

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16897

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症におけるマイクログリア・マクロファージを標的とした神経保護治療

研究課題名(英文) Neuroprotective therapy targeting microglia/macrophages in diabetic retinopathy

研究代表者

山口 宗男 (Yamaguchi, Muneo)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：50848017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：眼内でVEGF強制発現するマウス(VEGFマウス)の用いて視細胞死、マクロファージ/マイクログリアの動態について観察した。VEGF発現とともに、糖尿病網膜症患者で上昇が報告されている種々の炎症性サイトカインの増加を認めた。徐々に視細胞死が起こり、網膜が菲薄化した。視細胞死のピークでマクロファージ/マイクログリアが増加、形態の変化を認めた。網膜硝子体界面のマクロファージ/マイクログリアの表現型は一様にM2様であり、局所で増殖している所見を得た。網膜内のマクロファージ/マイクログリアの表現型はM1、M2様の両方であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

眼内でのVEGF高発現とともに、炎症に関与しているとされているM1マクロファージ/マイクログリアの増加、活性化を認めた。種々の炎症性サイトカインも増加しており、M1マクロファージ/マイクログリアを標的とした新規治療を創製できれば、糖尿病網膜症患者でのアンメット・メディカルニーズである神経障害を抑制する病態特異的な治療法となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We observed photoreceptor cell death and macrophage/microglia kinetics in mice retina with over expression of VEGF in the eye (VEGF mice). Along with VEGF expression, various inflammatory cytokines, which have been reported to be elevated in patients with diabetic retinopathy, increased. Photoreceptor cell death occurred gradually and the retina thinned. At the peak of photoreceptor cell death, macrophages/microglia increased and morphological changes were observed. The phenotype of macrophages/microglia at the vitreoretinal interface was uniformly M2-like, with findings of local proliferation. The phenotype of macrophages/microglia within the retina was both M1 and M2-like.

研究分野：糖尿病網膜症

キーワード：糖尿病網膜症 神経障害 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

抗 VEGF 療法等により、糖尿病網膜症(DR)の本態である血管病変の沈静化は得られるようになった。しかし、しばしば血管病変は沈静化していても視力不良な症例を認める。網膜イメージング機器の解像度が上がったことにより、そのような症例では網膜視細胞の障害が示唆されるようになったが現在治療法はない。そのため DR における神経障害は、臨床の現場においてアンメット・メディカルニーズとなっている。申請者はこれまで、DR は炎症性疾患であるという概念のもと、その本態について臨床、基礎両方の側面から研究を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DR と同様に VEGF が高発現している眼内環境における視細胞障害を評価する。炎症の本態をマクロファージ/マイクログリアと考え、その表現型と動態を解析し、治療ターゲットとしての可能性を追求することである。

3. 研究の方法

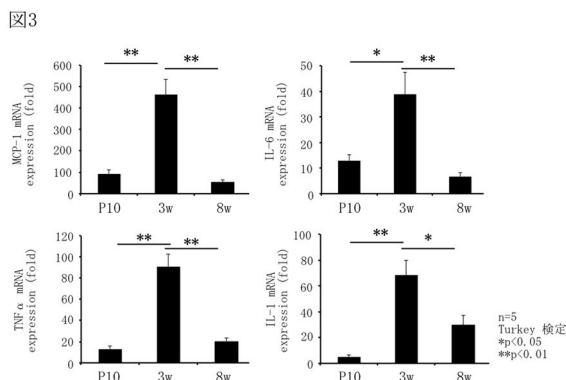
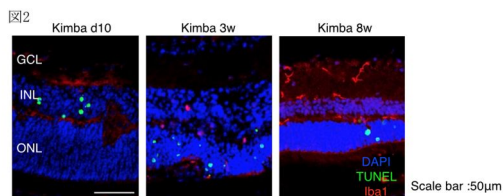
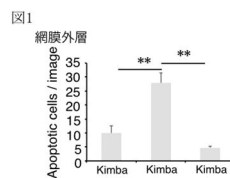
DR と同様に眼内で VEGF が高発現している Kimba マウスを用いて、視細胞死、網膜マクロファージ/マイクログリア、炎症性サイトカインについて継時的に観察する。また、マクロファージ/マイクログリアを除去するため、クロドロネートリポソームを硝子体注射を行った。凍結切片、whole mount 免疫染色、フローサイトメトリー、RT-PCR にて検討を行う。

