

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861622

研究課題名(和文)近視動物モデルを用いた網膜内グルカゴン含有アマクリン細胞の解析

研究課題名(英文)Analyses of glucagon related peptides in amacrine cells of eyes induced from deprivation myopia

研究代表者

長岡 奈都子(Nagaoka, Natsuko)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30626271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：視覚遮蔽によるラット実験近視モデルを用いて、近視発症において網膜の主にアマクリン細胞でのグルカゴンファミリーの発現変化を検討した。凍結切片を用いた免疫染色では、網膜内アマクリン細胞にて、正常眼と近視誘導眼の両方でGIPとVIPの発現が見られた。網膜組織を用いたRT-PCRによるmRNAの検討と、ウエスタンブロットによるタンパク量の検討では、正常眼と比較して近視誘導眼においてGIP、VIPともにmRNAとタンパク発現量の低下が見られ、近視発現に関与する分子である可能性が示唆された。今後の近視抑制治療に繋がられる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the change of the expression of glucagon family in Amacrine cells of the retina in the progression of myopia using rat experimental myopia model. Immunohistochemical examinations showed GIP and VIP which were members of glucagon family in Amacrine cells in the retina both in the normal control and the myopia induced eyes. We analyzed the expression level of the mRNA of GIP and VIP by RT-PCR, and GIP and VIP protein expression amount by Western blotting, and they showed decreased expression of mRNA of GIP and VIP, GIP and VIP protein in myopia induced eyes compared with the normal control eyes. These substances were suggested to be associated with myopia progression. These results are expected to be useful for developing a therapy to inhibit the progression of myopia.

研究分野：強度近視

キーワード：実験近視 アマクリン細胞 グルカゴン ラット GIP VIP 視覚刺激遮断

## 1. 研究開始当初の背景

ヒヨコ近視モデルにおいて、アマクリン細胞由来の Egr-1 の発現変化が近視発症の重要なシグナルであることが報告された。ヒヨコにおいてはアマクリン細胞内のグルカゴンが正視化に重要な役割を果たしていることが報告されており、哺乳類においてもグルカゴンは近視発症に関与している可能性が示唆されるが、哺乳類の近視モデルにおいては近視発症に関与する分子は未だ特定されていない。

## 2. 研究の目的

哺乳類の小動物を用いて視覚刺激遮断による近視モデルを確立する。次に作成した近視モデルを用いて、網膜内で近視発症に関与すると推察されるグルカゴンファミリーの発現の有無と、近視誘導の有無により発現量に変化が生じるか解明する。さらに、近視予防の新規治療の開発に繋げる。

## 3. 研究の方法

### (1) 哺乳類における近視モデル確立

近視作成を試みる哺乳類動物として、ラットを使用することとした。生後 3 週齢のオス Wistar ラットを用いた。片眼を眼瞼縫合による視覚遮断を行い、もう片眼はコントロールとして用いた。屈折度は検影法で、眼軸長は超音波 A モードで測定した。4 週間の視覚刺激遮断にて、眼軸長の延長を伴う近視誘導が可能かどうかを検討した。また、眼球の超薄切切片を用いた電子顕微鏡観察にて、近視誘導を行った眼の強膜組織に構造変化が生じているかを検討した。



