

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：32651

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893253

研究課題名(和文) 網膜変性における炎症をターゲットとした新規治療戦略の解明

研究課題名(英文) New inflammation targeted strategy for retinal degeneration

研究代表者

神野 英生 (Hideo, Kohno)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60514536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性や網膜色素変性症等の網膜変性疾患は患者視機能を著しく傷害し失明へと至る難治性疾患群である。網膜変性での失明へのプロセスは光を感知する細胞である視細胞の細胞死による。近年の研究により網膜変性時に生じる局所炎症が視細胞へと傷害を与えることが明らかとなってきた。今研究において我々は網膜変性時に炎症を発生させる起源であると考えられる網膜内在住マクロファージであるマイクログリアと骨髄由来のマクロファージに特異的に発現しているケモカインレセプターに蛍光蛋白質を遺伝的に導入しそれぞれの細胞を可視化できる網膜変性動物モデルを作成した。この動物モデルは網膜変性疾患の新規治療戦略の開発に有用となる。

研究成果の概要(英文)：Retinal degeneration (RD) is a direct reason of blindness. The photoreceptor cell death (PCD) is the direct featured process to blindness in RD. Though accumulating evidence suggests that microglia, a resident macrophage in the retina, and bone marrow derived macrophage can cause retinal inflammation which accelerates PCD, the details of how these cells activate during RD remains uncertain. Therefore, it is important to clarify which cells play a dominant role in fueling retinal inflammation. However distinguishing between microglia and macrophage is difficult by using conventional technique such as cell marker. In current study, we established two chemokine receptor visualized RD mouse models, named as Mertk-/-Cx3cr1GFP/+Ccr2RFP/+ mice. Cx3cr1-GFP positive microglia and Ccr2-RFP positive macrophage were distinguishable in the retina of Mertk-/-Cx3cr1GFP/+Ccr2RFP/+ mice. Mertk-/-Cx3cr1GFP/+Ccr2RFP/+ mice may usable to develop feature inflammation targeted treatment strategy for RD.

研究分野：眼科学

キーワード：マイクログリア 加齢黄斑変性 網膜色素変性症 炎症

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性や網膜色素変性などの網膜変性疾患は視細胞死を生じ失明に直結する難治性疾患である。視細胞は光シグナルを受容し後頭葉視覚野へ伝達する視覚に取って不可欠である細胞である。中枢神経系である視細胞は一度ダメージを受けるとその後の再生は不可能であることから、網膜変性疾患の治療においてはどのようにして視細胞を保護していくのかを検討していくことが重要である。しかしながら、現在までに人において視細胞を直接に保護する治療戦略はいまだ開発されておらず新たな方法を発見しなくてはならない。

2. 研究の目的

我々はこれまで視細胞死を促進する網膜内の炎症に着目し研究を進めてきた。本研究の目的は網膜内炎症における新知見を提供することにより新たな視細胞保護を狙う治療戦略を考案することである。

3. 研究の方法

Cx3cr1^{GFP/GFP} および *Ccr2^{RFP/RFP}* マウスはそれぞれのケモカインレセプターに green fluorescein protein(GFP) ないしは red fluorescein protein(RFP) を遺伝子導入した動物モデルである。近年、網膜を含む中枢神経系においてマイクログリアは *Cx3cr1* GFP 陽性 *Ccr2*-RFP 陰性である一方モノサイト由来マクローファージは *Cx3cr1* GFP 陰性 *Ccr2*-RFP 陽性であるとの報告がなされた。しかし、網膜変性におけるこれら炎症細胞の役割は依然として不明である。我々は自然発症網膜変性モデルである *Mertk^{-/-}* マウスに *Cx3cr1^{GFP/GFP}* および *Ccr2^{RFP/RFP}* マウスを配合させることにより *Mertk^{-/-}Cx3cr1^{GFP/+}Ccr2^{RFP/+}* マウスを作製する。このマウスは網膜変性におけるマイクログリア及びモノサイト由来マクローファージの遊走を区別して観察することができるかと期待される。このモデルを用い網膜変性における *in vivo* でのマイクログリアおよびマクローファージの役割について検討していく。*Cx3cr1* および *Ccr2* はマウス染色体9番に共存しているため配合による *Cx3cr1^{GFP/GFP}Ccr2^{RFP/RFP}* マウスの作成は不可能である。そこでまずは *Mertk^{-/-}Cx3cr1^{GFP/GFP}* マウスおよび *Mertk^{-/-}Ccr2^{RFP/RFP}* マウスの作成を目指す。次に *Mertk^{-/-}Cx3cr1^{GFP/GFP}* マウスと *Mertk^{-/-}Ccr2^{RFP/RFP}* マウスを配合させることによって *Mertk^{-/-}Cx3cr1^{GFP/+}Ccr2^{RFP/+}* マウスを作製する。このマウスの網膜切片を時系列的に観察することによって網膜下腔に侵入するマイクログリアおよびマクローファージの動態を検討する。

