

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390447

研究課題名（和文） 網膜浮腫をおこすノックアウトマウスを用いた糖尿病黄斑浮腫の新しい治療法の開発

研究課題名（英文） Development of new treatment modality for diabetic macular edema using knockout mice that show prominent retinal edema.

研究代表者

村田 敏規（MURATA TOSHINORI）

信州大学・医学部・教授

研究者番号：50253406

研究成果の概要（和文）：我々が作成した Receptor-activity-modifying protein (RAMP)-2 は、全身に高度の浮腫を生じてホモ接合型は胎生期に死亡する。我々はこのマウスが、網膜にも浮腫を生じることを確認した。従来、網膜浮腫の動物モデルは存在しなかったため、原因究明と治療法の開発には困難があった。我々はこのマウスを用いて、網膜色素上皮細胞の tight junction の破綻とブルッフ膜の異常が網膜浮腫に関係している可能性を報告した。

研究成果の概要（英文）：Homozygote RAMP-2 knockout (KO) mice are fatal before delivery, but heterozygote RAMP-2 KO mice show largely normal development except for systemic edema. We found these mice have marked retinal edema. Diabetic retinal edema is a leading cause of legal blindness. There has been no animal model for retinal edema. (RAMP)-2 knockout mice are new and the only existing animal model of retinal edema. Using this model, we reported that insufficient formation of tight junction and disruption of Bruch's membrane are potential causes of breakdown of blood-retinal barrier.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	3,700,000	1,100,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	11,900,000	3,560,000	15,470,000

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：眼細胞生物学糖尿病黄斑浮腫治療

1. 研究開始当初の背景

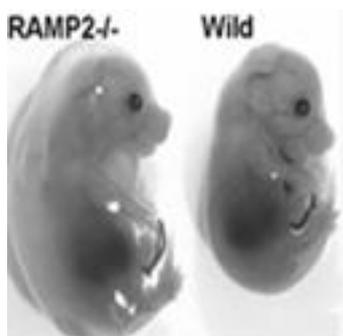
糖尿病黄斑浮腫（網膜浮腫）の治療は、種々の手技や薬剤を試行錯誤して使用しているのが現状である。現在抗 VEGF (vascular endothelial growth factor) 抗体の臨床治験が行われているが、その効果は 1-2 ヶ月に留まり長期間の反復投与には困難を伴う。安全で効果が高い安価な治療方法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

日本人の社会的な失明原因の首位は現在でも糖尿病網膜症である。中でも病早期から発症する網膜浮腫による視力低下に苦しむ患者の数が最も多い。網膜浮腫には再現性のある動物モデルが、過去には存在しなかった。

糖尿病モデルマウスとして最も代表的に用いられるストレプトゾトシン糖尿病マウスは、糖尿病発症後一ヶ月で白内障

を生じて、生存したまま眼底（網膜）を観察することができないため、その後の *in vivo* 研究に制限がある。また、6ヶ月から1年で死亡するため、人間では最低でも10年かかるとされる、糖尿病網膜症の発症は明らかにはならない。



上の写真のように、我々が作製したアドレノメデュリン・ノックアウトマウスおよび、アドレノメデュリンのレセプターである Receptor - activity - modifying protein (RAMP)-2 のノックアウトマウスは全身に高度の浮腫を生じる。これらのマウスは我々が知る範囲で、世界で初めて作成された網膜にも高度の浮腫を起こすマウスである。これらのマウスの網膜浮腫を治療することで、糖尿病網膜症の網膜浮腫の新しい治療法を開発し、糖尿病患者を社会的失明から救うことが本研究の最終的な目標である。

3. 研究の方法

アドレノメデュリンとそのレセプターの RAMP-2 ノックアウトマウスで病的な網膜浮腫がおこる。従来の研究結果から、我々は主な病院として以下のような4つの仮説を立てた。

仮説 1) アドレノメデュリンが欠損すると血管の tight junction 破綻する。

仮説 2) アドレノメデュリン欠損による網膜血管 tight junction 破綻が網膜浮腫の原因である。

仮説 3) アドレノメデュリン欠損が tight junction 破綻に至るメカニズムを明らかにすれば同様なメカニズムが糖尿病網膜血管でも生じている可能性がある。

