

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09941

研究課題名(和文) 虚血網膜の再灌流メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of reperfusion of ischemic retina

研究代表者

瓶井 資弘 (Kamei, Motohiro)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：40281125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：活性化プロテインC(APC)を投与すると、非投与群と比較して、網膜虚血領域においてアストロサイトの変性が緩徐である事が確認できた。

酸素誘導網膜症(OIR)モデルマウスにおいて、生後12日目に残存血管から発芽した血管が虚血網膜内に伸長し、血管再生が開始され、Neo-Vascular Tufts(NVT)が形成された。NVT個々の内皮細胞はペリサイトに被覆されており、高酸素直後の生後12日及び15日に抗PDGFR 抗体をマウス腹腔内投与し、ペリサイトを消失させてもNVTの範囲は変化しなかった。よって虚血網膜では、内皮細胞が自律的に糸球体様新生血管を形成することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性化型プロテインC(APC)が、虚血網膜における網膜アストロサイトの変性を緩徐にすることが分かった。APCによる実験を継続し、虚血網膜再灌流のメカニズム解明することで、網膜虚血性疾患に対する根治療法を確立すること可能性が高まると考えられる。また、今回虚血網膜において内皮細胞が自律的に糸球体様新生血管を形成することが明らかになり、脈管形成や血管新生の研究にも大きな方向性を示すことができると期待される。

研究成果の概要(英文)：The results showed that the administration of activated protein C (APC) slowed down the degeneration of astrocytes in the retinal ischemic area compared to the non-treated group.

In a mouse model of oxygen-induced retinopathy (OIR), vessels sprouting from residual vessels extended into the ischemic retina on postnatal day 12, initiating vascular regeneration and forming Neo-Vascular Tufts (NVTs), and individual NVT endothelial cells were coated with pericytes and anti-PDGFR antibody was detected on postnatal days 12 and 15 immediately after hyperoxia. Intraperitoneal administration of anti-PDGFR antibody at postnatal days 12 and 15, immediately after hyperoxia, and loss of pericytes did not alter the extent of NVTs. Thus, it is clear that endothelial cells autonomously form glomerulosa-like neovessels in the ischemic retina.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜 網膜虚血 活性化プロテインC 網膜再灌流 網膜アストロサイト 血管内皮細胞 ペリサイト

1. 研究開始当初の背景

血行再建を目標とした根治療法がないため、網膜虚血性疾患は後天性失明の主要原因となっている。我々は活性型プロテインC (APC)の眼内投与により、広範囲の網膜再灌流に初めて成功したが、その詳細なメカニズムは不明である。そこで、APCによる血行再建のメカニズムを解明し、将来的に更に有効な分子標的治療の開発や、全身の虚血性疾患への応用を目指す。現在難治とされている網膜虚血性疾患、ひいては、全身の虚血性疾患に対する根治療法を確立することができれば、その社会的意義は計り知れないものである。また、脈管形成や血管新生の研究にも大きな方向性を示すことができると期待される。

2. 研究の目的

虚血再灌流に関わる網膜血管の構成要素として、血管内皮細胞、周皮細胞、網膜アストロサイトの3種の細胞が挙げられる。これらの細胞が網膜血管の再生にどのように関与するのか、また、APCを投与することでどのような変化が起こるのか、in vivo 実験を用いて探るのが今回の実験の目的である。

3. 研究の方法

網膜虚血モデルマウスの選定

P7 から P12 にかけて 75% の高酸素下で飼育し、VEGF (Vascular endothelial growth factor: VEGF) の発現を低下させ、網膜血管の退縮を促し網膜虚血領域が得られる高酸素誘導網膜虚血モデル (oxygen-induced retinopathy: OIR) を用いた。

APC の投与

高酸素直後の生後 12 日目に、マウスの硝子体腔内に 1 μ l (0.015 μ g) 投与した。

網膜血管構成細胞への影響に対する評価

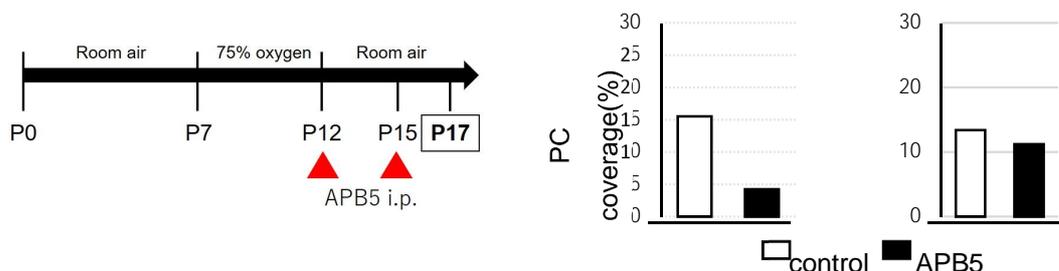
Wholemout に対する免疫染色を用いて評価を行った。内皮細胞に関しては CD31 (Abcam, ab119341)、周皮細胞に関しては NG2 (Millipore ab5320)、網膜アストロサイトに関しては、GFAP を用いた。

