

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861633

研究課題名(和文) 実験的網脈絡膜新生血管に対する生体防御因子の抑制効果

研究課題名(英文) Suppression of the choroidal neovascularization by Thioredoxin

研究代表者

高井 保幸 (TAKAI, YASUYUKI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：20397871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：過酸化脂質の1つである13(S)-Hydroperoxy-9Z,11E-octadecadienoic acid (HpODE) を網膜下に注入したラット群において、緩衝液を網膜下に注入したコントロール群と比較し、有意に脈絡膜新生血管(CNV)の発生を認めた。また、酸化還元タンパク質で生体防御因子であるチオレドキシン(TRX)を静注したラットCNVモデルにおいて、硝子体・網膜組織液に含まれるvascular endothelial growth factor (VEGF)が低く、CNV発生率が抑制される傾向にあったため、TRXはVEGFを介した脈絡膜血管新生抑制作用を有する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The subretinal injection of the lipid hydroperoxide 13(S)-Hydroperoxy-9Z,11E-octadecadienoic acid (HpODE) induced the choroidal neovascularization (CNV) in rat eyes. The incidence of HpODE-induced CNV was reduced in rats treated with thioredoxin (TRX) compared with the control. The concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) was lower in the tissue fluid of rat eyes treated with TRX compared with the control, so TRX may suppress the CNV by reducing the production of VEGF in the rat eyes.

研究分野：眼科学

キーワード：HpODE CNV TRX

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (AMD) の根本要因は光による酸化ストレスと考えられている。網膜の視細胞が光を受容し電気信号を発生し、刺激が脳に伝達されて視覚となるが、その過程で網膜色素上皮や視細胞で活性酸素が発生する。生体は防御因子による活性酸素などのラジカル消去能を有するが、加齢に伴う防御能低下と長年の酸化ストレスにより網膜組織障害を生じることが根源と考えられている。

・実際に AMD 患者の網膜下に過酸化脂質が正常人に比べ多く沈着していることがわかっている。(Curcio CA et al. *Prog Retin Eye Res.* 2009)

・網膜下に沈着する過酸化脂質の 1 つである
13(S)-Hydroperoxy-9Z,11E-octadecadienoic acid

(HpODE) は、マウス網膜における光暴露による酸化ストレスのマーカーであることがわかっている。(Tanito M et al. *Neurosci Lett.* 2006)

・これまでの脈絡膜血管新生モデルは、レーザー光凝固により網膜を破壊することにより作成された (Ryan SJ et al. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1979) モデルが使用されてきたが、近年、ラットの網膜下にこの HpODE を注射することにより、より AMD の脈絡膜血管新生に近いモデルが作成できることが報告されている。(Baba T et al. *Am J Pathol.* 2010)

・これまでマウスにおいて生体防御因子である TRX が光に対する網膜障害を軽減させるという報告 (Tanito M et al. *Invest ophthalmol Vis Sci.* 2002) や、レーザー光凝固による実験的脈絡膜新生血管の発生を抑制するという報告 (Inomata Y et al. *Invest ophthalmol Vis Sci.* 2008) がある。

以上のように、TRX はマウスにおいて、網

膜の光障害やレーザー光凝固による実験的脈絡膜血管新生を抑制することが報告されているが、HpODE の網膜下注射による AMD により近い状態の脈絡膜血管新生モデルにおいては、TRX の脈絡膜血管新生に対する効果も含め、検討が殆どなされていない状況である。

2. 研究の目的

AMD は、黄斑部の脈絡膜新生血管 (CNV) あるいは萎縮性変化により中心視野障害を来し、本邦における中途失明原因の第 4 位を占めている重要な疾患である。最近では、抗血管内皮増殖因子 (VEGF) 抗体の硝子体内注射で、CNV の退縮により病状の進行を阻止または改善させることが可能となったが、根治的な治療方法は無く、発症予防がより重要である。そこで、より人体の CNV に近い実験的脈絡膜血管新生モデルを作成し、すべての生物に存在する酸化還元タンパク質で生体防御因子である TRX が脈絡膜血管新生および眼内の酸化ストレス状態にどのような役割を果たすのか検討し、生体防御因子強化による AMD の発症予防の可能性を見出すこと。

3. 研究の方法

HpODE の網膜下注射による実験的脈絡膜血管新生ラットモデルを作成し、生体防御因子である TRX の静脈注射により脈絡膜血管新生にどのような影響が及ぶのかを肉眼的・組織学的に検討する。さらに、眼内の酸化ストレスの状態と炎症関連サイトカイン濃度を測定し、TRX がこれらに及ぼす影響や CNV の状態 (肉眼的・組織学的) と酸化ストレス・サイトカインの状態の関連について比較検討を行う。

(1) 実験的脈絡膜血管新生ラットモデルの確立 (modified from Baba T et al. *Am J Pathol.* 2010)