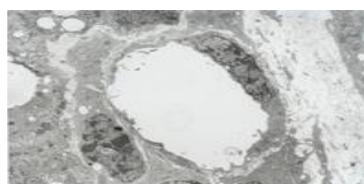
仮説 4) アドレノメデュリンを投与すれば、糖尿病網膜で破綻した血管の tight junction を成熟化させて、浮腫の治療につながる可能性がある。

4. 研究成果

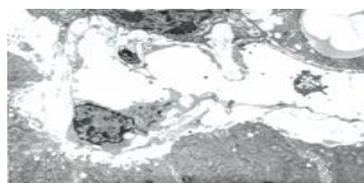
電子顕微鏡的に観察するとアドレノメデュリン欠損マウスでは、正常の動脈と比較して内皮細胞が菲薄化して、正常な tight junction が観察されない。また、claudin、occludin などの tight junction を形成する蛋白の発現が低下している事が、real time PCR などで確認されている。

これまでの三年間の研究で下記のように仮説 1 と仮説 2 は、RAMP-2 のリガンドであるアドレノメデュリンの、ノックアウトマウスで証明された。

仮説 1) アドレノメデュリンが欠損すると血管の tight junction 破綻する。

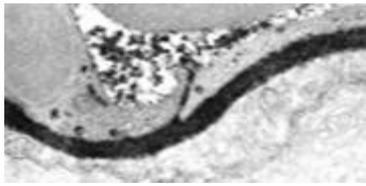


上図のように、正常マウスの細動脈では基底膜の内層を血管内皮細胞が一層に被覆していて、これが管腔構造を形成しているのがわかる。この血管の強拡大像では、内皮細胞間に tight junction が形成されている。



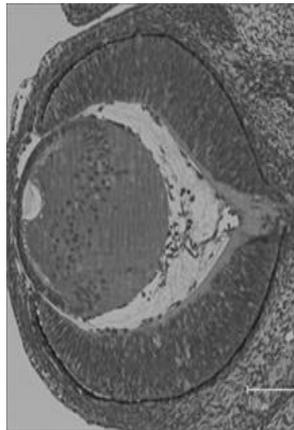
上図は、電子顕微鏡的に観察するとアドレノメデュリン欠損マウス (RAMP-2 のリガンド) の血管である。正常の動脈と比較して内皮細胞が菲薄化して、明らかな tight junction が観察されない。また、claudin、occludin などの tight junction を形成する蛋白の発現が低下している事が、real time polymerase chain reaction (PCR) などで確認された。

仮説 2) アドレノメデュリン欠損による網膜血管 tight junction 破綻が網膜浮腫の原因である。網膜血管の blood-retinal barrier を構成する tight junction の破綻は、血管からの漏出につながり、網膜浮腫の原因となる。



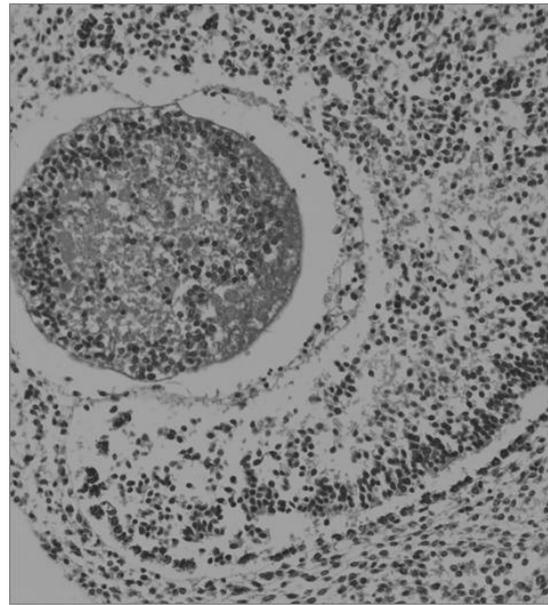
上図は分担研究者石橋が行った研究で、糖尿病網膜症の透過性亢進は、2つの血管内皮細胞間の tight junction がバリア機能を喪失に起因する事が示されている。すなわち、黒く見える horse-radish peroxidase (HRP) が血管壁外に漏出している。アドレノメデュリンおよび RAMP-2 ノックアウトマウスでも、確認のための現在同様の研究を計画、実行予定である。ここまでの研究から、三枚の電顕写真からわかるように、アドレノメデュリンもしくはそのレセプターである RAMP-2 の欠損により浮腫と、糖尿病網膜の浮腫には、tight junction の破綻が原因の一つとなることが強く示唆された。