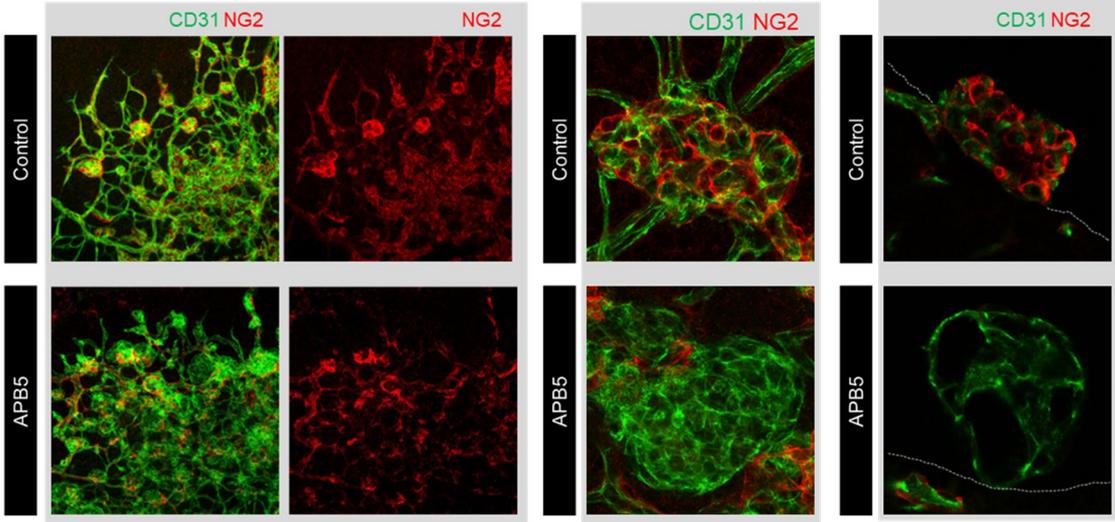
4. 研究成果

OIR を用いると安定した網膜虚血領域を作成することができたが、その後の血管再生のスピードに個体差があった。その個体差の原因を検討したところ、発育 (体重増加) が関与していることが分かった。APC による血管再生効果の定量には、自然経過による血管再生スピードを一定にする必要があるため、本研究では P12 では 5g であり、かつその後の P15、P17 の時点で体重が増加するマウスを用いることとし、同一個体の左右の網膜で、効果を比較することでばらつきを抑えることとした。

OIR では、高酸素下の生後 9 日、高酸素直後の生後 12 日、相対的虚血状態に陥った生後 14 日において眼球摘出し、免疫染色を用いて網膜アストロサイトの形態変化について調べたところ、生後 12、14 日目の網膜アストロサイトの変性が認められた。高酸素直後の生後 12 日目に APC を投与すると、非投与群と比較して、網膜虚血領域においてアストロサイトの変性が緩徐である事が確認できた。

OIR モデルでは、生後 12 日目に残存血管から発芽した血管が虚血網膜内に伸長し、血管再生が開始した。生後 14 日から主に静脈壁にて増殖した内皮細胞が局所的に集積し、押し出されるようにして Neo-Vascular Tufts (NVT) が形成された。生後 17 日にかけて NVT が増大するとともに、隣接する NVT と癒合した。NVT 内部では、内皮細胞が頂底極性を維持しつつ、連続した管腔構造をもつ糸球体様血管網を形成した。個々の内皮細胞はペリサイトに被覆されており、高酸素直後の生後 12 日及び 15 日に抗 PDGFR 抗体をマウス腹腔内投与し、ペリサイトを消失させても NVT の範囲は変化しなかった。よって虚血網膜では、内皮細胞が自律的に糸球体様新生血管を形成することが明らかになった。





5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名 Tsuboi Kotaro, Sasajima Hirofumi, Kamei Motohiro | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 Collateral Vessels in Branch Retinal Vein Occlusion | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Ophthalmology Retina | 6. 最初と最後の頁 767 ~ 776 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.oret.2019.04.015 | 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 Tsuboi Kotaro, Ishida Yuichiro, Kamei Motohiro | 4. 巻 126 |
| 2. 論文標題 Congenital Retinal Macrovascular Strays into Deep Capillary Plexus | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Ophthalmology | 6. 最初と最後の頁 1658 ~ 1658 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ophtha.2019.07.006 | 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 Takatsu Hiroko, Tsuboi Kotaro, Wakabayashi Taku, Kamei Motohiro | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Vascular Abnormalities May Progress in Branch Vein Occlusion Despite Resolution of Macular Edema | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Ophthalmology Retina | 6. 最初と最後の頁 252 ~ 254 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.oret.2021.11.003 | 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 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

| |
|-----------------------------------------------|
| 1. 発表者名 瓶井資弘 |
| 2. 発表標題 Activated Protein C硝子体投与による虚血網膜再灌流 |
| 3. 学会等名 日本眼薬理学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 白木幸彦 |
| 2. 発表標題 虚血網膜における糸球体様新生血管の形成機構 |
| 3. 学会等名 日本眼科学会 |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|