

令和元年6月25日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10893

研究課題名(和文) 活性化型プロテインCによる網膜再灌流メカニズムの解明

研究課題名(英文) To elucidate the mechanism of retinal reperfusion by activated protein C

研究代表者

瓶井 資弘 (Kamei, Motohiro)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：40281125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：活性化型プロテインC(APC)による網膜血管再生効果を見るため、P12の酸素誘発網膜症(OIR)モデルマウスの眼内にAPCを投与し、非投与群と網膜虚血領域の面積をP17の時点で測定した結果、APC投与群の網膜虚血領域が非投与群よりも狭くなっており、OIRマウスにおいてAPCによる網膜虚血改善効果が確認できた。また、APCが網膜血管を構成するどの細胞の効果を及ぼしているか検討したところ、網膜アストロサイトが高酸素投与後P12の時点から網膜虚血領域においてその細胞密度が減少するが、APC投与群において虚血領域の網膜アストロサイトが残存していることから、APCの網膜アストロサイト保護作用が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性化型プロテインC(APC)の網膜血管再生効果を見るため、酸素誘発網膜症(OIR)モデルマウスの眼内にAPCを投与し、網膜虚血領域の面積を測定した結果、APCによる網膜虚血改善効果が確認できた。また、APCが網膜血管を構成するどの細胞に効果を及ぼしているか検討し、高酸素投与後から網膜虚血領域において網膜アストロサイトの細胞密度が減少するが、APC投与群において虚血領域の網膜アストロサイトが残存していることから、APCの網膜アストロサイト保護作用が示唆された。これらの結果と今後さらにAPCの作用機序が解明されれば、新たな虚血性網膜疾患治療薬としてのAPCの可能性が高まると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To examine the retinal reperfusion by activated protein C (APC), APC was administered into the eyes of P12 oxygen-induced retinopathy (OIR) mice, and the area of the non-administration group and the retinal ischemic area was measured at P17. The retinal ischemic area of the APC administration group was narrower than that of the control group, and the retinal ischemia improving effect by APC could be confirmed in the OIR mice. In addition, we examined which cells that constitute the retinal blood vessels had an effect on APC, and the cell density of retinal astrocytes decreased in the area of the retinal ischemia from P12 after hyperoxia, but was reduced in the APC administration group. Remaining retinal astrocytes in the blood region suggested that APC might protect the retinal astrocytes.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜 網膜虚血性疾患 網膜再灌流 神経保護 活性化型プロテインC (APC) 網膜アストロサイト 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

網膜虚血性疾患は、根治療法である血行再建が確立されていないため、後天性失明の主要原因となっている。我々は活性型プロテイン C (APC) の眼内投与により、広範囲の網膜再灌流に初めて成功したが、その詳細なメカニズムは不明である。そこで、APC による血行再建のメカニズムを解明し、将来的に更に有効な分子標的治療の開発や、全身の虚血性疾患への応用を目指す。本研究期間内には、どのような細胞が再灌流に関与しているのか、それらの細胞では再灌流に際しどのような分子が、どのような時期に発現しているのかを解明する。現在難治とされている網膜虚血性疾患、ひいては、全身の虚血性疾患に対する根治療法を確立することができれば、その社会的意義は計り知れないものである。また、脈管形成や血管新生の研究にも大きな方向性を示すことができると期待される。

2. 研究の目的

我々が発見した APC 投与後に時間をかけて虚血再灌流が生じる仕組みとして、1) 血管新生と、2) 既存血管の再灌流の、両方が緩徐に進行しているのではないかと考えている。網膜血管の構成要素には大きく分けて血管内皮細胞、周皮細胞、網膜アストロサイトの3種の細胞がある。これらの細胞のどの細胞に対し APC が関与し、網膜血管の再生が起こるのかを、in vivo 実験を用いて探るのが今回の実験の目的である。

