

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21日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791722

研究課題名（和文） 糖尿病網膜症における網膜無血管領域の血管網再構築

研究課題名（英文） Vascular Reconstruction in Avascular Area of Diabetic Retinopathy

研究代表者

松岡 雅人 (MATSUOKA MASATO)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：20509575

研究成果の概要（和文）：

高酸素虚血網膜症モデル(OIR)マウスにおける網膜において、fibronectin は網膜血管と局在が同一であった。網膜無還流領域では、fibronectin は網膜血管と同様に検出されなかった。OIR マウスの網膜では astrocyte は検出困難であった。

研究成果の概要（英文）：

Fibronectin was detected at the same local existence as retinal vasculature in the retina of oxygen-induced retinopathy model (OIR) mouse. Whereas fibronectin was not detected at the retinal avascular area of OIR mouse. Retinal astrocyte of OIR mouse could not be detected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：眼細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は本邦の成人における中途失明の原因の第2位を占める重要な疾患である。病態の本態は網膜微小血管の閉塞、網膜無血管領域の形成による網膜虚血、それに続く眼内新生血管の発生である。治療は網膜無血管領域に網膜光凝固や網膜冷凍凝固を行い、網膜外層を破壊することで網膜虚血部における酸素需要量を減少させ、新生血管促進因子

の産生を抑えて網膜新生血管の発生を予防する。しかし組織学的には網膜の破壊であり、光感度の低下や視野障害などの副作用があるため、より効果的で低侵襲な治療法が熟望されている。

糖尿病網膜症で生じる網膜新生血管は本来必要とされる網膜無血管領域ではなく、硝子体腔へ異所性に伸長することが問題である。そこで新生血管を網膜無血管領域、すなわち

虚血に陥った網膜内へと誘導できれば、組織破壊を伴うことなく網膜虚血が改善できる可能性がある。

正常眼での網膜血管の発生過程では血管伸長に先立ち astrocyte が Vascular endothelial growth factor (VEGF) を発現しながら視神経乳頭から網膜周辺へ伸長して網目状のネットワークを構築し、続いて網膜血管が VEGF に誘導され、神経乳頭から astrocyte のネットワークに沿って伸長して血管網が構築される。また以前より血管網構築前の網膜には spindle-shaped cell が存在していることが知られており、この細胞は血管芽細胞と考えられていた。しかし近年、この spindle-shaped cell は未熟な astrocyte であることが証明された。またこの未熟 astrocyte は VEGF だけでなく、細胞外マトリックスである fibronectin を発現しており、これが血管内皮細胞の増殖する足場となり、さらに血管伸長のガイド役として重要であることが報告されている。

Astrocyte はグリア細胞の一種であり、その保護因子として、Platelet-derived growth factor-A (PDGF-A) や Pigment epithelium-derived factor (PEDF) が知られている。

2. 研究の目的

網膜無血管領域発生モデルマウスを作製する。その網膜に存在する astrocyte を網膜虚血から保護し、さらに遺伝子導入で fibronectin による足場を再構築することにより、網膜無血管領域に網膜血管網の再構築を試みる。

3. 研究の方法

網膜無血管領域発生モデルの作製
網膜無血管領域の作製のため、高酸素負荷虚血網膜症(OIR)モデルを使用する。

Smithらの報告をもとに OIR モデルを作製する。実験マウスを生後7日目から75%酸素下で飼育する。生後12日に眼球を摘出する。

網膜無血管領域における astrocyte や fibronectin の局在の確認

OIRモデルを作製し、麻酔下に眼球を摘出。4%パラホルムアルデヒドにて1時間固定し網膜を単離後、さらにメタノールで再固定し、whole mount 免疫組織染色を行う。

Griffonia simplicifolia lectin(GS lectin)にて網膜血管を蛍光標識し、網膜無血管領域を同定する。同時に astrocyte のマーカー

(PDGF receptor- α , glial fibrillary-acid protein(GFAP), S-100) 抗体や抗 fibronectin 抗体を用いて免疫組織多重染色を行う。

