

平成 21年 6月 8日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18791277

研究課題名（和文）加齢黄斑変性マウスモデルを用いた病態メカニズムの解明と治療への応用

研究課題名（英文）Mouse model of age-related macular degeneration: mechanism, pathogenesis and new therapeutic strategy

研究代表者

馬場 高志（BABA TAKASHI）

鳥取大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40304216

研究成果の概要：加齢黄斑変性の発生機序を解明するために、疾患モデルとなるレーザー誘発脈絡膜血管新生マウスを作成し、脈絡膜新生血管発生に影響を与えると思われる候補遺伝子の解析を行った。更に、マウスのレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルを用いて、多発性骨髄腫の治療薬である 2-methoxyestradiol の内服での薬物治療が有用であることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,800,000	0	1,800,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	210,000	3,710,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：血管新生、加齢黄斑変性、マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性（age-related macular degeneration:AMD）は、加齢に伴い視力に重要な役割を果たす黄斑に発生する疾患で、特に60歳以上の高齢者では、視覚障害の主な原因疾患の一つである。AMDは滲出型と萎縮型とに分類され、特に滲出型は進行が早く、

予後が不良で、その原因究明と治療法の確立が急務であるが、その発生機序は不明な点が多い。

滲出型AMDでは網膜を外側から栄養している脈絡膜から、網膜に向かって病的な新生血管が発生し、これによって出血を生じたり、血液中の水分が漏出し黄斑網膜を障害すると考えられている。新生血管の発育には網

膜色素上皮と脈絡膜の間にあるブルッフ膜が、老化に伴う沈着物のために厚くなることが関与しているという報告もあり、この病的な新生血管が発生する原因として、網膜色素上皮やブルッフ膜の変化に加齢や炎症、遺伝的要因が指摘されている。

疫学的にも発生に性差があり、滲出型は男性に多く、男性は女性の約3倍の頻度で見られる。人種間でも発症率が有意に異なり、白人に多く有色人種に少ないという傾向を持つ。更に、家族内や双子での発症が報告されている。以上の点から、遺伝的背景が影響しているのは確実である。

そこで、AMDの原因を究明し、その発生機序に基づいた治療を確立するためには、その遺伝的背景の解析は避けては通れない課題であった。しかし、患者での研究では、出生から発症までの期間が長く、遺伝以外の影響を除去するのが困難なため限界があり、遺伝的背景について多く用いられており、解析が進んでいるマウスモデルを選択した。

視力予後不良のAMDの大多数を占める滲出型の発生機序を解明する事ができれば、高齢者全体の本疾患の視力予後の改善が期待できる。現時点での滲出型AMDの治療は、抗血管新生促進因子の硝子体注射、ステロイド剤のテノン嚢内注射、光線力学療法、手術などが挙げられるが、いずれにしても侵襲的治療である。その他に、サプリメントの内服も報告があるが、視力が低下した病状を改善させることは困難である。そこで、滲出型AMDに的を絞って、再現性のあるマウスモデルを作成し、遺伝的背景の関与を解析し、そこで得られた知見をもとに新しい治療法の開発を行った。

2. 研究の目的

(1) 滲出型AMDの発生機序を解明するために、マウスモデルでのAMD関連遺伝子の解析とマッピングを行う目的で、異なるさまざまな系統のマウスと、C57BL/6JとDBA2/Jの組換え近交系であるBXDマウスを主に用いて、AMDのモデルとなるレーザー誘発脈絡膜血管新生マウスを作成した。発生した脈絡膜新生血管を脈絡膜伸展標本(フラットマウント)を作成して測定した。これを表現型として解析を行った。更にレーザー誘発脈絡膜血管新生の種依存性について解析を行い、脈絡膜新生血管発生に影響を与えられる候補遺伝子のマッピングを行った。今後、この結果をもとに、候補遺伝子の疾患発生への作用機序を解明するとともに、この発生機序に基づいた新しい治療の開発を進める見込みである。

(2) 滲出型AMDの侵襲が少なく安全な内服治療を確立するため、多発性骨髄腫の治療薬である2-methoxyestradiolに着目して、マウスのレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルを用いて、その有効性を確認する。さらに、効果的で副作用の少ない薬剤投与濃度や投与方法について検討する。

(3) 従来のモデルの問題点である吸収エネルギーが眼底の色素量に影響されないYAGレーザーを用いた淡色系マウスへのレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルの確立を試みる。

