

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18883

研究課題名（和文）ペリサイト消失網膜症モデルマウスを用いた網膜線維化のメカニズム解析

研究課題名（英文）Analysis of retinal fibrosis using a pericyte-deficient retinopathy mouse model

研究代表者

井上 奈緒美（Inoue, Naomi）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：60791168

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病網膜症では毛細血管壁のペリサイトが消失することにより、血管透過性が亢進する。さらに血管閉塞が進行すると線維血管増殖膜が形成され、網膜剥離により失明に至る。本研究では、ペリサイト消失網膜症モデルマウスの急性炎症から慢性炎症への移行に伴って、残存ペリサイトと網膜色素上皮細胞が筋線維芽細胞に分化転換すること、さらに活性化型ミクログリアが線維化を促進することを明らかにした。同様の機構により、糖尿病網膜症の線維血管増殖膜が形成されると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病網膜症はしばしば血管透過性亢進に伴う黄斑浮腫を合併し、視機能低下の原因となる。近年では抗VEGF療法の普及により薬物治療が急速に進歩している。一方で、増殖期の糖尿病網膜症における線維血管増殖膜形成に対しては、未だ有効な薬物療法がない。本研究では、糖尿病網膜症の病態を再現するペリサイト消失網膜症モデルマウスを用いて、網膜線維化の細胞・分子機構を解明した。こうした成果は、増殖糖尿病網膜症の新規治療法開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In diabetic retinopathy, dropout of pericytes from retinal capillary walls evokes vascular hyperpermeability. Furthermore, progression of vessel obstruction leads to the formation of fibrovascular membranes, which create blinding conditions including retinal detachment. In the present study, by exploiting a pericyte-deficient retinopathy mouse model, we have elucidated that remaining pericytes and retinal pigment epithelium cells transdifferentiate into myofibroblasts, and activated microglia promotes fibrosis during the transition from acute to chronic inflammation. This machinery may underlie the fibrovascular membrane formation in human diabetic retinopathy.

研究分野：眼科学

キーワード：糖尿病網膜症 筋線維芽細胞 ペリサイト マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症では、毛細血管壁のペリサイトが消失することにより、血管透過性が亢進する。さらに増殖期では線維血管増殖膜が形成され、硝子体出血や網膜剥離により失明に至る。こうした増殖期の病態に対しては、未だ有効な治療法がない。このため、網膜における線維血管増殖膜の形成機構の解明が求められているが、糖尿病網膜症の病態を再現する有用な動物モデルが欠如している。我々は、抗 PDGFR 抗体を新生仔マウスの腹腔内に投与することにより、網膜血管壁のペリサイトを消失させ、糖尿病網膜症と同様の血管異常を再現した (Ogura et al. JCI Insight 2017)。さらに筋線維芽細胞が線維血管増殖膜を形成し、網膜組織構造を不可逆的に破壊させることを見出した。

2. 研究の目的

ペリサイト消失網膜症モデルマウスを用いて、糖尿病網膜症における線維血管増殖膜の形成過程と、元となる筋線維芽細胞の由来を解明し、増殖糖尿病網膜症における線維血管増殖膜に対する新規薬物治療の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 生後 1 日マウスの腹腔内に抗 PDGFR 抗体を投与して網膜血管壁のペリサイト集積を阻害し、ペリサイト消失網膜症モデルマウスを作成した。モデルマウスの網膜フラットマウント標本および網膜凍結切片標本を作成し、免疫組織科学染色を行った。さらに、網膜フローサイトメトリー解析とリアルタイム PCR 解析を行った。

(2) 筋線維芽細胞の由来を明らかにするため、EdnraCreERT2:R26R-EYFP マウスの腹腔内に 4-hydroxytamoxifen (4OHT) を投与して、網膜ペリサイトの細胞運命マッピング解析を行った。また、TyrCre:R26R-H2B-mCherry マウスを用いて網膜色素上皮細胞の細胞運命マッピング解析を行った。

(3) CX3CR1-CreERT2:R26R-EYFP マウスの眼内に 4OHT を投与して、網膜ミクログリアの細胞運命マッピング解析を行った。また、CX3CR1-CreERT2:R26R-EYFP マウスの腹腔内に 4OHT を投与して、網膜ミクログリアと骨髄由来マクロファージの細胞運命マッピング解析を行った。新生仔マウスの腹腔内に抗 CSF1R 抗体を投与して、網膜ミクログリアを消失させた。さらに、フローサイトメトリー法により精製した網膜 CD45^{hi}CD11b⁺細胞を用いて、単細胞 RNAseq 解析を行った。

4. 研究成果

(1) ペリサイト消失網膜における急性炎症と慢性炎症

生後 1 日マウスの腹腔内に抗 PDGFR 抗体を単回投与すると、IL-1、IL-6、TNF- α 、CCL2 などの炎症性サイトカインの遺伝子発現が生後 2 週にかけて急激に上昇した。一方、IL-4、IL-10、IL-13 などの慢性炎症に關与するサイトカインの遺伝子発現は、生後 3 週にピークに達した。また、ペリサイト消失網膜のフローサイトメトリー解析では、生後 2 週まで CD45^{hi}CD11b⁺細胞が増加するのに対し、生後 3 週以降は CD45^{int}CD11b⁺細胞が増加した。これらのことから、ペリサイト消失網膜症モデルマウスでは、生後 2 週から 3 週にかけて、急性炎症から慢性炎症に移行すると考えられた。

(2) 筋線維芽細胞の由来

ペリサイト消失網膜症モデルマウスでは、生後 2 週に網膜中心部と周辺部に筋線維芽細胞が出現し、生後 3 週にかけて網膜下の線維化が進行する。この際、外顆粒層を裏打ちする筋線維芽細胞は残存ペリサイトに由来し、脈絡膜に接する筋線維芽細胞は、上皮間葉転換をきたした網膜色素上皮細胞に由来することが明らかとなった。また、内在性ミクログリアや骨髄由来マクロファージは、筋線維芽細胞には分化転換しないことが明らかとなった。

(3) ミクログリアの役割

ペリサイト消失網膜症モデルマウスの急性炎症期では、活性化型ミクログリアと骨髄由来マクロファージが網膜表層の血管壁周囲に集積していた。一方、慢性炎症期に移行すると、骨髄由来マクロファージが減少し、活性化型ミクログリアが網膜下腔に移行した。抗 CSF1R 抗体を投与してミクログリアを消失させると線維化が抑制されることから、活性化型ミクログリアは線維化を促進することが明らかとなった。さらに単細胞 RNAseq 解析の結果、慢性炎症期の活性化型ミクログリアは M2 極性化していることが明らかとなった。

(4) 今後の展望

本研究の成果から、糖尿病網膜症における線維血管増殖膜の形成でも、ペリサイトや網膜色素

上皮細胞が筋線維芽細胞に分化転換し、活性化型ミクログリアが線維化を促進する可能性が想定される。我々は現在、活性化型ミクログリアを標的とした抗線維化療法の開発を進めているが、こうした成果は糖尿病網膜症の新規治療法開発に寄与することが期待される。

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
---------	---------