

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15737

研究課題名(和文) 網膜新生血管における内皮細胞ダイナミクスの解析

研究課題名(英文) Analyses of endothelial cell dynamics in retinal angiogenesis

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウス網膜の細胞動態をリアルタイムで観察することを目的に、共焦点レーザー蛍光顕微鏡および二光子レーザー顕微鏡を用いた生体イメージング技術を開発した。さらに、血小板由来増殖因子受容体に対する阻害抗体を投与して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により、マクロファージの動態異常をとらえることに成功した。これらの成果により、今後は網膜における神経細胞、グリア細胞、内皮細胞などの動態を生理的・病的状況において観察することが可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：For the real-time monitoring of cell dynamics in live mouse retinas, we have developed an intravital imaging system utilizing confocal or two-photon laser scanning fluorescence microscopy. By exploiting this system, we successfully detected abnormalities in macrophage dynamics in pericyte-deficient mouse retinas following injections of an anti-PDGFR antibody, which reproduced characteristic features of human diabetic retinopathy. These achievements will contribute to elucidating dynamic movements of various types of retinal cells, including neurons, glial cells, and endothelial cells, under physiological and pathological conditions.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜 マウス イメージング 数理モデル 内皮細胞 ペリサイト マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症では網膜血管壁のバリア破綻にともなう黄斑浮腫や、虚血に伴う血管新生が視覚障害の原因となる。こうした網膜血管の機能異常では、炎症が深く関与していることが示唆されている。しかし、糖尿病モデル動物ではヒト網膜症を再現できないため、その実体は不明な点が多い。一方、糖尿病網膜症では毛細血管壁からペリサイトが脱落することが、半世紀以上前の剖検眼を用いた病理組織学的解析より明らかにされている。そこで我々は、新生仔マウスに抗血小板由来増殖因子受容体 (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR) モノクローナル阻害抗体を投与することにより、網膜血管壁からペリサイトを消失させ、糖尿病網膜症と同様の病理変化を再現することに成功した (Uemura et al. J Clin Invest. 2002)。こうしたペリサイト消失網膜において、内皮細胞や炎症細胞の動態を観察し、さらにその数理モデルを構築することができれば、糖尿病網膜症の病態理解を深め、新たな創薬コンセプトを創出できる可能性が期待される。

2. 研究の目的

ペリサイトを消失したマウス網膜において、血管内皮細胞やマクロファージの動態を観察する生体イメージングシステムを開発する。さらに、網膜血管異常を *in silico* で再現する数理モデルを確立する。

3. 研究の方法

(1) 網膜血管におけるペリサイト消失

生後 1 日野性型 C57BL/6 マウスまたは CX3CR1-GFP マウスの腹腔内に、ラット抗マウス PDGFR モノクローナル抗体 (clone APB5) を投与し、網膜血管発生過程におけるペリサイト集積を阻害した。

(2) マウス網膜イメージング

2%イソフルラン麻酔下に、ミドリン P 点眼液 (トロピカミドおよびフェニレフリン塩酸塩) にて瞳孔を散大し、スコピゾル眼球用液 (ヒドロキシエチルセルロース) を用いてマウス用コンタクトレンズを装用した。その後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡または二光子レーザー蛍光顕微鏡を用いて *in vivo* マウス網膜タイムラプス観察を行った。さらに摘出マウス眼球から作成したホールマウント網膜の *ex vivo* 器官培養にて、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いたタイムラプス観察を行った。

(3) *in silico* 数理モデル

新生仔マウスにおける網膜血管発生画像をもとに数理モデルを構築し、*in silico* シミュレーションを行った。

4. 研究成果

(1) 成体網膜症モデルマウス

生後 1 日野性型 C57BL/6 マウスに抗 PDGFR 抗体を単回投与すると、成体に至るまで網膜血管壁におけるペリサイト被覆は正常化しなかった。また、マクロファージを主体とする炎症細胞の浸潤が長期間にわたって遷延した。さらに、血管新生と血管退縮を含む血管リモデリングが継続的に進行するにもかかわらず、網膜内低酸素が改善することはなかった。こうした状況では、マクロファージが血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) および胎盤由来増殖因子 (placental growth factor, PlGF) を分泌するとともに、VEGF receptor (VEGFR) 1 を発現することから、VEGF/PlGF-VEGFR1 によるマクロファージのオートクラインシグナルの存在が考えられた。実際に、VEGFR1 細胞内キナーゼドメインを欠失した VEGFR1-TK^{-/-}マウスに抗 PDGFR 抗体を投与すると、網膜ペリサイト消失にもかかわらずマクロファージ浸潤が減少し、バリア破綻が抑制された。これらのマウス網膜における病理変化は、ヒト糖尿病網膜症の側面を再現するものと考えられた (Ogura et al. JCI Insight. 2017)。

