

令和 3 年 5 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02958

研究課題名（和文）糖尿病網膜症における線維血管増殖膜の形成機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of mechanisms underlying fibrovascular membrane proliferation in diabetic retinopathy

研究代表者

小椋 祐一郎 (Yuichiro, Ogura)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・教授

研究者番号：70191963

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病網膜症では毛細血管壁のペリサイトが消失することにより、血管透過性が亢進する。さらに血管閉塞が進行すると線維血管増殖膜が形成され、網膜剥離により失明に至る。本研究では、ペリサイト消失網膜症モデルマウスの急性炎症から慢性炎症への移行に伴って、残存ペリサイトと網膜色素上皮細胞が筋線維芽細胞に分化転換すること、さらに活性化型ミクログリアが線維化を促進することを明らかにした。同様の機構により、糖尿病網膜症の線維血管増殖膜が形成されると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病網膜症では、血管透過性亢進に伴う黄斑浮腫と、血管閉塞に伴う線維血管増殖膜形成により、視機能が低下する。抗VEGF療法の普及により、黄斑浮腫の治療成績は各段に向上したが、線維血管増殖膜形成に対しては未だ有効な薬物療法がない。本研究では、糖尿病網膜症の病態を再現するペリサイト消失網膜症モデルマウスを用いて、網膜線維化の細胞・分子機構を解明した。こうした成果は、増殖糖尿病網膜症の新規治療法開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In diabetic retinopathy, dropout of pericytes from retinal capillary walls evokes vascular hyperpermeability. Furthermore, progression of vessel obstruction leads to the formation of fibrovascular membranes, which create blinding conditions including retinal detachment. In the present study, by exploiting a pericyte-deficient retinopathy mouse model, we have elucidated that remaining pericytes and retinal pigment epithelium cells transdifferentiate into myofibroblasts, and activated microglia promotes fibrosis during the transition from acute to chronic inflammation. This machinery may underlie the fibrovascular membrane formation in human diabetic retinopathy.

研究分野：眼科学

キーワード：糖尿病網膜症 線維血管増殖膜 ペリサイト 筋線維芽細胞 ミクログリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症では毛細血管壁のペリサイトが消失することにより、血管透過性が亢進する。さらに血管閉塞が進行すると線維血管増殖膜が形成され、硝子体出血や網膜剥離により失明に至る。こうした病態に対しては、網膜レーザー光凝固や硝子体手術などの侵襲的手段を除いて、未だ有効な治療法がない。その一因として、糖尿病網膜症の病態を再現する動物モデルの欠如が挙げられる。一方、我々は抗 PDGFR β 抗体を新生仔マウスの腹腔内に投与することにより、網膜血管壁のペリサイトを消失させ、糖尿病網膜症と同様の血管異常を再現することに成功している(1)。ペリサイトを消失した網膜では、内在性ミクログリアの活性化を伴う炎症が惹起され、血管透過性亢進と網膜剥離を生ずる(2)が、その後さらに線維化が進行することが明らかとなっている(未発表)。

2. 研究の目的

糖尿病網膜症における線維血管増殖膜の形成機構の解明を目的に、ペリサイト消失網膜症モデルマウスにおける筋線維芽細胞の由来と、ミクログリアの役割について研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) ペリサイト消失網膜症モデルマウスの解析

文献(1)に準じて、新生仔マウスの腹腔内に抗 PDGFR β 抗体(クローン APB5)を投与し、網膜血管壁のペリサイト集積を阻害した。文献(1)に準じて、網膜フラットマウント標本および網膜凍結切片標本を作成し、免疫組織化学染色を行った。文献(2)に準じて、網膜フローサイトメトリー解析とリアルタイム PCR 解析を行った。

(2) 筋線維芽細胞の由来

EdnraCreERT2:R26R-EYFP マウスの腹腔内に 4-hydroxytamoxifen (4OHT) を投与して、網膜ペリサイトの細胞運命マッピング解析を行った。また、TyrCre:R26R-H2B-mCherry マウスを用いて網膜色素上皮細胞の細胞運命マッピング解析を行った。

