

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390400

研究課題名(和文) 網膜浮腫をおこすノックアウトマウスを用いた糖尿病黄斑浮腫の新しい治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment modality for diabetic macular edema using animal models

研究代表者

村田 敏規 (MURATA, Toshinori)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：50253406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：RAMP-2のノックアウトマウスを用いて網膜浮腫を発症するマウス動物モデルを世界で初めて確立した。また、VEGF過剰産生Kimbaマウスも網膜浮腫を生じる事を確認した。蛍光眼底造影を用いて、 β -catenin、PPAR α -ligand、apelinの外因性投与で、漏出が減少するか否かを検討したが、明らかな減少は見られなかった。Kimbaマウスへのアドレノメデュリン補充療法では、Kimbaマウスの網膜血管漏出が抑制される可能性が示唆された。アドレノメデュリンの投与方法としては、alzet徐放性ポンプを用いてKimbaマウスの皮下に埋め込んだ。今後半減期が長いFc領域の融合タンパクで検討を続ける。

研究成果の概要(英文)：Using two mouse model of retinal edema, i.e., receptor-activity-modifying protein (RAMP)-2 knockout mouse and kimba mouse which overexpresses vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retina, we pursued the possibility for experimental treatment for macular edema. We investigated the effect of intraocular injection of β -catenin, PPAR α -ligand, apelin on retinal vascular leakage, but none of them exhibited prominent reducing effect of fluorescein dye leakage in fluorescein angiography. Then we investigated the effect of intravitreal and systemic injection of adrenomedullin on the hyperpermeability of retinal vessels in kimba mice. Adrenomedullin reduced fluorescein dye leakage from retinal vessels in kimba mice suggesting its therapeutic effect on retinal edema, in which VEGF plays a causative role. Since half-life of adrenomedullin is short, we consider that we have to synthesize a fusion protein of adrenomedullin and Fc portion of IgG to make its effect long lasting.

研究分野：眼科学 糖尿病網膜症

キーワード：黄斑浮腫 糖尿病 血管透過性亢進 adrenomedullin knockout mouse VEGF

1. 研究開始当初の背景

糖尿病黄斑浮腫（網膜浮腫）の治療は、種々の手技や薬剤を試行錯誤して使用しているのが現状であった。研究開始当初は、抗 VEGF (vascular endothelial growth factor) 抗体の臨床治験が行われていた段階で、その視力改善効果が期待される一方で、その効果は 1-2 ヶ月に、長期間の反復投与には困難を伴うことが明らかになりつつあった。安全で効果が高い、かつ安価で患者負担が少ない治療方法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

「遺伝子改変マウスを用いた糖尿病黄斑浮腫の臨床応用可能な治療法の開発」

我が国の勤労世代の社会的失明原因の首位は糖尿病網膜（黄斑）浮腫である。我々が作成した Receptor-activity modifying protein (RAMP)-2 ホモノックアウト (KO) マウスは、**網膜に浮腫を起こす世界で初めての動物モデル**であるが、胎生期に高率に死亡する欠点があった。これまでの研究で、長期間生存する RAMP2 のヘテロ KO マウスの網膜で、vascular endothelial growth factor (VEGF) を過剰産生させると、高率に網膜浮腫を発症する可能性が示唆された。これらのマウスを用いて、アドレノメデュリンを使った、糖尿病黄斑浮腫の治療法を開発する。

3. 研究の方法

RAMP2^{+/-}-ヘテロノックアウトマウスと、網膜で選択的に VEGF を過剰発現する kimba マウスの交配で、再現性をもって網膜浮腫を生じ、長期生存するマウスを作成する。このマウスと、RAMP2 の KO マウスを用いて、-catenin の発現の抑制の有無を確認する。-catenin の発現が低下していたら、それが網膜血管透過性亢進の一因であると仮説を立て、研究を進めることとした。

