

令和 6 年 4 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16962

研究課題名（和文）慢性眼血流障害による新規緑内障モデル動物の作製

研究課題名（英文）Novel animal model of glaucoma caused by chronic ocular blood flow disorders

研究代表者

矢花 武史（Yabana, Takeshi）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30725213

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：血流を低下させるマウス個体の作製をおこなった。AAV2によりヒトエンドセリン1を発現させるウイルスベクターを作製後、マウスの硝子体内に投与し眼局所の血流低下を誘導した。4週間後、LSFGにより網膜血流を測定したところコントロール群と比較してヒトエンドセリン1過剰発現群において眼血流の低下が認められた。その後、網膜を摘出し抗RBPMs抗体により網膜神経節細胞を染色したところ、視神経乳頭周囲ならびに網膜周辺部については網膜神経節細胞数の減少を認めなかったが、網膜中心部においては減少を認めた。本結果は、血流障害に脆弱な部位ならびに網膜神経節細胞のサブタイプが存在する可能性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障患者の多くは眼圧が正常範囲内であり、眼圧下降治療が十分に行われているにもかかわらず視野障害の進行をきたす症例が数多く存在する。そのため緑内障はその発症や進行に近視、遺伝的素因、眼血流循環、酸化ストレス、軸索障害などが関与する多因子疾患であると多く報告されている。しかし、その詳細は未だ不明な点が多い。血流低下は、歴史的に緑内障との関連が指摘されており、エンドセリンが関与する末梢血管の攣縮を背景とした慢性的で緩徐な血流障害の存在が示唆されている。そこで、本研究では、アデノウイルスをベクターにして、エンドセリンによる血流障害を誘導したマウスを作製し、網膜神経節細胞への影響を評価する。

研究成果の概要（英文）：Mice with reduced ocular blood flow were developed by injecting a viral vector expressing human endothelin 1 by AAV2 into the vitreous to induce a reduction in ocular blood flow. 4 weeks later, retinal blood flow was measured by LSFG, ocular blood flow was decreased in the human endothelin 1 overexpression group compared to the control group. Retinal ganglion cells were stained with anti-RBPMs antibody. The number of retinal ganglion cells was not decreased in the peripapillary and peripheral areas but was decreased in the central retina. These results suggest that there may be subtypes of retinal ganglion cells or areas vulnerable to blood flow disorders.

研究分野：緑内障

キーワード：緑内障 眼血流障害 網膜神経節細胞 エンドセリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

研究成果の概要

血流を低下させるマウス個体の作製をおこなった。AAV2 によりヒトエンドセリン 1 を発現させるウイルスベクターを作製後、マウスの硝子体内に投与し眼局所の血流低下を誘導した。4 週間後、LSFG により網膜血流を測定したところコントロール群と比較してヒトエンドセリン 1 過剰発現群において眼血流の低下が認められた。その後、網膜を摘出し抗 RBPMS 抗体により網膜神経節細胞を染色したところ、視神経乳頭周囲ならびに網膜周辺部については網膜神経節細胞数の減少を認めなかったが、網膜中心部においては減少を認めた。本結果は、血流障害に脆弱な部位ならびに網膜神経節細胞のサブタイプが存在する可能性を示唆するものである。

研究成果の概要 (英文): Mice with reduced ocular blood flow were developed by injecting a viral vector expressing human endothelin 1 by AAV2 into the vitreous to induce a reduction in ocular blood flow. 4 weeks later, retinal blood flow was measured by LSFG, ocular blood flow was decreased in the human endothelin 1 overexpression group compared to the control group. Retinal ganglion cells were stained with anti-RBPMS antibody. The number of retinal ganglion cells was not decreased in the peripapillary and peripheral areas but was decreased in the central retina. These results suggest that there may be subtypes of retinal ganglion cells or areas vulnerable to blood flow disorders.

研究分野： 緑内障

キーワード： 緑内障 眼血流障害 網膜神経節細胞 エンドセリン 1

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障患者の多くは眼圧が正常範囲内であり、眼圧下降治療が十分に行われているにもかかわらず視野障害の進行をきたす症例が数多く存在する。そのため緑内障はその発症や進行に近視、遺伝的素因、眼血流循環、酸化ストレス、軸索障害などが関与する多因子疾患であると多く報告されている。しかし、その詳細は未だ不明な点が多い。血流低下は、歴史的に緑内障との関連が指摘されており、エンドセリンが関与する末梢血管の攣縮を背景とした慢性的で緩徐な血流障害の存在が示唆されている。そこで、本研究では、アデノウイルスをベクターにして、エンドセリンによる血流障害を誘導したマウスを作製し、網膜神経節細胞への影響を評価する。

