

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592569

研究課題名(和文) 未熟児網膜症におけるアドレナリン 1 受容体の役割解明と制御による治療法の開発

研究課題名(英文) Disclose the role and develop a new therapy regulating adrenergic receptor alpha 1 f or retinopathy of prematurity

研究代表者

塚原 康友 (TSUKAHARA, Yasutomo)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20236855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000 円、(間接経費) 1,110,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では未熟児網膜症(ROP)の発生におけるアドレナリン 1 受容体の働きを解明するために、1受容体ノックアウトマウスを用いたROPモデル(酸素誘発網膜症)を作成する計画を立てた。当初 1A、1B、1D各受容体のダブルノックアウトおよびトリプルノックアウトマウスの作成を試みたが、遺伝子欠損による生殖機能あるいは仔マウスの保育機能不全のため上記ノックアウトマウスの作成は極めて困難であった。そのため研究計画を修正してシングルノックアウトマウスの作成を行う事とし、1A、1B、1D各シングルノックアウトマウスの作成には成功した。本研究期間後もさらに研究を継続する予定である。

研究成果の概要(英文)：To disclose the role of adrenergic receptor (ADR) alpha 1 in the development of retinopathy of prematurity (ROP) we tried to develop ADR alpha 1A, 1B and 1D knock out (KO) mice and to compare the feature of experimental ROP model (oxygen induced retinopathy) between KO mice and wild mice. Although it was very difficult to make double or triple KO mice, we have succeeded to obtain single KO mouse of each subtype. We will continue the research after this time period.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：未熟児網膜症 アドレナリン受容体 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

近年、未熟児管理の飛躍的な改善によって在胎週数 23 週前後、出生体重 500 ~ 600g の極小未熟児の救命率が格段に上昇している。しかしながら、それに伴って身体発育の未熟性に基づく各種疾患の予防管理あるいは治療が大きな課題として持ち上がってきた。未熟児網膜症(ROP)はその最たるものの一つであり、早期産あるいは低出生体重児に起こる網膜中間周辺部の血管生育不全と異常増殖、それに伴う網膜剥離を主体とする疾患である。我々の経験では極小未熟児の ROP は半数を超える割合で光凝固等の治療が必要となるが、その場合でも全身状態の悪化や中間透光体の混濁などによって最適のタイミングや環境で治療が行えないことも多い。また、特に重症化する症例では網膜血管の未熟性が甚だしく、従来の ROP に行われていた網膜凝固治療のみでは進行を止める事が困難で、視力予後は極めて不良である。最近では進行性 ROP に対して早期の硝子体手術あるいは抗血管内皮増殖因子(VEGF)抗体の硝子体注射で対処しようとする試みがなされているが、現在の所このような治療が行える医療機関は限られており、患児搬送によるリスクを考えると手術的治療が一般化されるには数多くのハードルが存在する。このような背景をふまえると、ROP 診療に関しては予防、特に重症化の予防に最大限の努力がなされるべきであるが、現在行なわれている輸液や酸素管理等による予防効果にはおのずと限界があり、よって有効な薬物治療の確立が真に待ち望まれるところである。しかしながら現在までの所、ROP の薬物治療は一般的ではない。これは偏に薬物の全身への影響を懸念しての結果と思われる。我々は ROP の病初期において血管の未熟性の基づく高酸素投与が網膜血管成長末端の閉塞を起こす点に着目し、循環改善(血管拡張)作用を持つアドレナリン 1 受容体阻害薬である塩酸ブナゾ

シンを用いた点眼治療によって酸素誘発網膜症が抑制されることを観察した。しかしながら 1 受容体にも幾つかのサブタイプがあり、また其々の細胞内シグナルに関わる分子の種類など不明な点は多々残されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の通りである。

- (1) 1 受容体ノックアウトマウスを用いた ROP モデル(酸素誘発網膜症)を作成し、野生型マウスにおける ROP モデルとの間で網膜血管発育の様子を比較する。それによって 1 受容体ノックアウトが異常血管の発育を抑制できるかどうかを検討する。また、その分子メカニズムについても解析を行なう。
- (2) 上記実験にて 1 受容体ノックアウトによる異常血管新生の抑制が確認できれば、1 阻害薬等の点眼を用いたヒト ROP 予防の臨床研究を実施する。

3. 研究の方法

- (1) 当研究では、まず ROP の進展における 1 受容体の影響を確認するために 1 受容体ノックアウトマウスを用いた ROP モデルを作成し、野生型マウスにおける ROP モデルとの間で網膜血管発育および異常血管増殖の様子の違いを明らかにする。また、その分子メカニズムについてもマイクロアレイを用いた解析を行ない、発現遺伝子のプロファイリングを行なう。その結果を元に正常血管および網膜神経細胞への影響(特に有害な影響)の有無を確認する。
- (2) 1 受容体ノックアウトによる ROP の異常血管新生の抑制が観察でき、かつ正常神経細胞への有害事象(アポトーシスなど)が起こらないことが明らかになれば、当大学倫理委員会の承認後、新生児科の協力を得て 1 阻害薬等の点眼を用いたヒト ROP 予防の臨床研究を開始する。

