

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11280

研究課題名(和文) 網膜剥離に対する Bクリスタリンの視細胞保護効果

研究課題名(英文) Protection of photoreceptors by alpha-B crystallin in eyes with retinal detachment

研究代表者

馬場 隆之 (Baba, Takayuki)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：00361725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Brown-Norwayラットに実験的網膜剥離をヒアルロン酸ナトリウムを用いて作成したのち網膜下へクリスタリン Bを投与した。視細胞のアポトーシスが最大となる3日目の網膜組織を用いて、TUNEL染色を行った。クリスタリン Bを20マイクログラム、2マイクログラム、0.2マイクログラム、それぞれ網膜下に投与した群では、視細胞のTUNEL陽性率は0.15%、0.67%、0.88%であり、特に20マイクログラム投与した群ではコントロールの0.74%よりも低く抑えられていた。実験的網膜剥離では、クリスタリン Bの網膜下投与により視細胞死の抑制が得られる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Bクリスタリンは、眼の中の水晶体だけでなく、網膜や脈絡膜、さらに全身組織にも分布しており、別名熱ショックプロテインと呼ばれるように、生体に対するストレスから組織を守る働きを持つと考えられている。網膜剥離は、進行すると失明につながる重篤な疾患であるが、網膜剥離を起こすと視細胞が障害され機能が大きく損なわれる。この視細胞の障害を Bクリスタリンによって防ぐことが出来ることが実験的網膜剥離で示唆されたことから、網膜剥離による視細胞のダメージを軽減する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Alpha-B crystallin was subretinally injected in the eye of experimental retinal detachment. In the eyes of Brown-Norway rats, the maximum apoptosis of photoreceptors was observed at three days after the creation of retinal detachment. The percentages of TUNEL-positive apoptotic photoreceptors were 0.15 after the injection of 20 micrograms of alpha-B crystallin and 0.67 after the injection of 2 micrograms and 0.88 after 0.2 micrograms. In the rat eyes with experimental retinal detachment, the reduction of photoreceptor cell death by alpha-b crystallin was suggested.

研究分野：眼科学

キーワード： Bクリスタリン 視細胞保護 網膜剥離

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

黄斑を含む裂孔原性網膜剥離では、視機能が大幅に低下し、外科的治療により網膜の解剖学的治療が得られても視力の回復が不十分となることが問題となる。網膜剥離により視細胞が障害されると、視機能の低下は不可逆となる。この視細胞の障害を防ぐための薬物的治療が手術療法の補助として望まれるが、現在までこのような薬物は臨床的に使われる段階には至っていない。

2. 研究の目的

ヒト裂孔原性網膜剥離での検討により、剥離した網膜では視細胞のアポトーシスが生じていることが報告されている。Bクリスタリンは、光障害および酸化ストレスモデルにおいて、アポトーシスを抑制することが報告されており、網膜剥離におけるアポトーシスも抑制する可能性があると考えられる。ただし従来の研究は網膜色素上皮細胞の細胞ライン (ARPE-19) を用いたものが多く、視細胞に対する効果は不明である。そのため本計画では、ラットを用いた実験的網膜剥離において、Bクリスタリンを複数の経路から投与し、視細胞のアポトーシスが抑制されるかを *in vivo* で確認することを目的とする。

3. 研究の方法

ラットを用いた実験的網膜剥離により、Bクリスタリンの剥離網膜に対する視細胞傷害抑制効果について検討する。実験的網膜剥離は経強膜的にヒアルロン酸ナトリウム溶液を網膜下に注入することにより作成する。Bクリスタリンの投与方法は、網膜剥離作成時のヒアルロン酸溶液に混合して投与、網膜剥離作成後硝子体内へ注入、点眼による投与、の3通りの投与経路で行う。一定期間のBクリスタリン投与後、眼球を摘出しTUNEL染色によるアポトーシスを起こした細胞数のカウント、ヘマトキシリン染色による外顆粒層厚の計測を行い、視細胞の障害が抑制されているか形態的に評価する。視細胞傷害の抑制効果がみられれば、アポトーシス経路 (caspase 等) のタンパク発現量、ネクローシス (RIP kinase) の発現など作用機序についての検討を行う。