4. 研究成果

(1) *Mertk^{-/-}* マウス網膜における *Cx3cr1* および *Ccr2* の上昇
網膜変性を生じた *Mertk^{-/-}* マウス網膜中

の *Cx3cr1* および *Ccr2* を定量 PCR にて測定した結果、両ケモカインレセプターが *Mertk^{-/-}* マウスの網膜変性発症と共に上昇していくことが観察された。

(2) *Mertk^{-/-}Cx3cr1^{GFP/+}Ccr2^{RFP/+}* マウスにおける *Cx3cr1*-GFP 陽性マイクログリアの網膜下腔への遊走と *Ccr2*-RFP 陽性マクローファージの網膜内への浸潤。

Mertk^{-/-}Cx3cr1^{GFP/+}Ccr2^{RFP/+} マウス網膜切片を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した結果、網膜変性の発症と共に *Cx3cr1*-GFP

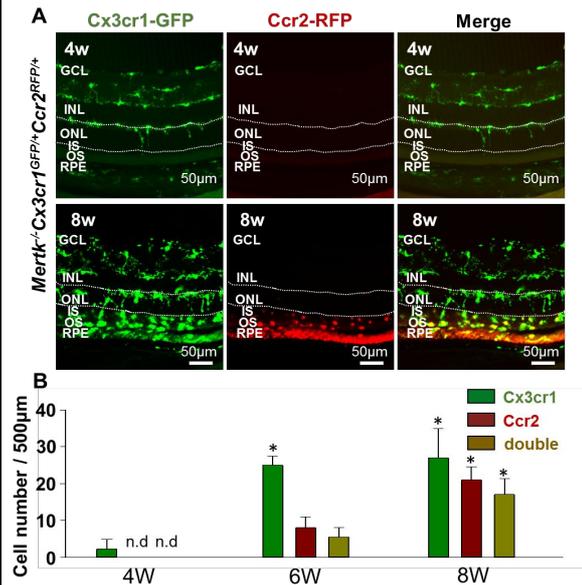


図1

陽性マイクログリアの網膜下腔への遊走と *Ccr2*-RFP 陽性マクローファージの網膜内への浸潤を認めた。(図1)

(2) 網膜および RPE フラットマウントを使用した *Cx3cr1*-GFP 陽性マイクログリアの網膜下腔への遊走と *Ccr2*-RFP 陽性マクローファージの観察。

4,5,6,8,16 週齢の *Mertk^{-/-}Cx3cr1^{GFP/+}Ccr2^{RFP/+}* マウスより網膜および RPE フラットマウントを作成しそれぞれの細胞の詳細を観察した。6 週齢の *Mertk^{-/-}Cx3cr1^{GFP/+}*

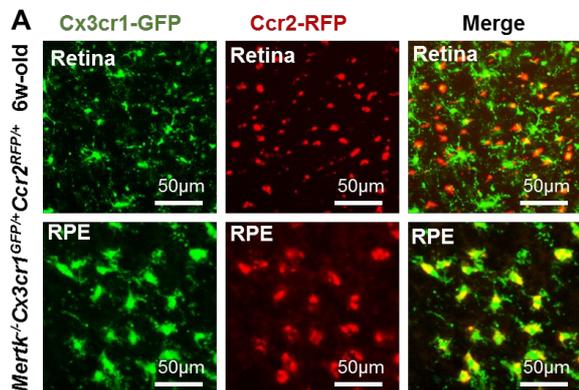


図2

Ccr2^{RFP/+} マウス網膜および RPE フラットマウントを提示する(図2) 網膜フラットマウントにおいて *Cx3cr1*-GFP 陽性マイクログリア

アの網膜下腔への遊走と Ccr2-RFP 陽性マクロファージをその発現パターンより識別できた一方、RPE フラットマウントにて観察される網膜下腔へと侵入したマイクログリアおよびマクロファージは Cx3cr1-GFP および Ccr2-RFP の共陽性であった。Ccr2-RFP 陽性マクロファージは網膜変性慢性期に当たる 16 週齢の *Mertk^{-/-}Cx3cr1^{GFP/+}Ccr2^{RFP/+}* マウスにおいても網膜内および網膜下腔に認められたことにより、網膜変性における網膜内炎症は長期にわたり持続しうることを示唆していた。