Sprague-Dawley (SD) rat(6~8 週齢)を用い、ketamin,xylazine にて全身麻酔のあと、眼科手術顕微鏡下に HpODE の網膜下注射を行う。眼科手術顕微鏡下にまず、ラットの結膜切除を行い、強膜を露出する。強膜に 22G 針で角膜輪部より 1mm の場所に強膜創を作成し、ラット用前置レンズを用い眼底を観察しながら、30G 鈍針を網膜下で後極側まで注意深く進め、HpODE30 μ g (2 μ l) を網膜下に注入する。注射後 21 日目に走査型レーザー検眼鏡にて、蛍光眼底造影を行い CNV の有無を確認する。

コントロール群として、ホウ酸緩衝液を 2 μ l 網膜下注射して同様に観察する。

両群 15 匹 30 眼ずつ行い、脈絡膜血管新生モデル作成手法を確立する。

・HpODE はホウ酸ナトリウム緩衝液に溶解し、0.02mol/L モル濃度に調整したものを使用する。

(2) 実験的脈絡膜血管新生モデルでの TRX の血管新生抑制効果についての検討

実験的脈絡膜血管新生モデルラットを以下の 3 群に分ける。

それぞれの群 10 眼以上を解析目標とする。

A 群：生理食塩水を網膜下注射直前 /3/6/9/12/15/18 日目に投与する群(コントロール群) 12 眼

B 群：rhTRX 0.5 mg を網膜下注射直前 /3/6/9/12/15/18 日目に投与する群 14 眼

C 群：rhTRX 1.0 mg を網膜下注射直前 /3/6/9/12/15/18 日目に投与する群 16 眼

・投与方法は脈絡膜新生血管に作用させるため、尾静脈からの静脈注射が効果的と考え、投与量は、これまで rhTRX の静脈内投与で網膜虚血再灌流障害を軽減させるという報告 (Shibuki H et al. *Invest ophthalmol Vis Sci.*

2000) に準じて静脈内投与量を決定した。

・rhTRX は phosphate-buffered saline (PBS)に溶解し、5.0mg/ml の濃度に調整したものを使用する。

解析方法は、網膜下注射 21 日目に走査型レーザー検眼鏡にて、蛍光眼底造影を行い CNV の有無を確認し、TRX 濃度と脈絡膜血管新生の抑制の関係を観察する。

(3) 硝子体・網膜組織液の酸化度と脈絡膜血管新生との関連を検討

硝子体・網膜組織液(lysis buffer を加え amplitude 後、遠心分離機を行い上澄み液を回収し、タンパク量を一定にしたもの)を The OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit (Millipore 社)を使用して酸化タンパク量を dot blot analysis で測定し、CNV の発生の有無と酸化タンパク量との間に関連があるかどうかを検討する。

(4) 硝子体・網膜組織液のサイトカイン濃度と脈絡膜血管新生との関連を検討

硝子体液・網膜組織液中に脈絡膜血管新生に重要な vascular endothelial growth factor (VEGF)濃度測定を Rat VEGF Assay Kit (IBL 社)を用いて行い、濃度と CNV の有無との関連を検討する。

4. 研究成果

(1) 実験的脈絡膜血管新生ラットモデルの確立 (modified from Baba T et al. *Am J Pathol.* 2010)

HpODE30 μ g (2 μ l) を網膜下に注入する。注射後 21 日目に走査型レーザー検眼鏡にて蛍光眼底造影を行い、HpODE 注射部位に図 1 (矢印)のような過蛍光の部分を確認した場合 CNV 有りと判定した。

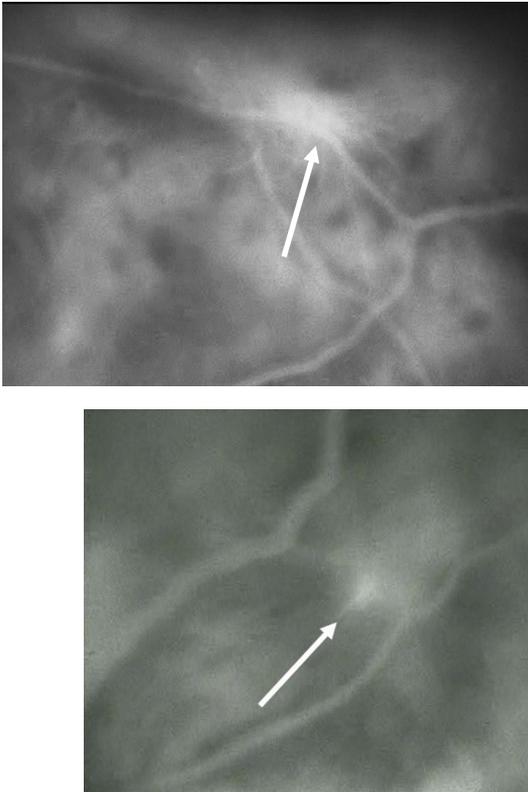


図 1

HpODE 注射群 30 眼中 21 眼 (70%)、コントロール群 30 眼中 5 眼 (16.7%) に CNV を確認し、有意に HpODE 注射群で CNV の発生を認めた。

