

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 元 年 6 月 24 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20337

研究課題名（和文）網膜血行再建の機序解明と臨床応用

研究課題名（英文）Mechanism of retinal vessel reperfusion and clinical application

研究代表者

白木 幸彦（Shiraki, Yukihiro）

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：30465546

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000 円

研究成果の概要（和文）：実験的に網膜虚血をマウスに作成するOIR（Oxygen-induced Retinopathy：OIR）モデルマウスにおいて、P12の時点でAPCを投与し、P17の時点で網膜虚血領域を評価したところ、APC投与群において、網膜虚血領域の縮小を認めた。網膜アストロサイトへのAPCの効果を検討した結果、OIR後の虚血領域に存在する網膜アストロサイトの消失がAPC投与群において減少していることが分かった。臨床応用に関しては今後検討していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜虚血性疾患の根本的治療は網膜虚血の改善であるが、現在そのような治療法は存在しない。APCは臨床研究において網膜血管の再生が報告された薬物であるが、その基礎的なメカニズムは解明されていない。今回我々の研究では、APCによる網膜虚血改善効果が実験動物においても確認でき、それは網膜の血管を誘導する網膜アストロサイトの保護作用によるものであることが分かった。今後はこの結果から、APCによる網膜血管再生治療につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To examine effect of APC to retinal ischemia, we use Oxygen-induced Retinopathy(OIR) model mouse, and we compared ischemic area between APC-injected group and APC-non-injected group. The result was that the ischemic area of APC-injected group at P17 was smaller than that of APC-non-injected group. And we evaluated APC effect of APC to retinal astrocyte, prevention effect of APC to retinal astrocyte loss in ischemic area was observed. We have a plan to proceed clinical experience of APC to ischemic retinopathy.

研究分野：眼科

キーワード：血行再建 APC 虚血性疾患 神経保護 網膜アストロサイト 網膜中心静脈閉塞症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜血管の閉塞により、虚血をきたす網膜虚血性疾患は、我が国における視覚障害の主要原因となっている。その患者数は、食生活の欧米化に伴い、糖尿病・動脈硬化・高血圧と言った生活習慣病が増加し、今後更に増加すると予想される。網膜虚血性疾患の根本的治療は閉塞血管の再灌流であるが、現在では再灌流を目指した治療方法はなく、レーザー網膜光凝固や抗 VEGF 療法、硝子体手術といった虚血網膜による二次的な悪影響を取り除く治療のみである。そのため、失明に至る患者も数多い。

根治療法につながる血行再建に関しては、自然経過や治療の過程で一部無灌流領域の縮小が観察されたとの報告もあるが、極めて小範囲の改善に限られている。基礎研究では血管発生、血管新生制御を解明する努力がなされているが、現在広範囲の網膜虚血改善に関する研究は、国内外でも見当たらない。

我々は活性型プロテイン C (APC: Activated Protein C) の虚血網膜に対する効果を検討した結果、網膜細胞保護効果を見出した (Invest Ophthalmol Vis Sci. 52:987, 2011)。そして、高度虚血型網膜中心静脈閉塞症を対象とした APC 眼内投与の医師主導型臨床試験の結果、広範囲の無灌流領域が再灌流する現象が、約 6 割の症例で見られた (図 1)。広範囲の網膜血行再建に成功した世界初の報告となった (JAMA Ophthalmol. 132:361, 2014) が、再灌流の詳細なメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

網膜血管の構成要素には大きく分けて血管内皮細胞、周皮細胞、網膜アストロサイトの 3 種の細胞がある。これらの細胞のどの細胞に対し APC が関与し網膜血管の再生が起こるのかは不明である。in vivo の実験を用い APC がどのようなメカニズムで網膜血管を再生させているのかを探るのが今回の実験の目的である。