<研究成果報告内容ファイル>

1. 研究開始当初の背景

緑内障は網膜神経節細胞 (RGC) 障害とそれに伴う視野障害を呈する慢性進行性の眼科疾患である。主要なリスクファクターは眼圧であり、唯一エビデンスのある治療法は眼圧下降治療である。しかし、本邦において緑内障患者の多くは眼圧が正常範囲内であり、眼圧下降治療が十分に行われているにもかかわらず視野障害の進行をきたす症例が数多く存在する。

そのため緑内障はその発症や進行に近視、遺伝的素因、眼血流循環、酸化ストレス、軸索障害などが関与する多因子疾患であると多く報告されている。しかし、その詳細は未だ不明な点が多く、眼圧下降以外の有効な治療方法が未だに確立されていないのが現状である。中でも血流低下は、歴史的に緑内障との関連が指摘されており、特にエンドセリンが関与する末梢血管の攣縮を背景とした慢性的で比較的緩徐な血流障害の存在が示唆されている。しかしながら、実臨床に即した眼血流障害モデル動物は存在しない。そこで、本研究では、アデノウイルスをベクターにして、全身あるいは眼局所のエンドセリン濃度を上昇させたマウスを作製し、眼血流障害を誘導した動物モデルの作製を目指す。レーザースペckルフローグラフィ(Laser Speckle Flowgraphy; LSFSG)を用いて、非侵襲的に脈絡膜血流を評価し、慢性的な眼血流障害と網膜神経節細胞の障害についての関連を評価する。過去の検討で作成した AAV8-CMV-hEDN1 をマウス(C57BL/6J)の尾静脈や硝子体内へ投与し、エンドセリンを全身のおよび眼局所に長期的に発現させることによって緩徐な眼血流障害モデルの作成を試みた。そのマウスモデルを用いて慢性眼血流障害による網膜神経節細胞死が生じるか検討した。

2 . 研究の目的

ウイルスベクターを用いた遺伝子操作により眼血流の低下を誘導し、緑内障における血流低下による RGC 障害のメカニズムについて検討する。

3 . 研究の方法

AAV8 カプシドを用い、ヒトエンドセリン 1 (hEDN1) の cDNA 全長を導入したウイルスベクター (AAV8-CMV-hEDN1) を本研究ではウイルスベクターとして使用した。エンドセリン過剰発現群として 9 週齢の C57BL/6J マウスに AAV8-CMV-hEDN1 を 5.0×10^{11} gc/mL の濃度で 100 μ L 尾静脈から投与した。コントロールベクターとして、もう一方のマウスへ AAV8-CMV-EGFP を同様の量で投与した。LSFG を用いて、ベースラインとして投与前に 3 回脈絡膜血流 (Mean of All area; MA) を測定した。領域は視神経乳頭を中心に直径 135 μ m の円周内とした。投与後は 1, 3, 8 日後に LSFSG を撮影し、経時的に MA 量が減少することを確認した。エンドセリン過剰発現群は 1 日目、3 日目、8 日目で MA の変化に有意差を認めず、11 ~ 14 日目に全個体が死亡した。一方、コントロール群に関しては 1 日目、3 日目、8 日目で MA の変化に有意差を認めなかった。エンドセリンの過剰発現群は、全身血流の低下が誘導され、死亡したと考えられた。次に、AAV2 によりヒトエンドセリン 1 を発現させるウイルスベクターを作製後、マウスの硝子体内に投与し眼局所の血流低下を誘導し同様に経時的に評価した。4 週間後、LSFG により網膜血流を測定したところコントロール群と比較してヒトエンドセリン 1 過剰発現群において眼血流の低下が認められた。さらに、網膜を摘出し抗 RBPM5 抗体により網膜神経節細胞を染色し細胞死の有無や障害の程度について評価した。

4 . 研究成果

ウイルスベクターを用いてエンドセリンを導入し、血流を低下させるマウス個体の作製をおこなった。尾静脈に注入した個体は全身の血流低下を誘導が強く致命的な影響を及ぼすため、本研究に適さないことが判明した。また AAV2 によりヒトエンドセリン 1 を発現させるウイルスベクターを作製後、マウスの硝子体内に投与し眼局所の血流低下を誘導した。4 週間後、LSFG により網膜血流を測定したところコントロール群と比較してヒトエンドセリ

ン1過剰発現群において眼血流の低下が認められた。その後、網膜を摘出し抗 RBPMS 抗体により網膜神経節細胞を染色したところ、視神経乳頭周囲ならびに網膜周辺部については網膜神経節細胞数の減少を認めなかったが、網膜中心部においては網膜神経節細胞数の減少を認めた。本結果は、血流障害に対して脆弱な部位ならびに網膜神経節細胞のサブタイプが存在する可能性を示唆するものであった。

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