組織の HE 染色では、図 2 (矢印) に示すように、HpODE 注射群・コントロール群ともに CNV が発生した部分は神経線維層より外側の網膜層構造は乱れ、神経線維層に向かって盛り上がるような変化を認めた。CNV が発生しなかったものについては層構造の多少の乱れは認めるものの、神経線維層に向かい盛り上がるような変化は認めなかった。また、oil red O 染色ではコントロール群では網膜下・網膜内に脂肪は染色されなかったが、HpODE 注射群では、脈絡膜新生血管周囲では網膜下だけでなく、網膜内まで脂肪を含んだ細胞を多数認めた (図 2)。

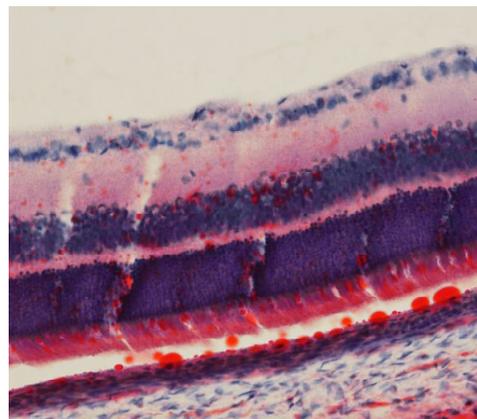


図 2

(2) 実験的脈絡膜血管新生モデルでの TRX の血管新生抑制効果についての検討

3 群それぞれの CNV 発生率は

A 群 6 / 12 眼 = 50.0%

B 群 4 / 14 眼 = 28.6%

C 群 6 / 16 眼 = 37.5% であり、TRX 投与群では TRX 濃度に関係なく、CNV 発生が抑えられる傾向にあった。

(3) 硝子体・網膜組織液の酸化度と脈絡膜血管新生との関連を検討

The OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit (Millipore 社) を使用した酸化タンパク量の dot blot analysis の結果を図 3 に示す。酸化タンパク量と CNV 発生の有無に明らかな関連は認められなかった。

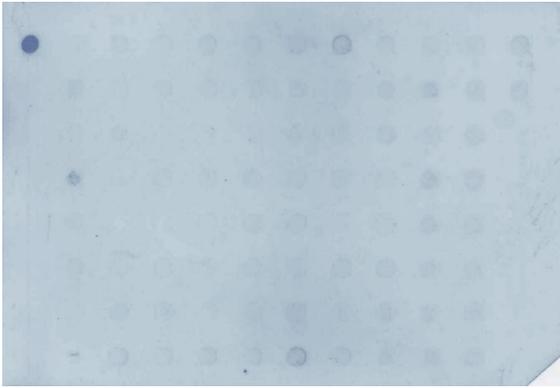


図 3

(4) 硝子体・網膜組織液のサイトカイン濃度と脈絡膜血管新生との関連を検討

それぞれの硝子体・網膜組織液中の VEGF 濃度は、A 群 49.6 pg/ml、B 群 35.4 pg/ml、C 群 33.9 pg/ml であり、有意差は認めないものの TRX 投与群で低値である傾向にあった(図 4)。

また、サブ解析として全体の CNV(+)群と CNV(-)群で VEGF 濃度を比較したところ、CNV(+)群は 48.55 pg/ml、CNV(-)群は 34.85 pg/ml で、CNV(+)群で有意な高値($P=0.0094$: Wilcoxon の順位和検定)であった(図 5)。

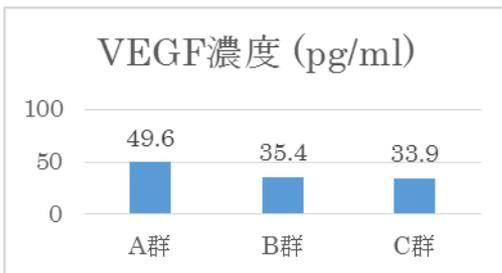


図 4

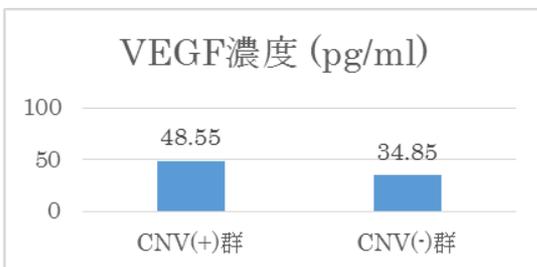


図 5

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0件)

[学会発表](計0件)

[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

高井 保幸 (TAKAI YASUYUKI)

島根大学医学部眼科学講座・助教

研究者番号：20397871

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：