

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09698

研究課題名(和文) 糖尿病網膜神経変性におけるアクアポリン9の役割の解明

研究課題名(英文) Roles of aquaporin9 in diabetic retinal neurodegeneration

研究代表者

楠原 仙太郎 (Kusuhara, Sentaro)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：40437463

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)：Cx3cr1-GFPマウスおよびアデノ随伴ウイルスによる標識を適宜利用し、糖尿病マウス網膜についての免疫染色および2光子顕微鏡による生体イメージングを行った。糖尿病マウス網膜では網膜中間層におけるミクログリアの密度が増加している傾向にあった。2光子顕微鏡を用いたミクログリアの動的評価では、ミクログリアの細胞体面積と突起面積の変化は2群間で有意な差を示さなかったが、突起長の変化は糖尿病マウスで有意に大きい結果であった($P < 0.01$)。糖尿病Aqp9ノックアウトマウスについて同様の解析を行ったところ、Aqp9ノックアウトマウス網膜においてミクログリア数の増加および活発な突起変化が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において慢性炎症の際に早期から異常が認められるミクログリアの変化が2光子顕微鏡による生体イメージングで解析され糖尿病Aqp9ノックアウトマウスでその動きに変化が認められたことから、多面的な神経保護作用を有する乳酸のトランスポーターであるAQP9が糖尿病早期における糖尿病網膜神経変性に関与している可能性が高いと思われる。このことAQP9の基質である乳酸をターゲットにした糖尿病網膜症への早期介入への道筋を示唆しており、将来の失明予防に大いに貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：We conducted immunostaining and in vivo imaging of diabetic mouse retinas using appropriate labeling with Cx3cr1-GFP mice and adeno-associated virus. In diabetic mouse retinas, there was a tendency for an increased density of microglia in the inner retinal layer. Dynamic evaluation of microglia using two-photon microscopy showed no significant difference in cell body area and process area between the two groups, but there was a significantly greater change in process length in diabetic mice ($P < 0.01$). Similarly, analysis of diabetic Aqp9 knockout mouse retinas revealed increased microglial numbers and active process alterations in Aqp9 knockout mouse retinas.

研究分野：眼科学

キーワード：糖尿病網膜症 アクアポリン9 マウス in vivoイメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会において糖尿病患者の視機能を長期に維持するためには、視機能に影響を及ぼす網膜血管イベントを短期的に治療することに加えて潜在的に進行する不可逆的な糖尿病網膜神経変性に対する長期的な介入が重要であると考えられる。乳酸を輸送するトランスポーターであるアクアポリン9 (AQP9) は網膜では主に神経節細胞とアストロサイトに発現しており、ストレス下で神経保護的に作用すること、AQP9 遺伝子のプロモーター領域にインスリンによって制御される領域が存在することがそれぞれ報告されている。我々は、糖尿病の発症早期から糖尿病網膜神経変性に対する治療介入を行うことによって糖尿病網膜症で生じる血液網膜柵の破綻を抑制するというシナリオを描いており、治療のターゲットとして中枢神経で神経保護的に働く AQP9 に注目した。

2. 研究の目的

本研究では、網膜においてアストロサイトと網膜神経節細胞に発現する膜型トランスポーターである AQP9 の糖尿病網膜神経変性への関与を機能的に解析することを目的とする。

3. 研究の方法

遺伝子改変マウス *Cx3cr1-GFP* マウス (ミクログリア標識) およびアデノ随伴ウイルス (アストロサイト、網膜神経節細胞) による標識を適宜利用し、*Aqp9* ノックアウトマウスにおける高血糖の影響を H-E 染色、免疫染色および 2 光子顕微鏡による生体イメージングで評価した。高血糖 (糖尿病) マウスは 6 週齢の雄マウスにストレプトゾトシン (150mg/kg) の腹腔内注射することで作成した (コントロールではクエン酸ナトリウム緩衝液を腹腔内注射した)。

4. 研究成果

- (1) H-E 染色による網膜切片の観察では、網膜の層構造に明らかな異常は認められなかった。一方、*Cx3cr1-GFP; Aqp9*^{-/-} マウスにおいて CD31 抗体で血管内皮細胞を免疫染色したところ、糖尿病マウス網膜においてコントロールマウス網膜との比較で網膜中間層におけるミクログリアの密度が増加している傾向にあった (図 1)。

