

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20314

研究課題名(和文) Akitaマウス(KK/Ta-Akita)を用いた重症糖尿病網膜症モデルの作成

研究課題名(英文) Diabetic retinopathy in KK/Ta-Akita mouse

研究代表者

一山 悠介 (Ichiyama, Yusuke)

滋賀医科大学・医学部・医員

研究者番号：10749021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：今回検討したAkitaマウス(KK/Ta-Akita)では、生後12ヶ月において網膜深層血管叢が脱落している所見を認めた。従来型Akitaマウス(C57BL/6-Akita)では網膜深層血管叢に大きな変化は認めず、新型Akitaマウスにのみ認める糖尿病網膜症所見である可能性が示唆された。最近の報告で、ヒトの糖尿病網膜症においても網膜深層血管叢から先に障害されることが報告されており、新型Akitaマウスは初期の糖尿病網膜症モデルとして今後幅広く利用されることが期待される結果であった。

研究成果の概要(英文)：The dropout of deep capillary plexus was observed at the retina in KK/Ta-Akita mouse although it was not observed in C57BL/6-Akita mouse. Recent report demonstrated that the dropout of deep capillary plexus was observed in early phase of human diabetic retinopathy. Therefore, KK/Ta-Akita mouse could be useful mouse model of early phase of diabetic retinopathy.

研究分野：網膜硝子体疾患研究

キーワード：Akitaマウス 糖尿病網膜症

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は本邦における失明原因の第2位であり、失明者減少ますますの基礎研究、臨床研究が望まれている。これまで、糖尿病合併症の基礎研究を行うためのモデルマウスを作成する際、ストレプトゾシンなどの薬剤投与による方法や外科的方法などが用いられてきたが、これらの方法では薬剤や外科的侵襲による影響を排除することができず、合併症評価の実験には不向きとの指摘がある。そこで1997年インスリン生成にのみ関与する遺伝子(Ins2Akita 遺伝子)の単一変異により糖尿病状態となるAkitaマウス(C57BL/6-Akita)が開発され、糖尿病の研究のため世界中で幅広く使用されている。しかしながら、Akitaマウスは著明な高血糖状態が持続するにもかかわらず、その腎病変は軽度にとどまることが報告されている。その後の検討で、Akitaマウスの背景であるC57BL/6ストレインが糖尿病性腎症への抵抗性を示す原因と判明し、同実験においてKKストレインマウスは糖尿病性腎症への感受性が極めて高いことが分かった。この結果に基づき、Ins2Akita 遺伝子をKKストレインマウスに導入した新型Akitaマウス(KK/Ta-Akita)が開発され、進行性の糖尿病性腎症を発症することが示されている。網膜症についても腎症同様にAkitaマウスでは軽度に留まり、発症も生後6か月以降と遅いことが報告されている。これも腎症同様、C57BL/6ストレイン背景であることが原因であると推測され、背景を糖尿病に感受性の高いKKストレインマウスにした新型Akitaマウスでは、より早期により重度の網膜症を来すことが期待されるが、これまで新型Akitaマウスの網膜症を評価した報告は存在しない。

2. 研究の目的

新型Akitaマウス(KK/Ta-Akita)を用いて網膜病変の程度を評価し、有用な糖尿病網膜症モデルマウスとなり得るかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

Akitaマウスの糖尿病網膜症評価

C57BL/6-Akitaマウス、C57BL/6-wild typeマウス、KK/Ta-Akitaマウス、KK/Ta-wild typeマウスの4種類のマウスを飼育し、以下の実験を行う。麻酔にはケタミン 1.25mg とキシラジン 0.1mg を混和したものを使用し腹腔内投与する。

・蛍光眼底造影検査

フルオレセイン蛍光眼底造影検査およびインドシアニングリーン蛍光眼底造影検査を行う。フルオレセイン蛍光眼底造影検査は、

麻酔下に、腹腔内へフルオレセイン 2mg を投与し、蛍光眼底写真を撮影可能な共焦点走査型ダイオードレーザ検眼鏡(F-10 ニデック)に30-diopterのレンズを装着した機器で撮影を行う。インドシアニンググリーン蛍光眼底造影検査は、麻酔下に、インドシアニンググリーン 0.125mg を眼窩静脈叢へ静脈内投与して撮影を行う。

