

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 3 年 8 月 25 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18845

研究課題名（和文）ショートパルス網膜光凝固における遺伝子発現プロファイル

研究課題名（英文）Gene expression profile in short-pulse retinal photocoagulation

研究代表者

藤田 智純（Fujita, Tomoyoshi）

香川大学・医学部・協力研究員

研究者番号：90448366

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）：糖尿病網膜症や網膜静脈閉塞症の治療法として、網膜光凝固術は非常に有用なものである。近年、ショートパルス網膜光凝固という新しい概念の装置が開発され、最大の特徴は、数発から数十発を連続発振できることにある。その短い照射時間のゆえ脈絡膜への熱伝達がおさえられ、患者の負担を大幅に軽減させることができる。これまでその至適条件は確立しておらず、本研究は照射条件を変えることによって遺伝子発現に差異があることを証明し、遺伝子レベルからみた至適条件の決定を企画した。しかしながら研究準備を進めている段階で、新型コロナウイルス感染症問題に直面した。当初予定していた研究スケジュールの実施が困難となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ショートパルス網膜光凝固術の至適条件の決定を企画したが、研究準備を進めている段階で新型コロナウイルス感染症問題に直面した。研究施設への立ち入り制限や地域間異動の制限、臨床業務は増加し研究以外の業務が増えたことで、当初予定していた研究スケジュールの実施が困難となった。最終年はその状態はますます悪化し、情報収集や実験準備を進めたが、当初予定していた研究スケジュールの実施が困難となった。今後、実験再開の道を模索している。

研究成果の概要（英文）：Retinal photocoagulation is very useful as a treatment for diabetic retinopathy and retinal vein occlusion. In recent years, a device with a new concept of short pulse retinal photocoagulation has been developed, and the greatest feature is that it can continuously oscillate several to several tens of shots. Due to the short irradiation time, heat transfer to the choroid is suppressed, and the burden on the patient can be significantly reduced. The optimum conditions have not been established so far, and this study proved that there is a difference in gene expression by changing the irradiation conditions, and planned to determine the optimum conditions from the viewpoint of the gene level.

However, while preparing for research, I faced the problem of new coronavirus infection. It became difficult to carry out the originally planned research schedule.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜光凝固術 ショートパルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

網膜光凝固術は非常に古典的な治療方法であるが、今なお網膜疾患の治療としては非常に有用なものである。近年、Semiautomated patterned scanning laser for retinal photocoagulation (以下 PASCAL) という新しい概念の網膜光凝固装置が開発され、最大の特徴は、単発発振ではなく、数発から数十発を連続発振できることにある。その短い照射時間のゆえ脈絡膜への熱伝達がおさえられ、患者の負担を大幅に軽減させることができる。しかしながらこれまで、網膜光凝固術の術後評価方法は照射後の凝固班の色、大きさなど視覚的にのみ評価がされてきており、至適条件は確立していない。視覚的には同じ凝固班であっても、レーザーの照射条件を変えることによって遺伝子発現に差異があることを証明し、遺伝子レベルからみた網膜光凝固術の至適条件の決定を企画する。さらには、ショートパルスによる組織選択性のある凝固でのみ発現する遺伝子を同定できる可能性があり、新たな研究に発展する可能性も含んでいる。

## 2. 研究の目的

網膜光凝固術の治療概念は、1950 年代に提唱されて、1970 年代から臨床の場で使用されるようになってから 30 年以上が経過している非常に古典的な治療方法である。しかし、今なお網膜疾患の治療としては非常に有用なものであり、それを代替する治療手段はないに等しい。網膜疾患における網膜光凝固術の主な目的は大きく分けて以下の 2 つに分けられる。

糖尿病網膜症や網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞症などの網膜血管閉塞性病变において、その部分の酸素の需要を減らすことにより、二次的に発生する網膜血管新生を予防し、それに続発する硝子体出血や牽引性網膜剥離を回避すること

