

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08259

研究課題名(和文) 未熟児網膜症マウスモデルにおける細胞内抗酸化物質チオレドキシンの重要性

研究課題名(英文) Importance of the Intracellular Antioxidant Thioredoxin in a Mouse Model of Retinopathy of Prematurity

研究代表者

難波 文彦 (Namba, Fumihiko)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20643323

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)：野生型(WT)とチオレドキシシン-1(TRX)-Tgマウスを新生仔期に高濃度酸素に曝露し、網膜表現型を評価した。高濃度酸素曝露後のWTでは、網膜内の無血管野と新生血管による結節面積の増加が認められたが、TRX-Tgでは、増加が軽減された。曝露後のWT網膜では、血管新生因子の発現低下と炎症性サイトカインの発現上昇を認めたが、TRX-Tg網膜では認めなかった。高濃度酸素曝露からの回復期では、TRX-Tgでは、異常な新生血管形成および血管透過性の亢進を抑制した。以上、過剰発現したTRXは、炎症性サイトカイン及び血管新生因子の遺伝子発現を調節することにより、高濃度酸素性網膜症の表現型を軽減させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未熟児網膜症(retinopathy of prematurity, ROP)は、小児の失明原因の中で最も多い原因の一つで、主に在胎期間28週未満の超早産児が罹患する。現在、ROPに対する治療として、レーザー光凝固術、冷凍凝固術、抗血管内皮増殖因子薬硝子体注射が行われているが、その効果は限定的であり、副作用も懸念される。本研究では、TRX-Tgマウスは、WTマウスと比較して、高濃度酸素曝露による網膜障害を軽減した。今回のわれわれの結果から、TRXは将来ROPの予防または治療薬として臨床応用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Wild-type (WT) and thioredoxin-1 (TRX)-Tg mice were exposed to high concentrations of oxygen during the neonatal period and retinal phenotypes were evaluated. After exposure to hyperoxia, WT showed an increase in the area of atretic vessels and nodules due to neovascularization in the retina, whereas the increase was reduced in TRX-Tg mice. During the recovery period from exposure to hyperoxia, TRX-Tg suppressed abnormal neovascularization and increased vascular permeability. Overexpressed TRX alleviated the phenotype of hyperoxia-induced retinopathy by modulating gene expression of inflammatory cytokines and angiogenic factors.

研究分野：新生児学、呼吸器学

キーワード：未熟児網膜症 高濃度酸素 早産児 チオレドキシシン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 未熟児網膜症 (retinopathy of prematurity, ROP) は、小児の失明原因の中で最も多い原因の一つで、主に在胎期間 28 週未満の超早産児が罹患する。超早産児の多くは、呼吸器系の未熟性から出生後に呼吸補助としての酸素投与が必要となる場合が多い。胎内の低酸素環境から急激な酸素投与による高濃度酸素環境への変化により、生後、児の網膜内には異常な血管新生が生じる。ROP の発症時には、異常な網膜血管が形成され、異常な網膜血管は網膜表面や硝子体に浸潤する。異常な網膜血管の浸潤により網膜が牽引されると網膜剥離を発症し、重篤な視力障害、最たるは、失明に至る。現在、ROP に対する治療として、レーザー光凝固術、冷凍凝固術、抗血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 薬硝子体注射が行われているが、その効果は限定的であり、副作用も懸念される。ROP に対するビタミン E やグルタチオンペルオキシダーゼ-1 などの抗酸化物質投与の有効性についての研究がこれまでに行われ、重症 ROP の予防とリスク軽減に、抗酸化物質が重要な役割を果たしていることが示唆されている。ROP を評価する上で新生仔マウスに高濃度酸素を曝露して作製する高濃度酸素性網膜症 (oxygen-induced retinopathy, OIR) マウスモデルが広く用いられている。OIR マウスモデルは ROP の特徴である血管退行及び新生血管形成を再現するため、ROP に対する薬剤の治療効果などを同マウスモデルで評価することができる。

