

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10898

研究課題名(和文) 硝子体血管の異所性網膜内進入によるPHPV発症機構の解明

研究課題名(英文) Identification of mechanisms underlying ectopic hyaloid invasion into retina in PHPV

研究代表者

吉田 宗徳 (Yoshida, Munenori)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60273447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：第一次硝子体形成遺残では、残存した硝子体血管がしばしば網膜表面に付着する。我々は以前、semaphorin 3E (Sema3E) ノックアウトマウスにおいて、硝子体血管が網膜内に異所性に進入し、網膜ヒダを形成することを確認していた(Fukushima et al. J Clin Invest 2011)。本研究課題では、網膜神経節細胞由来のSema3Eが、硝子体血管の内皮細胞に発現するPlexinD1に結合することにより低分子量G蛋白質RhoJが活性化され、硝子体血管の異所性網膜内進入を抑制していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In persistent hyperplastic primary vitreous (PHPV), remaining hyaloid vessels often adhere to retinal surfaces. We previously found that in semaphorin 3E (Sema3E) knockout mice, hyaloid vessels ectopically invaded into retinas, leading to the formation of retinal folds (Fukushima et al. J Clin Invest 2011). In this research project, Sema3E derived from retinal ganglion cells bound to PlexinD1 on the endothelial cell surfaces of hyaloid vessels and activated a small GTPase RhoJ, thereby preventing ectopic hyaloid invasion into the retina.

研究分野：眼科学

キーワード：PHPV 硝子体血管 網膜 内皮細胞 Sema3E PlexinD1 RhoJ

1. 研究開始当初の背景

第一次硝子体過形成遺残 (persistent hyperplastic primary vitreous [PHPV] または persistent fetal vasculature [PFV]) では、硝子体血管内皮細胞のアポトーシス異常や、網膜血管形成不全に伴う眼内 VEGF 濃度上昇が、硝子体血管退縮遅延を惹起すると考えられている。しかし PHPV は多様な病型を呈する症候群であるとともに、様々な遺伝性素因や環境因子が発症要因として指摘されており、個体により発症機構が異なると考えられる。我々は以前の研究において、semaphorin 3E (Sema3E) ノックアウト (KO) マウスが硝子体血管の異所性網膜内進入に伴って PHPV を呈することを見出していた (Fukushima et al. J Clin Invest. 2011)。さらに発生期マウス網膜では神経節細胞から分泌される Sema3E が、血管内皮細胞の PlexinD1 受容体に結合して低分子量 G 蛋白質 RhoJ を活性化することにより、新生血管を退縮させることを報告している (Fukushima et al. J Clin Invest. 2011)。しかし、硝子体血管の退縮や残存における Sema3E-PlexinD1-RhoJ シグナルの意義については不明であった。

2. 研究の目的

Sema3E ノックアウト (KO) マウスおよび RhoJ-KO マウスの解析により、硝子体血管の異所性網膜内進入による PHPV 発症機構を検証し、さらに Sema3E-PlexinD1-RhoJ シグナルによる網膜血管と硝子体血管の吻合の制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス

野性型 C57BL/6 マウス、ephrinB2-lacZ マウス (Wang et al. Cell. 1998)、EphB4-lacZ マウス (Gerety et al. Mol Cell. 1999)、Sema3E-KO マウス (Gu et al. Science. 2005)、RhoJ-KO マウス (Kim et al. Cancer Cell. 2014) を使用した。

(2) 眼組織解析

マウス眼球パラフィン切片にてヘマトキシリン・エオジン染色を実施した。マウス眼球凍結切片および網膜・硝子体ホルマウント標本にて、免疫組織化学染色および in situ hybridization を実施した。

(3) 生体マウス網膜イメージング

超広角走査型レーザー検眼鏡 (Optos) にてマウス眼底撮影およびフルオレセイン蛍光血管造影を行った。また、光干渉断層計 (OCT) にて硝子体-網膜界面の観察を行った。