網膜裂孔や裂孔原性網膜剥離において、裂孔周囲にレーザーを照射することで意図的に網膜を熱凝固し、瘢痕化させることによって神経網膜と網膜色素上皮細胞の接着を強固にし、網膜剥離を予防すること

その中でも、増殖糖尿病網膜症に対する汎網膜光凝固術のレーザー照射は日常診療で数は 1 眼につき、1,500-2,000 発と非常に多く、かつ、光凝固はいわば人工的な熱傷であるために、照射数が多数になると、術後網膜における炎症が非常に強くなる。そこで、通常は一度全ての光凝固をすることはなく、3-4 回に分割して施行する。分割してもなお術者、患者双方にとっての負担はかなり大きくその理由は以下の通りである。

1 回に 500-700 発照射する

手術時間が 15-20 分程度かかる

痛みを伴う

近年、PASCAL という新しい概念の網膜光凝固装置が開発された(文献 1)。PASCAL は Nd-YAG を媒体とし、波長は 532nm である。このレーザーの最大の特徴は、単発発振ではなく、数発から数十発を連続発振できることにある。照射パターンはあらかじめ複数設定されており、そこから照射する領域に合ったものを選択するようになる。

PASCAL で複数の光凝固を同時に行う場合には従来使用されてきた 200ms-500ms のパルスを使用せずに、ショートパルス(10-20ms)で照射する必要がある。これまでの研究で、ショートパルスにした場合は、その治療安全域(可視できる凝固班を得る出力からブルッフ膜を穿孔する出力までの幅)が狭くなることが証明されているが(文献 2)、10-20ms 程度では臨床に使用するのには十分安全であると考えられている。つまり、PASCAL を用いてショートパルスにて汎網膜光凝固術を試行した場合にはまず、前述した患者、術者双方の負担になると考えられる手術時間を大幅に短縮することができる。実際の臨床経験では従来の半分の時間である 10 分以内に終了できることが分かっている。また、ショートパルスではその短い照射時間のゆえ脈絡膜への熱伝達がおさえられ、患者はレーザー中の疼痛を訴えることがほとんどなく、患者の負担を大幅に軽減させることができると考えられる。また、ショートパルスでの照射は組織選択性が高いとされており、網膜内層や脈絡膜の障害を最小限にとどめられることも証明されている(文献 1)。これからの利点から、PASCAL はこれからの網膜光凝固装置としてスタンダードになる可能性を持っている。

## 3. 研究の方法

マウスを 2 群に分類し、それぞれに従来のパルスとショートパルスを用いて網膜光凝固術を施行する。全てのマウス網膜から網膜光凝固術後、1 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間、3 日、7 日において網膜から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ(Wholemouse)を用いて各タイムポイントでの 2 群間の遺伝子発現を比較する。発現差のある遺伝子を選択し RT-PCR で確認のうえ、実際のマウス組織にて免疫染色で発現部位を調べる。

【令和元年度の計画】

マウスにおけるショートパルス汎網膜光凝固術の試行

当大学動物実験規約に基づき、ketamine, xylazine の腹腔内注射にて有色マウス(C57BL/6J)を全身麻酔した後、Nd :YAG laser ( 波長 532nm ) を用いてマウス網膜への光凝固を試行する。マウスに光凝固の視覚的な評価 ( 文献 1 ) であるが、PASCAL レーザーを開発したスタンフォード大学でウサギを用いた実験を経験済みであり、マウス網膜で視覚的に moderate な光凝固の設定を従来のパルス長(500ms)とショートパルス(10ms)にて視覚的に同様な " moderate " な凝固班が出るように設定する。また、遺伝子発現解析のポイントを 網膜光凝固術後、1 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間、3 日、7 日後の 7 ポイントと設定する。各タイムポイントでそれぞれ 5 匹 10 眼の必要として、合計 70 匹のマウスが必要となる。光凝固は視神経乳頭周囲に 1 眼につき 20 発とする。