(2) 網膜内アマクリン細胞のグルカゴンファミリーの発現の検討

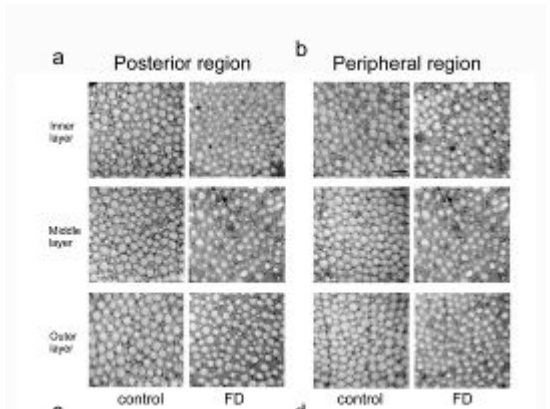
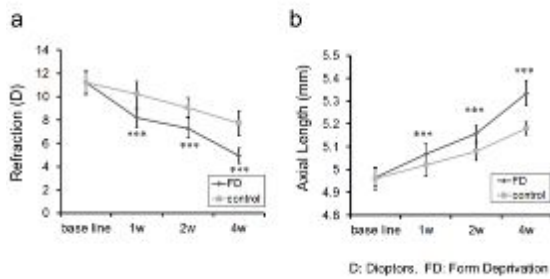
4 週間の視覚刺激遮断後、正常コントロール眼と近視誘導眼を摘出し、凍結切片を作成した。この凍結切片にグルカゴンファミリーの抗体を用いて免疫染色を行い、グルカゴンファミリーの発現の有無を検討した。

(3) 近視誘導眼におけるグルカゴンファミリー発現変化の検討

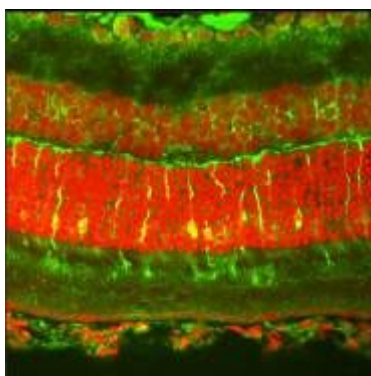
4 週間の視覚刺激遮断後、正常コントロール眼と近視誘導眼を摘出し、網膜組織を抽出した。この網膜組織全体を用いて、RT-PCR でグルカゴンファミリーの mRNA 発現量を、ウエスタンブロットを用いてタンパク発現量に変化が生じているかを検討した

## 4. 研究成果

眼瞼縫合による視覚刺激遮断にてラットでも眼軸延長を伴う近視誘導が可能であった。4 週間の視覚刺激遮断にて正常コントロール眼では眼軸長が 5.15mm であったのに対して、近視誘導眼では 5.36mm と約 200  $\mu$ m の眼軸延長が得られた。屈折度においても近視誘導眼はコントロール眼と比較して約 3D 程度の近視化が見られた。さらに、電子顕微鏡での強膜超薄切切片観察では、近視誘導眼はコントロール眼と比較して強膜コラーゲン線維の狭細化が認められ、視覚刺激遮断はラットにおいて強膜の構造変化を伴う近視化を誘導できることが確認できた。ラットを用いた近視モデルはこれまで報告がなく、本研究が最初の報告であり、またマウスと比較して眼球が大きく処置や計測が容易なため、今後の近視研究に有用と考えられた。



このラット実験近視モデルを用いて、近視誘導眼において網膜の主にアマクリン細胞でのグルカゴンファミリーの発現変化を検討した。凍結切片を用いた免疫染色では、網膜内アマクリン細胞にて、正常コントロール眼と近視誘導眼の両方でGIPとVIPの発現が見られた。しかし、免疫染色ではこれらの発現量に差が生じているかは比較が困難であった。



網膜組織全体を用いた RT-PCR による mRNA の検討と、ウェスタンブロットによるタンパク量の検討では、正常眼と比較して近視誘導眼において GIP、VIP とともに mRNA とタンパク発現量両方で低下が見られ、近視発現に関与す

る分子である可能性が示唆された。これらの結果は今後の近視抑制治療に繋がられる可能性が期待される。

## 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 1 件)

Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine に投稿  
現在査読中

〔学会発表〕(計 1 件)

発表者(代表): 長岡奈都子

表題: ラットを用いた新しい実験近視動物モデルの開発

学会名: 第 119 回日本眼科学会総会

発表年月日: 2015 年 4 月 17 日 ~ 19 日

発表場所: 北海道札幌市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

(1)研究代表者 長岡 奈都子

(Natsuko Nagaoka)

東京医科歯科大学 眼科学 医員

研究者番号：30626271

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：