(2) TRX は、システイン-グリシン-プロリン-システイン配列の中に酸化還元活性のあるジスルフィド (-S-S-) /ジチオール (-S-H-) 基を持つ内因性の抗酸化酵素である。TRX は、活性酸素を消去することで酸化ストレスから細胞を保護すると同時に、白血球の化学走性を調節し、炎症部位への浸潤を抑制し、抗炎症作用も示す。これまでに報告された研究で、TRX-トランスジェニック (transgenic, Tg) マウスやヒト組換え TRX を全身投与したマウスでは、ウイルス性肺炎、急性肺損傷、肺炎、心筋炎、慢性閉塞性肺疾患、インドメタシン誘発性胃粘膜傷害、リポポリサッカライド誘発性早産、新生仔期高濃度酸素性肺傷害、そして脳虚血など、さまざまな疾患モデルにおける傷害抵抗性を示した。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、TRX-Tg マウスを用いて、「過剰発現した TRX は OIR マウスモデルに対して、その抗炎症作用により同疾患マウスモデルの網膜内表現型を改善させる」という仮説を立て、ROP 疾患モデルにおける TRX の重要性について検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物について

TRX-Tg マウスは、Takagi らによって作製されたマウスを京都大学から譲渡後、飼育し、実験に使用した。TRX-Tg ヘテロ接合体雄マウスと野生型 (wild-type, WT) 雌マウスを交配した。膈栓を確認した日を胚発生日 0 日とした。

#### (2) 新生仔マウスに対する高濃度酸素曝露

出生日を日齢 0 とした。すべての新生仔は、日齢 7 まで 21%酸素 (室内空気) 下で飼育した。OIR マウスは、日齢 7 から日齢 12 まで 75%酸素 (高濃度酸素) 曝露を行い作成した。日齢 7 の仔マウスは授乳中の親マウスとともに 75%酸素チャンパーに入れて飼育した。日齢 7 の仔マウスは室内空気群と高濃度酸素曝露群に無作為に割り当てた。酸素曝露を行ったマウスは日齢 12 で室内空気環境に戻した。新生仔マウスは、実験に応じ日齢 12、17 および 28 に深麻酔を行い、眼球を取り出した。

#### (3) 免疫組織化学

マウスに深麻酔をかけ、右の眼球を摘出した。摘出眼球は 4%パラホルムアルデヒド固定液で 4、30~40 分固定した。固定後、眼球をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) に浸し、角膜、水晶体、ぶどう膜、強膜を実体顕微鏡下に取り出した。取り出した網膜は 4%パラホルムアルデヒド液で一晩再固定し、翌日メタノールで -20 に保存した。網膜をブロッキング液中で 30 分間室温でインキュベートした後、ラットモノクローナル anti-CD31 (PECAM-1) 抗体で一晩インキュベートした。インキュベート後は特異的 2 次抗体である Cy3 Affinipure Goat Anti-rat IgG でインキュベートした。網膜を、0.5% Tween 20 を含む PBS で洗浄した後、vectashield で網膜フラットマウント標本を作成した。

#### (4) 網膜血管の透過性

マウス網膜血管の透過性測定は日齢 28 マウスの網膜血管で行った。マウスに深麻酔をかけた後、開胸し、100 mg/ml の Hoechst 33342 および 20 mg/ml の FITC-デキストランを含む PBS を 1 mL 左心室に投与して灌流した。投与後眼球を摘出し、直ちに網膜を実体顕微鏡下に取り出した。

取り出した網膜はフラット状態にして、蛍光顕微鏡で観察した。血管透過性は、Image J を用いて、Hoechst33342 と FITC-デキストランの染色面積を測定することで評価した。血管透過率は、 $((\text{Hoechst 33342 の面積}) - (\text{FITC-デキストランと Hoechst 33342 で染まった血管面積})) / (\text{FITC-デキストランの面積})$  で算出した。

