

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659808

研究課題名(和文) アミロイド b を標的とした加齢黄斑変性・緑内障の早期診断・治療に向けた新規戦略法

研究課題名(英文) The diagnostic and therapeutic strategies for age-related macular degeneration and glaucoma targeting the amyloid b

研究代表者

大野 京子 (Ohno-Matsui, Kyoko)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：30262174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000 円、(間接経費) 780,000 円

研究成果の概要(和文)：我々は、アミロイド (A β) が AMD の重要な原因物質であることを解明したが、最近、緑内障の網膜に A β 蓄積が明らかになり、両者が A β 蓄積という共通の発症プロセスを有する可能性がある。そこで、両者に対し、A β を標的とした早期診断、早期治療に向けた新規戦略法を確立することを目的として、眼底に蓄積した A β を *ex vivo*, *in vivo* で可視化するために、網膜下注入 A β を PiB 標識ののちに網膜フラットマウントにて観察した。neprilysin 欠損マウスの脳および網膜組織切片において PiB 標識により A β が観察できるか調べた。さらにラマン分析で凝集 A β に特徴的なパターンを同定した。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that Alzheimer's amyloid beta (A β) was an important causative material for age-related macular degeneration (AMD). Recent studies showed A β accumulation within retina in glaucoma. These suggest that A β deposition might be a common precursor for both pathologies. To develop the methods of *in vivo* visualization of A β deposited in the retina, we injected A β into subretinal space of mouse eyes and injected the PiB; via tail vein. In retinal flatmount, subretinal A β was clearly observed. However, the amount of A β in the retina was not sufficient to be detected in neprilysin deficient mice. We also performed Raman spectroscopy to detect A β in a non-invasive way.

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：加齢黄斑変性 Amyloid 緑内障 ラマン分光

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性(AMD)は先進諸国における50代以上の失明原因の首位である。滲出型AMDに対し、現在抗VEGF療法が施行されているが、視力改善は限られたものである。AMDの発症メカニズムとして、我々はドルーゼン内に存在するアルツハイマー病の原因物質；アミロイドβ(Aβ)に着目して研究を展開し、Aβを過剰に蓄積するマウスでは網膜下にドルーゼン様物質の蓄積や網膜色素上皮の変性など、AMDの病態を再現できることを報告し、AβがAMD発症の主要な原因物質であることを明らかにした(J Clin Invest 2005)。本研究成果に基づき、Aβを標的としたAMD治療薬の patents が2008年以降に続々と取得されており、現行の抗VEGF療法に代わる、新たな観点からの治療として注目されている。さらに最近では、緑内障における網膜神経節細胞死に網膜内層に蓄積したAβが関与していることが明らかになり(Guo L. Proc Natl Acad Sci 2007, Wang WH. IOVS 2008)、Aβを標的とした治療が網膜神経節細胞死を阻止できると期待されている。そこで本研究では我が国の2大失明原因である緑内障とAMDに対し、in vivoで網膜に蓄積したAβ画像を可視化することにより、Aβを標的とした全く新しい早期診断・早期治療の新規戦略法を確立しようとするものである。

2. 研究の目的

まず、網膜下にAβを留置したマウスを用いて、種々のAβ標識物質の中から、蛍光波長特性やAβ標識の特異性に基づいて眼底Aβ画像の可視化に最も適した物質を、網膜伸展標本を用いたex vivo実験およびマウス生体の観察によるin vivo実験により選定する。つぎに、動物実験で選定されたAβ標識物質を用いて、HAB研究機構を通じて輸入したAMDもしくはドルーゼンを有するヒト死体眼において、眼底Aβ画像を可視化できるか検討する。それとともに眼圧上昇による緑内障モデルマウスおよびAMDモデルマウスを用いて高感度かつ特異的にAβ画像を可視化する標識物質の選定と検出システムを確立しようとするものである。

