

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06604

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症治療薬開発の効率化を指向した新規網膜血管ペリサイト脱落モデルの確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel experimental model of retinal pericyte deletion for accelerating the development of therapeutic agents for diabetic retinopathy

研究代表者

中原 努 (Nakahara, Tsutomu)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：10296519

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)：慢性骨髄性白血病治療薬であるimatinibはPDGFR 阻害作用を有する。本研究は、新生仔ラットにimatinibを投与すると網膜の毛細血管においてペリサイトが速やかに脱落し、1週間以内にその部位より瘤状の異常血管が生じることを示した。VEGF受容体2は血管瘤とその周囲の新生血管ならびに神経細胞に、VEGFは神経節細胞に発現しており、VEGF受容体阻害薬処置は血管瘤を縮小させた。Imatinibによって網膜血管ペリサイトを脱落させた後に生じる血管新生および血管瘤形成にはVEGF経路が重要な役割を担っていることが明らかになり、ヒトの糖尿病網膜症で生じる血管異常との類似性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病網膜症は失明の危険性が極めて高く、Quality of lifeを著しく低下させる疾患として、その病態の解明と予防法・治療法の確立が待ち望まれている。一方で基礎研究に汎用されるマウス・ラットでは、糖尿病を発症させて長期間飼育しても、網膜において血管内皮細胞及びペリサイトの脱落などのヒトの糖尿病網膜症と類似した網膜血管病変が生じにくいという問題点がある。薬物を使用する簡便な方法によりヒトの糖尿病時に生じる網膜血管病変を再現することができれば糖尿病網膜症の病態解明とそれに対する予防/治療薬スクリーニングの飛躍的な効率化に繋がり得る。

研究成果の概要(英文)：Imatinib, a drug for the treatment of chronic myelogenous leukemia, has inhibitory activity on PDGF receptor . The present study showed that in neonatal rats treated with imatinib, degeneration of retinal capillary pericytes occurred rapidly, and neovascular tufts formed at the site within a week. VEGF receptor 2 was expressed in neovascular tufts and surrounding neovascular vessels and neurons, and VEGF was expressed in retinal ganglion cells. Inhibition of VEGF receptors regressed the neovascular tufts. Thus, VEGF signaling pathway plays an important role in the formation of neovascular tufts following imatinib-induced deletion of retinal capillary pericytes, showing similarities with the vascular abnormalities that occur in human diabetic retinopathy.

研究分野：薬理学

キーワード：網膜血管 網膜症 内皮細胞 ペリサイト

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の患者数は、高齢者人口の増加と社会のグルメ化とも相まって、今後益々増加していくことが予想されている。糖尿病は様々な合併症を伴うが、中でも網膜症は失明の危険性が極めて高く、Quality of life (QOL) を著しく低下させる疾患として、その病態の解明と予防法・治療法の確立が待ち望まれている。

これまでの研究により、糖尿病網膜症の発症には 5~10 年の糖尿病期間を経て形成される網膜血管病変に起因する網膜循環障害が大きく関与していること、そして二次的に生じる網膜の虚血並びに低酸素状態が透過性の高い脆弱な血管を新生させ、それが破綻することにより著しく視覚が障害されることが示されている。従って、糖尿病網膜症の発症と進行抑制のためには、網膜循環の正常化こそが最優先されるべき治療法と言っても過言ではないが、現在のところ、網膜循環を改善する有効な手段は存在しない。その原因として、基礎研究に汎用されるマウス・ラットでは、糖尿病を発症させて長期間飼育しても、網膜において血管内皮細胞及び周皮細胞（ペリサイト）の脱落などのヒトの糖尿病網膜症と類似した網膜血管病変が生じにくく、虚血並びに低酸素による血管新生が誘導されない点を挙げることができる。このことは糖尿病網膜症における網膜血管障害の全貌解明並びに予防/治療薬の開発にとって大きな障壁となっている。

ペリサイトは毛細血管の内皮細胞周囲を取り巻く細胞であり、platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) β を発現しており、内皮細胞が産生する PDGF-B によりその機能（血液網膜柵の形成及び血流量の調節）が維持されている。また増殖因子の産生を介して内皮細胞の機能と維持に重要な役割を演じている。マウスにおいて PDGF-B - PDGFR β シグナル経路を抗体投与又は遺伝子改変により抑制するとペリサイトが脱落して、その後網膜血管異常が生じることが報告されているが、より簡便な方法によりヒトの糖尿病時に生じる網膜血管病変を再現することは糖尿病網膜症治療薬の開発を行う上で必要不可欠である。