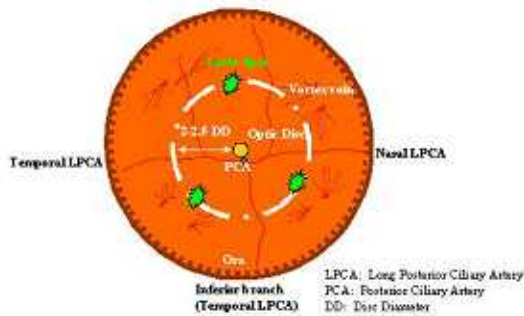
3. 研究の方法

(1) マウスのレーザー誘発脈絡膜血管新生モ

デル

C57BL/6J (8 週齢、雄) を用いてマウスのレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルを確立した。ヒトでの疾患発生の性差を考慮して性別は雄を選択し、処置の簡便さや再現性を考慮し、8 週齢を選択した。今回の一連の研究に使用した他のマウス系統においても同様である。最初に、さまざまなレーザー照射条件を設定し、最も再現性があり、効率よく脈絡膜血管新生が得られる条件を確認した。また、照射後の観察期間についても同様に検証した。その結果、ダイオードレーザーを用いた場合、視神経乳頭から 2.5 乳頭の位置で鼻、上、耳側の 3 カ所に、150 mW の出力で、0.50 秒間照射するのが最も効率がいことが確認できた。また、照射後 2 週間で新生血管が発生することが確認できた。これは、既に報告されている結果と同様であった。

図 1 マウスレーザー照射部位



(2) 脈絡膜新生血管の定量

Fluorescein-isothiocyanate

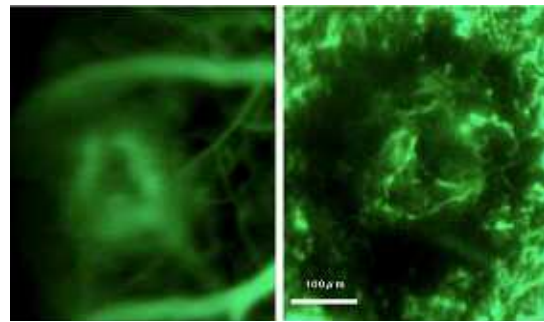
(FITC)-dextran 蛍光眼底撮影検査

生存下での脈絡膜新生血管の定量のため、 2×10^6 Mw の FITC-dextran を 10 mg/mL に調整し、麻酔下でマウス尾静脈から 0.2 mL を

投与し、蛍光実体顕微鏡を用いてマウス生体の脈絡膜新生血管を経瞳孔的に撮影し、画像解析ソフトを用いて計測し、3 カ所の新生血管の平均値を用いた。レーザー処置を行った左右眼の平均新生血管のサイズに差はなかった。

図 2 脈絡膜新生血管

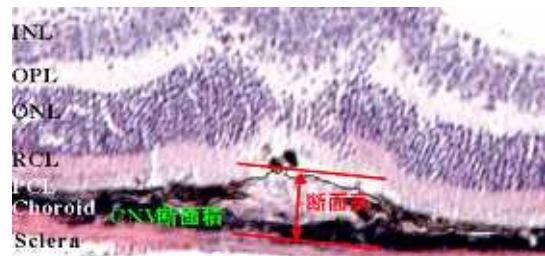
蛍光眼底撮影所見 脈絡膜伸展標本



組織検査

レーザー誘発脈絡膜新生血管が発生したマウス眼の組織切片を作成した。顕微鏡下で脈絡膜新生血管を観察記録し、画像解析ソフトを用いて断面積を測定し、3 カ所の新生血管の平均値を用いた。

図 3 脈絡膜新生血管組織所見



脈絡膜伸展標本

レーザー誘発脈絡膜新生血管が発生したマウスを安楽死後、 2×10^6 Mw の FITC-dextran を 50 mg/mL に調整し、PBS で

環流固定した後、体内を環流させ、眼球を摘出した。顕微鏡下で脈絡膜伸展標本を作製し、蛍光実体顕微鏡を用いて脈絡膜新生血管を記録し、画像解析ソフトを用いて計測し、3カ所の新生血管の平均値を用いた。

レーザー誘発脈絡膜新生血管の FITC-dextran 蛍光眼底撮影検査でのサイズ、組織切片の断面積、脈絡膜伸展標本でのサイズに有意な相関が確認され、これらの定量性と再現性について確認できた。