すなわち、-catenin の補充、さらにはアドレノメデュリン、apelin の補充を、タンパクの眼内投与にあわせて、眼周囲テノン嚢下投与、遺伝子導入で局所産生させ、網膜浮腫を改善させる、実験的に新しい治療法を開発をおこなうことを予定していた。

しかし、研究過程で kimba マウスが単独でも十分に糖尿病黄斑浮腫に類似した、網膜の浮腫および網膜血管新生を発症することが明らかとなった。このため、主に研究は網膜でヒト同様の、蛍光眼底造影、光干渉断層計、そして、黄斑浮腫の治療である無灌流領域へのレーザー、白内障があるマウスでのレーザー等の手技の開発と、kimba マウスへのアドレノメデュリン投与による、VEGF 誘導生の網膜浮腫の治療が可能であるか否かの検討に、研究の中心はシフトした。

4. 研究成果

(1) マウスにおける網膜浮腫の検出に、蛍光眼底造影は網膜血管からの漏出を検出で

き、極めて有用な手方となるが、頻回に施行することが困難であり、客観的な浮腫の定量化が困難であった。我々は、光干渉断層計でマウスの網膜の精密な画像を撮影する方法を開発した。図のように網膜の 10 層構造を描出でき、



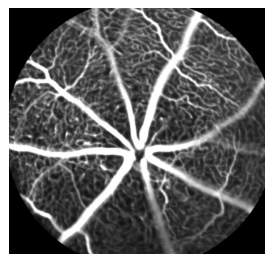
網膜浮腫や漿液性の網膜剥離などの浮腫性の変化を、非侵襲性に何回でも検査することができるようになった。この結果薬剤の効果や、レーザーの効果など、種々の治療の効果を容易に検討できるようになった。

(2) 糖尿病マウスには早期から白内障が発症する。軽度の白内障があっても、波長の長い赤色レーザーを使用可能な、multicolor laser を用いて、網膜レーザーが可能なることを確認した。黄色、緑、赤の 3 種類の波長で、白内障の程度に応じて、適切なレーザーの条件、すなわち、凝固径、凝固時間、波長を決定した。また凝固効率を改善するため、単発のレーザーではなく、一度の凝固で複数の凝固斑を得ることがかのような、pattern scan laser を用いることも、工夫した。

この結果は以下の論文に報告している。
Takao Hirano, Toshinori Murata
Effect of Laser Wavelength on Developing Appropriate Laser Burns through the Opaque Lens Using a Pattern Scan Laser
Ophthalmic Research 51 204-209 2014

(3) Kimba マウスの、網膜血管透過性亢進による網膜浮腫の形成過程を、光干渉断層計、蛍光眼底造影、眼底写真撮影などから評価する方法を確立した。下図は、正常マウスの網膜血管の蛍光眼底造影だが、従来の眼底カメラではこのように 360 度の全体像をとることができず、また毛細血管は描出されなかった。

正常マウスの網膜血管の蛍光眼底造影



下図は kimba マウスの網膜血管の蛍光眼底造影写真である。星印のように無灌流領域が描出され、挿入図のように強い斑点状の蛍光漏出で示される、血管新生も確認できる。

kimba マウスの網膜血管の蛍光眼底造影写真



(4) RAMP2^{+/-}-ヘテロノックアウトマウスで網膜浮腫が亢進する所見から、アドレノメデュリン活性の低下が、網膜浮腫の原因となる事を明らかとした。この知見に基づいて、VEGF 過剰産生による網膜浮腫を発症する kimba マウスの、網膜血管透過性亢進をアドレノメデュリンの硝子体内投与で、抑制が可能である事を明らかとした。これは、網膜浮腫の実験的治療を可能とし、さらには将来の新しい糖尿病黄斑浮腫治療薬の開発につながる知見であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