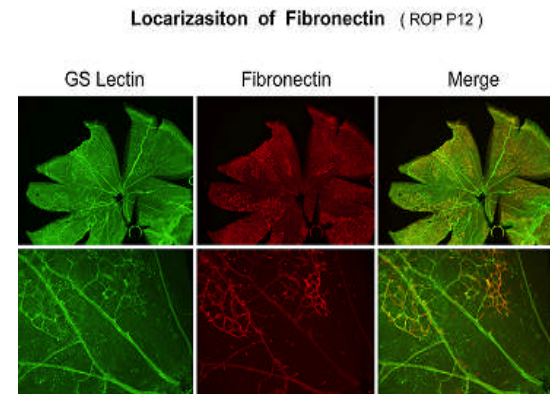
LSM510 共焦点レーザー顕微鏡を用いて、網膜無血管領域における astrocyte や fibronectin の局在を観察する。

4. 研究成果

OIRモデルマウスの網膜血管をGS lectinで標識し、網膜無還流領域を検出した。Fibronectinは網膜血管と同一の場所に検出されたが、網膜無血管領域内には検出されなかった。(図1)

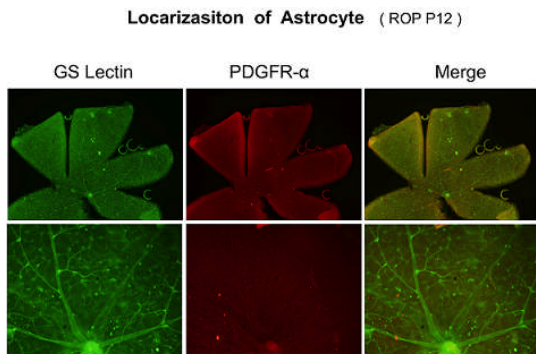
ヒト糖尿病網膜症の病理組織から、閉塞した網膜血管は内腔にミュラー細胞などのグリア細胞が侵入し、血管壁の構造は保たれていることがある。そのため血管壁の構成成分である fibronectin は網膜無血管領域にも残存すると予想していたが、今回の結果からそのことは否定された。

(図1)



一方、astrocyte はそのマーカーである PDGFR- α で標識し、検出を試みたが、検出不可能であった。(図2)そこで非特異的なグリア細胞のマーカーである GFAP や S-100, Connexin26 などで多重染色し、astrocyte の検出を試みたが、網膜の astrocyte の同定は困難であった。astrocyte も分化し、発現蛋白が変化することが近年報告されているが、このことが同定困難な理由と考えられる。本研究では OIR モデルを使用するが、生後12日のマウスを使用する。Tailoiら(2009)の論文より Immature retina における astrocyte の発現マーカー (Pax2+, Vimentin, GFAP, S100, Ran2) で多重染色し、検出を試みたが、検出困難であった。

(図2)



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 10 件)

① Matsuoka, M., Ando, A., Minamino, K., Matsuyama, K., Shima, C., Matsumura, M., et al. (in press)

Dampening of Diurnal Intraocular Pressure Fluctuation by Combined Trabeculotomy and Sinusotomy in Eyes With Open-angle

Glaucoma. *J Glaucoma*.

DOI:10.1097/IJG.0b013e31824479e6

② 南野桂三, 安藤彰, 松岡雅人, 松山加耶子, 畔満喜, 武田信彦, 高木智恵子, 桑原敦子, 西村哲哉 (2012)

ラタノプロストからトラボプロストへの切り替えによる眼圧下降効果

あたらしい眼科 29 巻 3 号 415-418

③ Matsuyama, K., Ogata, N., Matsuoka, M., Wada, M., Nishimura, T., & Takahashi, K. (2011)

Effects of intravitreally injected bevacizumab on vascular endothelial growth factor in fellow eyes.

J Ocul Pharmacol Ther, 27(4), 379-383.

④ Fujita, N., Fujita, S., Ogata, N., Matsuoka, M., Okada, Y., Kon, S., et al. (2011)

Endogenous osteopontin involvement in laser-induced choroidal neovascularization in mice.

Invest Ophthalmol Vis Sci, 52(13), 9310-9315.