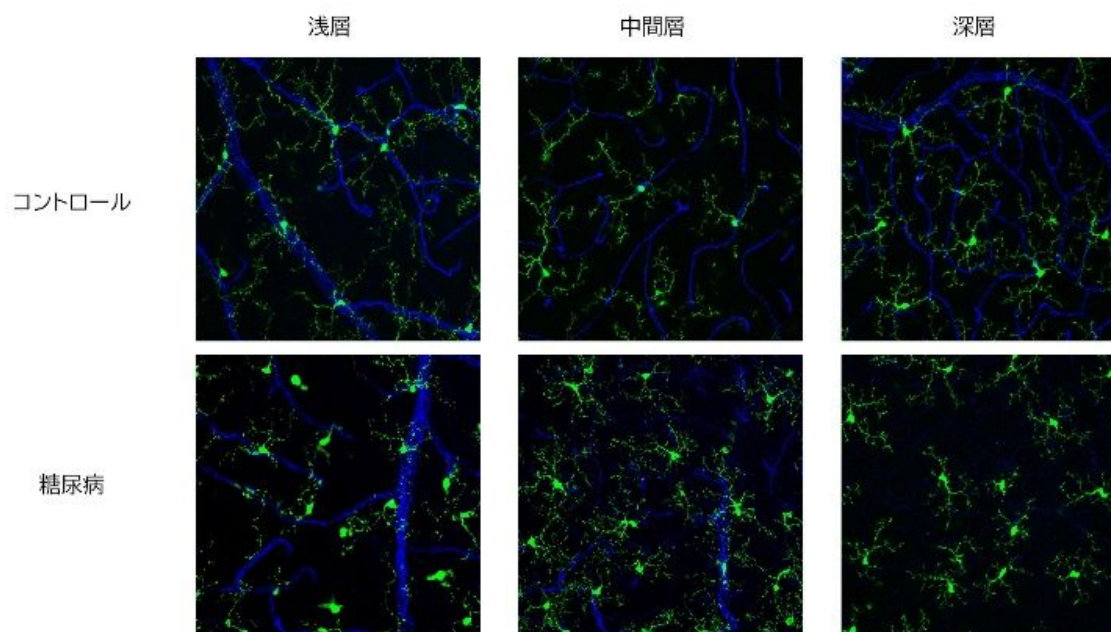


図 1 糖尿病マウス網膜におけるミクログリアの変化。

13 週齢 (糖尿病発症 7 週間後) において、糖尿病マウスではコントロールマウスと比較して網膜中間層におけるミクログリアの密度が増加している傾向にあった。青 = 網膜血管、緑 = ミクログリア。

- (2) 2 光子顕微鏡による生体イメージングにおいて、ミクログリアの動きおよび形態変化を定量化する方法につき複数のアルゴリズムをトライした。その結果、細胞体面積、突起面積、突起長の 10 分間での変化量を糖尿病マウスとコントロールマウスで比較したところ (それぞれ $n=5$)、細胞体面積と突起面積の変化は 2 群間で有意な差を示さなかったが、突起長の変化

は糖尿病マウスで有意に大きい結果であった ($P=0.005$) (図2)。

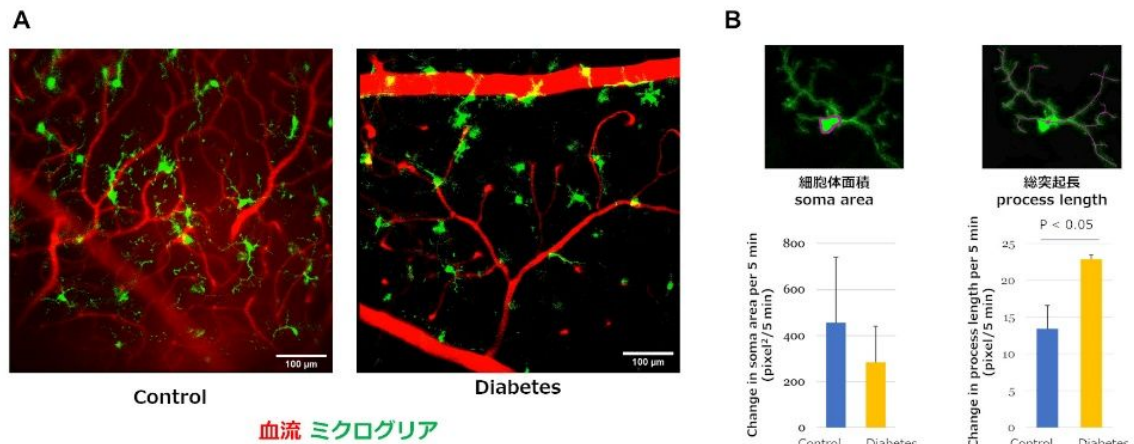


図2 糖尿病早期のマウス網膜におけるミクログリアの形態変化

糖尿病発症5週間後(11週齢)における2光子顕微鏡によるマウス網膜のin vivo imaging.(A) *Cx3cr1-GFP*マウスにEvans blueの腹腔内注射を行うことにより血流とミクログリアの両方が描出されている.(B)ミクログリアの細胞体面積および総突起長を測定し5分間における変化によってミクログリアの動的な変化を評価した.糖尿病マウスでは総突起長の変化がコントロールマウスに比べて有意に大きかった (Mann-Whitney test).

