

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09430

研究課題名（和文）網膜静脈閉塞症の病的/生理的血管新生発生要因をOCTアンギオグラフィ-で検討する

研究課題名（英文）Investigation for formative process of collateral circulation in mice experimental BRVO model

研究代表者

高橋 寛二（TAKAHASHI, Kanji）

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：60216710

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：マウス網膜静脈閉塞症（以下RVO）モデルに生じる側副血行路に対し、それをOptical Coherence Tomography Angiography（以下OCTA）を用いて測定することで側副血行路の経時的な変化を捉えることに成功した。またRVOモデルの側副血行路が人と同じ網膜上の層に位置していることをOCTA、組織の双方で確認した。そして、この研究において報告者らはRVOにおける側副血行路の形成因子の1つを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究によってマウスと人のRVOにおける側副血行路に類似点が示された。つまり、マウスRVOモデルの探求によって解き明かされる内容は人にも当てはまる可能性が高いことが示唆されたことは大きな意義があると考えられる。また、これまでRVOにおける側副血行路形成要因については不明であったが、その1つの可能性を初めて確認できたことは今後の研究に対し大いに意義があり、これまでと異なる新たな治療法のブレイクスル-につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We succeeded in elucidating the process of collateral blood vessel formation in a mouse RVO model using Optical Coherence Tomography Angiography(OCTA). We also confirmed that the collateral vessels of this mouse RVO model were located in the same capillary bed of the retina as humans in both OCTA and histological assessment of retinal tissue. In this study, we also uncovered one of the factor in collateral vessel formation in RVO.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜静脈閉塞症 側副血行路 OCTA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜静脈閉塞症 (Retinal Vein Occlusion、以下 RVO) は、網膜静脈が閉塞することにより、閉塞領域の網膜虚血を生じ、やがて、病的新生血管が発生し病状が悪化する。治療としてはレーザー - 光凝固や抗 VEGF 薬の硝子体注入を行うが、対症的な治療の領域を出ない。

一方、慢性期に側副血行路 (= 生理的新生血管) が自然に形成されることがあり、治療なしで病状が改善する例がある。報告者らは、マウスを用い実験的 RVO モデルを作成し、それにおける側副血行路形成過程を観察、またどのような因子が働いているのかを精査する。

それによって、人為的に生理的新生血管が生じるメカニズムが解明できれば、将来的な新たな治療法に結びつく可能性がある。

また近年、従来の蛍光眼底造影検査とは異なり、造影剤の体内投与なしで網膜血管を描出できる Optic coherence tomography angiography (OCTA) が登場し、臨床において新たなブレイクスル - を起こしている。当機器は長波長光を等間隔で照射し、組織からの反射光を検知する。反射光が経時的に違いの出る組織を 3D で構築する。他の組織と異なり、血管内の赤血球は絶えず動いているため血管には反射光に経時的な差異が生まれる。この様式で血管が蛍光造影剤の血管内投与なしで低侵襲に描出される。従来の蛍光眼底検査では少なからずアレルギー - 発症のリスクがあること、静脈路確保が必要なこと、検査時間が比較的長いということがあり検査を頻回に行うことは困難であった。それに比べ OCTA は低侵襲で検査時間も短いため施行しやすく、様々な網膜疾患の診断や治療効果の判定に多大な影響を与えている。

2. 研究の目的

実験的モデルにおける側副血行路形成時の形成過程を画像検査 (OCTA) とフルオレセイン蛍光眼底造影 (組織学的検討 (免疫染色など) を用い精査する。それにより RVO における生理的新生血管生成のメカニズムを検討する。また生理的新生血管と病的新生血管との差がどこにあるのか検討する。

学術的独自性と創造性としては、新機軸の OCTA を用いることにより、これまでの研究とは一線を画すと考えられる。また生理的新生血管生成メカニズムに関わる何らかの因子を特定できれば、将来的にこれまでと異なる新たな治療法のブレイクスル - につながる可能性がある。

