

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592549

研究課題名(和文)高眼圧性RGC障害新規評価系の開発：緑内障疾患モデルVavマウスを用いた研究

研究課題名(英文)Characterization of CFP-expressed Vav-deficient mice with spontaneous IOP elevation to evaluate pressure-dependent RGC death

研究代表者

藤川 恵子(Fujikawa, Keiko)

北海道大学・保健科学研究所・客員研究員

研究者番号：70374246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：網膜の神経節細胞の障害を経時的に可視化して評価可能なシステムの研究開発は、緑内障などの重要な眼疾患の本体が視神経症であることから、創薬の効果の評価にとってもきわめて有用な系である。我々は、蛍光色素(CFP)によってその網膜障害を経時的に数値化して評価できるCFP/Vavマウスを研究開発し解析した。その結果、障害数の解析だけでなく障害パターンの解析も可能な評価系であることが示され、極めて有効であることを認めた。網膜の神経節細胞に有効なことは脳神経にも応用可能であり、今後の発展性が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：It seems critically useful to develop the visible system how the retinal ganglion cells (RGCs) suffer from its damages and proceed into neuropathy under relative high intraocular pressures in vivo, although serious ocular disease like glaucoma, exists itself in optic neuropathy. Therefore we generate cyan fluorescein protein (CFP) expressed Vav2-deficient (CFP/Vav2) mice and Vav2, 3-deficient (CFP/Vav2, 3) mice respectively that only RGCs express CFP in those mice. First, we examined and proved that CFP/Vav2 mice system allows us to evaluate the RGCs damages quantitatively and paternally in vivo on the time course. This innovation is promising because the results obtained from RGCs examination are available for the neural cells of the brain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

(1) 緑内障は多因子慢性進行性神経変性疾患であり、高眼圧ストレスも疾患の進行要因の一つである。日本において失明の第一原因疾患であり、高齢化社会への急速な移行と共に病態の解明と治療の研究はますます取り組むべき課題である。緑内障研究では適切な疾患モデル動物の開発が分子レベルでの解明をすすめていくために重要である。

(2) 緑内障の本体は視神経症であり、網膜神経節細胞(retinal ganglion cells: RGCs) に対する病態の解明がますます大切となっている。とその視神経束である視神経乳頭の変性にいたる病態解明

2. 研究の目的

(1) 緑内障性視神経症(glaucomatous optic neuropathy: GON) の *in vivo*での病態解明のため、我々の報告した生後高眼圧を呈しそれに続いて RGCs の脱落、視神経乳頭の陥凹所見をフェノタイプとして持つ Vav 遺伝子欠損マウスを用いて RGCs の脱落の経時的・数的変化を可視化できるマウスを作製する。

(2) 作製したマウスにて眼圧のストレスによって経時的に生じる RGCs の変性、脱落を検討する。

3. 研究の方法

(1) 蛍光色素(CFP) を網膜神経節細胞に特異的に発現させるプロモーターを使用して作製されたトランスジェニックマウス(CFP マウス; ジャクソンラボより購入) を Vav マウスと掛け合わせ CFP/Vav2 マウスと

CFP/Vav2,3 マウスを作製する。

(2) CFP マウス(コントロールマウス) と CFP/Vav2, CFP/Vav2,3 マウスを眼圧の上昇のない生後 21 日(3 週齢) にて眼球を取り出し固定してフラットマウント標本を作製する。その後 CFP/Vav2 マウスでは生後 8 週齢から正確に眼圧を測定できるマイクロニードル法によって 2 週に一回、即ち 8, 10, 12, 14 週齢にて日中の眼圧を測定して記録する。CFP マウスでもコントロールのため同様に測定する。眼圧測定終了後 15 週齢にて眼球を取り出し固定してフラットマウント標本を作製する。フラットマウント標本の外側、内側、耳側、鼻側方向の 4 方向に分けてそれぞれを optic disc からの距離により三点に分けて(中心部、中間部、外側部) 総計 12 カ所に分けてそれぞれにて 400mm² 内の蛍光発色する RGC をカウントする(図 1)。

網膜フラットマウント標本

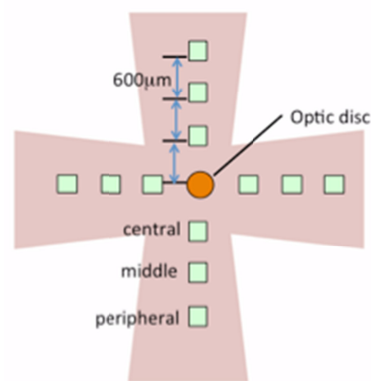


図 1

また RGC への眼圧負荷の指標として、眼圧 × 日数である AUC (area under the curve; mmHg × day) を計算して評価に使用した(図 2)。

