

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11445

研究課題名(和文) 網膜疾患病態解明に向けたマルチファクター生体内イメージングシステムの構築

研究課題名(英文) In vivo imaging to understand retinal diseases

研究代表者

國方 彦志(Kunikata, Hiroshi)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40361092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラットNMDA網膜障害モデルでの網膜細胞死を、死細胞蛍光プローブであるSYTOXオレンジを用いたイメージングシステムによって、生体内で可視化及び定量評価することが可能であり、また既知の神経保護剤の薬効評価に有用であることを明らかにした。また同モデルにおいて、予め網膜神経節細胞を蛍光標識した上で、アポトーシス細胞を可視化することが可能な蛍光標識AnnexinVと本研究で用いている死細胞蛍光プローブであるSYTOXオレンジを投与し、蛍光標識AnnexinVとSYTOXオレンジが同一の障害細胞で陽性であること、その障害細胞が主に蛍光標識された網膜神経節細胞であることを明らかにし、英文雑誌に報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、後天性網膜疾患病態において、低酸素応答、酸化ストレス反応、炎症細胞、網膜死細胞等の複数の関連因子を網膜疾患動物モデルの同一個体内でリアルタイムに観察可能な生体内イメージングシステムを構築することを目的とする。今回、網膜障害動物モデルで細胞死イメージングシステムを確立し、さらにラット網膜動脈閉塞モデルで網膜における活性酸素を生体内で可視化することが可能であった。閉塞後12時間で酸化ストレスが生じることが明らかになった。本研究は、主要な失明原因疾患である後天性網膜疾患の病態解明及び革新的治療薬の開発に資するものであり、その社会的貢献は極めて大きいことが期待される。

研究成果の概要(英文)：We used NMDA injury in rats to confirm our model and assess the effect of neuroprotective agents on RGCs. The rats received NMDA injury and the intravitreal injection of S0, a cell-impermeant dyeing compound that targets nucleic acid. After ten minutes, non-invasive confocal scanning laser ophthalmoscopy visualized damaged or dying cells. Finally, the retinas were flat-mounted for histological confirmation of RGC death, with retrograde Fluorogold labeling and Alexa Fluor 488 Annexin V-conjugate (Annexin V) staining. This also revealed the time course of retinal cell death and the neuroprotective effect of SNJ-1945. Real-time imaging showed that S0-positive cells significantly increased starting 2 h after NMDA injection and reached an approximate plateau at 3 h. S0-positive cells were positive for Fluorogold and Annexin V in the isolated retinas. Moreover, the number of S0-positive retinal cells was significantly lower after treatment with SNJ-1945, compared to carboxymethyl cellulose.

研究分野：眼科学

キーワード：生体内イメージングシステム 網膜疾患 細胞死 活性酸素 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

後天性網膜疾患は、不可逆的な視機能損失を招く眼疾患であり、先進国における中途失明の主要原因でもある。網膜疾患の更なる病態解明及び新規作用機序に基づく革新的治療薬の開発が期待されている。これまで動物モデルを用いた基礎研究において、低酸素、酸化ストレス、炎症等の生体反応が網膜疾患発症や進展の原因となり、網膜細胞死を生じ、不可逆的な視機能障害に至ることが明らかとなっている。しかし、これらの複数の生体反応やその関連分子が複雑に関与していることから、その病態は十分に解明されていない。近年開発された生体内イメージングは、特定の分子、細胞、生体反応等の生体内における観察を可能とし、病態解明及び治療開発のための有力なツールとなる可能性が高いと考えられる。特に眼球は、角膜、水晶体、硝子体等の中間透光体が透明組織であり、眼底の血管・神経組織を透見出来ることから、網膜・脈絡膜は生体内イメージングに最適な臓器である。実際、酸化ストレス、炎症細胞、網膜細胞死などの生体内イメージングが報告され、病態解明及び治療開発における有用性が示されつつあるが、網膜疾患の複雑な病態を解明し治療開発に繋げるためには、様々な生体反応・細胞・関連分子を同一個体で生体内イメージングすることが有用と考えられる。本研究成果は、複数の分子、生体反応及び関連細胞が複雑に関与し、その病態が十分に解明されていない網膜疾患の更なる病態解明及び革新的治療薬の開発への貢献が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、先行研究において開発した SYTOX オレンジと CSL0 を用いた網膜細胞死の生体内イメージングシステムが、緑内障や糖尿病網膜症などの主要な眼疾患の病態に関連し、神経興奮毒性により RGC 死を誘導するラット N-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-D-aspartate: NMDA) 障害モデルにおいて、RGC 死の定量的評価が可能であるか検討した。NMDA 障害モデルでは、NMDA 受容体を介した網膜神経細胞内への Ca イオンの流入が増加する。細胞内 Ca イオン濃度上昇はカルパインの活性化を介して細胞死を誘導するため、カルパイン阻害薬は NMDA 障害による網膜神経細胞死を抑制する。そこで既に神経保護効果が報告されているカルパイン阻害薬である SNJ-1945 を用いて、NMDA 障害により誘導される RGC 死を抑制する SNJ-1945 の神経保護効果を定量的に評価可能であるか検討した。