(2) 網膜マクロファージ動態イメージング

生後 1 日 CX3CR1-GFP マウスに抗 PDGFR 抗体を投与してペリサイト消失網膜症モデルを作成し、さらに生後 4 週にエバンスブルー色素を静脈注射した後に網膜マクロファージと血流のタイムラプス観察を行った (図)。その結果、正常網膜のミクログリアと比較し、ペリサイト消失網膜に浸潤したマクロファージでは突起形成が抑制されることが明らかとなった。また、ペリサイトを消失させた CX3CR1-GFP マウス網膜の血管内皮細胞を蛍光レクチンで標識した *ex vivo* 器官培養のタイムラプス観察 (図) では、VEGF および PlGF を中和して VEGFR1 シグナルを阻害すると、マクロファージの突起形成が回復することを見出した (Ogura et al. JCI Insight. 2017)。我々は現在、ペリサイト消失網膜の新生血管における内皮細胞イメージング技術の開発に取り組んでおり、今後も継続する予定である。

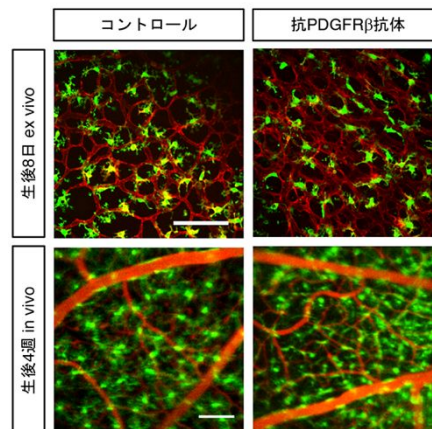


図. マウス網膜イメージング

Ogura et al. JCI Insight. 2017 より改変

(3) 網膜血管新生シミュレーション

新生仔マウス網膜では、視神経から網膜周辺部に向かって血管発生が進行する。この過程を、内皮細胞マーカーである PECAM-1 を用いたフラットマウント網膜免疫組織化学染色により連続的に観察し、数理モデルによるシミュレーションを行った。その結果、動静脈リモデリングを含む網膜血管新生を *in silico* で再現することに成功した(論文投稿準備中)。今後さらに、ペリサイト消失網膜症モデルマウスにおける血管新生のシミュレーションを行う予定である。

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 2 件)

以下、すべて査読有

1. Uemura A. Pharmacologic management of diabetic retinopathy. *J Biochem.* 163:3-9, 2018.
DOI: 10.1093/jb/mvx057.
2. 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.
DOI: 10.1172/jci.insight.90905.

[学会発表](計 11 件)

1. 植村明嘉「網膜症発症機序の最新の知見」
第 52 回糖尿病学の進歩 臨床医が知っておくべき糖尿病の基礎(福岡)
2018.3.3
2. Uemura A “Sustained inflammation and fibrosis in pericyte-deficient retinas”
Asia-Australia Vascular Biology Meeting 2017 (Osaka) 2017.12.9
3. 植村明嘉「ペリサイト消失網膜における炎症と血管壁バリア破綻」
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 ワークショップ(神戸)
2017.12.7

4. 植村明嘉「網膜症に対する薬物療法の現状と展望」
第 32 回日本糖尿病合併症学会・第 23 回日本糖尿病眼学会合同シンポジウム(東京) 2017.10.27
5. Ogura S, Kurata K, Takase H, Hattori Y, Kusuhara S, Fukushima Y, Kim P, Miyata T, Uemura A. “Sustained inflammation after pericyte depletion induces irreversible blood-retina barrier breakdown.”
Keystone Symposia Mononuclear Phagocytes in Health, Immune Defense and Diseases. (Austin) 2017.5.3
6. 植村明嘉「Pericyte depletion induces sustained inflammation and irreversible blood-retinal barrier breakdown」
第 24 回日本血管生物医学会学術集会/第 14 回 Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology シンポジウム(長崎) 2016.12.10
7. 植村明嘉「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」
第 39 回日本分子生物学会年会シンポジウム(横浜) 2016.11.30
8. 植村明嘉「Blood-Retina Barrier Breakdown in Pericyte-Free Vessels」
第 70 回日本臨床眼科学会シンポジウム(京都) 2016.11.3
9. 植村明嘉「ペリサイト消失による血液網膜関門の不可逆的破綻」
第 89 回日本生化学会大会シンポジウム(仙台) 2016.9.26
10. 植村明嘉「糖尿病網膜症の病態・生理」
第 59 回日本糖尿病学会シンポジウム(京都) 2016.5.21
11. 植村明嘉「ペリサイト消失による網膜血管バリア機能の破綻」
第 120 回日本眼科学会総会シンポジウム(仙台) 2016.4.7

[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/endowed-chair>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

西山 功一 (NISHIYAMA, Koichi)
熊本大学・国際先端医学研究機構・准教授
研究者番号：80398221

(3) 連携研究者

三浦 岳 (MIURA, Takashi)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：10324617

手老 篤史 (TERO, Atsushi)
九州大学・マス・フォア・インダストリ研
究所・准教授
研究者番号：60431326

宮田 卓樹 (MIYATA, Takaki)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：70311751

(4) 研究協力者

Pilhan Kim