3. 研究の方法

生後 2 か月の adult マウス (BALB/C マウス) に全身麻酔下 (塩酸ケタミン 10mg/kg と塩酸キシラジン 3mg/kg を腹腔内に投与) で網膜光凝固装置を用いて網膜光凝固を行う。

網膜光凝固を行う際には事前に光感受性物質であるロ - ズベンガル液 (5mg/ml 食塩水、0.15ml) を腹腔内注射を行い、網膜血管に行き渡り、かつ消失する前に、(3 分以内に) 光凝固を行う。ロ - ズベンガル液は光の吸収波長が 532 μ m であり、その波長に応じたレ - ザ - 波長で光凝固を行う。BALB/C マウス (いわゆる白マウス) では網膜のメラニン色素が少なく、光感受性物質を網膜血管内に流し込むことによって周辺網膜は凝固せず、血管だけを集中的に凝固することができる。凝固は 1 本の静脈を凝固するパターン、複数 (3 本程度) を凝固するパターンそれぞれ行って、効率よく RVO が発生するレーザー - 条件を検討する。

ある程度の高確率で人工的 RVO モデルが作成できるようになった後、凝固後決まった日程で下記の検査を行う。

(1) フルオレセイン蛍光眼底造影、OCT アンギオグラフィ - を用いて網膜光凝固後の血管の変化を観察し、側副血行路形成の有無をみる。側副血行路形成があれば、何日で形成できたか、どんな形状なのか、どこにできたのか (網膜浅層なのか深層なのか等) 網膜厚、視神経からの凝固箇所との距離、血管径を精査する。また側副血行路形成に関係する可能性のある因子を人為的に投与等を行い、側副血行路の様子がどのように変化するのか検討する。

(2) 更に組織学的検討を行うため、光凝固後の眼球を摘出し、網膜組織標本を作成する。側副血行路形成に関与していると想定されている因子について、それぞれの抗体を用い免疫染色を行う。その染色された面積をコンピュータ - にて測定する。どの因子がいつの時点で働いているのかを正常血管や、網膜新生血管と比較し PCR 等も用いて検討する。

4. 研究成果

マウス RVO モデルに生じる側副血行路に対し、それを新機軸の測定機器である OCTA を用いて測定することで、側副血行路の経時的な変化を非侵襲的に捉えることに成功した。そしてその側副血行路形成のパターン分類に成功した。またマウス RVO モデルの側副血行路が人と同じ網

膜上の層に位置し、その様子が似ていることについて OCTA、さらに組織の双方で確認することができた。マウスを使用することで、人に対しては実際に実施できない組織を使ってその様子を確認することができた。これによってマウスと人の側副血行路に類似性があることが推察され、マウス RVO モデルを研究していけば人における RVO の病態解明に繋がる可能性があることを示せた。そして、これまで RVO における側副血行路形成メカニズムは不明であったが、OCTA の画像所見、その他の生物化学的手法を組み合わせることで、RVO における側副血行路の形成メカニズムの 1 つの可能性を示唆することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hajime Takahashi, Kazuki Nakagawa, Haruhiko Yamada, Hidetsugu Mori, Shimpei Oba, Keiko Toyama, Kanji Takahashi	4. 巻 7
2. 論文標題 Time course of collateral vessel formation after retinal vein occlusion visualized by OCTA and elucidation of factors in their formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e05902
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2021.e05902	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高橋元 山田晴彦 中川和紀 高橋寛二
2. 発表標題 Optical Coherence Tomography Angiography in laser-induced mouse branch retinal vein occlusion model
3. 学会等名 ARVO annual meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋元 山田晴彦 中川和紀 高橋寛二
2. 発表標題 レ・ザ - 誘発性網膜静脈分枝閉塞症モデルにおけるOptical Coherence Tomography Angiography所見
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会
4. 発表年 2019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	山田 晴彦 (YAMADA Haruhiko) (50288841)	関西医科大学・医学部・准教授 (34417)	

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
---------	---------