3. 研究の方法

1. 網膜虚血モデルの作成

今回の評価では、APC による血管再生能の評価が重要であるため、血管が退縮した網膜虚血領域の面積が安定して作成できるモデルが必要となる。網膜虚血の作成方法の候補としてローズベンガル静注と網膜静脈へのレーザー照射による網膜中心静脈閉塞症モデル (Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 246:509, 2008) と酸素誘発網膜症モデル (Oxygen-induced Retinopathy : OIR) がある。臨床結果との関連から、成熟後の血管に対し虚血領域を作成するレーザー照射による網膜静脈閉塞モデルを用いた評価が理想である。しかし以前の我々の検討にてレーザーによる血管閉塞処置は手技が安定せず、虚血改善効果の評価には不適切と思われる。一方 OIR はマウスを P7 から P12 にかけて 75% の高酸素下で飼育し、網膜の血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor : VEGF) 発現を低下させ網膜血管の退縮を促し網膜虚血を作成するモデルである。OIR は表層の網膜血管が完成したばかりの P7 の時点から網膜虚血を作成するモデルであり、レーザーによる網膜虚血作成方法とは異なり、生育途中の網膜血管に対し網膜虚血を作成する方法である。しかし OIR の場合、網膜血管の再生がその後 P28 までにかけて起こるため、血管再生メカニズムの評価のためには適している。よって今回は OIR を用いて網膜血管の再生メカニズムを評価することとした。

OIR を用いた網膜虚血の再生は、使用するマウスの種類によっての影響が指摘されている。よって遺伝子組み換えマウスの使用においても結果が左右されるため、今回の評価では C57BL/6 マウスのみ用い検討を行った。

2. APC の投与方法

血管再生が始まる時期となる高酸素終了直後、P12 の時点で APC を投与することとした。マイクロインジェクターを用いてマウスの硝子体腔内に 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の APC を投与する。

3. 網膜血管再生領域の評価

OIR では、P12 から血管再生が開始し、P17 で血管再生の活性が最大化し、21 前後には完了する。そこで今回の網膜虚血領域の評価タイミングは P17 とした。

虚血領域の面積の評価は P21 以降に関しては、フルオレセインの腹腔内投与後、蛍光眼底造影を行い評価した。P21 未満に関しては網膜の Wholemount を作成し、血管領域は CD31 (Abcam, ab119341) 免疫染色を用いて評価した。

4. APC による網膜血管構成細胞への影響に対する評価

Wholemount に対する免疫染色を用いて評価を行った。内皮細胞に関して CD31 (Abcam, ab119341)、周皮細胞に関して NG2 (Millipore ab5320)、網膜アストロサイトに関しては GFAP () を用いた。

5. APC の臨床使用

無灌流領域を有する網膜静脈分枝閉塞症と糖尿病網膜症で、APC 硝子体内投与による血行再建の臨床研究を進める。以前の臨床試験に準じ、3 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$ の APC を硝子体内投与し、

以下の検討をおこなう。

i) 視野測定や網膜電図などの測定を行ない、安全性を評価する。

ii) 投与前後、定期的に蛍光眼底造影を含む眼科検査を行い、灌流状態および視機能の評価する。

iii) 網膜断層撮影 (OCT) を用いて、網膜各層の厚みから残存細胞の数を評価するとともに、OCT angiography で血流再建の程度を経時的に評価する。