3. 研究の方法

網膜虚血モデルの作成

今回の評価では、APC による血管再生能の評価が重要であるため、血管が退縮した網膜虚血領域の面積が安定して作成できるモデルが必要となる。網膜虚血の作成方法の候補としてローズベンガル静注と網膜静脈へのレーザー照射による網膜中心静脈閉塞症モデル (Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 246:509, 2008) と酸素誘発網膜症モデル (Oxygen-induced Retinopathy: OIR) がある。OIR はマウスを P7 から P12 にかけて 75% の高酸素下で飼育し、網膜の血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) 発現を低下させ網膜血管の退縮を促し網膜虚血を作成するモデルである。OIR は表層の網膜血管が完成したばかりの P7 の時点から網膜虚血を作成するモデルであり、レーザーによる網膜虚血作成方法とは異なり、生育途中の網膜血管に対し網膜虚血を作成する方法である。しかし網膜虚血を作成するモデルとして広く用いられているため、今回使用するモデルとして検討する。OIR を用いた網膜虚血の再生は、使用するマウスの種類によっての影響が指摘されているため、今回の評価では C57BL/6 マウスのみ用い検討を行った。

APC の投与方法

高酸素終了直後、マイクロインジェクターを用いてマウスの硝子体腔内に 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の APC を投与する。

網膜血管再生領域の評価

P21 以降に関しては、フルオレセインの腹腔内投与後、蛍光眼底造影を行い評価した。P21 未満に関しては網膜の Wholemout を作成し、血管領域は CD31 免疫染色を用いて評価した。

APC による網膜血管構成細胞への影響に対する評価

Wholemout に対する免疫染色を用いて評価を行った。内皮細胞に関して CD31 (Abcam, ab119341)、周皮細胞に関して NG2 (Millipore ab5320)、網膜アストロサイトに関しては GFAP を用いた。

4. 研究成果

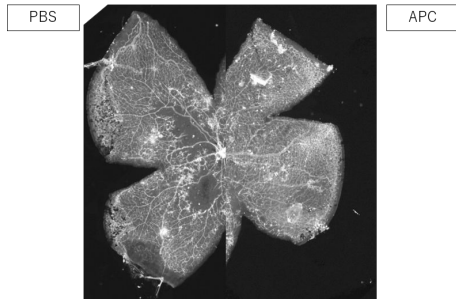
網膜虚血モデルマウス作成方法の確立と採用基準の設定

野生型マウスを用い、網膜静脈へのレーザー照射による網膜静脈閉塞モデルの作成を行った。これにより虚血領域の作成は可能であったが、安定した虚血領域を作成することができなかった。そこで OIR を用いて網膜虚血モデルを作成することとした。

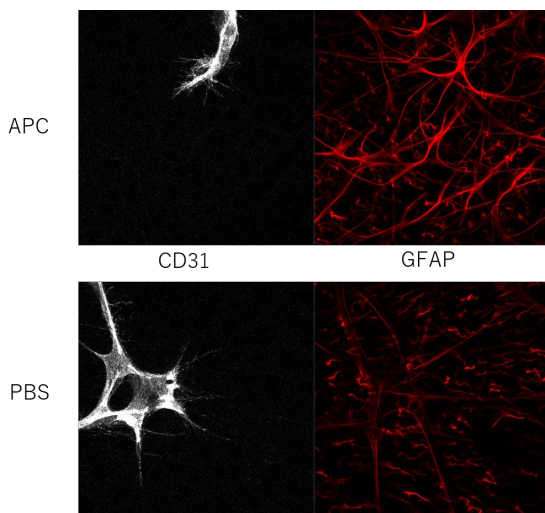
まずは APC 非存在下において、OIR で作成される虚血領域が安定して作成されているか評価するため、高酸素終了後、P12, P15, P17, P21, P28 の虚血領域を測定した結果、同腹仔においてばらつきはなかったが、異腹仔間ではばらつきがあることが分かった。次に虚血領域に影響する因子を検討したところ、体重が関与することが分かった。低体重のマウスほど虚血領域が広く、その後の血管再生が遅いことが分かった。しかもある時点での体重だけでなく、体重の推移が関与していることが分かった。よって今回の検討には、正確な虚血領域の測定のため、体重と体重の推移をそろえることとし、P12 の時点で 5g 台であることに加え、その後 P15, P17 の時点で体重が増加するマウスを用いるのが最良であることが判明した。