Takao Hirano, Yasuhiro Iesato, Akira Imai, Yuichi Toriyama, Wataru Kikushima, Toshinori Murata
Effect of Laser Wavelength on Developing Appropriate Laser Burns through the Opaque Lens Using a Pattern Scan Laser
Ophthalmic Research 51 204-209 2014 査読有
DOI:10.1159/000357918

Takao Hirano, Yasuhiro Iesato, Yuichi Toriyama, Akira Imai, Toshinori Murata
Detection of Fovea-Threatening Diabetic Macular Edema by Optical Coherence Tomography to Maintain Good Vision by Prophylactic Treatment
Ophthalmic Research 52 65-73 2014 査読有
DOI:10.1159/000362372

Takao Hirano, Yasuhiro Iesato, Yuichi Toriyama, Akira Imai, Wataru Dai Chiba, Toshinori Murata
Correlation between diabetic retinopathy severity and elevated skin autofluorescence as a marker of advanced glycation end-product accumulation in

type 2 diabetic patients
Journal of Diabetes and Its Complications 28 729-734 2014
査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2014.03.003>

平野 隆雄 村田 敏規: 特集 糖尿病黄斑浮腫 4 黄斑浮腫治療におけるレーザー光凝固治療
眼科 56(4):475-482, 2014
総説: 査読無

平野 隆雄 村田 敏規: 特集 糖尿病黄斑浮腫は今こう治療する 光凝固
臨床眼科 68:20-26, 2014
総説: 査読無

京本 敏行, 平野 隆雄, 村田 敏規: 【高齢者の感覚器障害】 眼疾患 診断と最新の治療 糖尿病網膜症
臨床と研究 91(9):1146-1150, 2014
総説: 査読無

平野 隆雄, 村田 敏規: 網膜疾患の薬物治療 薬物治療と網膜光凝固の併用による糖尿病黄斑浮腫治療
眼薬理 28(1):62-66, 2014
総説: 査読無

平野 隆雄, 村田 敏規:
【眼科診療指針のパラダイムシフト】 網膜硝子体 糖尿病網膜症の治療
眼科 56(2):142-148, 2014
総説: 査読無

村田 敏規: わかりやすい臨床講座 矯正視力 1.0 を目指せる糖尿病黄斑浮腫の治療
日本の眼科 84(10):1354-1359, 2013
総説: 査読無

平野 隆雄, 村田 敏規: 網膜光凝固 レーザーの種類と注意点 レーザーの基本的知識と注意点
眼科グラフィック 2(3):296-302, 2013
総説: 査読無

[学会発表](計 4 件)

村田 敏規、瓶井資弘：近未来の網膜硝子体
領域 第 68 回日本臨床眼科学会、2014 年 11
月 13 日から 16 日、神戸市
(シンポジウム・オーガナイザー)

村田 敏規：糖尿病合併症 予防と治療の進
歩 糖尿病網膜症
第 29 回糖尿病合併症学会、2014 年 10 月 3 日、
東京 (シンポジウム)

村田 敏規：糖尿病黄斑浮腫 薬物 (ステロ
イド、抗 VEGF) 療法
第 67 回臨床眼科学会、2013 年 10 月 31 日-11
月 3 日、横浜市 (シンポジウム)

村田 敏規：糖尿病網膜症で運転免許をなく
さないために必要なこと
第 48 回 糖尿病学の進歩、2014 年 3 月 7 日
札幌市 (教育講演)

[図書](計 2 件)

村田 敏規：糖尿病網膜症 今日の眼疾患治
療指針 第 3 版 後藤浩 (編) in press
医学書院、東京、2015 刊行 (分担執筆)

村田 敏規：黄斑症の治療/光凝固 白神史雄
(編)専門医のための眼科診療クオリファ 16
巻 糖尿病合併症の新展開 Pp11-118
中山書店、東京、2013 (分担執筆)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 敏規 (MURATA, Toshinori)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号：50253406

(2) 研究分担者

石橋 達朗 (ISHIBASHI, Tatsuro)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：30150428