⑤ 松山加耶子, 松岡雅人, 久保木香織, 畔満

喜, 西村哲哉, 高橋寛二, 松村美代, 内藤毅, 飽浦淳介, アジア眼科医療協力会 (2011)
ネパールアイキャンプでの超音波乳化吸引術と水晶体嚢外摘出術の合併症の比較
臨床眼科 65 巻 6 号 833-837

⑥ 松山加耶子, 南野桂三, 安藤彰, 竹内正光, 和田光正, 嶋千絵子, 松岡雅人, 福井智恵子, 桑原敦子, 松山英子, 西村哲哉 (2010)

Soemmering 輪による続発閉塞隅角緑内障の 1 例

あたらしい眼科 27 巻 11 号 1603-1606

⑦ Matsuyama, K., Ogata, N., Matsuoka, M., Wada, M., Takahashi, K., & Nishimura, T. (2010)

Plasma levels of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor before and after intravitreal injection of bevacizumab.

Br J Ophthalmol, 94(9), 1215-1218.

⑧ 南野桂三, 松岡雅人, 安藤彰, 松山加耶子, 嶋千絵子, 福井智恵子, 桑原敦子, 尾辻剛, 緒方奈保子, 西村哲哉 (2009)

選択的レーザー線維柱帯形成術の治療成績

あたらしい眼科 26 巻 9 号 1249-1252

⑨ 萩原実早子, 寺内博夫, 星野健, 西川真生, 北川誠彦, 松岡雅人, 樋口暁子, 松村美代 (2009)

関西医科大学における最近の未熟児網膜症管理と治療

眼科臨床紀要 2 巻 5 号 433-437

⑩ Matsuyama, K., Ogata, N., Jo, N., Shima, C., Matsuoka, M., & Matsumura, M. (2009).

Levels of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor in eyes before and after intravitreal injection of bevacizumab. *Jpn J Ophthalmol*, 53(3), 243-248.

[学会発表] (計 8 件)

① 畔満喜 松岡雅人 南野桂三 松山加耶子 武田信彦 桑原敦子 竹内正光 西村哲哉

「前眼部OCTを用いた正常シュレム管断面積の日内変動の検討」

第116回日本眼科学会総会 (2012. 4. 5)

東京国際フォーラム

② 大津弥生 松岡雅人 畔満喜 松山加耶子

吉川匡宣 南野桂三 和田光正 西村哲哉
「血糖コントロール不良の増殖糖尿病網膜症に角膜感染を合併、眼球摘出術を施行した1例」

第17回日本糖尿病眼学会総会(2011.12.2)

東京国際フォーラム

③ 南野桂三 安藤彰 松岡雅人 松山加耶子

畔満喜 桑原敦子 西村哲哉

「マイラゲルを使用した網膜剥離手術後に著明な眼圧の日内変動を認めた1例」

第22回日本緑内障学会 (2011.9.23)

秋田ビューホテル

④ 松岡雅人 南野桂三 和田光正

松山加耶子 緒方奈保子 西村哲哉

「左右差のある糖尿病網膜症の軽症眼に眼虚血症候群を合併した一例」

第16回日本糖尿病眼学会総会(2010.11.26)

大阪国際会議場

⑤ 松岡雅人 緒方奈保子 高橋寛二

足立 靖 木下勇一 西村哲哉

「硝子体細胞診で腺癌細胞を検出した仮面症候群の一例」

第64回日本臨床眼科学会 (2010.11.11)

神戸国際会議場

⑥ 松岡雅人 安藤彰 南野桂三 松山加耶子

嶋千絵子 桑原敦子 松村美代 西村哲哉

「開放隅角緑内障の眼圧日内変動に対するサイヌソトミー併用線維柱帯切開術の効果」第21回日本緑内障学会 (2010.9.24)
アクロス福岡

⑦ 松岡雅人 緒方奈保子 松山加耶子 和田光正 西村哲哉

「糖尿病と眼圧」

第15回日本糖尿病眼学会総会(2009.12.4)

名古屋国際会議場

⑧ 松岡雅人 緒方奈保子 高橋寛二 足立靖杉本博是 西村哲哉

「硝子体細胞診が診断に有用であったサルコイドーシスの2例」

第63回日本臨床眼科学会 (2009.10.12)

福岡国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 雅人 (MATSUOKA MASATO)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：20509575

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：