4. 研究成果

(1) 上記の目的から 1 受容体を完全に欠損させるため、まず 1A、1B、1D 各受容体サブタイプのダブルノックアウトマウスおよびトリプルノックアウトマウスの作成を試みた。その内、ダブルノックアウトマウスの作成には成功したが、ダブルノックアウトマウス同士を交配した場合、遺伝子欠損による生殖機能あるいは仔マウスの保育機能不全のためかトリプルノックアウトの作成は極めて困難であった。(元々、1 ノックアウトマウスは親マウスによる仔マウスの保育に難があるとされている)

(2) また、1A と 1B、1A と 1D ダブルノックアウトマウスの系にて酸素誘発網膜症を発生させるために、生直後から高酸素(75%)下での飼育を行ったところ、母マウスの保育機能不全(あるいは過ストレス)によると思われる仔マウスの生育不能という事態が生じた。

(3) 研究計画をさらに修正して、まずシングルノックアウトマウスでの酸素誘発網膜症の作成を試みる事とし、1A、1B、1D 各シングルノックアウトマウスの作成には成功した。[図 1]

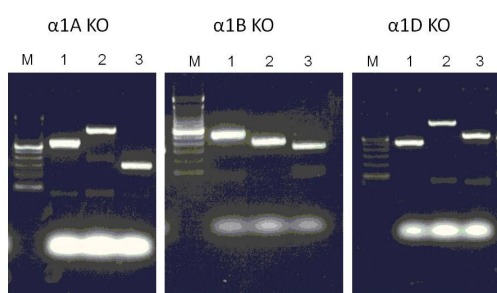


図 1 アドレナリン受容体 1A、1B、1D 各ノックアウトマウスの遺伝子発現様式 (M:molecular weight marker, 1: 1A, 2: 1B, 3: 1D, KO が成立すると PCR 産物の分子量が変化する)

この中で、1D ノックアウト(ホモ)マウスは

野生型と同等の交配、仔の生育効率を示したが、1A ノックアウト(ホモ)マウスにおいては交配効率が著明に低下し、1B ノックアウトマウスではホモ型だけでなくヘテロ型においても交配効率が著しく低下した。そのため本研究期間中には酸素負荷実験の開始ができなかったが、今後も継代が可能であった 1A と 1D ノックアウトマウスに限って研究を継続し、未熟児網膜症とアドレナリン受容体の関連を明らかにする所存である。

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 15 件)

1. Honda S, Miki A, Yanagisawa S, Matsumiya W, Nagai T, Tsukahara Y. Comparison of the outcomes of photodynamic therapy between two angiographic subtypes of polypoidal choroidal vasculopathy. *Ophthalmologica* in press. (査読有)
2. Matsumiya W, Honda S, Yanagisawa S, Miki A, Nagai T, Tsukahara Y. Evaluation of clinical and genetic indicators for the early response to intravitreal ranibizumab in exudative age-related macular degeneration. *Pharmacogenomics* in press. (査読有)
3. Fujioka K, Morioka I, Honda S, Tsukahara Y, Miwa A, Shibata A, Tanimura K, Yokoyama N, Yamada H, Iijima K. Severe retinopathy of prematurity with retinal detachment in monozygotic twins. *Pediatr Int*. 55:366-8, 2013. (査読有)
4. Miki A, Honda S, Nagai T, Tsukahara Y, Negi A. The effects of oral bisphosphonates on myopic choroidal neovascularization over 2 years of follow-up: a pilot study comparing with anti-VEGF therapy and photodynamic therapy. *Br J Ophthalmol*. 97:770-4, 2013. (査読有)
5. Matsumiya W, Honda S, Kusuhara S, Tsukahara Y, Negi A. Effectiveness of intravitreal ranibizumab in exudative age-related macular degeneration (AMD): comparison between typical neovascular AMD and polypoidal choroidal vasculopathy over a 1 year follow-up. *BMC Ophthalmol*. 13:10, 2013. (査読有)