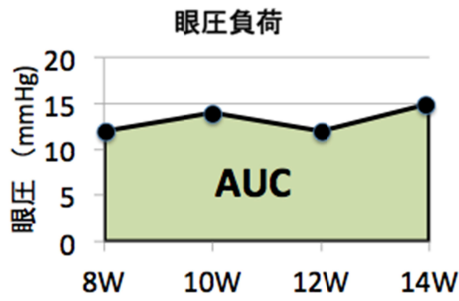


図 2

4. 研究成果

CFP/Vav2 マウスの解析は終了したため、報告する。CFP/Vav2,3 マウスは現在解析中である。

- (1) Vav マウスでは、生後少なくとも 2 8 週齢まで眼圧の上昇がマイクロニードル法にて確認できた。
- (2) 従来は Southern 法でしか検定できなかった Vav マウスのジェノタイピングのための PCR 法を開発した。

慢性高眼圧 RGC 蛍光発現マウスについて得られた結果を (3) ~ (7) に述べる。

- (3) CFP/Vav2 マウスの 20% がコントロールマウスと比べて統計学的に高い眼圧を示した (図 3)。

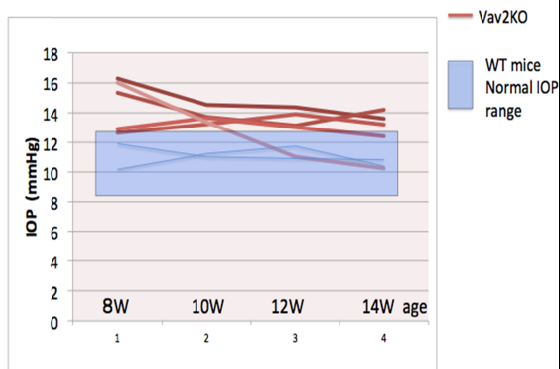


図 3

- (4) P21 (3 週齢) での RGC 数は CFP/Vav2

マウス と CFP マウスの間に差は認めない。また、4 方向別にみても RGC 数は同等であった。

- (5) CFP/Vav2 マウスでは 1 5 週齢にて RGC 数が優位に減少していた (図 4)。

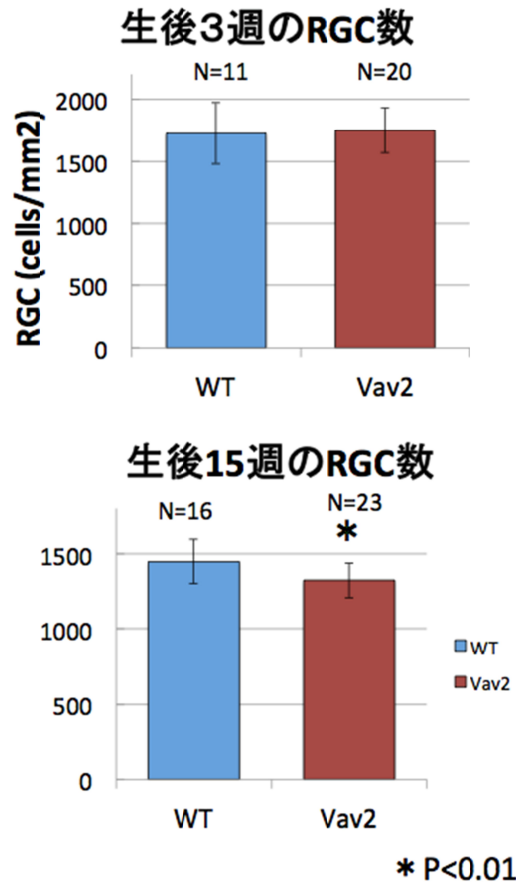


図 4

- (6) CFP/Vav2 マウスにみられる経時的な RGC の減少にはパターンが認められ、網膜鼻側と下方部位にて有意な減少であった (図 5)

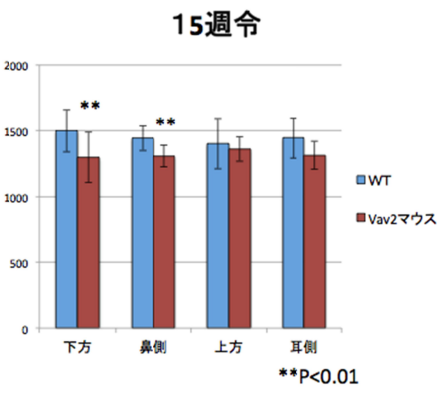
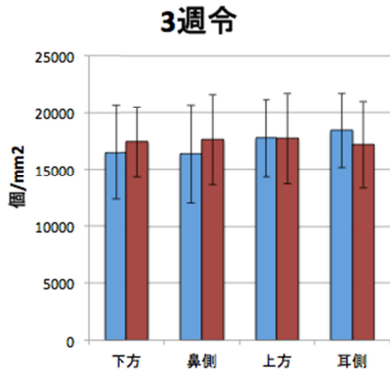