APC による網膜血管再生効果

OIR では、P12 から血管再生が開始し、P17 で血管再生の活性が最大化し、P21 前後には完了する。そこで今回の網膜虚血領域の評価タイミングは P17 とした。P12 の時点で眼内に APC を投与し、非投与群と網膜虚血領域の面積を P17 の時点で測定した結果、APC 投与群の網膜虚血領域が非投与群よりも狭くなったことが確認できた。モデルマウスにおいても APC による網膜虚血改善効果が証明できた。



APC が作用する網膜血管構成細胞の特定
 APC が網膜血管を構成する細胞の効果を及ぼしているか検討するため、網膜アストロサイトへの影響を検討した。網膜アストロサイトは高酸素負荷後の P12 の時点から、網膜虚血領域において密度が減少するが、APC 投与群においては、虚血領域の網膜アストロサイトが残存していることが確認できた。APC は網膜アストロサイトの保護作用があることが分かった。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

Sakimoto S, Gomi F, Sakaguchi H, Akiba M, Kamei M, Nishida K. Analysis of retinal nonperfusion using depth-integrated optical coherence tomography images in eyes with branch retinal vein occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015 Jan 8;56(1):640-6. doi: 10.1167/iovs.14-15673.

Tsuboi K, Ishida Y, Kamei M. Gap in Capillary Perfusion on Optical Coherence Tomography Angiography Associated With Persistent Macular Edema in Branch Retinal Vein Occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017 Apr 1;58(4):2038-2043. doi: 10.1167/iovs.17-21447.

Nishida K, Sakaguchi H, Kamei M, Shiraki N, Oura Y, Wakabayashi T, Hara C, Fukushima Y, Sato T, Sayanagi K, Sato S, Fukuda M, Nishida K. Simulation of panretinal laser photocoagulation using geometric methods for calculating the photocoagulation index. *Eur J Ophthalmol*. 2017 Mar 10;27(2):205-209. doi: 10.5301/ejo.5000865. Epub 2016 Sep 13.

Kamei M, Terasaki H, Yoshimura N, Shiraga F, Ogura Y, Grotzfeld AS, Pilz S, Ishibashi T. Short-term efficacy and safety of ranibizumab for macular oedema secondary to retinal vein occlusion in Japanese patients. *Acta Ophthalmol*. 2017 Feb;95(1):e29-e35. doi: 10.1111/aos.13196. Epub 2016 Sep 22.

Kamei M. Problems Related to Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment for Retinal Vein Occlusion. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 2016 May;120(5):361-3.

Takeyama M, Takeuchi F, Goshō M, Sugita K, Zako M, Iwaki M, Kamei M. Effect of oral tranexamic acid

on macular edema associated with retinal vein occlusion or diabetes. *Clin Ophthalmol*. 2017 Dec 20;12:35-41. doi: 10.2147/OPTH.S149935. eCollection 2018.

Hara C, Kamei M, Sakaguchi H, Matsumura N, Sakimoto S, Suzuki M, Nishida K, Fukushima Y, Nishida K. Activated Protein C for Ischemic Central Retinal Vein Occlusion: One-Year Results. *Ophthalmol Retina*. 2019 Jan;3(1):93-94. doi: 10.1016/j.oret.2018.07.012. Epub 2018 Jul 25.

Hayashi H, Mamun AA, Takeyama M, Yamamura A, Zako M, Yagasaki R, Nakahara T, Kamei M, Sato M. Activator of G-protein signaling 8 is involved in VEGF-induced choroidal neovascularization. *Sci Rep*. 2019 Feb 7;9(1):1560. doi: 10.1038/s41598-018-38067-4.

Nishida K, Miura K, Sakaguchi H, Kamei M, Wakabayashi T, Hara C, Sakimoto S, Fukushima Y, Sayanagi K, Sato S, Fukuda M, Nishida K. The impact of spot size, spacing, pattern, duration and intensity of burns on the photocoagulation index in a geometric simulation of pan-retinal laser photocoagulation. *Acta Ophthalmol*. 2019 Jun;97(4):e551-e558. doi: 10.1111/aos.13939. Epub 2018 Dec 3.