(4) 将来における網膜変性に対する炎症をターゲットとした新規治療戦略の開発へ向けて

今研究において Cx3cr1 および Ccr2 の発現パターンを解析することにより網膜変性におけるマイクログリアおよびマクロファージの識別が全てではないが、ある程度行えることが明らかとなった。血流より網膜血液間隙を越えて網膜内へと侵入してくる Ccr2 陽性マクロファージを多数認めたことにより網膜変性に対する治療法は眼局所療法のみでは不十分であり全身的な抗炎症療法が必要である可能性を示唆していた。今研究課題にて新規作成された *Mertk^{-/-}Cx3cr1^{GFP/+}Ccr2^{RFP/+}* マウスは世界初の網膜変性自然発症マイクログリア、マクロファージ可視化モデルであり、今後新たな創薬研究において有用となると考えられる。

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 6 件)

1. Kohno H, Maeda T, Perusek L, Pearlman E, Maeda A. CCL3 production from microglial cells modulates severity of retinal degeneration in mouse models. *J Immunol* (IF= 5.362). 192(8):3816-27;2014. DOI: 10.4049/jimmunol.1301738.

2. Osada M, Sakai T, Kuroyanagi K, Kohno H, Tsuneoka H. Treatment of experimental autoimmune uveoretinitis with peroxisome proliferator-activated receptor agonist fenofibrate. *Mol Vis*(IF= 2.245). 2014;20:1518-26. DOI:無し

3. Maeda A, Palczewska G, Golczak M, Kohno H, Dong Z, Maeda T, Palczewski K. Two-photon microscopy reveals early rod photoreceptor cell damage in light-exposed mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* (IF=9.809). 2014;111(14):E1428-37. DOI: 10.1073/pnas.1317986111.

4. Sundermeier TR, Zhang N, Vinberg F,

Mustafi D, Kohno H, Golczak M, Bai X, Maeda A, Kefalov VJ, Palczewski K. DICER1 is essential for survival of postmitotic rod photoreceptor cells in mice. *FASEB J* (IF=5.480). 28:3780-91;2014. DOI: 10.1096/fj.14-254292.

5. Sawada O, Perusek L, Kohno H, Howell SJ, Maeda A, Matsuyama S, Maeda T. All-trans-retinal induces Bax activation via DNA damage to mediate retinal cell apoptosis. *Exp Eye Res* (IF=3.017). 2014;123C:27-36. DOI: 10.1016/j.exer.2014.04.003.

6. Sakai T, Ohkuma Y, Kohno H, Hayashi T, Watanabe A, Tsuneoka H. Three-year visual outcome of photodynamic therapy plus intravitreal bevacizumab with or without subtenon triamcinolone acetate injections for polypoidal choroidal vasculopathy. *Br J Ophthalmol* (IF=2.809). 2014 ;98:1642-8. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2014-305189.

[学会発表](計 7 件)

招待講演

1) 網膜変性におけるマイクログリア活性化と視細胞死の関連. 東京大学医科学研究所, 学友会セミナー (東京, 2014年2月18日)

2) 網膜変性におけるマイクログリア活性化と視細胞死の関連. 第6回泉央眼科研究会 (東京, 2014年4月18日)

3) Microglial activation in retinal degeneration. OIST mini-symposium. "Microglia: Key to Understanding Neural Development and Pathology" (Okinawa, March 1st 2015)

学会報告

1) 神野 英生, 酒井 勉, 前田 忠郎, 常岡 寛, 前田 亜希子. 網膜変性モデルにおけるマイクログリア活性化と視細胞死の関連. 第47回日本眼炎症学会. 大阪. 2013年7月

2) 神野 英生, 酒井 勉, 前田 忠郎, 常岡 寛, 前田 亜希子. CCL3の急性網膜変性と慢性網膜変性における相反する役割. 第48回日本眼炎症学会. 東京. 2014年7月

3) Hideo Kohno, Tsutomu Sakai, Tadao Maeda, Eric Pearlman, Krzysztof Palczewski, Akiko Maeda. The paradoxical role of CCL3 in acute and chronic retinal degeneration. ARVO 2014. Orlando. 2014, May.

4) Hideo Kohno, Tsutomu Sakai, Tadao Maeda, Hiroshi Tsuneoka, Akiko Maeda. Minocycline Administration Suppresses Microglia Activation in Vitro and Rescue All-Trans-Retinal Mediated Photoreceptor Cell Death in Vivo. WOC 2014. Tokyo. 2014, April

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://jikei-eye.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

神野 英生 (kohno hideo)

東京慈恵会医科大学・助教

研究者番号：60514536