研究代表者らは慢性骨髄性白血病の治療薬である imatinib が PDGFR β 阻害作用を有する点に着目し、新生仔ラットに imatinib を投与すると網膜血管においてペリサイトが速やかに脱落し、1 週間以内にその部位より瘤状の異常血管が生じることを見出した。Imatinib を投与して網膜血管ペリサイトを著しく脱落させたラット（網膜血管ペリサイト脱落モデルラット）の網膜血管病変進行過程の詳細とその分子基盤、ヒトの糖尿病網膜症との類似点・相違点を明確にすることにより新たな薬効評価系を確立できれば、糖尿病網膜症の病態解明とそれに対する予防/治療薬スクリーニングの飛躍的な効率化が期待できると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の究極の目的は、ヒトの糖尿病網膜症と類似した網膜血管障害を短期間で発症する実験モデルを確立し、糖尿病網膜症の病態解明及び創薬研究を飛躍的に効率化することである。その実現のために、研究期間内には、慢性骨髄性白血病の治療薬である imatinib によってラットの網膜血管ペリサイトを脱落させた後に生じる網膜血管の構造及び機能異常の詳細とその異常の分子基盤を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Imatinib の標的分子である PDGFR α 及び β の網膜内発現分布と発達に伴う変化

各日齢 (4, 7, 10, 13, 21, 28 及び 56 日齢) のラットから網膜の whole-mount 標本作製し、抗 PDGFR α 抗体及び PDGFR β 抗体を用いて蛍光免疫染色を行なった。

(2) 網膜血管ペリサイト脱落条件の検討

4 日齢のラットの背部皮下に imatinib (50 及び 100 mg/kg) を投与し網膜血管ペリサイトの脱落の程度を比較した。次に、各日齢 (4, 7, 10, 13 及び 21 日齢) のラットの背部皮下に imatinib (100 及び 300 mg/kg) を投与し、網膜血管ペリサイトの脱落の程度に及ぼす個体成熟の影響について検討した。さらに、imatinib (100 mg/kg) の投与日数を 2 日間 (4 及び 5 日齢時) と 4 日間 (4, 5, 6 及び 7 日齢時) へ延長した場合についても検討を行なった。

(3) 網膜血管ペリサイト脱落モデルラットにおいて形成される網膜血管異常

各条件の imatinib を投与したラットの眼球を摘出して網膜 whole-mount 標本作製し、血管内皮細胞とペリサイトの特異的マーカーを用いた蛍光免疫染色を行い、血管ネットワーク全体の構造と血管内皮細胞及びペリサイトの分布と形態を評価した。

(4) 網膜血管ペリサイト脱落モデルラットにおいて形成される網膜血管異常の分子基盤

網膜血管異常形成に血管内皮細胞の増殖が関与しているか否かについて、増殖細胞マーカーを用いて検討した。また VEGF 受容体経路の役割を明らかにするために、VEGF 及び VEGF 受容体の発現分布、VEGF 受容体阻害薬の効果について検討した。

網膜血管周囲に存在する神経細胞やグリア細胞 (アストロサイト) の役割を明らかにするた

め、これらの細胞の分布と形態変化について検討した。

4. 研究成果

(1) Imatinib の標的分子である PDGFR α 及び β の網膜内発現分布と発達に伴う変化

PDGFR α はアストロサイト、PDGFR β はペリサイトにそれぞれ発現していた。アストロサイトにおける PDGFR α の発現は 4 日齢から 13 日齢にかけて低下し、21 日齢以降、ほとんど認められなくなった。一方、ペリサイトにおける PDGFR β の発現は 56 日齢まで大きく変化しなかった。

(2) 網膜血管ペリサイト脱落条件の検討

Imatinib (50 及び 100 mg/kg) を 4 日齢のラットの背部皮下に投与すると翌日にはそれぞれ 60% 及び 90% の毛細血管のペリサイトが脱落した。ペリサイトの被覆率は imatinib の用量が 50 mg/kg の場合は投与 4 日後には投与前のレベルまでに回復した。100 mg/kg の場合は投与 4 日後では依然として 70% のペリサイトが脱落した状態であったが、7 日後には投与前のレベルにまで回復した。

