

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16984

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症における網膜マイクログリアの活性化分子機構と機能解析

研究課題名(英文) The molecular and functional analysis of retinal microglia in diabetic retinopathy

研究代表者

大内 亜由美 (Usui-Ouchi, Ayumi)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：80645664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病網膜症において、重篤な視機能障害をもたらす網膜病的新生血管の形成と、網膜マイクログリアの活性機序および病態関与について検討した。虚血網膜症モデルにおいて、網膜マイクログリアにおけるTgf $\beta$ シグナルによる活性制御は、網膜病的血管新生において、重要な役割を持つ可能性が示された。また、Vldlrノックアウトマウスにおける網膜下病的新生血管の発生において、マイクログリアは決定的因子であり、マイクログリアの制御が網膜下新生血管形成阻害および視機能改善をもたらすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病網膜症は、近年、硝子体手術機器や抗VEGF薬など薬物療法の進歩により、治療成績は向上してきているものの、発症や進行を予防する治療法は存在せず、我が国の中途失明原因の第3位であり、年間約3000人が失明に近い状態に至っている。本研究成果は、網膜マイクログリアが、網膜病的血管新生を制御する可能性を示しており、糖尿病網膜症を始め重篤な視機能障害をもたらす未熟児網膜症や加齢黄斑変性症など、病的血管新生を主病態とする疾患において、従来の抗VEGF療法のみならず、マイクログリアをターゲットとした治療の有効性を示唆する重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：We investigated that the interaction between the pathology of neovascular formation, which is the cause of severe visual function loss in diabetic retinopathy and the mechanism of microglial activation in retina. In a mouse model of ischemic retinopathy, we have revealed that Tgf $\beta$  signal in retinal microglia regulates microglia activation and plays an essential role in neovascular tufts formation in the retina. Moreover, it was also suggested that retinal microglia were critical for retinal neovascular formation in Vldlr knock-out mice, and the pharmacological modulation of microglia rescued the neovascular tufts formation and improved visual function loss.

研究分野：眼科学

キーワード：マイクログリア 糖尿病網膜症 網膜血管新生 未熟児網膜症 加齢黄斑変性症

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は、近年、硝子体手術機器や抗VEGF薬など薬物療法の進歩により、治療成績は向上してきているものの、発症や進行を予防する治療法は存在せず、いまだ我が国の中途失明原因の第3位であり、年間約3000人が失明に近い状態に至っている。また、現在本邦の糖尿病患者は950万人で増加の一途をたどっており、さらに発症の若年化を認めていることから、今後も網膜症患者の増加、および重症例の増加が想定される。これらの背景から、糖尿病網膜症の発症進展メカニズムの更なる解明とそれに基づく新規治療の開発が急務である。

また、マイクログリアは中枢神経系における免疫担当細胞であり、神経栄養および保護作用により、中枢神経系の恒常性を維持している。一方で、アルツハイマー病やパーキンソン病など神経変性疾患などにおいては、マイクログリアの細胞特性が変化することで、慢性炎症や神経障害などの病態の中心的な役割を担っていることが報告され、新たな治療標的として注目されている。

網膜においても、これまで遺伝性網膜色素変性症や加齢黄斑変性などの様々な網膜変性疾患において、マイクログリアの関与が報告されている。一方で、糖尿病網膜症においても、マイクログリアの活性化が、視細胞の障害、線維化、血管新生の促進などの病態において様々な役割を担っている可能性が示唆されている (Lu li et al., Exp Eye Res, 2015)。また近年、Streptozotocinを用いた1型糖尿病ラットにおいて、糖尿病発症後ごく初期から網膜内のマイクログリアの分布や形態変化などの異常が認められることが報告されており、これらの変化が糖尿病網膜症の細小血管障害および神経障害にどのように関与しているかという点の解明が期待されている (X. Chen et al., Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2015)。これらのことから、網膜常在型マイクログリアが、糖尿病網膜症の発症進展に重要な役割を果たし、有力な治療標的細胞になり得ると期待されているが、これまでに網膜常在型マイクログリアにおける活性化機序は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

糖尿病網膜症、未熟児網膜症などに代表して見られ、視機能障害の原因として最も重要である、網膜新生血管の発症と網膜マイクログリアの活性化機序および病態への関与を、網膜血管新生モデルマウスを用いて解明すること。

## 3. 研究の方法

1) 高酸素負荷網膜血管新生(Oxygen-induced retinopathy; OIR)モデルマウスにおける網膜マイクログリアの検討。

マウス糖尿病モデルは網膜新生血管を発症しないため、虚血網膜症により網膜病的新生血管を呈するOIRモデルマウスを用いて、マイクログリアをフローサイトメトリーにて同定および単離し、マイクログリアの変化および遺伝子発現変化を検討した。