#### (5) ウェスタンブロッティング

深麻酔下に眼球摘出し、引き続き網膜を取り出した。両側網膜は液体窒素でスナップ凍結した。網膜組織は T-PER バッファとプロテアーゼインヒビター内で、超音波ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。抽出した溶液を  $12,000 \times g$  で 10 分間、4℃ で遠心分離し、上清を取り出した。上清中の蛋白質量の測定には、Qbit protein assay を使用した。同量の蛋白質をサンプルバッファと 10% 及び 2-メルカプトエタノールと混合し、混合溶液を SDS-PAGE にかけて、分離した蛋白質は PVDF 膜にブロッティングした。続いて、一次抗体に抗 occludin マウスモノクローナル抗体 (1:200)、抗 claudin-5 マウスモノクローナル抗体 (1:500)、抗  $\beta$ -actin ポリクローナルウサギ抗体 (1:5000)、二次抗体に HRP 標識二次抗体を用いた。Amersham ECL Prime Western blotting detection reagent を用いて化学発光させ、デジタルイメージングシステムで検出した。

#### (6) RNA の抽出と定量的リアルタイム PCR

マウスの左眼球から取り出した網膜は RNAlater を浸み込ませ 20℃ で保存した。新生仔マウスの網膜組織は、BioMasher II を用いてホモジナイズした。RNA は TRIzol Reagent を用いて抽出した。抽出した RNA は High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を用いて逆転写し、cDNA を作成した。TaqMan プローブと TaqMan Universal PCR Master Mix を用いて、定量的 PCR を行った。相対的な mRNA 発現レベルの測定には、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法を用いた。 $\beta$ -グルクロニダーゼを内因性コントロールとした。

#### (7) 統計解析

すべての値は平均値  $\pm$  標準誤差で示した。高濃度酸素曝露と室内空気曝露から生じる有意差および WT マウスと TRX-Tg マウス間の有意差を評価するため、二元配置分析を行った後、Tukey-Kramer test を使用した。P 値が 0.05 未満の場合、統計的に有意であるとみなした。

### 4. 研究成果

#### (1) 網膜の無血管野

日齢 12、17、28 各群の無血管野の面積を評価した。遺伝型に関わらず、高濃度酸素曝露された網膜では室内空気群に比べて無血管野が有意に広がったが、TRX-Tg マウス網膜の方が WT マウス網膜と比較して、高濃度酸素曝露後の無血管野面積は有意に小さかった。これらの結果は日齢 12、17、28、いずれの日齢においても同様であった。

#### (2) 網膜の結節形成

日齢 12 では、いずれの群でも網膜内での新生血管による結節の出現は乏しく、結節面積に有意差は見られなかった。高濃度酸素曝露から室内空気に戻し回復させた日齢 17 及び日齢 28 では、WT および TRX-Tg マウス網膜両方で新生血管による結節が多く出現したが、高濃度酸素曝露後の TRX-Tg マウス網膜は WT 網膜と比較して、網膜内結節面積が有意に小さかった。一方、室内空気群では、いずれの日齢でも網膜内結節は見られなかった。

#### (3) 網膜動脈・静脈の形態学的変化

形態学的に、高濃度酸素曝露された WT マウスでは、異常走行を示す網膜血管が多い一方、高濃度酸素曝露された TRX-Tg マウスでは、異常走行を示す血管が少なかった。WT の網膜動脈の直径は、日齢 12 では高濃度酸素曝露群が室内空気群よりも細かった。一方、TRX-Tg マウス網膜では、高濃度酸素曝露群と室内空気群で網膜動脈の直径に有意差は認めなかった。網膜動脈は日齢 17 と 28 ではいずれの群でも有意差は見られなかった。日齢 12、WT、TRX-Tg マウスともに、高濃度酸素曝露の有無で、網膜静脈直径に有意差はなかった。日齢 17 では、TRX-Tg マウスの網膜静脈の直径は、室内空気群および高濃度酸素曝露群の両方で WT よりも有意に小さかった。いずれの群においても日齢 28 の網膜静脈の直径に違いは見られなかった。網膜動脈数は、日齢 12、17、28 のすべてで、各群間の有意差は認めなかった。網膜静脈数は、日齢 12 では WT と TRX-Tg マウス網膜の両方で高濃度酸素曝露群は、室内空気群よりも少なかった。高濃度酸素曝露後 5 日経過した日齢 17 では、WT では高濃度酸素曝露群が室内空気群よりも静脈数が有意に少なかったが、TRX-Tg では、高濃度酸素曝露の有無で網膜静脈数に有意差はなかった。さらに、WT の高濃度酸素曝露群は TRX-Tg マウス網膜の高濃度酸素曝露群に比べて静脈数が有意に少なかった。