3. 研究の方法

7~14 週齢の雄の Brown Norway ラットを使用。10 μ M の NMDA を障害眼の硝子体内に 2 μ l 注射し、網膜細胞死を誘導した。対照眼には PBS 2 μ l を硝子体内に注射した。NMDA の硝子体注射 2、3、4、12、時間後に網膜死細胞を可視化するために、PBS で 2.5 μ M に調整した細胞膜非透過性死細胞染色蛍光プローブである SYTOX オレンジを NMDA 障害眼及び対照眼に硝子体内に 2 μ l 注射した。半数のラットでは、SYTOX オレンジの硝子体注射 10 分後に CSL0 で眼底撮影を行い、網膜表層の SYTOX オレンジ陽性の網膜死細胞数を測定した。その上で、NMDA の硝子体注射後の SYTOX オレンジ陽性網膜死細胞数の経時的变化を、SYTOX オレンジを用いた網膜細胞死の生体内イメー

ジングシステムにより評価可能であるか検討した。残りの半数のラットでは、SYTOX オレンジの硝子体注射の 10 分後に安楽死させて両眼球を摘出・固定し、蛍光顕微鏡で網膜伸展標本を観察し、網膜表層の SYTOX オレンジ陽性細胞数を測定した。

次に、NMDA 障害後の SYTOX オレンジ陽性の網膜死細胞の局在と細胞種を明らかにするために、RGC をフルオロゴールドで逆行性染色したラットに、フルオロゴールドの投与 7 日後に NMDA を硝子体内に 2 μ l 注射し、網膜細胞死を誘導した。対照眼には PBS 2 μ l を硝子体注射した。また、NMDA 障害眼および対照眼に Alexa Fluor 488 Conjugate Annexin V 4 μ l を硝子体内に注射した。さらに、NMDA の硝子体注射 4 時間後に、NMDA 障害眼および対照眼に 2.5 μ M の SYTOX オレンジ 2 μ l を硝子体内に注射し、安楽死させて両眼球を摘出・固定し、蛍光顕微鏡で網膜伸展標本の網膜表層を観察した。

さらに、SYTOX オレンジを用いた網膜細胞死の生体内イメージングシステムが、神経保護薬の RGC 死の抑制作用である神経保護効果を定量的に評価可能であるか検討した。まず、PBS により 10 μ M に調整した NMDA を NMDA 障害眼の硝子体内に 2 μ l 注射し、網膜細胞死を誘導した。2 時間後に、SNJ-1945 投与群では、カルパイン阻害薬である SNJ-1945 を、0.5%カルボキシメチル・セルロース (carboxymethyl cellulose : CMC) 溶液を用いて 4%に希釈した上で、100 mg/kg 腹腔内注射した。一方、対照群には同容量の 0.5% CMC を腹腔内注射した。さらに、NMDA の硝子体注射 4 時間後に 2.5 μ M に調整した SYTOX オレンジ 2 μ l を硝子体内に注射し、SYTOX オレンジの硝子体注射 10 分後に CSL0 で眼底撮影を行い、網膜表層の SYTOX オレンジ陽性の死細胞数を測定した。

次に、SNJ-1945 の NMDA 障害に対する神経保護効果を従来の手法で検証するために、10 μ M の NMDA を NMDA 障害眼の硝子体内に 2 μ l 注射し、網膜細胞死を誘導した。対照眼には PBS 2 μ l を硝子体注射した。SNJ-1945 投与群では、0.5%に希釈した CMC 溶液を用いて SNJ-1945 を 6%に希釈した上で 200 mg/kg を、対照群では同容量の 0.5% CMC を、NMDA 及び PBS の硝子体注射 2 時間前、及び 4 時間後から 1 日 1 回 10 日間連続で経口投与した。また SNJ-1945 投与群及び対照群について、NMDA 及び PBS の硝子体注射 4 日後に、フルオロゴールドで RGC を逆行性染色した。そして NMDA 及び PBS の硝子体注射 10 日後に、安楽死させて両眼球を摘出固定した後、網膜伸展標本作製し蛍光顕微鏡で網膜伸展標本を観察し残存 RGC 数を計測した。

4. 研究成果

NMDA 及び PBS の硝子体注射後 2、3、4、12 時間後における、SYTOX オレンジを用いた生体内イメージングシステムによる SYTOX オレンジ陽性細胞数は、NMDA 障害群と対照群間で統計学的有意差を認め、Bonferroni 検定による事後比較検定により NMDA 及び PBS の硝子体注射後 3、4、12 時間では、NMDA 障害群において対照群よりも統計学的に有意に増加している事が明らかとなった。NMDA 障害群及び対照群において、各計測時点間における SYTOX オレンジ陽性細胞数には有意差は認められなかった。以上より、SYTOX オレンジを用いた生体内イメージングシステムにより、ラット NMDA 障害モデルにおける網膜細胞死を定量的に評価可能であることが明らかとなっ