(4) マウス硝子体注射

タングステン針にてマウス眼球輪部を穿孔した後、ガラスキャピラリーを装着したマイクロインジェクターにて硝子体腔に Sema3E

リコンビナント蛋白質を注入した。

(5) 細胞分子生物学的解析

培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) において遊走アッセイや生化学的アッセイを行った。また、RhoJ-KO マウスから採取した大動脈輪を用いて ex vivo 血管新生アッセイを行った。

4. 研究成果

(1) 硝子体血管と網膜血管の吻合

出生直後のマウス眼では、視神経乳頭周囲の毛細血管網から新生血管が網膜内に伸長する。当初は一樣な大きさの血管叢が形成され、内皮細胞は静脈マーカーである EphB4 を発現していた。その後、生後3日に動脈マーカーである ephrinB2 を発現する内皮細胞が出現し、動脈・静脈・毛細血管が形態的にも明瞭に区別される。さらに視神経乳頭部付近での硝子体血管と網膜との位置関係を詳細に観察することにより、生後3日に硝子体動脈が網膜毛細血管と吻合することによって、網膜動脈が急速に形成されることが明らかとなった。

(2) 眼発生における Sema3E-PlexinD1-RhoJ シグナル

網膜の発生過程では、神経節細胞層内の約30%のニューロンが Sema3E を発現する。一方、硝子体血管の内皮細胞は PlexinD1 受容体を発現することが明らかとなった。また、Sema3E-KO マウスでは、網膜血管発生が開始する出生以前から、硝子体血管の一部が網膜表面に付着し、網膜ヒダを形成することが明らかとなった。こうしたヒト PHPV と同様の表現型は、成体に至るまで持続した。さらに RhoJ-KO マウスでも同様の表現型が観察された。これらの結果から、ニューロン由来の Sema3E が硝子体血管内皮細胞の PlexinD1 に結合して RhoJ を活性化することにより、硝子体血管の異所性網膜内進入を抑制していると考えられた。

(3) Sema3E シグナルによる内皮細胞運動の制御機構

培養 HUVEC を用いた解析により、Sema3E 刺激によって、PlexinD1 細胞内 Rho-binding ドメインより遊離した活性型 RhoJ がアクチン線維の脱重合を誘導することが明らかとなった。さらに RhoJ-KO 内皮細胞では、新生血管内における運動方向が無秩序になる結果、網膜血管発生が遅滞することが明らかとなった。

(4) 眼内 Sema3E 投与による PHPV 治療効果

Sema3E-KO マウス眼球内に Sema3E リコンビナント蛋白質を投与することにより、残存硝子体血管の退縮を誘導できることが明らかとなった。しかし Sema3E 投与は網膜血管網の形成異常も惹起するため、臨床応用に向け

たさらなる検証が必要であると考えられた。

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 12 件)

1. Kurobe R, Hirano Y, Niwa N, Sugitani K, Yasukawa T, Yoshida M, Ogura Y. Wide-field fluorescein and indocyanine green angiography findings in the eyes with Vogt-Koyanagi-Harada disease. J Ophthalmic Inflamm Infect. ; 7: 16, 2017 PMID: 28695542

2. Suzuki N, Hirano Y, Yoshida M, Tomiyasu T, Uemura A, Yasukawa T, Ogura Y. Microvascular Abnormalities on Optical Coherence Tomography Angiography in Macular Edema Associated With Branch Retinal Vein Occlusion. Am J Ophthalmol ; 161:126-132, 2016 PMID: 26454243

3. Nozaki M, Hamada S, Kimura M, Yoshida M, Ogura Y. Value of OCT Angiography in the Diagnosis of Choroidal Neovascularization Complicating Multiple Evanescent White Dot Syndrome. Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina. ; 47: 580-584, 2016 PMID: 27327289

4. Tomiyasu T, Hirano Y, Yoshida M, Suzuki N, Nishiyama T, Uemura A, Yasukawa T, Ogura Y. Microaneurysms cause refractory macular edema in branch retinal veinocclusion. Sci Rep. 8; 6: 29445, 2016 PMID: 27389770

5. Tomiyasu T, Nozaki M, Yoshida M, Ogura Y. Characteristics of Polypoidal Choroidal Vasculopathy Evaluated by Optical Coherence Tomography Angiography. Invest Ophthalmol Vis Sci. ; 57: OCT324-330, 2016 PMID: 27409489