#### (4) 網膜の血管透過性

注入された FITC-デキストランが血管内腔に入り、また、血管から漏出した Hoechst 33342 は周囲の細胞核を染色した。高濃度酸素曝露した WT 網膜では、室内空気群と比較して、血管外に漏出した Hoechst33342 が多く認められており、網膜の血管透過性亢進を示した。高濃度酸素曝露

した TRX-Tg マウス網膜の血管透過性は高濃度酸素曝露した WT よりも有意に低かった。

(5) 網膜内細胞タイトジャンクション蛋白質発現

遺伝型の違い、高濃度酸素曝露の有無の違いにより、マウス網膜内の Occludin 及び Claudin-5 の蛋白質発現量には有意差を認めなかった。

(6) 遺伝子発現解析

高濃度酸素曝露後の日齢 12 に、WT 網膜での VEGF と CXCL2 遺伝子発現は室内空気群に比べて有意に低かったが、TRX-Tg マウス網膜では室内空気群と高濃度酸素曝露群の間に有意差は認めなかった。IL-6 も同様に WT 網膜では高濃度酸素曝露群が通常の室内空気群よりも有意に高かったが、TRX-Tg マウス網膜では有意差がなかった。IGF-1 は、WT と TRX-Tg マウス網膜の両方で高濃度酸素曝露群の方が室内空気群よりも網膜内遺伝子発現が有意に低かった。日齢 12 で、その他の遺伝子発現 (IL-1、HO-1、Angpt1) に、各群間の有意差は見られなかった。室内空気へ戻して 5 日間経過した日齢 17 の WT 網膜において、VEGF と CXCL2 は、高濃度酸素曝露群では室内空気群よりも有意にその遺伝子発現が高かった一方、TRX-Tg マウス網膜では高濃度酸素曝露群と室内空気群との間に有意差は見られなかった。網膜内 HO1 遺伝子発現は、WT、TRX-Tg マウス網膜ともに高濃度酸素曝露群で有意に高かった。そして、高濃度酸素曝露した WT 網膜と比較して、高濃度酸素曝露した TRX-Tg マウス網膜では HO-1 の mRNA 遺伝子発現量が有意に高かった。日齢 28 の WT 網膜において、高濃度酸素曝露群では IGF-1 と Angpt-1 の遺伝子発現量は、室内空気群に比べて低かったが、TRX-Tg マウス網膜では高濃度酸素曝露群と室内空気群の間に両遺伝子の発現量の有意差はなかった。

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 Ozawa Junichi, Tanaka Kosuke, Arai Yukio, Haga Mitsuhiro, Miyahara Naoyuki, Miyamoto Ai, Nishimura Eri, Namba Fumihiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Thioredoxin-1 Ameliorates Oxygen-Induced Retinopathy in Newborn Mice through Modulation of Proinflammatory and Angiogenic Factors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 899 ~ 899
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox11050899	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 2件）

1. 発表者名 Junichi Ozawa, Kosuke Tanaka, Yukio Arai, Mitsuhiro Haga Fumihiko Namba
2. 発表標題 Thioredoxin-1 ameliorates oxygen-induced retinopathy in newborn mice through modulation of angiogenic factors
3. 学会等名 Pediatric Academic Societies Annual Meeting 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Junichi Ozawa, Kosuke Tanaka, Yukio Arai, Kikumi Matsuoka, Fumihiko Namba
2. 発表標題 Thioredoxin-1 ameliorates oxygen-induced retinopathy in newborn mice
3. 学会等名 The 3rd Taiwan-Korea-Japan Joint Congress on Neonatology（国際学会）
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
研究協力者	小澤 純一  (Ozawa Junichi)	埼玉医科大学・総合医療センター・小児科  (32409)	

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