RAMP-2 ノックアウトマウスでの網膜浮腫の組織学的確認。

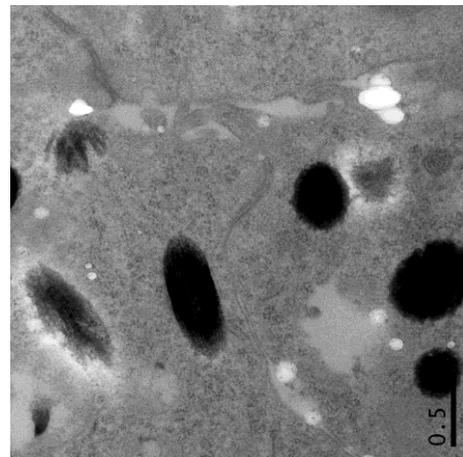


上図は、胎生期の正常の眼球の網膜と脈絡膜の組織像である。まだ、角膜は形成されておらず、網膜の層構造も明らかではないが、濃染する核がコンパクトに密集して存在する。

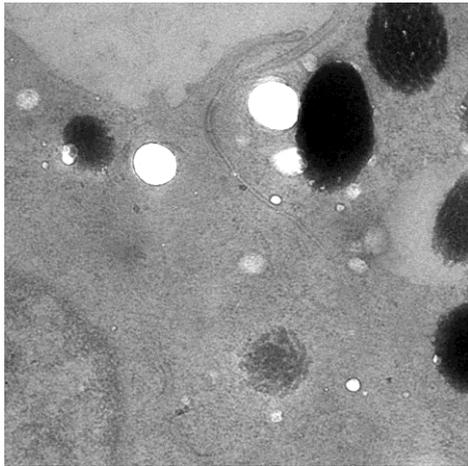
これに対して、下図は RAMP-2 ノックアウトマウスの組織像であるが、全身に浮腫があり細胞密度が低く、細胞間液が豊富なことがわかる。網膜も細胞間液が豊富で、著明な浮腫が存在していることがわかる。これはマクロ所見に一致する組織像であるといえる。



下図は正常マウスの網膜色素上皮細胞の細胞間接合部の電子顕微鏡写真である。外網膜血液関門の構成要素であると考えられる tight junction が形成されているのがわかる。



下の図は RAMP-2 ノックアウトマウスの網膜色素上皮細胞であるが、比較的健全な tight junction が確認できた。RAMP-2 ノックアウトマウスは、そのリガンドであるアドレノメデュリン・ノックアウトマウスと異なり、tight junction は正常に形成されている可能性も示唆され、今後さらなる検討が必要である。

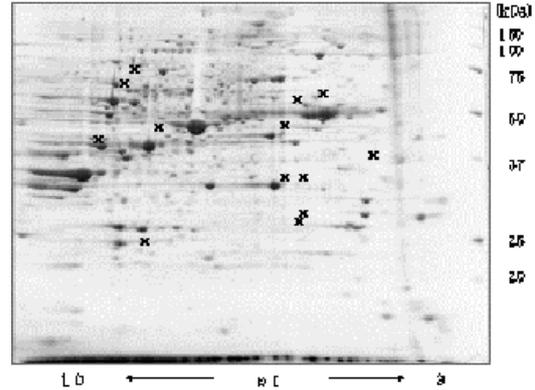


さらに、網膜色素上皮細胞の基底膜を含む5層構造をなすBruch's membraneと、脈絡膜の血管の接合部を観察したのが下図である。



RAMP-2 ノックアウトマウスのブルッフ膜網膜色素上皮細胞の電子顕微鏡的観察において、網膜浮腫がつよいマウスでは、ブルッフ膜の異常が観察され、脈絡膜血管の血管内皮細胞は基底膜から脱落していた。網膜色素上皮細胞は外網膜血液関門の重要な構成要素であるが、この基底膜がその一層をなすブルッフ膜の異常は、外網膜血液関門の破綻が網膜浮腫の原因となっていることを示唆した。