#### mRNA 回収

マウス網膜光凝固術後、1 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間、3 日、7 日後において当大学動物実験規約に基づきマウスを安楽死させた後に眼球摘出し RNAlater (Qiagen) に浸す。その後、マウス眼球から前眼部、水晶体を取り除き、ホモジェネートした後、RNA 抽出キット RNeasy(Qiagen)を用いて後眼部全体の RNA を抽出する(文献 2)。

#### cDNA の合成 cRNA の合成および蛍光ラベリング

2 つのサンプルから抽出した RNA を鋳型に、それぞれ cDNA を合成し、さらに T7RNA ポリメラーゼを使ってアンチセンス cRNA を合成する。この時、各サンプル反応液にそれぞれ Cy 3 と Cy 5 の 2 つの異なる蛍光色素でラベル化された CTP を入れておき、標識を行う。

#### DNA マイクロアレイへのハイブリダイゼーション

標識 cRNA を DNA マイクロアレイ上で競合的にハイブリダイゼーションさせ、洗浄する。使用する DNA マイクロアレイはアジレント社製の Whole Mouse Genome Oligo Microarray を使用する。Whole Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイは、41,000 個以上の Mouse 遺伝子と転写産物を表わす 41,534 個の 60-mer オリゴヌクレオチドを搭載している(参考文献 3)。

#### 蛍光シグナルのスキャン

香川大学に備えるアジレント社の高精度 Scanner で各蛍光シグナルを検出する。得られるデータは、2 つのサンプル間の遺伝子発現変動比が 2 倍上昇以上もしくは 0.5 倍減少以下と予想される。

#### データ解析

得られたデータをクラスター解析し、それぞれのタイムポイントで従来の網膜光凝固とショートパルスの網膜光凝固において発現レベルに差がある遺伝子をリストアップする。RNA 抽出後の実験行程は全てアジレント社によって推奨された方法があり、アジレント社の実験プロトコール (参考文献 4)に従って施行されるものとする。

### 【令和 2 年度の計画】

#### 定量的 PCR の試行

リストアップした遺伝子に関する PCR プライマーを購入し、はじめに採取した RNA から得た cDNA をテンプレートに定量的 PCR を試行する。これにより、非常にノイズの多いマイクロアレイのデータを裏付けでき、遺伝子発現量をより正確に比較することができる。

#### 免疫組織化学的検索

定量的 PCR にて発現の差が証明され、発現量に大きな差があった遺伝子における抗体を購入してそれぞれのタイムポイントにて免疫染色し、その網膜内での局在を調べる。この際、選択する遺伝子は炎症関連因子等、黄斑浮腫発症に関連する遺伝子を優先して選択する。

#### 海外学会発表

得られたデータは Association for Research in Vision and Ophthalmology ( 眼科と視覚に関する研究会議 ) にて報告する。

#### 論文作成

論文は眼科実験系のピアレビュージャーナルである Investigative Ophthalmology and Visual Science (IOVS)に投稿するものとする。

### 参考文献(URL 含む)

1. Jain et al. Effect of pulse duration on size and character of the lesion in retinal photocoagulation. Arch Ophthalmol. 2008 126:78-85.
2. Popp MP et al. Development of a microarray chip for gene expression in rabbit ocular research. Mol Vis. 2007 2:164-73.
3. <http://www.chem.agilent.com/jajp/products/instruments/dnamicroarrays/wholmousegenomeoligomicroarraykit/pages/default.aspx>
4. [http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4140-90050\\_Two-Color\\_GE\\_5.7.pdf](http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4140-90050_Two-Color_GE_5.7.pdf)

### 4 . 研究成果

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

研究準備を進めている段階で新型コロナウイルス感染症問題に直面した。研究施設への立ち入り制限や地域間異動の制限、臨床業務は増加し研究以外の業務が増えたことで、当初予定していた研究スケジュールの実施が困難となった。最終年はその状態はますます悪化し、情報収集や実験準備を進めたが、当初予定していた研究スケジュールの実施が困難となった。今後、実験再開の道を模索している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------