緑内障とAMDは全く別の疾患であると考えられてきたが、網膜内の蓄積部位は異なるものの、ともにAβ蓄積を最初のtriggerとする共通点があり、そのためにAβ標的治療が両疾患においてCNVや網膜神経節細胞死といった器質的变化を生じる前に原因物質自体を排除するという、根本的かつ全く新しい治療になりうると期待される。これまでの報告はすべて死体人眼での組織切片における報告であり、これではAβを同定してもそれを治療に反映することはできない。これまで生体において眼底Aβを可視化しようという試みは全くなされていない。患者の眼底で直接Aβを可視化することにより、AMDおよびそ

の前駆病変を有する患者に対し、より病態に即したAβ標的治療をテラメイド医療として施行することが可能となる。

3. 研究の方法

(1)マウス眼球における眼底Aβの可視化条件の設定(ex vivo実験)

まずex vivoにてAβ標識物質として、PiBを用いてex vivoのマウス眼球における網膜下Aβ画像の可視化を行った。実験方法としては

Aβペプチドを用い、単量体から凝集体まで種々の状態のAβ蛋白を調整

手術顕微鏡を用いて、C57Bl/6マウスの網膜下に上記で作成した種々の状態のAβペプチドを注入

1週間後にPIB(1.7mg/kgを100μl)をマウス尾静脈に注入してAβを標識

眼球摘出して網膜伸展標本を作製し、各物質に適した蛍光波長を用いて、走査レーザー顕微鏡にて観察

以上により、ex vivoで最も高解像度かつ検出率よく眼底Aβを可視化できる標識物質とその検出条件を特定する。同時に、Aβの形状(凝集体形態)による検出条件の違いについても検討する。

(2)マウス眼球における眼底Aβの可視化(in vivo実験)

つぎにin vivoでの可視化に向けて、Aβを網膜下に蓄積することを申請者が報告したネプリライシン欠損マウス(J Clin Invest 2005)およびAβの前駆蛋白であるamyloid precursor protein (APP)のトランスジェニックマウスを用い、尾静脈からPiBを注入したのちに、眼球を摘出したのちに固定し、組織切片を作成する。網膜組織においてAβが可視化できるか蛍光顕微鏡を用いた観察により確認する。

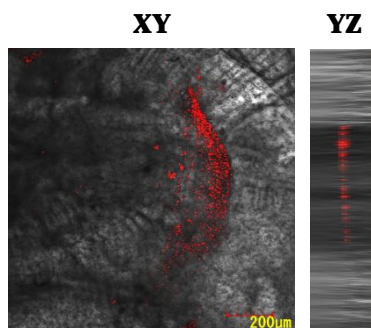
また、網膜内のAβ蓄積量を増加させるために、ネプリライシン欠損マウスとAPPトランスジェニックマウスの交配を行い、二重変異マウスを作成し、同様に網膜組織を用いてAβの蓄積を観察した。

さらに、標識物質を用いずにラマン分光の解析を用いて非侵襲的にAβのパターンを解析した。Aβは非凝集型と凝集型の両方を作成して用いた。

4. 研究成果

Aβ1-60 (HCl form)を用い、in vitroでincubationすることにより単量体から凝集体まで種々の状態を作成した。手術顕微鏡下にC57Bl/6マウスの網膜下に生理食塩水を注入して意図的に網膜剥離を作成後、ハミルトンシリンジを用いて網膜下にAβを注入した。翌日に眼底観察後、マウスの尾静脈からPiB色素を注入、その翌日に眼球を摘出した。摘出眼球は1時間パラホルムアルデヒドにて固定したのちに、半割し、強膜と脈絡膜、網膜色素上皮を除去し、神経網膜のみとする。そ

ののちに4象限に切れ込みをいれ、スライドガラス上に伸展して網膜伸展標本を作製した。蛍光顕微鏡による観察にて添付図のように、注入部位に一致し、網膜下の深さにPiBにより標識されるA β がみられた。さらに多光子励起を用いて観察を行った。(図;多光子励起により観察した網膜下注入A β)



