

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20243

研究課題名(和文) マイクログリアの新規接着因子Ninjurin1を標的とした糖尿病網膜症の病態解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of diabetic retinopathy targeting Ninjurin1 in microglia

研究代表者

下内 昭人 (SHIMOUCHI, AKITO)

旭川医科大学・大学病院・診療助教

研究者番号：60647692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病網膜症は失明の原因となる疾患である。マイクログリアはその病態に深く関与しているが、その機序の詳細は分かっていない。本研究は、糖尿病網膜症の病態解明を目的として、接着因子であるNinjurin 1に着目し、網膜血管新生で重要な役割をしているマイクログリアにおける特異的Ninjurin 1の役割を検討した。その結果、正常血管新生と病的血管新生でのマイクログリアにおけるNinjurin1の役割は異なる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Diabetic retinopathy is a leading cause of blindness. Microglia are deeply involved in the pathology of diabetic retinopathy. Although, much of the mechanism remains unknown. This study aimed to investigate the pathogenesis of diabetic retinopathy targeting the role of Ninjurin1, an adhesion factor, in microglia that play an important role in retinal neovascularization. Our observations suggested that Ninjurin1 in microglia had a different role during physiological and pathological retinal neovascularization.

研究分野：糖尿病網膜症

キーワード：Ninjurin1 血管新生 糖尿病網膜症 マイクログリア 接着因子 BV-2 高酸素負荷モデル 未熟児網膜症

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は本邦の中途失明の主因であり、その病態解明と治療法の確立は急務である。糖尿病網膜症では、持続的な高血糖による網膜循環障害が無灌流領域の形成を惹起し、網膜の組織低酸素に伴い血管新生が起こる。最終的には難治性の出血や網膜剥離が繰り返され、視機能が不可逆的に失われる。これまでの研究成果から、血管新生において、血管内皮増殖因子 (VEGF) が重要な役割を果たしていることが証明された。それにより現在、進行した網膜症に対して抗 VEGF 療法が臨床で用いられており、ある一定の成果を上げている。しかし、抗 VEGF 療法の血管新生抑制効果は一過性であり、網膜に無灌流領域がそのまま残存するため、低酸素状態に反応して血管新生が再発してしまう問題がある。したがって、無灌流領域と網膜血管新生の発生メカニズムを明らかにし、早期介入が可能で新規治療薬を開発することが必須といえる。

2. 研究の目的

マイクログリアは免疫担当細胞として、網膜での免疫担当細胞であり、恒常性維持に重要な役割を果たしている。一方で、マイクログリアが血管新生や血管退縮において重要な役割を果たしていることが明らかになってきており、糖尿病網膜症の発症にも深く関与しているが、その詳細な機構は明らかになっていない。

近年、神経細胞の接着因子として知られていた Ninjurin1 (Nerve injury-induced protein 1) が、骨髄由来細胞の遊走や接着に重要な因子であることが報告されてきた。具体的に、マクロファージに発現する Ninj1 が周皮細胞に作用し、硝子体血管の退縮に関与していることが報告された (Lee H. J et al. Cell Death Differ 2009)。網膜マイクログリアにおける Ninjurin1 が網膜血管新生や無灌流領域の形

成に重要な役割を果たしていると考えられるが、その役割は全く解明されていない。

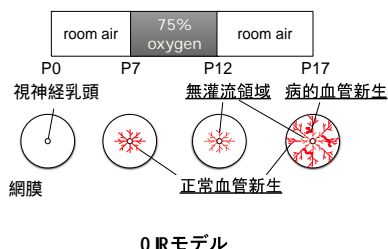
そこで本研究では、マイクログリア特異的 Ninj1-KO マウスを用いて、網膜での無灌流領域の形成および血管新生におけるマイクログリア特異的 Ninj1 の役割を解明することを目的とする。これにより得られた知見に基づき、応用研究を展開するに資する研究基盤を形成し、糖尿病網膜症に対して早期介入を可能とする根本的新規治療薬の開発に向けた模索をする。