2) マイクログリア特異的 Tgfr2 ノックアウトマウスにおける網膜病的血管新生の検討。

網膜マイクログリアの活性化に重要なシグナルとしてTgfbシグナルに着目し、Tgfr2<sup>flox</sup>; Cx3Cr1<sup>Cre</sup> マウスを作成した。マイクログリア特異的v Tgfbシグナルの欠損によるマイクログリアの活性化が、網膜血管新生形成に示す影響について、OIRモデルを作成し検討した。

3) Vldlr knock-out マウスの網膜下新生血管形成における網膜マイクログリアの検討。

網膜新生血管と網膜マイクログリアの関連を調べるため、網膜外層に病的新生血管を形成し、加齢黄斑変性症の一種である、網膜血管腫状増殖やMacular TelangiectasiaのモデルであるVldlr knock-outマウス (Vldlr<sup>-/-</sup>) を用いて検討を行った。薬剤および遺伝学的にマイクログリアを除去し、網膜下新生血管の形成およびメカニズムさらに視機能への影響について検討した。

## 4. 研究成果

1) OIR マウス網膜では、正常酸素下マウスと比較して、高酸素条件下のP10から網膜新生血管の出現がピークとなるP17にかけて徐々にマイクログリア(Cd11b<sup>+</sup>Ly6C/G<sup>-</sup>Cx3cr1<sup>+</sup>)の数が増加し、その後もさらにマイクログリアの増加は続き、網膜血管の再構築が進むP25がピークとなり約3倍の数であった。この結果から、マイクログリアは網膜虚血新生血管および、網膜血管再構築に重要な役割を担っている可能性が示唆された。そこでP15 OIRと正常マウス網膜よりCd11b陽性マイクログリアを単離し、遺伝子発現変化をqPCRで検討したところ、OIRマイクログリアにおいてVegfaが有意に発現上昇していた他に、Tgfb受容体の発現が有意に低下していた。これらから、マイクログリアにおけるTgfbシグナルの低下が虚血新生血管形成に関与している可能性が示唆された (投稿準備中)。

2) マイクログリア特異的Tgfr2ノックアウトマウスの網膜マイクログリアはameboid状の強い活性型の表現形を呈し、perivascular area に集まることを確認した。同マウスを用いてOIRモデルを作成したところ、網膜新生血管がコントロールマウスと比較して有意に悪化した(投稿準備中)。同マウスより、マイクログリアをフローサイトメトリーで単離し、網膜新生血管に与する遺伝子の発現をコントロールと比較すると、糖尿病網膜症、未熟児網膜症の発症に重要な成長因子が数十倍上昇していることが明らかとなった(投稿準備中)。これらより、網膜マイクログリアにおいてTgfbシグナルによる活性制御が網膜新生血管形成に重要な役割を持つ可能性が示唆された。

3) 網膜新生血管と網膜マイクログリアの関連を調べるため、網膜外層に病的新生血管を形成し、加齢黄斑変性症の一種である、網膜血管腫状増殖やMacular TelangiectasiaのモデルであるVldlr knock-outマウス (Vldlr<sup>-/-</sup>)を用いて検討を行った。マイクログリア特異的にGFPを発現するVldlr<sup>-/-</sup> Cx3cr1<sup>GFP/+</sup>マウスにおいて、網膜新生血管の周囲に多数のGFP陽性マイクログリアを認めた(図1)。このマイクログリアをM-CSF阻害剤(Ki20227)を用いて除去したところ、病的新生血管の数がほぼ消失した(図2)。また、Cx3cr1<sup>Cre-ERT</sup>; R26<sup>iDTR</sup>; Vldlr<sup>-/-</sup>マウスを作成しgeneticにマイクログリアを除去したところ、有意に網膜新生血管の数の減少が見られた。これらより、マイクログリアはVldlr<sup>-/-</sup>マウスにおける網膜新生血管の形成に必須であることが明らかとなった。更に、薬剤にてマイクログリアを除去したVldlr<sup>-/-</sup>マウスでは、新生血管の減少と共に、網膜電図で網膜視細胞の有意な機能改善が認められた(図3)。

続いて、網膜色素上皮細胞においてVEGFが欠損するマウス(VMD2<sup>Cre</sup>; Vegfa<sup>fllox</sup>; Vldlr<sup>-/-</sup>)を作成し新生血管の数を評価したところ、コントロールと比較し有意に新生血管が抑制されていた。同時に遊走マイクログリアも抑制されており、網膜外層からのVEGFが、新生血管形成に重要なマイクログリアの遊走に与する可能性が考えられた。