4. 研究成果

(1)我々は、糖尿病網膜症患者の視細胞障害に炎症関与しており、その炎症の本態がマクロファージ/マイクログリアであるという仮説を立てた。Kimbaマウスは生後すぐに眼内で一過性にVEGFが高発現するように遺伝子改変されたマウスであり、生後10日、3週、8週で視細胞死、マクロファージ/マイクログリアをTUNEL、Iba1染色で凍結切片を用いて評価した。血管病変が完成する前である生後3週に有意に視細胞死が増加を認めた。アメボイド型のマクロファージ/マイクログリアを多く網膜内に観察できた(図1,2)。

(2)糖尿病網膜症患者で上昇している種々の炎症性サイトカインについて、上述のタイムポイントでKimbaマウス網膜を回収し、RT-PCRで解析した。VEGF発現に遅れて、視細胞死が増加する生後3週に有意に発現増加を認めた(図3)。

(3)視細胞死が増加している網膜内で増加しているマクロファージ/マイクログリア分画の詳細を解析するために、生後3週のKimbaマウス網膜内のマクロファージ/マイクログリア(CD11b+F4/80+細胞)をBD FACS Ariaを用いて回収している。単細胞解析を行うために、生細胞を効率良く回収できるよう検討中である(図4)。



(4)大まかなマクロファージ/マイクログリアの表現型について代表的なM1M2マクロファージ/マイクログリアの表面マーカーについて免疫染色を行った。また、*Ccr2^{flp/1b}Cx3cr1^{gfp/1b}*マウスとKimbaマウスを交配させ、網膜外層のマクロファージ/マイクログリアの表現型を評価した。網膜外層のマクロファージ/マイクログリアはCD80+CCR2+のM1様分画であった(図5)。一方で、網膜表層の組織常在マクロファージも増加していたが、表現型はCD206+CX3CR1+のM2様分画であり局所で増殖していることを論文発表を行った (Yamaguchi M, et al. Diabetes. 2022;71:2685-2701)。

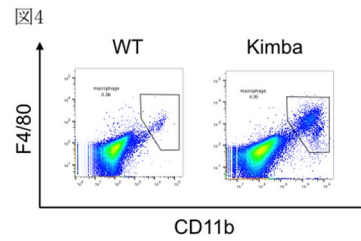


図5

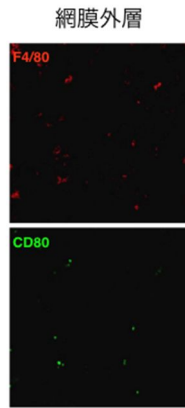
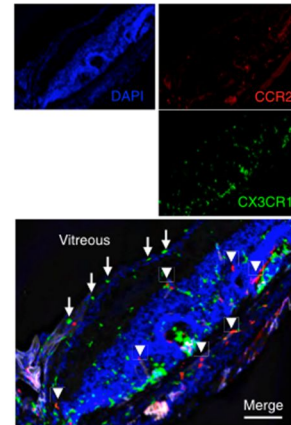


図6



(5)マクロファージ/マイクログリアを除去するため、クロドロネートリポソームをKimbaマウスに硝子体

注射を行い、視細胞死、マクロファージ/マイクログリアを評価を行った。網膜表層の組織常在マクロファージは減少していたが、網膜外層のマクロファージ/マイクログリアの数は変化なく、視細胞死の抑制も認めなかった。個体差が激しいマウスではあるが、網膜外層のマクロファージ/マイクログリアを特異的に除去できないか検討している。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaguchi Muneo, Nakao Shintaro, Wada Iori, Matoba Tetsuya, Arima Mitsuru, Kaizu Yoshihiro, Shirane Mariko, Ishikawa Keijiro, Nakama Takahito, Murakami Yusuke, Mizuochi Masaharu, Shiraishi Wataru, Yamasaki Ryo, Hisatomi Toshio, Ishibashi Tatsuro, Shibuya Masabumi, Stitt Alan W., Sonoda Koh-Hei	4. 巻 71
2. 論文標題 Identifying Hyperreflective Foci in Diabetic Retinopathy via VEGF-Induced Local Self-Renewal of CX3CR1+ Vitreous Resident Macrophages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 2685 ~ 2701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db21-0247	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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