形態学的には網膜色素上皮細胞の tight junction の破綻のみが網膜浮腫の原因ではない可能性が高くなった。しかし、我々のプロテオミクスおよびDNA マイクロアレーを用いた研究では、RAMP-2 ノックアウトマウスは tight junction の脆弱性が存在することを示唆するものであった。



以上のデータと、他の研究グループからの報告により、抽象的表現にとどまっていた旧仮説3と4を以下のように具体的な表現に変更し、今後も研究を継続する予定である。

修正仮説3) アドレノメデュリン欠損マウスの tight junction の破綻には、アドレノメデュリンシグナル伝達がブロックされることにより、GSK-3 β (glycogen synthase kinase) の発現が亢進して、 β -catenin、claudin、occludin の抑制がおこり、細胞間接合や細胞骨格の異常が生じることが原因である。

旧仮説3) アドレノメデュリン欠損が tight junction 破綻に至るメカニズムを明らかにすれば、同様なメカニズムが糖尿病網膜血管でも生じている可能性がある

修正仮説4) アドレノメデュリン補充にだけでなく、GSK-3 β の抑制と、 β -catenin の活性化が網膜浮腫の治療につながる可能性がある。

旧仮説4) アドレノメデュリンを投与すれば、糖尿病網膜で破綻した血管の tight junction を成熟化させて、浮腫の治療につながる可能性がある。

今後は、修正仮説2と4の証明に、分子生物学的手法、遺伝子導入などの手法を用いて研究を続ける。最終的には、網膜浮腫の実験的な治療を行うことを目標とする。

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5件)

- ① Yanagidaira T, Miyahara T, Tokushima T, Yoshida A, Murata T:
Histopathological study of angle closure glaucoma secondary to retinopathy of prematurity. Jpn J Ophthalmol 53:267-287, 2009 査読有
- ② Ikeda Y, Murata T, Ishibashi T. Acute Toxicity Study of a Simian Immunodeficiency Virus-Based Lentiviral Vector for Retinal Gene Transfer in Nonhuman Primates. Hum Gene Ther. 2009 Sep;20(9):943-954. 査読有
- ③ Ikeda Y, Murata T, Tabata T, Ueda Y, Ono F, Suzuki T, Ageyama N, Terao K, Hasegawa M, Sueishi K, Ishibashi T. Stable Retinal Gene Expression in Nonhuman Primates via Subretinal Injection of SIVagm-based Lentiviral Vectors. Hum Gene Ther. 2009 Jun;20(6):573-579 査読有
- ④ Ichikawa-Shindo Y, Murata T, Kangawa K, Nagai R, Shindo T GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity. J Clin Invest. 2008 Jan;118(1):29-39. 査読有
- ⑤ Mera K, Murata T, Maruyama T, Baynes JW, Otagiri M, Nagai R. Glutaraldehyde is an effective cross-linker for production of antibodies against advanced glycation end-products. J Immunol Methods. 2008 May 20;334(1-2):82-90 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① Murata T: Histopathological aspects of vitrectomy for diabetic retinopathy Sept 18, 2010 The 25th APAO congress A joint meeting of APAO/AAO Beijing China
- ② Murata T: Converting to a 20G-vitrectomy from a small-incision vitrectomy for intractable cases. The third joint meeting of China Korea Japan Ophthalmologists Sep 14-15 2010. Beijing China
- ③ Murata T: The incidence of choroidal nevi in Japan Pathology Symposium World ophthalmology congress 2008 July 2 Hong Kong
- ④ Murata T: Resolution of retinoschisis after vitrectomy in X-linked

retinoschisis The third Congress of the Asian Pacific VitreoRetinal Society (APVRS2008) 6th December 2008 Busan Korea

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 敏規 (MURATA TOSHINORI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号: 50253406

(2) 研究分担者

新藤 隆行 (SHINDO TAKAYUKI)
信州大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 90345215

石橋 達朗 (ISHIBASHI TATSURO)
九州大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 30150482