており、網膜の異常新生血管の内皮細胞における VEGF-mTOR 経路の活性化抑制が観察された可能性がある。

本章では、OIR モデルを使用することにより、VPA が網膜異常血管新生に対して抑制作用を示すことが明らかとなった。また、VPA は、網膜の正常血管新生には影響を及ぼすことなく、異常血管新生を選択的に抑制することも示された。

第三章の内容は、学術雑誌へ投稿する予定があるため、公表を延期致します。
なお、学術雑誌への投稿後は、全文を公表致します。

総 括

DR では、網膜の毛細血管が退縮することに起因する網膜虚血が VEGF などの血管新生促進因子の発現を誘導し、異常血管新生が生じる。新生血管は脆弱であるため、破綻し易く、眼内出血を引き起こす可能性がある。新生血管が破綻し、出血すれば、著しい視覚障害や失明の原因となる。現在、臨床では、DR に関連する薬物治療として、副腎皮質ステロイド薬及び抗 VEGF 薬の硝子体内投与が行われているが、薬物による重大な副作用が報告されているだけでなく、硝子体内投与法自体が手術に準ずる侵襲的な治療法であり、内服などで効果を発揮する、安全性の高い治療薬が必要とされている。そこで、本研究では、基礎研究と臨床研究の双方から、網膜異常血管新生抑制作用を有する既存医薬品を見出すことを目的として検討した。

第一章では、新生仔期のマウスを用いて、高酸素曝露により、網膜の毛細血管の退縮過程を詳細に解析すると共に、高酸素曝露により誘導される網膜血管の変化に対する Ca 拮抗薬 (amlodipine 及び nicardipine) の効果について検討した。高酸素曝露により、網膜の中心領域から中間領域にかけて存在する毛細血管が退縮する一方で、末梢領域の血管網は、高酸素曝露の影響をほとんど受けないことが示された。また、網膜の中心領域から中間領域にかけて走行する動脈には、収縮能を有する α -SMA 陽性のペリサイトが豊富に認められた。さらに、高酸素曝露により、動脈径及び動静脈分岐数が減少することが明らかとなり、高酸素曝露による動脈の収縮に起因する血流障害が、毛細血管の脱落を導く可能性が示された。そして、高酸素曝露により誘導されるこれらの網膜血管の変化 (毛細血管の退縮、動脈の径及び分岐数の減少) は、amlodipine 及び nicardipine の投与により抑制されることが明らかとなった。これらの結果より、Ca 拮抗薬が、高酸素曝露によって引き起こされる血流障害を改善し、毛細血管の退縮が抑制されることで、虚血領域の拡大が抑制された可能性が示された。そして、これらのことは、Ca 拮抗薬が、その後の異常血管新生をも抑制する可

能性を示唆している。

第二章では、OIR モデルマウスにおいて観察される血管新生 (血管瘤の形成及び無血管領域への血管新生) に対する VPA 及び HDAC 阻害薬である vorinostat の効果について検討した。VPA 及び vorinostat は、血管瘤の形成 (異常血管新生) を抑制することが見出されたが、一方で両薬物は、無血管領域への血管新生 (正常血管新生) には影響を及ぼさないことが示された。さらに、OIR モデルの血管瘤における VEGF-mTOR 経路の活性化 (S6 タンパク質のリン酸化) が VPA により抑制されることも示され、増殖活性の高い血管瘤を形成する内皮細胞において、VEGF への応答が VPA により抑制される可能性が示された。これらの結果より、VPA は、網膜の正常血管新生よりも、異常血管新生に対して、より選択的に抑制作用を示すことから、網膜異常血管新生抑制薬として期待できると考えられた。

一方で、本研究における動物実験の結果をヒトに応用する上では、以下の 2 点について注意深く考察する必要がある。すなわち、1) DR の病態を模倣する上で、DM を発症させたマウスではなく、新生仔期のマウスを用いた高酸素曝露モデルを使用した点、及び 2) マウスで有用性を示した薬物の用量が、臨床において患者に対して使用する用量より多かった点、である。