Fukutomi A, Tsuboi K, Ono H, Ishida Y, Kamei M. Sequential Observations of Conversion from Nonischemic to Ischemic Central Retinal Vein Occlusion Using Optical Coherence Tomography Angiography. *Case Rep Ophthalmol Med*. 2018 Apr 23;2018:1354217. doi: 10.1155/2018/1354217. eCollection 2018

Tsuboi K, Sasajima H, Kamei M. Chorioretinal Shunt Vessel in Eyes with Central Retinal Vein Occlusion after Radial Optic Neurotomy. *Ophthalmology*. 2018 Sep;125(9):1409. doi: 10.1016/j.ophtha.2018.06.035. Epub 2018 Aug

Shiraki A, Sakimoto S, Tsuboi K, Wakabayashi T, Hara C, Fukushima Y, Sayanagi K, Nishida K, Sakaguchi H, Nishida K. Evaluation of retinal nonperfusion in branch retinal vein occlusion using wide-field optical coherence tomography angiography. *Acta Ophthalmol*. 2019 Mar 22. doi: 10.1111/aos.14087.

Tsuboi K, Sasajima H, Kamei M. Collateral Vessels in Branch Retinal Vein Occlusion: Anatomic and Functional Analyses by OCT Angiography. *Ophthalmol Retina*. 2019 Apr 18. pii: S2468-6530(19)30049-1. doi:

Tsuboi K, Kamei M. Longitudinal vasculature changes in branch retinal vein occlusion with projection-resolved optical coherence tomography angiography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2019 Jun 5. doi: 10.1007/s00417-019-04371-6.

〔学会発表〕(計7件)

瓶井資弘「慢性期 BRVO の毛細血管障害とレーザー光凝固」第 32 回日本眼循環学会(招待講演)(東京) 2015 年 12 月 04 日

瓶井資弘「虚血型網膜中心静脈閉塞症に対する活性化プロテイン C(APC)の長期成績」第 120 回日本眼科学会総会(招待講演)(宮城) 2016 年 04 月 07 日

Kamei M, “Long term outcomes of intravitreal activated Protein C for ischemic central retinal vein occlusion” XXXth Meeting of the Club Jules Gonin (国際学会), Bordeaux, France, 2016 年 07 月 08 日

Kamei M, “Current and Future Treatments for Retinal Vein Occlusion.”The 5th Annual Stanley Chang, MD Lectureship (招待講演)(国際学会) Columbia University, NY, 2016 年 09 月 29 日

山本敬子、植村明嘉、瓶井資弘、「APC は虚血領域のアストロサイトの Tlx を上昇させ、正常な血管リモデリングを誘導する」愛知眼科フォーラム(愛知) 2017 年 9 月

白木幸彦、植村明嘉、瓶井資弘、「anti-PDGFR 抗体を使用した遷延する網膜虚血モデルマウスの作成」愛知眼科フォーラム(愛知) 2018 年 9 月

山本敬子、植村明嘉、瓶井資弘、「活性化プロテイン C は虚血網膜における血行再建を促進する」愛知眼科フォーラム（愛知）2018年9月

〔図書〕(計0件)

〔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

<http://www.aichi-med-eye.com/>

<https://www.aichi-med-u.ac.jp/hospital/sh04/sh0402/sh040209/index.html>

6. 研究組織

研究代表者

瓶井 資弘 (KAMEI, Motohiro)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：40281125

研究分担者

植村 明嘉 (UEMURA, Akiyoshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30373278

研究分担者

西田 健太郎 (NISHIDA, Kentaro)

大阪大学・医学系研究科・寄付講座・助教

研究者番号：70624229

研究分担者

福嶋 葉子 (FUKUSHIMA, Yoko)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70647031

研究分担者

坂口 裕和 (SAKAGUCHI, Hirokazu)

大阪大学・医学系研究科・寄付講座・准教授

研究者番号：80379172

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。