

令和 3 年 8 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09409

研究課題名(和文) 糖尿病網膜神経変性におけるneurovascular unitの役割の解明

研究課題名(英文) Roles of neurovascular unit in diabetic retinal neurodegeneration

研究代表者

楠原 仙太郎 (Kusuhara, Sentaro)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：40437463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病(InsCreTg; Pdk1flox/flox)マウス網膜におけるneurovascular unit障害の評価とグリア細胞の2光子顕微鏡によるin vivoイメージングを行った。免疫染色では、糖尿病マウス網膜ではコントロールマウスに比べ、網膜神経節細胞軸索減少とラミニン菲薄化が先行するがその際にミクログリアが活性化されていることが明らかとなった。コンタクトレンズ等の光学系の改良により高解像度in vivo網膜イメージングが可能となった。この系を用いてミクログリアが突起を伸長させながら網膜血管とアストロサイトの周囲を遊走する様子および白血球がゆっくり血管腔内を移動する様子が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病網膜神経変性は検眼鏡的に明らかな糖尿病網膜症が出現する以前から網膜内層に生じている神経変性であり、細胞レベルではこの段階でneurovascular unitの障害が生じていると考えられている。本研究によって糖尿病早期における細胞レベルでの網膜機能評価を可能にする技術が確立されれば、早期からのneurovascular unit障害の評価が可能となり、結果的に糖尿病網膜症による失明予防に大いに貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the damage to neurovascular unit and performed in vivo two-photon imaging of retinal glial cells in diabetic (InsCreTg; Pdk1flox/flox) mice. Immunohistochemistry disclosed that microglial activation as well as decrease in laminin thickness and ganglion cell axons proceed other cellular and extracellular matrix events in diabetic mouse retinas. Improvement of optical system including contact lens enabled high-resolution in vivo retinal imaging. Using this imaging system, we observed microglia migrating around retinal vessels and astrocytes with its processes extending towards them and detected leukocytes slowly moving in the retinal vessel lumen.

研究分野：医歯薬学

キーワード：糖尿病網膜症 アストロサイト neurovascular unit in vivoイメージング

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は検眼鏡的に評価可能な眼底異常所見の有無と程度で分類されてきたが、明らかな糖尿病網膜症が出現する以前から網膜内層における神経変性が生じていることが分かっており糖尿病網膜神経変性という概念が出来上がりつつある。糖尿病網膜神経変性には網膜組織における神経-血管-グリアのユニット (neurovascular unit) 障害が関わっていることが予想されるがその詳細なメカニズムについては不明である。

2. 研究の目的

網膜内層で neurovascular unit を構成するグリアであるアストロサイトがどのように糖尿病網膜神経変性に関与しているかを明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 20 週齢の遺伝子改変糖尿病マウス (*InsCre;Pdk1^{flox/flox}* マウス) およびコントロールマウス (*Pdk1^{flox/flox}* マウス) において、neurovascular unit 構成細胞および細胞外マトリックスの変化を免疫染色で評価する。

(2) 糖尿病網膜におけるアストロサイトの挙動を他の細胞との関係において in vivo イメージングで評価する。

(3) 網膜アストロサイト死を誘導した後の他の網膜細胞の動きの変化を in vivo イメージングで評価する。

4. 研究成果

(1) Neurovascular unit 構成要素である、血管内皮細胞、周皮細胞、アストロサイト、網膜神経節細胞、ミクログリア、細胞外マトリックスの変化を免疫染色で評価しコントロールマウスと糖尿病マウスでの比較を行ったところ、ラミニンの菲薄化と網膜神経節細胞線維軸索束の狭細化が認められた。また、同時期にミクログリアが活性化し網膜内層での分布が増加していることが明らかとなった。しかしながら、その他の構成要素については明らかな変化が認められなかった (図 1-4)。

(2) アデノ随伴ウイルスの硝子体注射、各種色素の静脈注射および遺伝子改変マウスの利用および観察用のコンタクトレンズを幾度も改良することにより、網膜におけるアストロサイト、ミクログリア、網膜血管、神経、白血球の in vivo イメージングの系を確立した (図 5-7)。

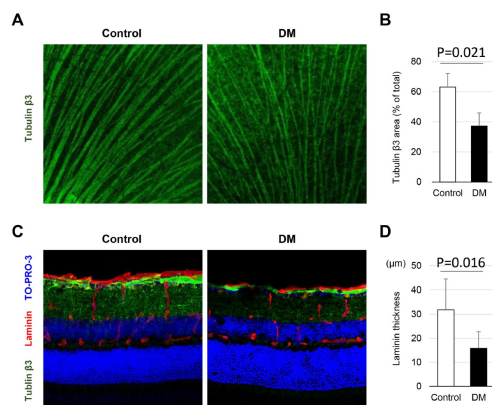


図1 糖尿病マウスにおける網膜最内層の変化。20 週齢において、糖尿病マウスではコントロールマウスと比較して、Tubulin β3 で標識される網膜神経節細胞の線維軸索束の減少 (A, B) およびラミニンの菲薄化が著明であった (C, D)。DM=糖尿病。*