4. 研究成果

実験的網膜剥離はBrown-Norwayラットを用いて、腹腔内麻酔および点眼麻酔を行った後に、結膜、強膜、脈絡膜および網膜色素上皮切開を行い、ヒアルロン酸ナトリウムを網膜下へ30G鈍針にて注入し、眼底半分に広がる網膜剥離を作成した(図1)。この網膜剥離は、作成後1日、3日、7日、14日、および28日にわたり存在していた。前眼部組織を除去後、網膜剥離が存在する部分と、存在しない部分を含むように眼球を2分割し凍結切片を作成した。TUNEL染色による視細胞死の割合は、剥離1日(0.8-2.7%)、剥離3日(2.4-3.6%、図2)、剥離7日(0.8-2.3%)、剥離14日(0.2%)、剥離28日(0.5%)であった(図3)。このことから、この網膜剥離モデルでは剥離3-7日が視細胞死のピークとなることがわかったため、Bクリスタリンの網膜保護効果を見るタイミングとしては、網膜剥離作成後3日を採用することとした。

Brown-Norwayラットによる実験的網膜剥離から、後眼部の組織ブロックを作成し、凍結切片を用いて実験を行った。免疫組織学的手法を用いて、Caspaseを介したapoptosis経路、AIFシグナル経路、RIPを介したnecrosisの関与を検討した。それぞれのマーカーを用いて、網膜剥離作成後3日目の組織でシグナルを検出することができ、実験的網膜剥離においては、apoptosis経路のみでなく、AIFシグナル、RIPを介したnecrosisも同時に進行していることが推察された。

Brown-Norwayラットに実験的網膜剥離をヒアルロン酸ナトリウムにて作成したのち網膜下へ濃度勾配をつけたクリスタリンBを投与した。剥離3日目の網膜組織を用いて、TUNEL染色を行い、クリスタリンBの網膜保護効果を観察した。クリスタリンBを20マイクログラム、2マイクログラム、0.2マイクログラム、それぞれ網膜下に投与した群では、視細胞のTUNEL陽性率は0.15%、0.67%、0.88%であり、特に20マイクログラム投与した群ではコントロールの0.74%よりも低く抑えられていた(図4)。実験的網膜剥離では、クリスタリンBの網膜下投与により視細胞死の抑制が得られる可能性が示唆された。