しかしながら、同マウスは網膜電図において、視機能の増悪を示し、VEGFをターゲットとすることで、新生血管は抑制されるものの視細胞機能も抑制しうることが示唆された。

これらは、網膜新生血管の抑制において、従来の抗VEGF療法のみならず、マイクログリアをターゲットとした治療の有効性を示す重要な知見である。

図 1

Vldlr<sup>-/-</sup> Cx3cr1<sup>GFP/+</sup> (3D)

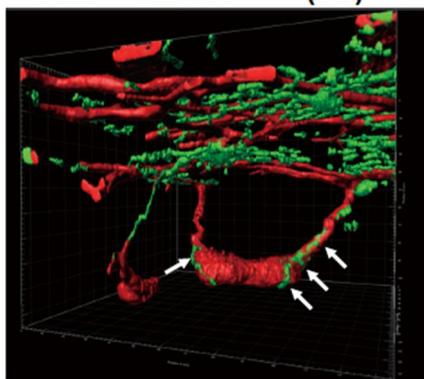
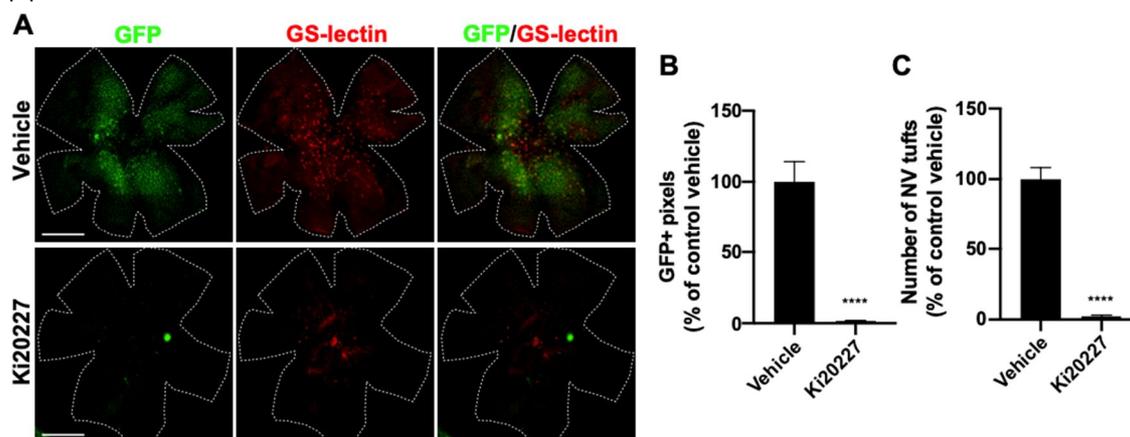
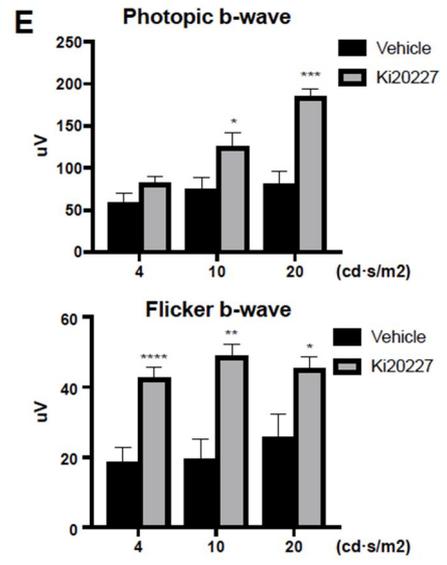
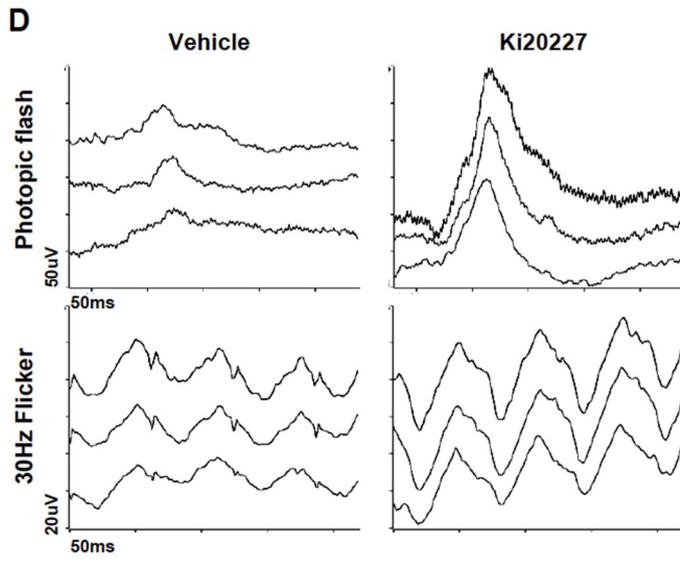