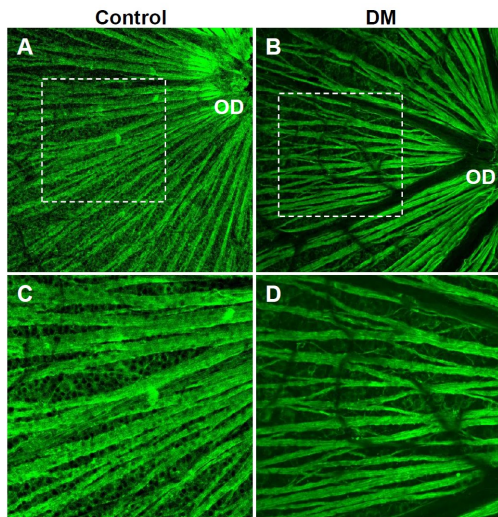


図2 代表的な Tublin $\beta 3$ による網膜組織染色像 (伸展標本、20 週齢)。糖尿病マウスではコントロールマウスと比較して、Tublin $\beta 3$ で染色される面積の明らかな減少が確認できた (A, B)。A, B の四角で囲まれた部位の拡大像 (C, D)。OD=視神経乳頭、DM=糖尿病。*

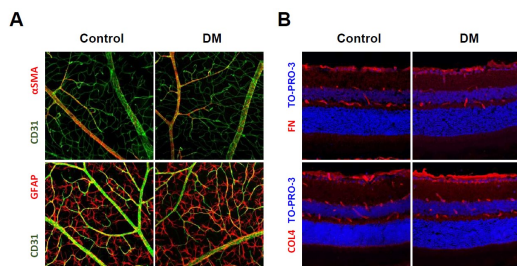


図3 糖尿病マウスにおける非神経細胞と細胞外マトリックスの形態変化。20 週齢において、血管内皮細胞 (CD31)、周皮細胞 (α SMA)、アストロサイト (GFAP)、に明らかな変化は認められなかった (A)。フィブロネクチン (FN) と4型コラーゲン (COL4) についても同様に明らかな変化は認められなかった (B)。TO-PRO-3=核染色、DM=糖尿病。*

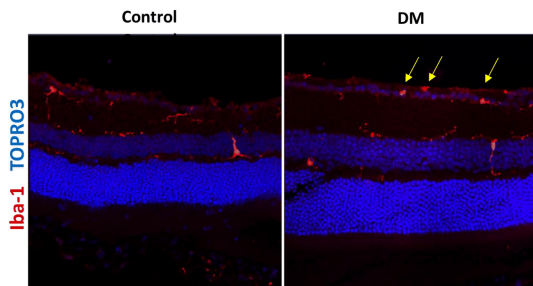


図4 糖尿病マウスにおけるミクログリアの変化。20 週齢において、糖尿病マウスではミクログリア (Iba-1) における非活性型 (ramified) に比べて活性型 (ameboid) の割合が高く、網膜内層で増加していることが観察された (矢印)。TOPRO3=核染色、DM=糖尿病。

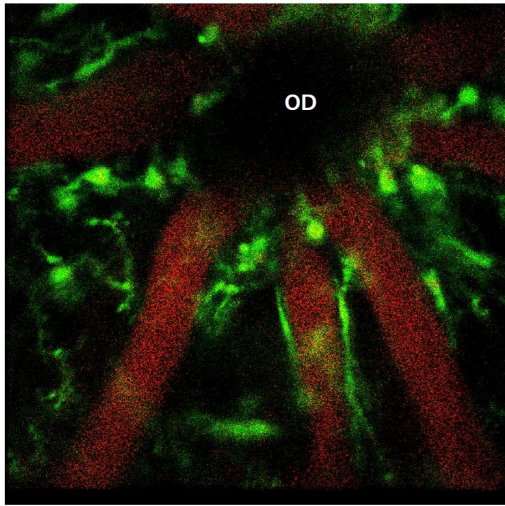


図4 マウス網膜における2光子顕微鏡での *in vivo* イメージング (1)。動画では一部のミクログリア (緑) が突起を伸ばしながら網膜血管 (赤) 周囲を動く様子が観察された。OD=視神経乳頭。