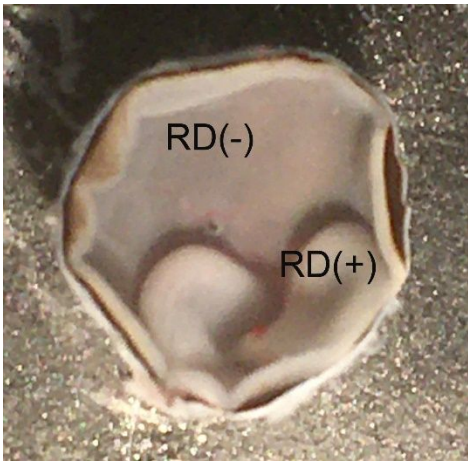


図1 眼球半分に広がる網膜剥離

摘出眼球より前眼部を除去した状態。視神経乳頭が中央に観察される。網膜剥離 (RD(+)) が眼底半分に見られている。

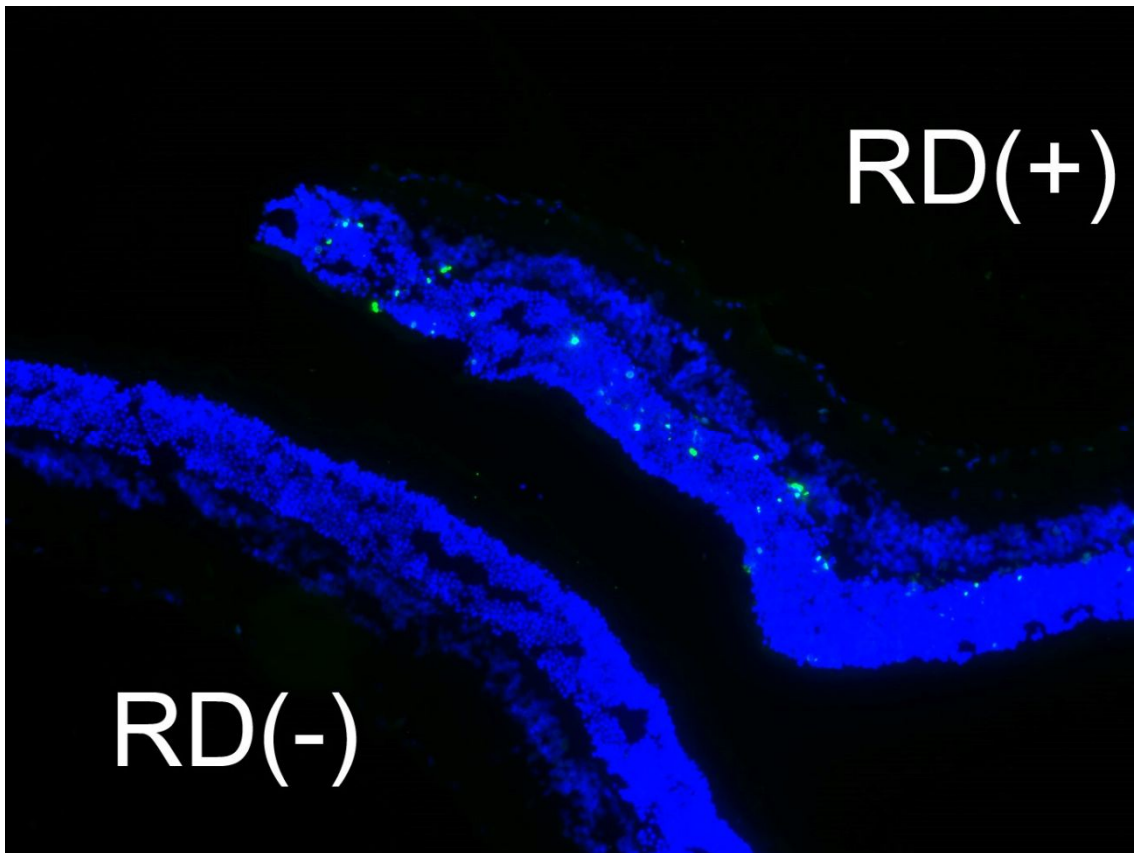


図2 実験的網膜剥離作成後3日目のTUNEL染色

TUNEL陽性細胞(黄緑)は剥離した網膜(RD+)に見られるが、非剥離網膜(RD-)ではほとんど見られない。

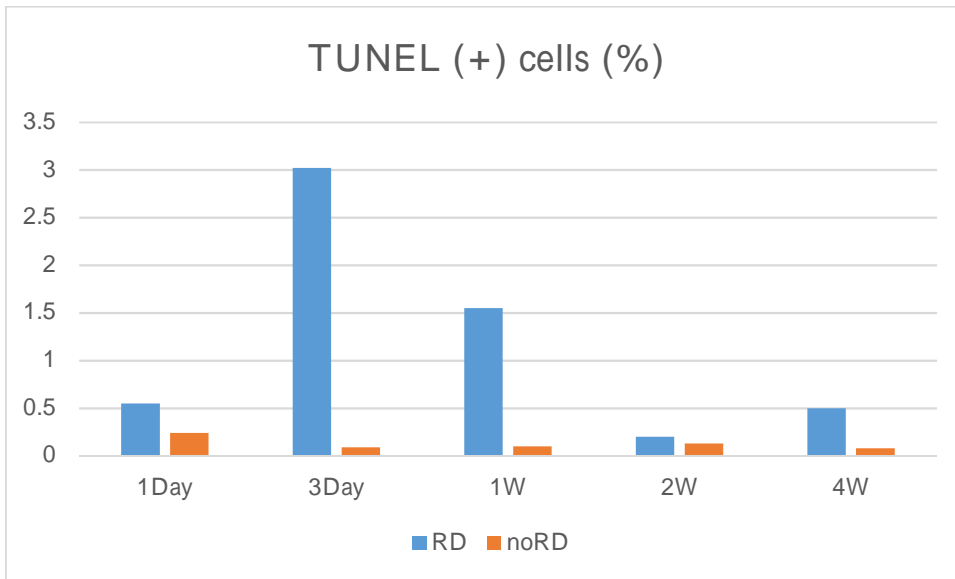


図3 網膜剥離作成後の日数と視細胞アポトーシス

網膜剥離（RD）の視細胞は網膜非剥離（noRD）の領域よりも視細胞アポトーシスの割合が高く、網膜剥離作成後3日目にピークとなっていた。

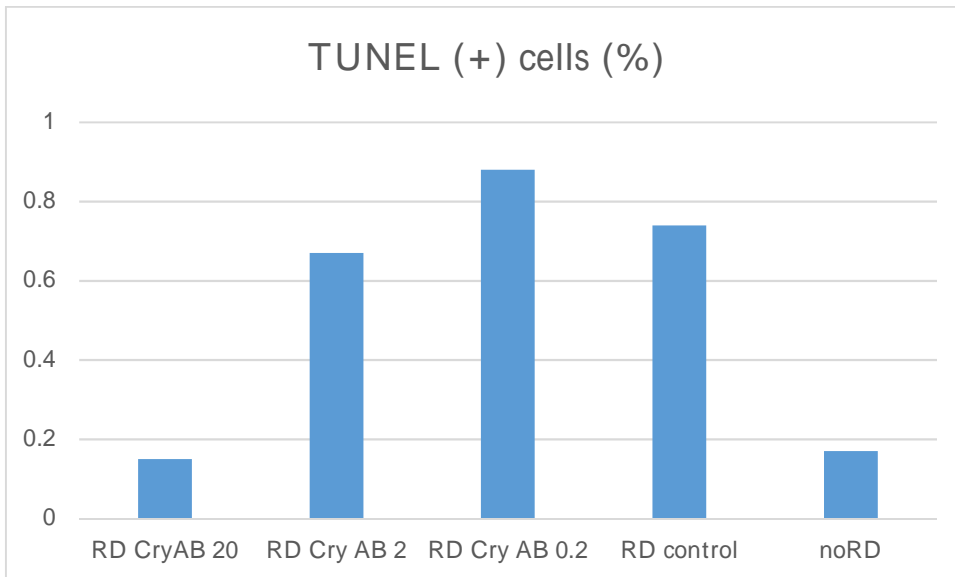


図4 実験的網膜剥離におけるクリスタリン B 投与量と視細胞アポトーシス

クリスタリン B を 20 マイクログラム投与した群（RD Cry AB 20）では、TUNEL 陽性細胞がコントロール群よりも有意に低かった。またクリスタリン B は容量依存性に TUNEL 陽性細胞数を抑制していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Baba Takayuki, Nizawa Tomohiro, Oshitari Toshiyuki, Yamamoto Shuichi	4. 巻 2018
2. 論文標題 Comparisons of Visual and Surgical Outcomes after Reuse or Replacement of Dislocated in-the-Bag Intraocular Lens	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1~4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1155/2018/7342917	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Baba Takayuki, Kakisu Masato, Nizawa Tomohiro, Oshitari Toshiyuki, Yamamoto Shuichi	4. 巻 2019
2. 論文標題 REGIONAL DENSITIES OF RETINAL CAPILLARIES AND RETINAL SENSITIVITIES AFTER MACULAR HOLE SURGERY WITH INTERNAL LIMITING MEMBRANE PEELING	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Retina	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/IAE.0000000000002637	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----