図 5

表 1

		Cells/mm2				
		WT (N=16)		Vav2 (N=21)		t-test
		平均値	SD	平均値	SD	
inferior	central	1460.94	238.57	1371.59	246.08	0.1352
	middle	1520.31	237.03	1371.59	278.42	0.0463
	peripheral	1517.19	361.22	1150.00	315.57	0.0010
	total	1499.48	161.12	1297.73	191.26	0.0008
nasal	central	1389.06	226.19	1286.36	262.85	0.1080
	middle	1565.63	176.98	1363.64	272.96	0.0070
	peripheral	1375.00	264.58	1275.00	276.35	0.1349
	total	1443.23	93.85	1308.33	181.54	0.0051
superior	central	1346.88	223.77	1337.50	344.32	0.4624
	middle	1450.00	310.78	1507.95	264.73	0.2698
	peripheral	1414.06	268.01	1234.09	224.08	0.0153
	total	1403.65	192.26	1359.85	202.51	0.2529
temporal	central	1384.38	180.02	1363.64	256.90	0.3918
	middle	1537.50	194.51	1382.95	293.42	0.0377
	peripheral	1417.19	317.64	1194.32	291.64	0.0157
	total	1446.35	153.93	1313.64	209.47	0.0194

(7) CFP/Vav2 マウスでの RGC 障害と眼圧負荷 (AUC) の間には、負荷の集積につれて障害は増加傾向があった (図 6)。

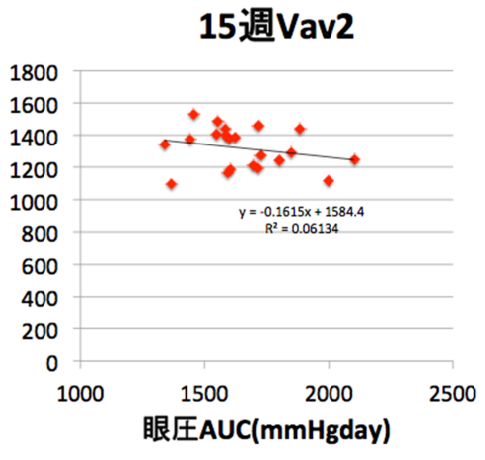
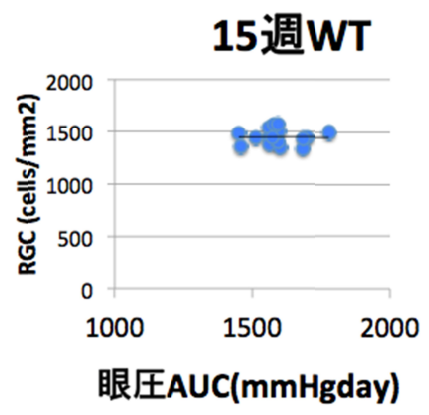


図 6

結果からのまとめ

CFP/Vav2 マウスは RGC 障害の定量的評価が可能である。数での評価と共にパターンがあることより、局在での評価も可能な評価系システムである。

5. 発表論文等

[学会発表]

- 1). 藤川恵子、井上馨、越山隆恵、山岸麗子、相原 一：自然発症高眼圧を呈する Vav 遺伝子欠損 マウスの眼圧の特徴、第 117 回日本眼

科学会、2013年4月4-7日

2) 藤川恵子、井上馨、越山隆恵、山岸麗子、
相原 一: Vav2 欠損 CFP 発現遺伝子改変マウスを用いた眼圧の影響と RGC 障害の解析、
第118回日本眼科学会、2014年4月2-6日

3) Fujikawa K, Inoue K, Koshiyama T, Yamagishi R, Aihara M: Characterization of CFP-expressed Vav2-deficient mice with spontaneous IOP elevation to evaluate pressure-dependent RGC death、2014 May 3-7, ARVO, Orlando, FL, USA.

[その他]

ホームページ等

<http://www.ot-hokudai.info>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤川 恵子 (FUJIKAWA, Keiko)

北海道大学・大学院保健科学研究院・客員研究員

研究者番号：70374246

(2) 分担研究者

井上 馨 (INOUE, Kaoru)

北海道大学・大学院保健科学研究院・教授

研究者番号：80133718

朝岡 亮 (ASAOKA, Ryo)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00362202