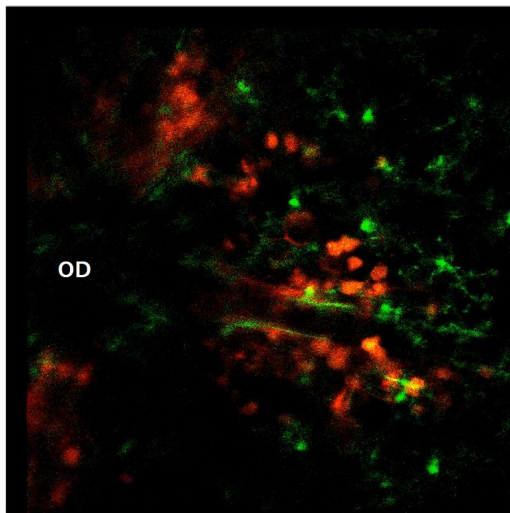


図5 マウス網膜における2光子顕微鏡での *in vivo* イメージング (2)。動画ではアデノ随伴ウイルスによって標識されたアストロサイト (赤) に対して一部のミクログリア (緑) が突起を伸ばして接触する様子が描出された。OD=視神経乳頭。

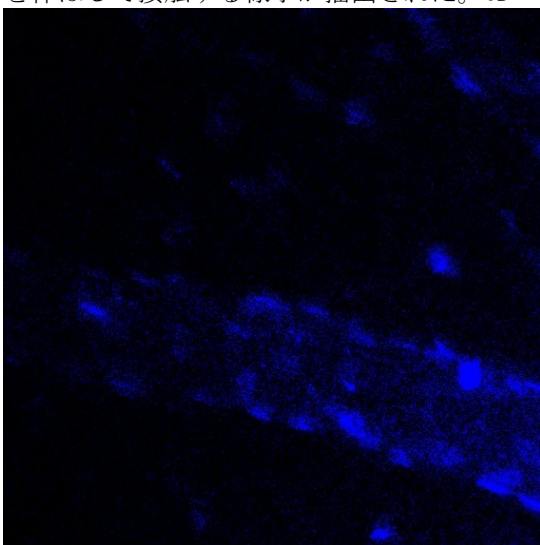


図6 マウス網膜における2光子顕微鏡での *in vivo* イメージング (3)。動画では Hoechst の尾静脈注射で染色された白血球が血管内を移動する様子が描出された。

本研究の結果から実験結果から持続高血糖下では主としてラミニンと網膜神経節細胞が先行して障害される可能性が示された。2光子顕微鏡による *in vivo* 網膜イメージングで neurovascular unit 構成を評価する系も完成したことから、糖尿病によって不可逆的な網膜内層障害に至るまでの過程で生じている細胞イベントを可視化できる可能性も示された。今後は、新型コロナウイルスの影響で施行が間に合わなかった網膜アストロサイト死を誘導した後の他の網膜細胞の挙動の変化を *in vivo* 網膜イメージングで評価することによって、neurovascular unit におけるアストロサイトの役割を明らかにすることが将来の臨床応用に必要なステップであると考えられる。

* The final, published version of this article is available at
<https://drc.bmj.com/content/8/1/e001120.long>.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Katsuyama Atsuko, Kusuhara Sentaro, Asahara Shun-ichiro, Nakai Shun-ichiro, Mori Sotaro, Matsumiya Wataru, Miki Akiko, Kurimoto Takuji, Imai Hisanori, Kido Yoshiaki, Ogawa Wataru, Nakamura Makoto	4. 巻 8
2. 論文標題 En face slab optical coherence tomography imaging successfully monitors progressive degenerative changes in the innermost layer of the diabetic retina	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open Diabetes Research & Care	6. 最初と最後の頁 e001120 ~ e001120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjdr-2019-001120	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 Kusuhara Sentaro, Fukushima Yoko, Ogura Shuntaro, Inoue Naomi, Uemura Akiyoshi	4. 巻 42
2. 論文標題 Pathophysiology of Diabetic Retinopathy: The Old and the New	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diabetes & Metabolism Journal	6. 最初と最後の頁 364 ~ 364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4093/dmj.2018.0182	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 勝山敦子、楠原仙太郎、金景佑、西庄龍東、松宮亘、中村誠
2. 発表標題 臍 細胞特異的Pdk1コンディショナルノックアウトマウスにおける糖尿病性網膜変化
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 勝山敦子、楠原仙太郎、松宮 亘、本田 茂、中村 誠
2. 発表標題 光干渉断層計slab en face像を用いた糖尿病網膜内層構造変化の評価
3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsuko Katsuyama; Sentaro Kusuhara; Wataru Matsumiya; Shigeru Honda; Makoto Nakamura
2. 発表標題 Structural changes in the inner retina assessed by slab en face optical coherence tomography in diabetic eyes
3. 学会等名 ARVO 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 楠原 仙太郎
2. 発表標題 糖尿病網膜における in vivo functional imagingに向けて
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会
4. 発表年 2021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 分担者	浅原 俊一郎 (Asahara Shun-ichiro) (00570342)	神戸大学・医学部附属病院・助教 (14501)	
研究 分担者	橘 吉寿 (Tachibana Yoshihisa) (50373197)	神戸大学・医学研究科・准教授 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------