本研究では、DR に対する治療薬を見出すことを目的としているが、DM モデル動物ではなく、新生仔期のマウスに高酸素を曝露する OIR モデルを使用した。それは、齧歯類に DM を発症させて長期間飼育しても、網膜の血管障害は生じるものの、ヒトの DR において観察されるような異常血管新生は誘導されない (Robison et al., 1991; Hammes et al., 2002) ことが広く知られているからである。OIR モデルでは、高酸素曝露という強い刺激を用いるため、網膜の毛細血管の退縮や異常血管新生の誘導は急速に生じるが、ヒトの DR では、その病態は緩徐に進行する。そのため、本研究において、新生仔期のマウスに対して用いた薬物の用量より低い用量においても、ヒトの DR で生じる血管退縮や異常血管新生に対して抑制作用が認められる可能性は十分に考えられる。

本研究でマウスにおいて有効であった薬物の用量と臨床で患者に対して使用される用量（体重 60 kg あたり）を比較すると、前者の方が数倍から数十倍多いこととなる。これについては、主に医薬品において、実験動物の体表面積から、ヒトでの同等な作用が発現する用量を算出されるために用いられるヒト等価用量（Human equivalent dose: HED）という概念（Nair and Jacob, 2016）を適用し計算すると、マウスとヒトで同等の作用を発現させるためには、マウスではヒトの約 12.3 倍の用量が必要となることになる。そのため、本研究において、マウスに使用した薬物の用量は、臨床で使用されている用量より多いが、一概に、ヒトにおける用量の方が低いからという理由で、薬物の作用が発揮されないとは断定できない。本研究では、高酸素曝露という強い刺激を用いていることもあり、病態が緩徐に進行する DR では、高血圧症（amlodipine 及び nicardipine）やてんかんなど（VPA）の治療に用いられる用量においても、血管収縮を抑制したり、異常血管新生を抑制する作用が副次的に発揮されている可能性は十分に考えられる。

以上のように、本研究は、既存医薬品の新たな可能性を拓くものであり、薬物治療学の発展に大きく寄与するものと考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、直接の熱心な御指導、御鞭撻を賜りました北里大学薬学部分子薬理学教室・中原努教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、北里大学薬学部分子薬理学教室で研究する機会を与えて下さいました北里大学薬学部臨床薬学研究・教育センター薬物治療学 II・黒山政一准教授に深く感謝致します。

ご多忙の中、快く主査を引き受けて下さいました北里大学薬学部薬理学教室・田辺光男教授、副査を引き受けて下さいました北里大学薬学部臨床薬学研究・教育センター薬物治療学 III・松原肇教授ならびに北里大学薬学部臨床薬学研究・教育センター薬物治療学 IV・尾鳥勝也教授に心より感謝申し上げます。

本研究において、北里大学病院における臨床研究を実施する機会を与えて下さいました北里大学薬学部臨床薬学研究・教育センター薬物治療学 I・厚田幸一郎教授、そして、臨床研究についての数々の有益な御助言ならびに御指導を頂きました北里大学薬学部臨床薬学研究・教育センター薬物治療学 II・川野千尋助教、北里大学薬学部臨床薬学研究・教育センター薬物治療学 I・平山武司准教授、春日井公美助教、中山萌美前助教、北里大学薬学部臨床薬学研究・教育センター薬物治療学 III・井上岳講師、北里大学薬学部臨床統計学教室・道前洋史助教、北里大学医学部内分泌代謝内科学・七里眞義教授、北里大学病院薬剤部・稲野寛主任ならびに勝呂美香先生に深く感謝致します。

本研究を遂行する上で終始御指導、御鞭撻を賜り、5 年間にわたる研究生活を有意義に過ごさせて下さいました北里大学薬学部分子薬理学教室・坂本謙司准教授、森麻美助教、森田茜助教、浅野大樹助教ならびに川島紘一郎客員教授に心より御礼申し上げます。さらに、本研究の立ち上げ時期に多くの御指導を頂きました北里大学薬学部分子薬理学教室・石井邦雄前教授ならびに牛久保裕子前助教に深く感謝致します。

本研究は、公益社団法人日本薬学会の研究奨励支援事業である日本薬学会長

井記念薬学研究奨励金（平成 27 年度）の支援を受けたものであり、研究に専念できるよう援助して下さいました、本事業及び関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