た。また NMDA 障害により SYTOX オレンジ陽性細胞数は、NMDA 硝子体注射後 3 時間以降で有意に増加していることが明らかとなった。

NMDA 及び PBS の硝子体注射後 2、3、4、12 時間後における網膜伸展標本の網膜表層の SYTOX オレンジ陽性細胞数は、NMDA 障害群と対照群間で統計学的有意差を認め、Bonferroni 検定による事後比較検定により NMDA 及び PBS の硝子体注射後 2、3、4、12 時間では、NMDA 障害群において対照群よりも統計学的に有意に増加している事が明らかとなった。NMDA 障害群及び対照群において、各計測時点間における SYTOX オレンジ陽性細胞数には統計学的有意差は認められなかった。以上の結果から、NMDA 障害後の SYTOX オレンジ陽性細胞数の評価において、網膜伸展標本上での蛍光顕微鏡を用いた評価と生体内イメージングシステムによる評価が同様の傾向を示すことが明らかとなった。

NMDA 障害眼では、網膜伸展標本における網膜表層の大半の SYTOX オレンジ陽性細胞が Annexin V 陽性細胞であり、さらにフルオロゴールドで標識された RGC であった。一方で対照眼は、フルオロゴールドで標識された RGC が認められたものの、SYTOX オレンジ陽性細胞及び Annexin V 陽性細胞はほとんど認められなかった。以上の結果から、NMDA 障害後の網膜表層における SYTOX オレンジ陽性細胞の大半は、細胞死を生じている RGC であることが示唆された。

NMDA 硝子体注射後にカルパイン阻害薬である SNJ-1945 を腹腔内注射した上で、SYTOX オレンジを用いた生体内イメージングシステムを行い、NMDA 障害後の網膜細胞死を評価した。SYTOX オレンジ陽性細胞数は、SNJ-1945 投与群では対照群と比較して統計学的に有意に減少した。また、網膜進展標本におけるフルオロゴールド標識平均生存 RGC 数の検討の結果、NMDA 障害眼の平均生存 RGC 数は、SNJ-1945 投与群では対照群と比較して統計学的有意に増加していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ichinohasama K, Kunikata H, Ito A, Yasuda M, Sawada S, Kondo K, Satake C, Katagiri H, Nakazawa T.	4. 巻 -
2. 論文標題 The Relationship between Carotid Intima-Media Thickness and Ocular Circulation in Type-2 Diabetes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/3421305. eCollection 2019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ito A, Tsuda S, Kunikata H, Toshihumi A, Sato K, Nakazawa T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Assessing retinal ganglion cell death and neuroprotective agents using real time imaging.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Res.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2019.02.008.	査読の有無 有
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 Ota H, Kunikata H, Aizawa N, Nakazawa T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Surgical results of internal limiting membrane flap inversion and internal limiting membrane peeling for macular hole.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0203789. eCollection 2018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yui N, Kunikata H, Aizawa N, Nakazawa T.	4. 巻 257
2. 論文標題 Optical coherence tomography angiography assessment of the macular capillary plexus after surgery for macula-off rhegmatogenous retinal detachment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 245-248
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00417-018-4133-3. Epub 2018 Sep 12.	査読の有無 有
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 Sato Risa, Kunikata Hiroshi, Asano Toshifumi, Aizawa Naoko, Kiyota Naoki, Shiga Yukihiro, Nishiguchi Koji M., Kato Keiichi, Nakazawa Toru	4. 巻 9
2. 論文標題 Quantitative analysis of the macula with optical coherence tomography angiography in normal Japanese subjects: The Taiwa Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-45336-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kunikata Hiroshi, Abe Toshiaki, Nakazawa Toru	4. 巻 248
2. 論文標題 Historical, Current and Future Approaches to Surgery for Rhegmatogenous Retinal Detachment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 159 ~ 168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.248.159	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Masaaki, Kunikata Hiroshi, Kunimatsu-Sanuki Shiho, Nakazawa Toru	4. 巻 2019
2. 論文標題 Efficacy of 27-Gauge Vitrectomy with Internal Limiting Membrane Peeling for Epiretinal Membrane in Glaucoma Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/7807432	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 國方彦志
2. 発表標題 巨大裂孔網膜剥離41眼に対するMIVSの治療成績と合併症
3. 学会等名 第58回日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國方彦志
2. 発表標題 特発性黄斑円孔に対する上方内境界膜翻転術後の網膜感度と血管密度
3. 学会等名 第73回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Kunikata
2. 発表標題 Development of an anti-oxidative intraocular irrigating solution based on reactive persulfides
3. 学会等名 1st International Conference on Persulfides and the Metabolism of Sulfur in Biology and Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
研究協力者	伊藤 梓 (Ito Azusa)		
研究協力者	浅野 俊文 (Asano Toshifumi)		
連携研究者	中澤 徹 (Nakazawa Toru) (30361075)	東北大学・眼科・教授 (11301)	