つぎに、APPトランスジェニックマウス及びネプリライシン欠損マウスにおいて、12週令のものの尾静脈からPiBを注入した翌日に眼球摘出し、PFAにて固定後、クライオスタットにて凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡にて観察した。コントロールとして脳組織も同様に切片を作成し、観察した。また、網膜内のA β 蓄積を示すために、網膜組織切片、脳組織切片をA β に対する抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、免疫染色では脳組織および網膜組織ともにA β が蓄積していることが確認されるとともに、PiB標識では脳組織ではA β に特異的な染色が確認できた。しかし網膜組織ではPiB標識ではA β を観察できず、この理由として、脳に比較し網膜における蓄積量が不十分であるためと考えられた。そこでAPPトランスジェニックマウスとネプリライシン欠損マウスとの交配を行い、二重変異マウスを作製しtail DNAのPCRにより二重変異を確認し、本マウスに対する解析を今後行う予定である。また、AMDおよび緑内障を有するヒト患者の剖検眼は国内のアイバンクの眼球は検査できないため、アメリカから輸入し解析を行おうとしたが、網膜部分の輸入は倫理的問題があり困難でこの部分の解析は今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計4件)

Shinohara K, Moriyama M, Shimada N, Nagaoka N, Ishibashi T, Tokoro T, Ohno-Matsui K. Analyses of Shape of Eyes and Structure of Optic Nerves in eyes with Tilted Disc Syndrome by Swept-source Optical Coherence Tomography and Three Dimensional Magnetic Resonance Imaging. Eye. 査読あり, 27(11), 2013, 1233-1241

Wang J, Ohno-Matsui K, Morita I. Cholesterol enhances amyloid β deposition in mouse retina by modulating the activities of A β -regulating enzymes in retinal pigment epithelial cells. Biophys

Biochem Res Commun, 査読あり, 424, 2012, 704-709

Wang J, Ohno-Matsui K, Morita I. Elevated amyloid β production in senescent retinal pigment epithelium, a possible mechanism of age-related subretinal accumulation of amyloid β . Biochem Biophys Res Commun, 査読あり, 423, 2012, 73-78

Wang J, Ohno-Matsui K, Nakahama K, Okamoto A, Yoshida T, Shimada N, Mochizuki M, Morita I. Amyloid β enhances migration of endothelial progenitor cells by up-regulating CX3CR1 in response to fractalkine, which may be associated with development of choroidal neovascularization. , 査読あり, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 31, 2011, e11-18

(学会発表)(計4件)

Kyoko Ohno-Matsui. The potential role of amyloid β in the development of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. Symposium "Fundamental mechanism underlying both physiological and pathological angiogenesis". The 19th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization and the 1st Asia-Pacific Vascular Biology Meeting. 2011.12.9, Tokyo

Kyoko Ohno-Matsui. Amyloid β enhances the migration of endothelial progenitor cells via CX3CR1. 5th International Symposium on Age-Related Macular Degeneration. 2011.9.9. Baden Baden, Germany.

Jiyang Wang, Kyoko Ohno-Matsui, Takeshi Yoshida, Noriaki Shimada, Manabu Mochizuki, Ikuo Morita. Amyloid beta enhances migration of endothelial progenitor cells via upregulation of CX3CR1. American Association of Research of Vision and Ophthalmology (ARVO). 2012.5.3, Fort Lauderdale, USA.

Kyoko Ohno-Matsui. Amyloid beta enhances migration of endothelial progenitor cells by up-regulating CX3CR1 and stimulates development of choroidal neovascularization. In symposium "Advances on molecular mechanisms in intraocular inflammation, neovascularization and neuroprotection". Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress 2011, 2011.3.24, Sydney, Australia

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大野 京子(OHNO-MATSUI, Kyoko)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・准
教授
研究者番号:30262174

(2)研究分担者

森田 育男(MORITA, Ikuo)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教
授
研究者番号:60100129