

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791876

研究課題名(和文)加齢黄斑変性における網脈絡膜間物質輸送の解明

研究課題名(英文)To analyze the transport between the outer retina and the choroidal circulation in A
ge-related macular degeneration

研究代表者

永井 香奈子(Izumi-Nagai, Kanako)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：60407103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：網膜脈絡膜物質輸送をモニタリングするためデキストラン(70KDa)、NHS-Biotin(443.43Da)、トランスフェリンをマウスに投与するとデキストラン投与マウスでは投与10分後に脈絡膜毛細血管内に点状の染色像を認め、NHS-Biotinでは5秒後に脈絡膜毛細血管の外壁に漏出像として検出され、トランスフェリンを投与すると1時間後に脈絡膜毛細血管間に点状の染色像として検出された。分子量の非常に小さい分子では脈絡膜毛細血管外への物質輸送はfenestrae依存性であること、分子量が中程度(70KDa)の分子ではエンドサイトーシスによる脈絡膜毛細血管の物質輸送が行われていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To analyze in vivo tracer transport through the murine choriocapillaris, cardiac or tail vein injection using dextran, NHS-Biotin or transferrin to wild mice was done. The leakage outside of the choriocapillaris was observed immediately after injection with NHS-Biotin. On the other hand, punctate staining pattern was observed using dextran (70KDa) or transferrin. These results suggested that transport of small molecule was fenestrae-dependent and that of large molecule was endocytosis-dependent.

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：網膜脈絡膜物質輸送 加齢黄斑変性 fenestrae 脈絡膜毛細血管

1. 研究開始当初の背景

研究背景-1 加齢黄斑変性の病態

加齢黄斑変性 (Age-Related Macular Degeneration: AMD) は欧米を始めとした先進国において成人の失明や視力低下の主原因となっており、我が国においても近年ますます増加傾向が認められている (2004 年、4 位)。今後高齢化社会に向けてますます患者数が増加することが予測される。

AMD は臨床的および病理的所見から大きく萎縮型と滲出型の 2 病型に分類される。萎縮型 AMD では網膜色素上皮の萎縮、視細胞の変性、ドルーゼンの形成がみられる。滲出型 AMD はより進行した病態で脈絡膜血管新生を特徴とする。

AMD は、初期には網膜と脈絡膜の間の沈着物であるドルーゼンや網膜色素上皮の萎縮が生じる。網膜の外層は有窓性血管である脈絡膜血管によって栄養されるが、加齢により脈絡膜と網膜間の物質輸送が減少すると、ドルーゼンと呼ばれる沈着物が網膜色素上皮とその下のブルッフ膜との間に蓄積、沈着すると推測される。ドルーゼンは糖蛋白、脂質、網膜色素上皮細胞の崩壊産物などからなる細胞外沈着物であり、眼底検査ではドルーゼンは黄白色斑として認められる。外観より辺縁の明瞭な硬性ドルーゼン、不明瞭な軟性ドルーゼンに分類される。小型の硬性ドルーゼンは健康な高齢者にも存在するが、大型、多数の軟性ドルーゼンは滲出性 AMD の有意なリスクとなる。リポフスチンや光による酸化ストレスにより網膜色素上皮が傷害されると、その崩壊産物は色素上皮とブルッフ膜の間に蓄積し、局所的な炎症を引き起こす。この結果、サイトカインの分泌、補体の活性化が生じ、炎症によって生じた脂質や蛋白質などが崩壊産物に加わり、ドルーゼンが形成されると考えられている。また、AMD の後期には網膜の中心にある黄斑に集中する光による酸化ストレスから炎症性血管新生が惹起され、脈絡膜由来の炎症性血管新生 (choroidal neovascularization: CNV) が惹起される。この網膜下で増殖した血管組織は、滲出性網膜剥離や網膜下出血などの重篤な合併症を引き起こし、急速に視力が低下する。

AMD に対する治療として、従来の光凝固治療・手術治療をはじめ、さまざまな新しい治療が試みられてきているが、いずれも満足のいく有効な方法はない。例えば近年認可となった光線力学療法といった新しい治療法もあるが、欧米での臨床成果 (TAP study) は自然経過に比べると視力低下が軽減される程度であった。そこで AMD に対する新たな治療法の確立は、眼科領域における急務である。