(3)経口 2-methoxyestradiol (2ME2) の効果

前述したレーザー誘発脈絡膜新生血管モデルマウスを用いて、2ME2 の経口投与による新生血管抑制効果を確認した。コントロールと異なる量の 2ME2 を毎日経口投与 (30、50、75 mg/kg) した群の 5 匹ずつ 4 群で解析した。レーザー照射直後、1 週間後、2 週間後に体重を測定し、投与薬剤の副作用の影響を確認した。レーザー照射後 2 週間で FITC-dextran 蛍光眼底撮影検査と脈絡膜伸展標本を用いて脈絡膜新生血管のサイズを測定した。

(4)モデルマウスでの加齢黄斑変性関連遺伝子の解析とマッピング

C57BL/6J と DBA2/J の組換え近交系である BXD マウスを用いてレーザー誘発脈絡膜血管新生マウスを作成し、脈絡膜伸展標本を作成して発生した脈絡膜新生血管の面積を測定した。これを表現型に脈絡膜血管新生の量的形質遺伝子座 (quantitative trait loci: QTL) の検出を試みた。脈絡膜新生血管発生に影響を与えると思われる候補遺伝子のマッピングを行った。

4. 研究成果

(1)マウスのレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルにおいて、FITC-dextran 蛍光眼底撮影検査での脈絡膜新生血管を反映する過蛍光領域の定量、脈絡膜伸展標本での脈絡膜新生血管の面積、組織切片の解析による脈絡膜新生血管断面積の定量を用いると、3 次的に解析することができ、それぞれの測定値は互いに相関することが確認できた。これらのパラメーターを用いた 3 次的な解析が脈絡膜新生血管の定量に有用である事を確認した。

同様の方法を用いた加齢黄斑変性のマウスモデルは従来より存在しており、生体での造影撮影検査はヒトで用いる検査機器をマウスに応用することで可能であった。しかし、屈折値や眼球のサイズなどのヒトとマウス眼の解剖学的な差異から、再現性のある結果を得る事は困難で、その結果は定性的なもので定量性を持たせる事は困難であった。

我々の実験系では、生体で再現性のある検査が可能であり、その結果は他の解析値と相関があることから、解析に用いるマウスの数を減らす事が可能となり、複数の方法を用いる事で信頼度の高い結果を得る事ができる。これらの知見で確立したマウスを用いた再現性のある加齢黄斑変性の実験系を用い、さまざまな発生機序仮説を検証し、ヒトへの応用可能な治療を開発することが可能となった。

(2)レーザー誘発脈絡膜血管新生モデルマウスに 2ME2 を経口投与すると、用量依存的に、FITC-dextran 蛍光眼底撮影検査の脈絡膜新

生血管サイズ、脈絡膜伸展標本での脈絡膜新生血管サイズにおいて共に減少することが確認できた。また、投与に際して体重減少など主要な合併症がなく、安全な治療であることがマウスで確認できた。現在まで、滲出型 AMD に対する有効な薬物療法としては、眼内注射による脈絡膜血管新生の抑制が報告され、既に臨床応用されているが、観血的治療であることから、合併症を完全に回避する事はできない。非観血的な内服療法では、血管新生を抑制させる程有効な薬剤の報告はなく、今後、この知見をもとにした観血的治療を必要としない簡便で安全な内服治療の臨床応用が期待できる。

(3)加齢黄斑変性に関与する原因遺伝子を同定するため、BXD 組換え近交系マウスを用いて QTL 解析を行った。composite interval mapping によって新しい QTL を 2 番染色体 (AngCNVq1) と 19 番染色体 (AngCNVq2) に同定した。この部位には、複数の血管新生メカニズムに関与する候補遺伝子が存在し、これらの遺伝子が加齢黄斑変性の発生に関与することが示唆された。今後、これらの候補遺伝子が、加齢黄斑変性の発生メカニズムに関して、どのように関与しているかを解析するとともに、その知見をもとにした新しい治療への応用を検討していく計画である。

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 3 件)

馬場高志、船越泰作、井上幸次(5 番目)、

他 5 名、乳び胸を合併した未熟児網膜症の一例、臨床眼科、63、出版準備中、2009、有
Nakai K、Rogers MS、Baba T、Funakoshi T、他 3 名、Genetic loci that control the size of laser-induced choroidal neovascularization、FASEB J.、Feb 23 電子版、2009、有

武田佐智子、馬場高志、山崎厚志、井上幸次、肝膿瘍由来 Citrobacter freundii によると考えられる両眼眼内炎の 1 例、あたらしい眼科、24、1261-1264、2007、有

[学会発表] (計 1 件)

馬場高志、乳び胸を合併した未熟児網膜症の一例、第 62 回日本臨床眼科学会、2008 年 10 月 24 日、東京

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 高志 (BABA TAKASHI)

鳥取大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 40304216