・蛍光色素灌流による網膜血管の可視化

麻酔下に左心室より50mg/mlのFITC-dextranを全身灌流し、すぐに眼球摘出を行い、網膜フラットマウント標本を作製する。作成したフラットマウントは共焦点顕微鏡を用いて観察し血管密度を検討する。

・網膜ホールマウント免疫染色

麻酔下に左心室より4%パラフォルムアルデヒドを全身灌流し、眼球摘出し、網膜ホールマウントを作製する。抗CD31抗体を用いて血管内皮を免疫染色し、血管構造を評価する。

・リアルタイムPCR

糖尿病網膜症に伴って、血管系のシグナルがどのように変動しているかを評価するためにVEGF-A、VEGFR2の転写レベルをリアルタイムPCRで評価する。頸椎脱臼法により安楽死させたマウスから眼球を摘出、網膜検体を採取する。RNAを抽出し、DNAに逆転写しリアルタイムPCRで発現量を測定する。

発生期Akitaマウスを用いた血管新生解析

インスリン欠乏状態が血管発生へ与える影響を検討するために、従来型Akitaマウス同士を掛け合わせhomozygousのC57BL/6-Akitaマウスを作成し、網膜血管構造を観察する。

血管構造の観察は、生後6日で安楽死ののち眼球を摘出、網膜ホールマウントを作成し免疫染色によって行なった。

4. 研究成果

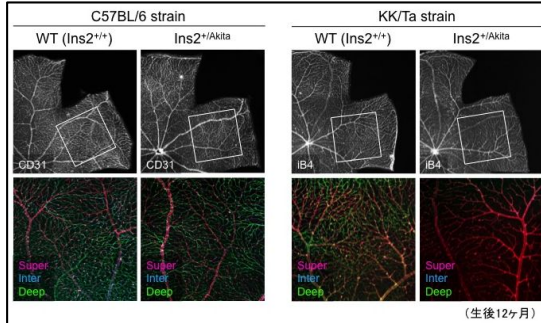
Akitaマウスでは従来型(C57BL/6-Akita)、新型(KK/Ta-Akita)ともに空腹時血糖は400mg/dlを超えており著明な血糖上昇を認めた。

蛍光眼底造影検査は、新型Akitaマウスがunpigmented mouseであったため、フルオレセイン蛍光眼底造影検査にて脈絡膜血管まで撮影されてしまった。そのため詳細な評価が困難であったが、従来型Akitaマウスやwild typeと比較して、新型Akitaマウスでは明らかな網膜血管構造異常は認めなかった。

上記の理由により蛍光眼底造影検査での評価が困難と判断し、蛍光色素灌流による網膜血管可視化を行った。その結果、網膜血管密度は新型Akitaマウスと従来型Akitaマウスで有意差を認めなかった。

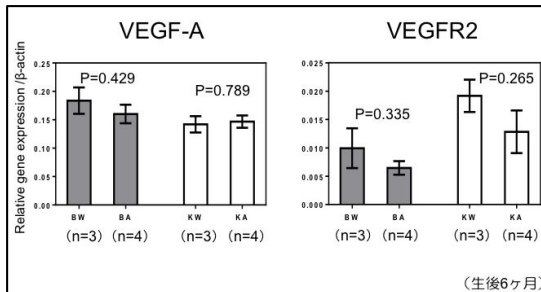
続いて細かな血管構造変化を検出するた

めに、網膜ホールマウントを作成し免疫染色を行なって血管構造を観察した。その結果、生後 12 ヶ月で、新型 Akita マウスでは deep capillary plexus の dropout を認めた。従来型 Akita マウスでは網膜血管の deep capillary plexus に大きな変化は認めておらず、新型 Akita マウスでのみ認める糖尿病網膜症所見である可能性が示唆された。(下図)