4 日齢から 13 日齢までのラットに imatinib (100 及び 300 mg/kg) を投与するとその翌日には imatinib の用量に依存したペリサイトの脱落が認められたが、その程度は日齢に依存して減少し、21 日齢のラットでは、imatinib の網膜血管ペリサイト脱落効果はほとんど観察されなくなった。

Imatinib (100 mg/kg) の投与日数を 2 日間 (4 及び 5 日齢時) と 4 日間 (4, 5, 6 及び 7 日齢時) と延長した場合、4 日齢時の単回投与の場合と比べて、投与翌日に観察されるペリサイトの脱落の程度には大きな差は認められなかったが、脱落期間は投与回数に依存して延長した。

(3) 網膜血管ペリサイト脱落モデルラットにおいて形成される網膜血管異常

4 日齢のラットに imatinib (100 mg/kg) を単回投与すると毛細血管ペリサイトは投与 1 日後に 90% 程度脱落するが、それに先行して投与 6 時間後には、ペリサイトにアポトーシスが誘導され始めることが示された。投与 1 日後の時点で、伸長しつつある血管の盲端部が膨大し血管瘤の形成が観察されたが、血管内皮細胞はほとんど脱落していなかった。血管瘤の数は、投与 7 日後まで時間依存的に増加した。毛細血管内皮細胞は、投与 4 日後には、有意に脱落し血管網全体が疎になったが、7 日後には、再形成されており対照とほぼ同様であった。再形成された血管はペリサイトに被覆されていた。以上の結果より、imatinib は、まず網膜ペリサイトにアポトーシスを誘導し、細胞死を引き起こすこと、その結果、ペリサイトが脱落した、血管網の先端では血管瘤が生じ、毛細血管では内皮細胞死が生じる可能性が示唆された。

Imatinib (100 mg/kg) の 4 日齢時の単回投与の場合と 4 日齢時と 5 日齢時の 2 日間投与した場合のほうが、血管瘤形成が顕著であった。

(4) 網膜血管ペリサイト脱落モデルラットにおいて形成される網膜血管異常の分子基盤

血管瘤には血管内皮細胞が密に存在しており、それらの多くは Ki67 陽性であることが示された。従って、血管瘤は血管内皮細胞の肥大ではなく数の増加により形成されるものと考えられた。そこで血管内皮細胞の生存と増殖に重要な役割を演じている VEGF の血管瘤形成における役割について検討を行なった。その結果、投与 4 日後の時点で、VEGF 受容体 2 は血管瘤とその周囲の新生血管管ならびに神経細胞に発現していること、VEGF は神経節細胞に発現していることが示された。その時点から VEGF 受容体阻害薬を処置すると血管瘤における Ki67 陽性細胞数の減少と血管瘤の縮小が生じた。以上の結果より、imatinib によって網膜血管ペリサイトを脱落させた後に生じる血管新生および血管瘤形成には VEGF-VEGF 受容体経路が重要な役割を担っていることが明らかになり、ヒトの糖尿病網膜症で生じる血管異常との類似性が示された。

血管周囲に存在する神経細胞とアストロサイトに対する imatinib の効果について検討したところ、imatinib によって神経細胞の数には有意な変化が生じないこと、一方、アストロサイトについては、数は有意に変化しないものの、増殖マーカー陽性のアストロサイト数の減少や突起の退縮等の変化が生じることが明らかになった。今後はアストロサイトの変化と血管瘤形成の関連について明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Erika Kamiya, Akane Morita, Asami Mori, Kenji Sakamoto, Tsutomu Nakahara	4. 巻 146
2. 論文標題 The process of methylglyoxal-induced retinal capillary endothelial cell degeneration in rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microvascular Research	6. 最初と最後の頁 104455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mvr.2022.104455	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中原 努
2. 発表標題 薬物を用いた網膜血管異常モデルの作製と応用
3. 学会等名 第41回日本眼薬理学会
4. 発表年 2021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
研究分担者	森田 茜 (Morita Akane) (00828072)	北里大学・薬学部・助教 (32607)	

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