最後に、研究室での生活の中で数々の助言、援助をして下さいました北里大学薬学部分子薬理学教室、北里大学薬学部臨床薬学研究・教育センター薬物治療学Ⅰならびに北里大学薬学部臨床薬学研究・教育センター薬物治療学Ⅱの大学院生、卒業研究生の皆様、そして、長年にわたり、私の研究生活を経済的、精神的に支えてくれた家族に深く感謝致します。

参考文献

Agostini H, Boden K, Unsöld A, Martin G, Hansen L, Fiedler U, Esser N, Marmé D. A single local injection of recombinant VEGF receptor 2 but not of Tie2 inhibits retinal neovascularization in the mouse. *Curr. Eye Res.* 2005;30(4):249-257.

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(10):1024-1028.

Ariyaratnam P, Loubani M, Bennett R, Griffin S, Chaudhry MA, Cowen ME, Guvendik L, Cale AR, Morice AH. Hyperoxic vasoconstriction of human pulmonary arteries: a novel insight into acute ventricular septal defects. *ISRN Cardiol.* 2013;31:685735.

Brown DM, Schmidt-Erfurth U, Do DV, Holz FG, Boyer DS, Midena E, Heier JS, Terasaki H, Kaiser PK, Marcus DM, Nguyen QD, Jaffe GJ, Slakter JS, Simader C, Soo Y, Schmelter T, Yancopoulos GD, Stahl N, Vitti R, Berliner AJ, Zeitz O, Metzger C, Korobelnik JF. Intravitreal Aflibercept for Diabetic Macular Edema: 100-Week Results From the VISTA and VIVID Studies. *Ophthalmology.* 2015;122(10):2044-2052.

Bruni J, Wilder BJ. Valproic acid. Review of a new antiepileptic drug. *Arch. Neurol.* 1979;36(7):393-398.

Bursell SE, Clermont AC, Kinsley BT, Simonson DC, Aiello LM, Wolpert HA. Retinal blood flow changes in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and no diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1996;37(5):886-897.

Chavala SH, Kim Y, Tudisco L, Cicatiello V, Milde T, Kerur N, Claros N, Yanni S, Guaiquil VH, Hauswirth WW, Penn JS, Rafii S, De Falco S, Lee TC, Ambati J. Retinal angiogenesis suppression through small molecule activation of p53. *J. Clin. Invest.* 2013;123(10):4170-4181.

Checchin D, Sennlaub F, Levavasseur E, Leduc M, Chemtob S. Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006;47(8):3595-3602.

Claxton S, Fruttiger M. Role of arteries in oxygen induced vaso-obliteration. *Exp. Eye Res.* 2003;77(3):305-311.

Connor KM, Krah NM, Dennison RJ, Aderman CM, Chen J, Guerin KI, Sapieha 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(11):1565-1573.

Dorrell MI, Aguilar E, Friedlander M. Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002;43(11):3500-3510.

Durham JT, Herman IM. Microvascular modifications in diabetic retinopathy. *Curr. Diab. Rep.* 2011;11(4):253-264.

Frayser R, Hickam JB. Retinal vascular response to breathing increased carbon dioxide and oxygen concentrations. *Invest. Ophthalmol.* 1964;3:427-431.

Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 2001;20(24):6969-6978.

Gu H, Nakanishi T, Momma K. Mechanisms of Oxygen-Induced Contraction of Ductus Arteriosus Isolated From the Fetal Rabbit. *Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery.* 1993;8(5):666-674.

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(2):496-502.

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(10):3107-3112.

Higgins RD, Yu K, Sanders RJ, Nandgaonkar BN, Rotschild T, Rifkin DB. Diltiazem reduces retinal neovascularization in a mouse model of oxygen induced retinopathy. *Curr. Eye Res.* 1999;18(1):20-27.

Hrgovic I, Doll M, Pinter A, Kaufmann R, Kippenberger S, Meissner M. Histone deacetylase inhibitors interfere with angiogenesis by decreasing endothelial VEGFR-2 protein half-life in part via a VE-cadherin-dependent mechanism. *Exp. Dermatol.* 2017;26(2):194-201.