3. 研究の方法

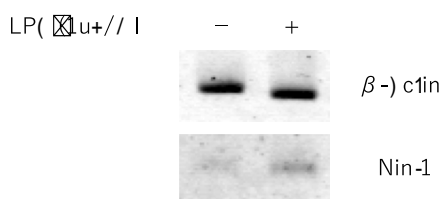
(1) 活性化マイクログリアと Ninjurin1 の関連性を解明するために、培養マイクログリア BV-2 細胞株を用いて Ninjurin1 の発現を RT-PCR を用いて定量した。培養マイクログリア BV2 細胞株 2×10^5 cell/ml を 24 時間かけて血清飢餓させ、LPS (リポポリサッカライド) $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ を用いて活性化させた。6 時間後に細胞を回収し、Ninjurin1 の発現を RT-PCR により定量した。また、コントロールには β -actin を用いた。

(2) 仔マウスは出生時には網膜血管は発達しておらず、生後に表層から深層にかけて徐々に発達していく。そこで本研究では、正常血管新生における Ninjurin1 の発現を検討するために、生後 1、5、7、12 日目の仔マウスの網膜を用いて免疫染色を行った。摘出した仔マウスの眼球を用いて凍結切片を作成し、血管内皮細胞をイソレクチン B4 (IB4) で、Ninjurin1 を抗 Ninjurin1 抗体 (Ninj1)、細胞核は DAPI を用いて染色した。また、血管新生に重要な役割を果たしているマイクログリアを Iba1 抗体で染色し、Ninjurin1 との関連性を検討した。次に、Ninjurin1 の発現を調べるため、同じく生後 1、5、7、12 日目の仔マウスの網膜を用いてウェスタンブロッティングを行った。

(3) 病的血管新生における Ninjurin1 の発現を検討するために、高酸素負荷虚血網膜症モデルマウスを作成した。高酸素負荷虚血網膜症モデルマウスは、日齢7日目のマウスを75%高酸素条件下で5日間飼育することで、無灌流領域を作成。その後17日目まで正常酸素環境下で育てることにより、病的血管新生を発生させるモデルである(下図参照)。本研究では、生後12日目と17日目のマウスの網膜を用いて、免疫染色により Ninjurin1 の発現と局在、およびマイクログリアとの関連性を検討した。次にウェスタンブロッティングを行い、Ninjurin1 の発現を検討した。



(4) マイクログリアに特異的に発現している Ninjurin1 の役割を検討するため、Cx3cr-1-cre マウスを購入し、ジェノタイピングを行いながら自家繁殖させた。



4. 研究成果

(1) 培養マイクログリア BV-2 株における Ninjurin1 の発現を RT-PCR を用いて定量したところ、正常環境下でもマイクログリアに Ninjurin1 が発現していることが確認された。次に、LPS 刺激により活性化させたマイクログリアにおける Ninjurin1 の発現を検討したところ、正常環境下と比較して、活性化したマイクログリアでは Ninjurin1 の発現が増加する傾向を認めた(図1)。これは骨髄由来

細胞に Ninjurin1 が発現しており、活性化した際にその発現が増加するという既報の結果と同様であり、マイクログリアにも骨髄由来細胞と同じく Ninjurin1 が存在し、活性化するとその発現が増加することが本研究により初めて明らかになった。

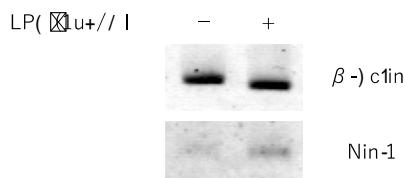
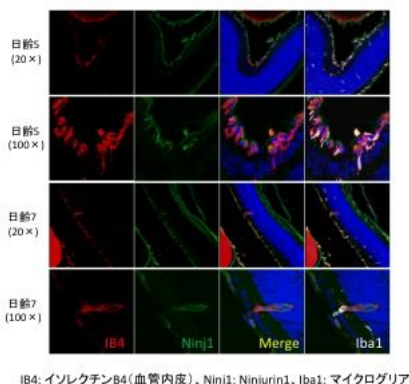