研究背景-2 脈絡膜血管の加齢黄斑変性への関与

脈絡膜は強膜と網膜の間にある血管と色素に富む層で網膜外層を栄養している。脈絡膜は強膜側から網膜側に向かって脈絡膜上腔、血管層、脈絡膜毛細血管板 choriocapillaris、ブルッフ膜 Bruch membrane の 4 層に分けられる。脈絡膜毛細血管板は 1 層の板状の毛細血管層で、血管壁には、電子顕微鏡的にみると多数の有窓構造 (fenestrae: 径 60~70 nm の内皮細胞に開いた小孔) が認められる。この有窓型毛細血管は脈絡膜毛細血管板以外にも腎系球体、内分泌腺、消化管粘膜の血管、脳の脈絡叢に認められ、内皮細胞の壁の小さな孔を介して各細胞への速やかな物質の受け渡しを行っている。また、ブルッフ膜は脈絡膜の最内層で、網膜色素上皮層に接している。脈絡膜から網膜外層へ栄養を送る通路で、網膜色素上皮と共に血液網膜柵 (関門) blood-retinal barrier として重要である。Bruch 膜は加齢とともに脂質や細胞外基質などの沈着によって厚みを増す。組織学的には網膜色素上皮と基底膜の間 (basal laminar deposit) や、基底膜とブルッフ膜の内側の膠原線維層の間 (basal linear deposit) の多形性物質としても観察される。このような Bruch 膜の加齢変化により網膜色素上皮と脈絡膜の間の物質輸送、細胞接着などの機能が障害されると考えられる。

近年、網脈絡膜疾患において、網膜の栄養血管である脈絡膜血管の循環動態やその機能異常が注目を集めている。中でも中心性漿液性網脈絡膜症 (central serous chorioretinopathy: CSC) は脈絡膜の循環障害が主因と考えられている。この疾患の中でも、慢性、再発性の経過をとる chronic CSC の患者の多くは AMD に移行することが多いことから、AMD の発症にも何らかの脈絡膜の機能不全、循環不全の病態が関わっていると示唆されている。しかしながら、AMD における脈絡膜の分子、細胞メカニズムについてはほとんど知られていないのが現実である。そこで、今回申請者は、AMD における脈絡膜血管の機能的、細胞生物学的解析、中でも網膜-脈絡膜間の物質輸送に着目して AMD の病態解析を行なう。

2. 研究の目的

加齢黄斑変性は欧米で失明原因の首座を占める網脈絡膜疾患である。初期には網膜と脈絡膜の間の沈着物であるドルーゼンや網膜色素上皮の萎縮が生じ、後期には脈絡膜由来の炎症性血管新生が惹起される。加齢黄斑変性は黄斑の網脈絡膜の加齢変化を基盤とし、酸化ストレスや炎症がその原因となるとされるが詳細は解明されていない。

申請者は網脈絡膜間の物質輸送に着目して加齢黄斑変性の病態解析を行なう。

3. 研究の方法

(1) 網膜脈絡膜物質輸送のモニター手法を確立するため、デキストラン (70KDa) を正常マウスへ尾静脈投与した。投与後 2 分、5 分、10 分でマウスを灌流固定し、眼球を摘出した。片眼は flatmount を作成し、脈絡膜毛細血管におけるデキストランの血管外への漏出を共焦点顕微鏡を用いて観察した。残りの片眼は凍結切片を作成し免疫組織化学染色を行い、デキストランの眼内での分布を解析した。脈絡膜毛細血管の染色には Plasmalemma vesicle protein(PV)-1 をマーカーとして用いた。

(2) 分子量、及び生物学的活性の違いによる網膜脈絡膜物質輸送パターンの変化の解析を行うため、生物学的活性を持たないデキストラン (70KDa) 及び NHS-Biotin (443.43Da) をマウスに心臓内投与した。各々 5 秒後、10 分後にマウスを灌流固定し、眼球を摘出した。片眼は flatmount を作成し、脈絡膜毛細血管における各分子の血管外への漏出を共焦点顕微鏡を用いて観察した。残りの片眼は凍結切片を作成し免疫組織化学染色を行い、各分子の眼内での分布を解析した。

また、生物学的活性を持つ分子として、トランスフェリン (70KDa) を正常マウスに尾静脈投与し、1 時間後にマウスを灌流固定し、眼球を摘出した。片眼は flatmount を作成し、残りの片眼は凍結切片を作成し免疫組織化学染色を行った。