Huber K, Doyon G, Plaks J, Fyne E, Mellors JW, Sluis-Cremer N. Inhibitors of histone deacetylases: correlation between isoform specificity and reactivation of HIV type 1 (HIV-1) from latently infected cells. *J. Biol. Chem.* 2011;286(25):22211-22218.

Ibarra M, Vázquez M, Fagiolino P, Derendorf H. Sex related differences on valproic acid pharmacokinetics after oral single dose. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 2013;40(4):479-486.

Ichikawa A, Nakahara T, Kurauchi Y, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Rapamycin prevents N-methyl-D-aspartate-induced retinal damage through an ERK-dependent mechanism in rats. *J. Neurosci. Res.* 2014;92(6):692-702.

Iizuka N, Nakahara T, Ushikubo H, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Retinal region-dependent susceptibility of capillaries to high-concentration oxygen exposure and vascular endothelial growth factor receptor inhibition in neonatal mice. *J. Pharmacol. Sci.* 2015;129(2):107-118.

Katoh H. Origin and future of the theory that humans have obtained 80% of information input from vision. *National University Corporation Tsukuba University of Technology Techno Report.* 2017;25(1):95-100

Kelly WK, O'Connor OA, Krug LM, Chiao JH, Heaney M, Curley T, MacGregore-Cortelli B, Tong W, Secrist JP, Schwartz L, Richardson S, Chu E, Olgac S, Marks PA, Scher H, Richon VM. Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* 2005;23(17):3923-3931.

Kim JH, Kim JH, Oh M, Yu YS, Kim KW, Kwon HJ. N-hydroxy-7-(2-naphthylthio) heptanamide inhibits retinal and choroidal angiogenesis. *Mol. Pharm.* 2009;6(2):513-519.

Kim KL, Suh W. Apatinib, an Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2, Suppresses Pathologic Ocular Neovascularization in Mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2017;58(9):3592-3599.

Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, Baek JH, Jang JE, Lee SW, Moon EJ, Kim HS, Lee SK, Chung HY, Kim CW, Kim KW. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat. Med.* 2001;7(4):437-443.

Krieg M, Haas R, Brauch H, Acker T, Flamme I, Plate KH. Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α under normoxic conditions in

renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene*. 2000;19(48):5435-5443.

Lange C, Ehlken C, Stahl A, Martin G, Hansen L, Agostini HT. Kinetics of retinal vaso-obliteration and neovascularisation in the oxygen-induced retinopathy (OIR) mouse model. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol*. 2009;247(9):1205-1211.

Langedijk J, Mantel-Teeuwisse AK, Slijkerman DS, Schutjens MH. Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature. *Drug Discov. Today*. 2015;20(8):1027-1034.

Leibinger M, Andreadaki A, Fischer D. Role of mTOR in neuroprotection and axon regeneration after inflammatory stimulation. *Neurobiol. Dis*. 2012;46(2):314-324.

Li YY, Jones SJ. Drug repositioning for personalized medicine. *Genome Med*. 2012;4(3):27.

Lobov IB, Cheung E, Wudali R, Cao J, Halasz G, Wei Y, Economides A, Lin HC, Papadopoulos N, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. The Dll4/Notch pathway controls postangiogenic blood vessel remodeling and regression by modulating vasoconstriction and blood flow. *Blood*. 2011;117(24):6728-6737.

Maier P, Unsoeld AS, Junker B, Martin G, Dreves J, Hansen LL, Agostini HT. Intravitreal injection of specific receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222 584 improves ischemia-induced retinopathy in mice. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol*. 2005;243(6):593-600.

Michaelis M, Michaelis UR, Fleming I, Suhan T, Cinatl J, Blaheta RA, Hoffmann K, Kotchetkov R, Busse R, Nau H, Cinatl J Jr. Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Mol. Pharmacol*. 2004;65(3):520-527.

Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J. Basic Clin. Pharm*. 2016;7(2):27-31.

Ogura Y, Sakamoto T, Yoshimura N, Ishibashi T. Phase 2/3 Clinical Trial of WP-0508 (MaQaid[®] Intravitreal Injection) for Diabetic Macular Edema. *Journal of the Eye*. 2014;31(12):1876-1884

Ogura Y, Takahashi K, Iida T. Guidelines for Intravitreal Injection for Macular Diseases. *J. Jpn. Ophthalmol. Soc*. 2016;120:87-90.