図 2





## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 大内亜由美	4. 巻 35(8)
2. 論文標題 基礎研究コラム 15. microRNAの臨床応用の可能性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 あたらしい眼科	6. 最初と最後の頁 1099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 玉城麻夏、大内亜由美、坂西良仁、李亜美、海老原伸行	4. 巻 72 (8)
2. 論文標題 Three cases of pulmonary tuberculosis detected after start of treatment for diabetic retinopathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床眼科	6. 最初と最後の頁 1161-1167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1410212793	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 佐久間 俊郎, 大内 亜由美, 坂西 良仁, 伊藤 玲, 清川 正敏, 海老原 伸行	4. 巻 12 (1)
2. 論文標題 飛蚊症の自覚から網膜剥離発見までの期間について	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 眼科臨床紀要	6. 最初と最後の頁 5-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Usui-Ouchi A, Ouchi Y, Ebihara N.	4. 巻 52
2. 論文標題 The peroxisome proliferator-activated receptor pan-agonist bezafibrate suppresses microvascular inflammatory responses of retinal endothelial cells and vascular endothelial growth factor production in retinal pigmented epithelial cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int Immunopharmacol.	6. 最初と最後の頁 70-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2017.08.027.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arai R, Usui-Ouchi A, Ito Y, Mashimo K, Murakami A, Ebihara N.	4. 巻 29
2. 論文標題 Effects of Secreted Mast Cell Mediators on Retinal Pigment Epithelial Cells: Focus on Mast Cell Tryptase.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mediators Inflamm.	6. 最初と最後の頁 3124753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2017/3124753.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakanishi Y, Usui-Ouchi A, Tamaki K, Mashimo K, Ito R, Ebihara N.	4. 巻 3
2. 論文標題 Short-term outcomes in patients with branch retinal vein occlusion who received intravitreal aflibercept with or without intravitreal ranibizumab.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clin Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 829-834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/OPHTH.S133594.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Usui-Ouchi Ayumi, Friedlander Martin	4. 巻 129
2. 論文標題 Anti-VEGF therapy: higher potency and long-lasting antagonism are not necessarily better	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 3032 ~ 3034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI129862	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Usui-Ouchi Ayumi, Usui Yoshihiko, Kurihara Toshihide, Aguilar Edith, Dorrell Michael I., Ideguchi Yoichiro, Sakimoto Susumu, Bravo Stephen, Friedlander Martin	4. 巻 12
2. 論文標題 Retinal microglia are critical for subretinal neovascular formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.137317	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Ayumi Ouchi, Edith Aguilar, Kyle Marra, Min Qiang, Yang Guang, Richard Lerner, Martin Friedlander
2. 発表標題 The role of Acid-sensing ion channel 1a in a mouse model of ischemic retinopathy
3. 学会等名 ARVO annual meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kyle Marra, Edith Aguilar, Ayumi Ouchi, Susumu Sakimoto, Martin Friedlander
2. 発表標題 Extracellular vesicles shed from endothelial colony forming cells (ECFCs) with high expression of CD44 are paracrine mediators of neurovasculotrophic retinal repair.
3. 学会等名 ARVO annual meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayumi Ouchi; Rebecca B Berlow; Edith Aguilar; Yoichiro Ideguchi; GUOQIN WEI; Kyle Vincent Marra; Peter E Wright; Martin Friedlander
2. 発表標題 CITED2 regulates hypoxia-induced retinal neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy
3. 学会等名 ARVO annual meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Edith Aguilar; Ayumi Ouchi; Yoshihiko Usui; Toshihide Kurihara; Michael Dorrell; Yoichiro Ideguchi; Martin Friedlander
2. 発表標題 Role of microglia in the formation of subretinal neovascularization in Vldlr <sup>-/-</sup> mice
3. 学会等名 ARVO annual meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ayumi Usui-Ouchi, Rebecca Berlow, Martin Friedlander
2. 発表標題 CITED 2 はHIF1と競合しマウス虚血性網膜症を改善する
3. 学会等名 第124回 日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	栗原 俊英  (Kurihara Toshihide)		
研究協力者	臼井 嘉彦  (Usui Yoshihiko)		
研究協力者	大内 靖夫  (Ouchi Yasuo)		