また、各々の分子の脈絡膜毛細血管外への輸送が fenestrae 由来か否かを解析するため、抗 Plasmalemma vesicle protein(PV)-1 抗体を中和抗体として用いた。各々の分子をマウスに投与する 1 時間前に抗 PV-1 抗体を尾静脈注射しフラットマウント、凍結切片により、染色パターンを評価した。

(3) 年齢による網膜脈絡膜物質輸送パターンを解析するため、2 ヶ月齢、4 ヶ月齢、12 ヶ月齢の正常マウスに対し、NHS-Biotin (443.43Da) を心臓内投与し 5 秒後にマウスを灌流固定し、眼球を摘出し、片眼は flatmount を作成し、残りの片眼は凍結切片を作成、免疫組織化学染色を行った。

(4) 脈絡膜新生血管を有するマウスにおける網膜脈絡膜物質輸送パターンを解析するため、脈絡膜新生血管を自然発症する加齢黄斑変性モデルマウスと正常マウスに NHS-Biotin (443.43Da) を心臓内投与し、5 秒後にマウスを灌流固定し、眼球を摘出し、片眼は flatmount を作成し、残りの片眼は凍結切片を作成、免疫組織化学染色を行った。

4. 研究成果

(1) デキストラン (70KDa) を正常マウスへ尾静脈投与し、投与後 2 分、5 分、10 分でマウスを灌流固定し flatmount と凍結切片による免疫組織化学染色を行い、デキストランの眼内での分布を解析したところ、尾静脈投与後 2 分では flatmount、凍結切片共にデキストラン (70KDa) の染色を検出することはできなかったが、投与後 5 分では、flatmount、凍結切片共に、脈絡膜毛細血管間にデキストラン (70KDa) の染色を検出した。投与後 10 分ではさらにデキストラン (70KDa) の染色の検出量が増加した。

(2) デキストラン (70KDa) 及び NHS-Biotin (443.43Da) をマウスに心臓内投与し、分子量の違いによる網膜脈絡膜物質輸送パターンの変化を解析したところ、分子量の大きいデキストラン (70KDa) では心臓内投与後 10 分で脈絡膜毛細血管間に点状の染色像として検出された一方、分子量の小さい NHS-Biotin では心臓内投与後 5 秒で脈絡膜毛細血管の外壁に漏出像として検出された。また、生物学的活性を持つ分子として、トランスフェリンを用いたところ、尾静脈投与 1 時間後に脈絡膜毛細血管間に点状の染色像として検出された。

また、各々の分子をマウスに投与する 1 時間前に抗 PV-1 抗体を尾静脈注射し、各々の分子の脈絡膜毛細血管外への輸送が fenestrae 由来か否かを解析したところ、NHS-Biotin (443.43Da) で認められた脈絡膜毛細血管の外壁への漏出像は抗 PV-1 抗体投与により抑制された。また、デキストラン (70KDa) およびトランスフェリンは抗 PV-1 抗体投与後も変わらず脈絡膜毛細血管間に点状の染色像を認めた。

(3) 2 ヶ月齢、4 ヶ月齢、12 ヶ月齢の正常マウスに対し、NHS-Biotin (443.43Da) を投与したところ、月齢が進むにつれ脈絡膜毛細血管外への漏出量の増加が認められた。

(4) 脈絡膜新生血管を自然発症する加齢黄斑変性モデルマウスに NHS-Biotin (443.43Da) を投与し、正常マウスと網膜脈絡膜物質輸送を比較したところ、加齢黄斑変性モデルマウスでは脈絡膜毛細血管の外壁に漏出像を認めるだけでなく、脈絡膜新生血管 (CNV) の外壁への NHS-Biotin の漏出を認めた。また、マウスが高齢化する程、漏出の程度は強くなった。

以上より、分子量の非常に小さい分子では脈絡膜毛細血管外への物質輸送は fenestrae 依存性であること、分子量が中程度 (70KDa) の分子では fenestrae 依存性ではなく、エンドサイトーシスによる脈絡膜毛細血管の物質輸送が行われていることが示唆された。

また、加齢黄斑変性で認められる脈絡膜新生血管からも分子量の非常に小さい分子の漏出像が認められたことから、脈絡膜新生血管も脈絡膜毛細血管と同様 fenestrae 構造を持っていることが示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

永井 香奈子 (Kanakano Izumi-Nagai)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：60407103