図1 RT-PCRの結果

(2) 正常網膜血管新生における Ninjurin1 の発現をウェスタンブロッティングにより検討したところ、生後1日目、5日目、7日目と徐々に増加していく傾向が見られた。次に免疫染色を用いて局在を検討したところ、血管及び血管周囲に Ninjurin1 の強い発現を認め、その周囲にはマイクログリアが遊走していることが確認された(図2)。Ninjurin1 は骨髄由来細胞の遊走や血管内皮細胞への接着に関与することが分かっている。また、血管周皮細胞に存在し、血管の形成や退縮に関与していることが報告されている。本研究の結果から、網膜の正常血管新生に Ninjurin1 が関与していることが示唆された。また、マイクログリアと血管との関わりに Ninjurin1 が関与していることが示唆された。

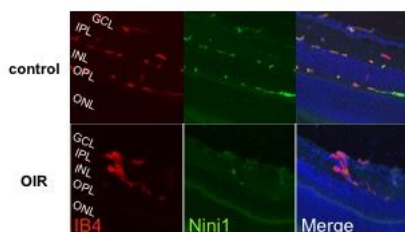


IB4: イソレクチンB4(血管内皮)、Ninj1: Ninjurin1、Iba1: マイクログリア

図2 日齢5, 7の網膜を用いた免疫染色

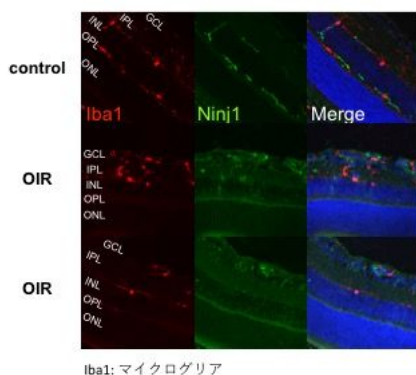
(3) 病的血管新生における Ninjurin1 の発現を検討するために、高酸素負荷虚血網膜症モデルマウスを用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、日齢 12 日目と日齢 17 日目では、同じ日齢の正常なマウスの網膜と比較して、Ninjurin1 の発現は低下していた。次に、免疫染色を用いて Ninjurin1 の発現と局在について検討したところ、ウェスタンブロッティングの結果と同様に、病的血管新生周囲の Ninjurin1 の発現は低下していた。これらの結果は、前述の正常血管新生での発現と異なる傾向が見られた。

これまでの結果から、Ninjurin1 は正常血管新生においては血管周囲での発現が増加し、マイクログリアと共に血管新生に関与している可能性が示唆されたのに対し、病的血管新生では Ninjurin1 の発現は低下を示していたことから、Ninjurin1 は正常血管新生と病的血管新生で異なる役割をしている可能性が示唆された (図 3)。



OIR: 高酸素負荷虚血網膜症モデル
IB4: イソレクチンB4 (血管内皮)
Ninj1: Ninjurin1

GCL: 神経節細胞層, IPL: 内網状層, INL: 内顆粒層
OPL: 外網状層, ONL: 外顆粒層



Iba1: マイクログリア

図 3 日齢 17 の網膜を用いた免疫染色

(4) Cx3cr1-cre マウスの繁殖は順調に行うことができ、ジェノタイプングで確認することができた。しかし、Ninjurin1 の Lox-P マウスの供給が追いつかず、研究期間内に掛け合わせを行うことができなかつたため、マイクログリア特異的 Ninjurin1 ノックアウトマウスの作成はできなかった。また、研究体制の変化や施設の改築などが重なり、それらも大きく本研究に影響した。今後さらに実験を推進していくために、新たな研究体制を整える必要がある。

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)

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下内 昭人 (SHIMOUCHI, Akito)
旭川医科大学・大学病院・診療助教
研究者番号: 60647692

(2) 研究協力者

吉田 晃敏 (YOSHIDA, Akitoshi)

長岡 泰司 (NAGAOKA, Taiji)

横田 陽匡 (YOKOTA, Harumasa)

松本 千恵美 (MATSUMOTO, Chiemi)

川辺 淳一 (KAWABE, Junichi)

木村 昭治 (KIMURA, Shoji)