

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04997

研究課題名(和文)新規糖尿病網膜症モデルマウスの開発と創薬コンセプトの確立

研究課題名(英文)Development of a new mouse model of diabetic retinopathy and establishment of novel concepts for drug discovery

研究代表者

小椋 祐一郎(Ogura, Yuichiro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70191963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病網膜症では毛細血管壁におけるペリサイトの消失が、バリア破綻を含む多様な血管病態の契機になると考えられている。しかし高血糖モデルマウスでは、糖尿病網膜症の病理変化を再現することができない。本研究では、新生仔マウスの腹腔内に抗PDGFR 抗体を単回投与して網膜血管発生過程におけるペリサイト集積を一時的に阻害することにより、成体に至るまで糖尿病網膜症と同様の血管異常を再現するモデルマウスを開発した。さらに、ペリサイトを消失した網膜血管壁では、内皮細胞とマクロファージがVEGF-A、PIGF、angiopoietin-2を介して負の連鎖を形成することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In diabetic retinopathy (DR), dropout of pericytes from capillary walls is assumed to initiate various vascular dysfunctions, including blood-retina barrier breakdown. However, hyperglycemic mice fail to reproduce retinal pathology characteristic of DR. In this research project, we established a new mouse model of DR in adult mice, by transiently inhibiting pericyte recruitment to developing retinal vessels during neonatal periods following single intraperitoneal injections of an anti-PDGFR antibody. Furthermore, we uncovered that endothelial cells and macrophages formed a cycle of vessel damage via VEGF-A, PIGF, and angiopoietin-2 in pericyte-deficient retinal vessels.

研究分野：眼科学

キーワード：糖尿病網膜症 ペリサイト 内皮細胞 マクロファージ VEGF-A PIGF Angiopoietin-2

1. 研究開始当初の背景

成人の主要な失明原因である糖尿病網膜症では、毛細血管壁のペリサイト消失に伴う血液網膜関門の破綻により、網膜浮腫が生じ視力が低下する。しかし高血糖モデル動物では網膜ペリサイトの消失を再現できないため、糖尿病網膜症の発症・進展に関与する細胞・分子機構については依然として不明な点が多い。一方、出生直後から血管発生が開始するマウス網膜では、内皮細胞が分泌する血小板由来増殖因子(PDGF)-Bが、PDGF受容体(PDGFR) β を発現するペリサイトの増殖・遊走を促進するため、PDGF-B/PDGFR β シグナルを阻害することにより網膜血管壁のペリサイトを消失させ、糖尿病網膜症と同様の血管異常を再現することができる(Uemura et al. J Clin Invest. 2002)。

2. 研究の目的

成体網膜にて糖尿病網膜症の病態を再現する新たなモデルマウスを確立し、さらに生体マウス網膜イメージング技術を開発することにより、糖尿病網膜症に対する新規創薬コンセプトを創出する。

3. 研究の方法

(1) マウス

野性型マウス(C57BL/6 および ICR) および遺伝子組換えマウス(Tie2-GFP、CX3CR1-GFP、DSCR1-lacZ、VEGFR2-GFP、VEGFR1-DsRed、Flt1-TK^{-/-})を用いた。生後1日マウスの腹腔内に抗PDGFR β 抗体(クローン APB5)を単回投与した。マウス眼内への薬物投与ではガラスキャピラリーを装着したマイクロインジェクターを用いた。マウス視機能の評価では網膜電図を用いた。

(2) 組織学的解析

免疫組織化学染色法(ホールマウント標本および凍結切片標本)、ヘマトキシリン・エオジン染色法(パラフィン切片標本)、in situ hybridization法(ホールマウント標本)、走査型および透過型

電子顕微鏡観察法を用いた。

(3) 遺伝子発現解析

qRT-PCR法およびマイクロアレイ法を用いた。

(4) マウス網膜生体イメージング

超広角走査レーザー検眼鏡、光干渉断層計、共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

(5) マウス網膜器官培養イメージング

共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

(6) 血球成分解析

フローサイトメトリー法を用いた。

(7) Tie2リン酸化の検出

共免疫沈降法およびウエスタンブロット法を用いた。

4. 研究成果

生後1日マウスに抗PDGFR β 抗体を単回投与して、網膜血管壁へのペリサイト集積を阻害すると、内皮細胞における炎症性サイトカインや白血球接着分子の発現が上昇し、生後6日より網膜内へのマクロファージ浸潤が亢進した。マクロファージは血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を分泌して内皮細胞のVEGFR2を活性化し、血管壁透過性を亢進させるとともに、胎盤成長因子(PlGF)を分泌してマクロファージのVEGFR1を活性化し、炎症を増悪させることが明らかとなった。さらに、ペリサイトを消失した内皮細胞はangiopoietin(Angpt)-2を分泌して内皮細胞のTie2受容体を不活化し、VEGFの作用を増強することが明らかとなった。その結果、成体に至るまで網膜におけるマクロファージ浸潤が遷延し、血管壁バリア機能が不可逆的に破綻した。こうした状況でVEGF、PlGF、Angpt2を同時に阻害すると炎症が抑制され、網膜血管壁の構造・機能が正常化した。上記の結果から、マウス網膜血管ではペリサイト消失を契機として、内皮細胞と

マクロファージが VEGF、PlGF、Angpt2 を介した悪循環経路を形成し、血管壁バリア機能を破綻させることが明らかとなった(図)。現在、糖尿病黄斑浮腫に対して施行されている抗 VEGF 療法では、高頻度の再発や、治療への不応性が問題となっている。本研究の成果から、抗 Angpt2 薬と抗 VEGF 薬を併用することにより、相乗効果を得られる可能性が期待される。

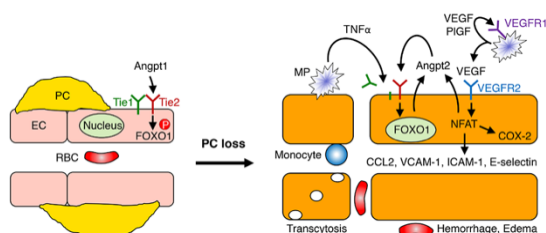


図. ペリサイト消失によるバリア破綻
ペリサイト(PC)に被覆された網膜血管壁では Angpt1 が内皮細胞(EC)の Tie2 受容体を活性化し、さらに転写因子 FOXO1 を不活化して、血管壁を安定化させる。ペリサイト消失に伴い内皮細胞における炎症反応が惹起され、網膜内に浸潤したマクロファージが VEGF および PlGF を分泌する。さらに内皮細胞が Angpt2 を分泌して FOXO1 を活性化する。こうした悪循環経路により、バリア機能が不可逆的に破綻する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 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*.

2:e90905, 2017.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://ncu-ganka.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小椋 祐一郎(OGURA, Yuichiro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号:70191963

(2)研究分担者

植村 明嘉(UEMURA, Akiyoshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 30373278

吉田 宗徳(YOSHIDA, Munenori)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 60273447

安川 力(YASUKAWA, Tsutomu)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 00324632

野崎 実穂(NOZAKI, Miho)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 00295601

平野 佳男 (HIRANO, Yoshio)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 40405163

(3)連携研究者
該当なし

(4)研究協力者
Gou Young Koh
Pilhan Kim