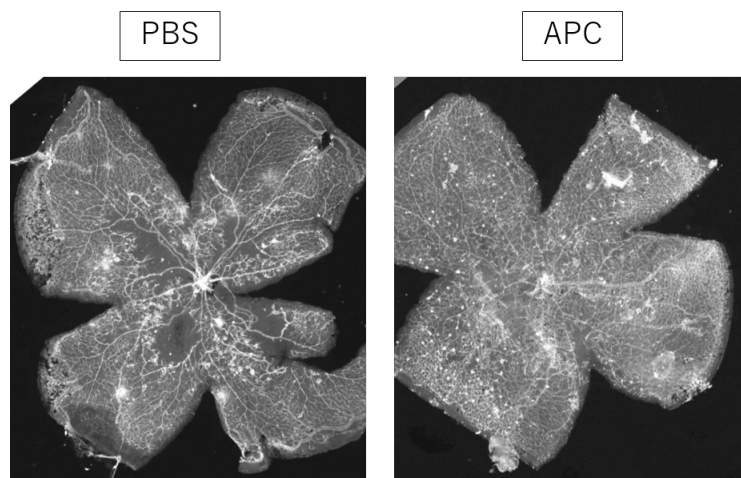
4. 研究成果

1. 網膜虚血モデルマウス作成方法の選定と採用基準の設定

APC 非存在下において、OIR で作成される虚血領域が安定して作成されているか評価するため、高酸素終了後、P12, P15, P17, P21, P28 の虚血領域を測定した結果、同腹仔においてばらつきはなかったが、異腹仔間ではばらつきがあることが分かった。次に虚血領域に影響する因子を検討したところ、体重が関与することが分かった。低体重のマウスほど虚血領域が広く、その後の血管再生が遅いことが分かった。しかもある時点での体重だけでなく、体重の推移が関与していることが分かった。これにより虚血領域の評価のタイミングである P17 時点での体重が同じであっても、P17 までの体重推移により虚血領域に差が発生し正確な評価ができない可能性があると言えるため、正確な虚血領域の測定のため、体重と体重の推移をそろえることとした。今回の検討には P12 の時点で 5g 台であることに加え、その後 P15, P17 の時点で体重が増加するマウス、しかも P17 時点で 6g 台のマウスを用いることとした。

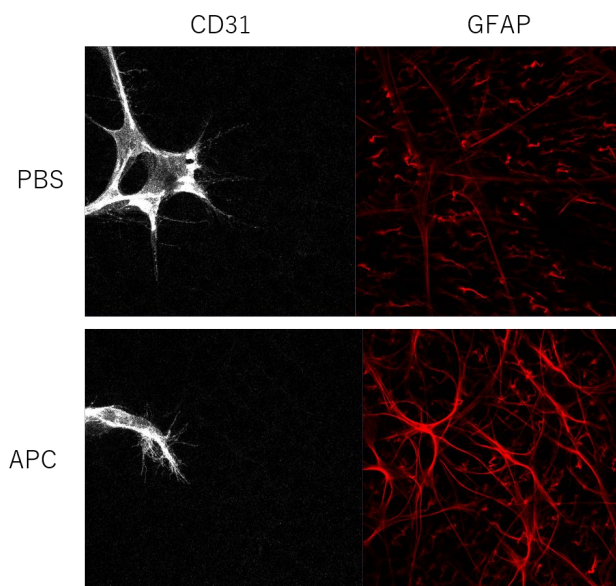
2. APC による網膜血管再生効果

P12 の時点で眼内に APC を投与し、非投与群と網膜虚血領域の面積を P17 の時点で測定した結果、APC 投与群の網膜虚血領域が非投与群よりも狭くなったことが確認できた。よってモデルマウスにおいても APC による網膜虚血改善効果が確認できた。



3. APC が作用する網膜血管構成細胞の特定

APC が網膜血管を構成するどの細胞の効果を及ぼしているか検討するため、網膜アストロサイトへの影響を検討した。網膜アストロサイトは高酸素後 P12 の時点から網膜虚血領域においてその密度が減少するが、P14 の時点で APC 投与群では虚血領域の網膜アストロサイトが残存していることが確認できた。よって APC は網膜アストロサイトの保護作用があることが分かった。



4. APC の臨床症例による効果
モデルマウスの選定に想定以上の時間がかかったため、まだ解析には至っていない。今後進めていく予定である。

5. 主な発表論文等
〔学会発表〕(計3件)

山本敬子、白木幸彦、植村明嘉、瓶井資弘、「APC は虚血領域のアストロサイトの Tlx を上昇させ、正常な血管リモデリングを誘導する」愛知眼科フォーラム(愛知)2017 年 9 月

白木幸彦、植村明嘉、瓶井資弘、「anti-PDGFR 抗体を使用した遷延する網膜虚血モデルマウスの作成」愛知眼科フォーラム(愛知)2018 年 9 月

山本敬子、白木幸彦、植村明嘉、瓶井資弘、「活性化プロテイン C は虚血網膜における血行再建を促進する」愛知眼科フォーラム(愛知)2018 年 9 月

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。