6. Hasegawa N, Nozaki M, Takase N, Yoshida M, Ogura Y. New Insights Into Microaneurysms in the Deep Capillary Plexus Detected by Optical Coherence Tomography Angiography in Diabetic Macular Edema. Invest Ophthalmol Vis Sci. ; 57: OCT348-355, 2016 PMID: 27409492

7. Kimura M, Nozaki M, Yoshida M, Ogura Y. Wide-field optical coherence tomography angiography using extended field imaging technique to evaluate the nonperfusion area in retinal vein occlusion. Clin Ophthalmol. ; 10: 1291-1295, 2016 PMID:

27471374

8. Suzuki N, Hirano Y, Tomiyasu T, Esaki Y, Uemura A, Yasukawa T, Yoshida M, Ogura Y. Retinal Hemodynamics Seen on Optical Coherence Tomography Angiography Before and After Treatment of Retinal Vein Occlusion. Invest Ophthalmol Vis Sci. ; 57: 5681-5687, 2016 PMID: 27784073

9. Suetsugu T, Kato A, Yoshida M, Yasukawa T, Nishiwaki A, Hasegawa N, Usui H, Ogura Y. Evaluation of peripheral fundus autofluorescence in eyes with wet age-related macular degeneration. Clin Ophthalmol. ; 10: 2497-2503, 2016 PMID: 28008222

10. Takase N, Nozaki M, Kato A, Ozeki H, Yoshida M, Ogura Y. Enlargement of Foveal Avascular Zone in Diabetic Eyes Evaluated by en face Optical Coherence Tomography Angiography. Retina ; 35: 2377-2383, 2015 PMID: 26457396

11. Kato A, Yasukawa T, Suga K, Hirano Y, Nozaki M, Yoshida M, Ogura Y. Intravitreal ranibizumab for patients with neovascular age-related macular degeneration with good baseline visual acuity. Ophthalmologica; 233:27-34, 2015 PMID: 25412682

12. Ogura S, Yasukawa T, Kato A, Kuwayama S, Hamada S, Hirano Y, Uemura A, Yoshida M, Ogura Y. Indocyanine Green Angiography-Guided Focal Laser Photocoagulation for Diabetic Macular Edema. Ophthalmologica; 234:139-150, 2015 PMID: 26393771

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Tomiyasu T, Hirano Y, Suzuki N, Yoshida M, Uemura A, Yasukawa T, Ogura Y. Predictive factors for visual outcome and risk factors for persistent macular edema in patients with branch retinal vein occlusion. 2016 Annual meeting , Association for Research in Vision and Ophthalmology, Seattle, USA, 2016

2. Suzuki K, Mizutani T, Nozaki M, Kato A, Yoshida M, Ogura Y. Persistent choroidal neovascularization in high myopia detected by optical coherence tomography angiography. 2016 Annual meeting , Association for Research in Vision and Ophthalmology, Seattle, USA, 2016

3. Suzuki N, Hirano Y, Yoshida M, Tomiyasu

T, Uemura A, Yasukawa T, Ogyra Y.
Microvascular abnormalities on optical
coherence tomography angiography in
macular edema associated with branch
retinal vein occlusion. 2016 Annual
meeting , Association for Research in
Vision and Ophthalmology, Seattle, USA,
2016

4. Tomiyasu T, Hirano Y, Ogura Y, Suzuki
N, Yasukawa T, Yoshida M. Earlier
administration of anti-VEGF agents
reduces microaneurysm formation in branch
retinal vein occlusion, The 10th Congress
of the Asia-Pacific Vitreo-retina Society,
Bangkok, Thailand, 2016

〔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〕

ホームページ等

<http://ncu-ganka.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 宗徳 (YOSHIDA, Munenori)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教
授
研究者番号：60273447

(2)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

小椋 祐一郎 (OGURA, Yuichiro)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70191963

(3)連携研究者

福嶋 葉子 (FUKUSHIMA, Yoko)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70647031

西山 功一 (NISHIYAMA, Koichi)
熊本大学・国際先端医学研究機構・准教授
研究者番号：80398221

(4)研究協力者

該当なし