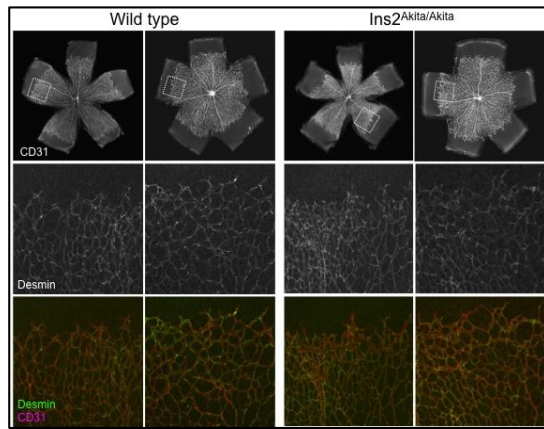
最近のヒトの臨床研究において、糖尿病網膜症の初期は deep capillary plexus から障害されると報告があり、初期の糖尿病網膜症モデルとして新型 Akita マウスが有用となることが期待される。

次に、血管発生や維持に重要である VEGF-A、VEGFR2 の転写レベルをリアルタイム PCR により評価した。(下グラフ)

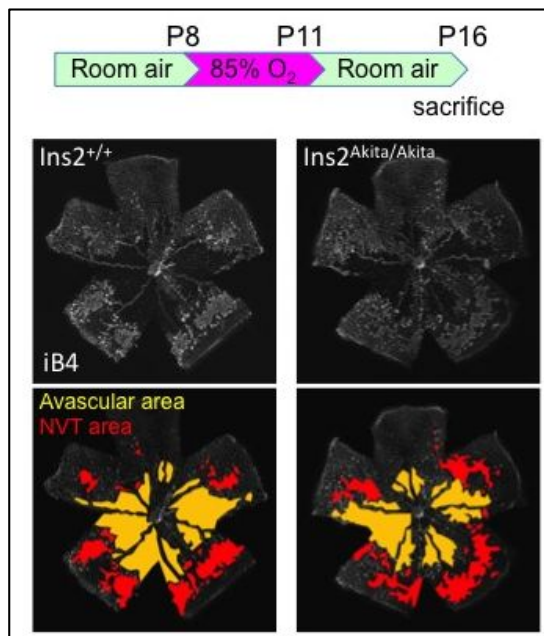


血管退縮による網膜虚血が存在するのであれば VEGF-A の転写活性が上昇するはずであるが、従来型 Akita マウス、新型 Akita マウスともに野生型と差を認めなかった。このことから、もっと初期に虚血が起きているすでに萎縮期に至っている可能性や、糖尿病による網膜神経細胞障害に伴って障害部位に一致する血管が不必要となり退縮した可能性が考えられた。また、VEGFR2 の転写活性は有意差はないものの従来型 Akita マウス、新型 Akita マウスともに野生型よりも低下していたが、低下の度合いは従来型、新型で同程度であった。

最後に、従来型 Akita マウス同士を掛け合わせて homozygous の C57BL/6-Akita マウスを作成し、生後 6 日で網膜血管新生を野生型と比較した。結果 homozygous C57BL/6-Akita マウスでは網膜血管伸長のわずかな遅延は認められたが有意差を得られず、血管構造や血管密度、足状突起数、周皮細胞被覆の程度に野生型と差は認めず、インスリン欠乏状態が血管新生に及ぼす大きな影響は見出されなかった。(下図)



最後に、homozygous C57BL/6-Akita マウスに高濃度酸素負荷をかけ、酸素誘導網膜症の重症度を野生型と比較したが、そちらにも明らかな差は見出されなかった。(下図)



以上より、adult の Akita マウスにおいては deep capillary plexus の dropout を認め、ヒトにおける初期糖尿病網膜症を再現するモデルマウスとして有用となる可能性が示唆された。今後、deep capillary plexus が退縮するメカニズムについて追加検討を行い、論文発表につなげる予定である。

また、有意差は得られなかったが、網膜検体中の VEGFR2 発現量が Akita マウスで wild type より少ない傾向があり、糖尿病網膜症発症メカニズム解明のヒントとなるかもしれない。今後、網膜中のどの細胞で VEGFR2 発現が低下しているかを検討していき、メカニズム解明に努める予定である。さらに発生期においては生後 6 日という網膜深層血管叢形成前の時期しか評価できておらず、今後、網膜深層血管叢の形成について追加検討を行う予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一山 悠介 (ICHIYAMA, Yusuke)
滋賀医科大学・医学部・医員
研究者番号：10749021

(2) 研究分担者

澤田 修 (SAWADA, Osamu)
滋賀医科大学・医学部・講師
研究者番号：00378465

大路 正人 (OHJI, Masahito)

滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：90252650

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()