Osuka S, Takano S, Watanabe S, Ishikawa E, Yamamoto T, Matsumura A. Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and glioma angiogenesis in vivo in the brain. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. 2012;52(4):186-193.

Ozaki H, Seo MS, Ozaki K, Yamada H, Yamada E, Okamoto N, Hofmann F, Wood JM, Campochiaro PA. Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. *Am. J. Pathol.* 2000;156(2):697-707.

Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J. Biol. Chem.* 2001;276(39):36734-36741.

Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995;92(3):905-909.

Pinder RM, Brogden RN, Speight TM, Avery GS. Sodium valproate: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in epilepsy. *Drugs*. 1977;13(2):81-123.

Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev.* 2000;14(1):34-44.

Robison WG Jr, McCaleb ML, Feld LG, Michaelis OE 4th, Laver N, Mercandetti M. Degenerated intramural pericytes ('ghost cells') in the retinal capillaries of diabetic rats. *Curr. Eye Res.* 1991;10(4):339-350.

Saint-Geniez M, D'Amore PA. Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int. J. Dev. Biol.* 2004;48(8-9):1045-1058.

Sapieha P, Sirinyan M, Hamel D, Zaniolo K, Joyal JS, Cho JH, Honoré JC, Kermorvant-Duchemin E, Varma DR, Tremblay S, Leduc M, Rihakova L, Hardy P, Klein WH, Mu X, Mamer O, Lachapelle P, Di Polo A, Beauséjour C, Andelfinger G, Mitchell G, Sennlaub F, Chemtob S. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nat. Med.* 2008;14(10):1067-1076.

Shim JS, Liu JO. Recent advances in drug repositioning for the discovery of new anticancer drugs. *Int. J. Biol. Sci.* 2014;10(7):654-663.

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(1):101-111.

Stahl A, Connor KM, Sapieha P, Chen J, Dennison RJ, Krah NM, Seaward MR, Willett KL, Aderman CM, Guerin KI, Hua J, Löfqvist C, Hellström A, Smith LE. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010;51(6):2813-2826.

Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T, Keshet E. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J. Neurosci.* 1995;15(7 Pt 1):4738-4747.

Takagi C, King GL, Takagi H, Lin YW, Clermont AC, Bursell SE. Endothelin-1 action via endothelin receptors is a primary mechanism modulating retinal circulatory response to hyperoxia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1996;37(10):2099-2109.

Van den Berg RJ, Kok P, Voskuyl RA. Valproate and sodium currents in cultured hippocampal neurons. *Exp. Brain Res.* 1993;93(2):279-287.

Weidemann A, Krohne TU, Aguilar E, Kurihara T, Takeda N, Dorrell MI, Simon MC, Haase VH, Friedlander M, Johnson RS. Astrocyte hypoxic response is essential for pathological but not developmental angiogenesis of the retina. *Glia.* 2010;58(10):1177-1185.

Wong TY, Klein R, Sharrett AR, Schmidt MI, Pankow JS, Couper DJ, Klein BE, Hubbard LD, Duncan BB; ARIC Investigators. Retinal arteriolar narrowing and risk of diabetes mellitus in middle-aged persons. *JAMA.* 2002;287(19):2528-2533.

Yagasaki R, Nakahara T, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Effects of mTOR inhibition on normal retinal vascular development in the mouse. *Exp. Eye Res.* 2014;129:127-134.

Yagasaki R, Nakahara T, Ushikubo H, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Anti-angiogenic effects of mammalian target of rapamycin inhibitors in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Biol. Pharm. Bull.* 2014;37(11):1838-1842.

Zhang ZH, Hao CL, Liu P, Tian X, Wang LH, Zhao L, Zhu CM. Valproic acid inhibits tumor angiogenesis in mice transplanted with Kasumi-1 leukemia cells. *Mol. Med. Rep.* 2014;9(2):443-449.

Zhao Y, You W, Zheng J, Chi Y, Tang W, Du R. Valproic acid inhibits the angiogenic potential of cervical cancer cells via HIF-1 α /VEGF signals. *Clin. Transl. Oncol.*

2016;18(11):1123-1130.