(3) 糖尿病 *Aqp9* ノックアウトマウスについて同様の解析を行ったところ、*Aqp9* ノックアウトマウス網膜においてミクログリア数の増加および活発な突起変化が確認できた(図3)。

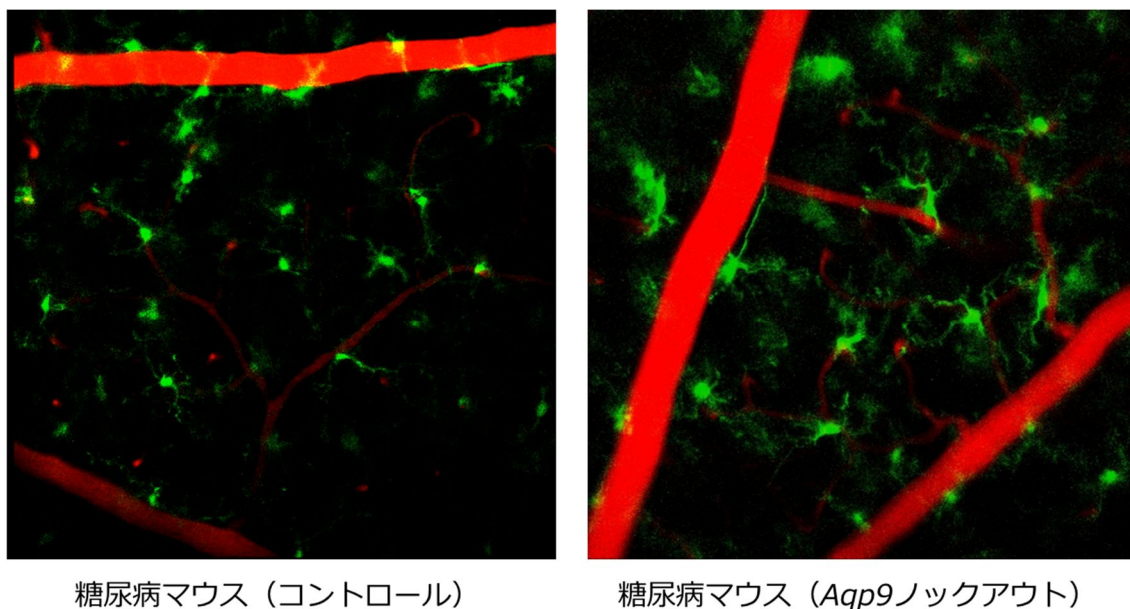


図3 *Cx3cr1-GFP*糖尿病マウスにおける2光子顕微鏡像

Aqp9 ノックアウトマウスではコントロールマウスに比べてミクログリア数の増加および活発な突起変化が生じていることが確認できる。赤 = 網膜血管、緑 = ミクログリア。

多面的な神経保護作用を有する乳酸のトランスポーターであるAQP9は糖尿病早期における糖尿病網膜神経変性に関与している可能性が高い。慢性炎症の際に早期から異常が認められるミクログリアの変化が2光子顕微鏡による生体イメージングで解析できており糖尿病網膜でその動きに変化が認められたことから、糖尿病網膜におけるAQP9の関与が明らかになった。

本研究を手掛かりに糖尿病早期におけるAQP9の役割がより詳細に明らかになれば、乳酸をターゲットにした糖尿病網膜症への早期介入への道筋が示されることになり将来の失明予防に大いに貢献できると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 楠原 仙太郎
2. 発表標題 眼炎症を克服するための精密医療の実現に向けて
3. 学会等名 第127回日本眼科学会総会
4. 発表年 2023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	浅原 俊一郎 (Asahara Shun-ichiro) (00570342)	神戸大学・医学部附属病院・助教 (14501)	
研究分担者	橘 吉寿 (Tachibana Yoshihisa) (50373197)	神戸大学・医学研究科・准教授 (14501)	

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