(3) ミクログリアの役割

CX3CR1-CreERT2:R26R-EYFP マウスの眼内に 4OHT を投与して、網膜ミクログリアの細胞運命マッピング解析を行った。また、CX3CR1-CreERT2:R26R-EYFP マウスの腹腔内に 4-hydroxytamoxifen (4OHT) を投与して、網膜ミクログリアと骨髄由来マクロファージの細胞運命マッピング解析を行った。新生仔マウスの腹腔内に抗 CSF1R 抗体(クローン AFS98)を投与して、網膜ミクログリアを消失させた。さらに、フローサイトメトリー法により精製した網膜 CD45⁺CD11b⁺細胞を用いて、単細胞 RNAseq 解析を行った。

4. 研究成果

(1) ペリサイト消失網膜における急性炎症と慢性炎症

生後 1 日マウスの腹腔内に抗 PDGFR β 抗体を単回投与すると、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、CCL2 などの炎症性サイトカインの遺伝子発現が生後 2 週にかけて急激に上昇した。一方、IL-4、IL-10、IL-13 などの慢性炎症に関与するサイトカインの遺伝子発現は、生後 3 週にピークに達した。また、ペリサイト消失網膜のフローサイトメトリー解析では、生後 2 週まで CD45^{hi}CD11b⁺細胞が増加するのに対し、生後 3 週以降は CD45^{int}CD11b⁺細胞が増加した。これらのことから、ペリサイト消失網膜症モデルマウスでは、生後 2 週から 3 週にかけて、急性炎症から慢性炎症に移行すると考えられた。

(2) 筋線維芽細胞の由来

ペリサイト消失網膜症モデルマウスでは、生後 2 週に網膜中心部と周辺部に筋線維芽細胞が出現し、生後 3 週にかけて網膜下の線維化が進行する。この際、外顆粒層を裏打ちする筋線維芽細胞は残存ペリサイトに由来し、脈絡膜に接する筋線維芽細胞は、上皮間葉転換をきたした網膜色素上皮細胞に由来することが明らかとなった。また、内在性ミクログリアや骨髄由来マクロファージは、筋線維芽細胞には分化転換しないことが明らかとなった。

(3) ミクログリアの役割

ペリサイト消失網膜症モデルマウスの急性炎症期では、活性化型ミクログリアと骨髄由来マクロファージが網膜表層の血管壁周囲に集積していた。一方、慢性炎症期に移行すると、骨髄由来マクロファージが減少し、活性化型ミクログリアが網膜下腔に移行した。抗 CSF1R 抗体を投与してミクログリアを消失させると線維化が抑制されることから、活性化型ミクログリアは線維化を促進することが明らかとなった。さらに単細胞 RNAseq 解析の結果、慢性炎症期の活性化型ミクログリアは M2 極性化していることが明らかとなった。

(4) 今後の展望

本研究の成果から、糖尿病網膜症における線維血管増殖膜の形成でも、ペリサイトや網膜色素上皮細胞が筋線維芽細胞に分化転換し、活性化型ミクログリアが線維化を促進する可能性が想定される。我々は現在、活性化型ミクログリアを標的とした抗線維化療法の開発を進めているが、こうした成果は糖尿病網膜症の新規治療法開発に寄与することが期待される。

<引用文献>

1. J Clin Invest. 110:1619-1628, 2002.
2. JCI Insight. 2(3):e90905, 2017.

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
研究分担者	野崎 実穂 (Nozaki Miho) (00295601)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師 (23903)	
研究分担者	安川 力 (Yasukawa Tsutomu) (00324632)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	
研究分担者	植村 明嘉 (Uemura Akiyoshi) (30373278)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	平野 佳男 (Hirano Yoshio) (40405163)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師 (23903)	
研究分担者	吉田 宗徳 (Yoshida Munenori) (60273447)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	

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