6. Matsumiya W, Kusahara S, Shimoyama T, Honda S, Tsukahara Y, Negi A. Predictive value of preoperative optical coherence tomography for visual outcome following macular hole surgery: effects of imaging alignment. *Jpn J Ophthalmol*. 57:308-15, 2013. (査読有)
 7. Honda S, Bessho H, Kondo N, Kusahara S, Tsukahara Y, Negi A. Positive association of CD36 gene variants with the visual outcome of photodynamic therapy in polypoidal choroidal vasculopathy. *Mol Vis*. 18: 2796-804, 2012. (査読有)
 8. Bessho H, Honda S, Kondo N, Kusahara S, Tsukahara Y, Negi A. The association of CD36 variants with polypoidal choroidal vasculopathy compared to typical neovascular age-related macular degeneration. *Mol Vis*. 18:121-7, 2012. (査読有)
 9. Yanagisawa S, Kondo N, Miki A, Matsumiya W, Kusahara S, Tsukahara Y, Honda S, Negi A. Difference between age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in the hereditary contribution of the A69S variant of the age-related maculopathy susceptibility 2 gene (ARMS2). *Mol Vis*. 17:3574-82, 2011. (査読有)
 10. Yanagisawa S, Kondo N, Miki A, Matsumiya W, Kusahara S, Tsukahara Y, Honda S, Negi A. A Common Complement C3 Variant Is Associated with Protection against Wet Age-Related Macular Degeneration in a Japanese Population. *PLoS One*. 6:e28847, 2011. (査読有)
 11. Imai H, Honda S, Tsukahara Y, Negi A. Macular edema formation and deterioration of retinal function after intravitreal bevacizumab injection for proliferative diabetic retinopathy. *Case Report Ophthalmol*. 2:314-8, 2011. (査読有)
 12. Matsumiya W, Honda S, Bessho H, Kusahara S, Tsukahara Y, Negi A. Early responses to intravitreal ranibizumab in typical neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *J Ophthalmol*. ID 742020, 2011. (査読有)
 13. Tagami M, Kusahara S, Imai H, Honda S, Tsukahara Y, Negi A. Impact of Intravitreal Injection of Tissue Plasminogen Activator on Full-Field Electroretinogram in Patients with Macular Oedema Secondary to Retinal Vein Occlusion. *Ophthalmologica*. 226:81-86, 2011. (査読有)
 14. Matsuo M, Honda S, Matsumiya W, Kusahara S, Tsukahara Y, Negi A. Comparison between anti-vascular endothelial growth factor therapy and photodynamic therapy for myopic choroidal neovascularization. *Eur J Ophthalmol*. 22:210-5, 2012. (査読有)
 15. Yagi M, Yamamori M, Morioka I, Yokoyama N, Honda S, Negi A, Nakamura T, Okamura N, Okumura K, Sakaeda T, Matsuo M. *VEGF* 936C>T is predictive of threshold retinopathy of prematurity in Japanese infants with a 30-week gestational age or less. *Research and Reports in Neonatology* 1: 5-11, 2011. (査読有)
- 〔学会発表〕(計 7件)
1. Shigeru Honda, Wataru Matsumiya, Suiho Yanagisawa, Akiko Miki, Takayuki Nagai, Yasutomo Tsukahara The Short Term Outcomes of a Single Intravitreal Injection of Aflibercept Combined With Photodynamic Therapy for Polypoidal Choroidal Vasculopathy APRVS 2013.12.6-8, Nagoya.
 2. Wataru Matsumiya, Shigeru Honda, Suiho Yanagisawa, Akiko Miki, Takayuki Nagai, Yasutomo Tsukahara The early response to aflibercept in the recurrent neovascular age-related macular degeneration after ranibizumab treatment APRVS 2013.12.6-8, Nagoya.
 3. Akiko Miki, Shigeru Honda, Suiho Yanagisawa, Wataru Matsumiya, Takayuki Nagai, Yasutomo Tsukahara The natural course and response to treatments in the cases with peripapillary polypoidal choroidal vasculopathy APRVS 2013.12.6-8, Nagoya.
 5. Wataru Matsumiya, Shigeru Honda, Hiroaki Bessho, Sentaro Kusahara, Yasutomo Tsukahara, Akira Negi. Early Responses to Intravitreal Ranibizumab in Typical Neovascular Age-related Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy. ARVO, 2011.5.1-5, Fort Lauderdale.
 6. 本田茂、別所弘明、松宮亘、近藤直士、楠原仙太郎、塚原康友、根木昭：日本人加齢黄斑変性に対する遺伝情報を利用した光線力学療法の検討、第115回日本眼科学会総会 2011.
 7. 松宮亘、本田茂、三木明子、塚原康友、根木昭：在胎38週出生の胎児仮死に対する高濃度酸素管理後に重度の未熟児網膜症を呈した1例、第50回日本網膜硝子体学会総会 TEAM2011 2011.
- 〔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

塚原 康友（TSUKAHARA, Yasutomo）
神戸大学・医学研究科・准教授
研究者番号：20236855

(2) 研究分担者

本田 茂（HONDA, Shigeru）
神戸大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60283892

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし（ ）

研究者番号：