

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791973

研究課題名(和文)加齢黄斑変性におけるミュークリスタリンの病態解析

研究課題名(英文)The role of mu-crystallin in laser-induced choroidal neovascularization

研究代表者

今井 弘毅 (IMAI, Hiroki)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：50568409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：8-12週齢のオスのマウス(ミュークリスタリンノックアウトマウス、ワイルドタイプマウス)の片眼の眼底(視神経乳頭周囲の網脈絡膜)半導体レーザーを用いてレーザー照射(照射条件125 μ m spot size, 130mW intensity, 50ms duration)を行い、レーザー誘発脈絡膜新生血管モデルを作製した。抗isolectin抗体による免疫組織化学染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡装置にて脈絡膜新生血管の体積、面積を測定し比較したが、両者の間に統計学的な有意差がえられなかった。

研究成果の概要(英文)：Choroidal neovascularization model was induced by laser photocoagulation(125 micro meter spot size, 130mW intensity, 50ms duration; 80nm; Oculight SLx; Iris Instruments, Mountain View, CA) performed on one eye of male C57BL6, mu-crystallin knockout, and wild-type mice (8 to 12 weeks of ages)choroid-sclera flatmount was stained by anti-isolectin antibody. The volume and area of neovascularization were measured by laser confocal microscopy (TCS SP2; Leica). The mean volume or area of choroidal neovascularization was not significantly different from mu-crystallin knockout mice and wild-type mice.

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：外科頸臨床医学・眼科学

キーワード：ミュークリスタリン 脈絡膜新生血管

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性における脈絡膜新生血管との関連についての報告は現在のところなく、脈絡膜新生血管の形成に不可欠か抗血管新生に作用するかの予想は困難である。しかしマウスエンドトキシン誘発ぶどう膜炎モデルのミュークリスタリンノックアウトマウスではマクロファージの遊走が抑制され、炎症が軽微であった。このことからマクロファージを介した炎症機転は脈絡膜新生血管の形成に関与しているのではないかと予想された。

2. 研究の目的

本研究計画では、ミュークリスタリンに着目し、加齢黄斑変性の病態を解明することが目的である。加齢黄斑変性における脈絡膜新生血管との関連についての報告は現在のところなく、脈絡膜新生血管の形成に不可欠か抗血管新生に作用するかの予想は困難である。しかしマウスエンドトキシン誘発ぶどう膜炎モデルのミュークリスタリンノックアウトマウスではマクロファージの遊走を抑制され、炎症が軽微であった。このことからマクロファージを介した炎症機転より脈絡膜新生血管の形成に関与していると予想される。

この研究でマウスのレーザー誘発脈絡膜新生血管モデルの確立し、ミュークリスタリンノックアウトマウスとワイルドマウスにおいてレーザーにより誘発される脈絡膜新生血管を比較する。そしてミュークリスタリンノックアウトマウスとワイルドマウスのレーザー誘発脈絡膜新生血管モデルの網膜、脈絡膜新生血管に対する DNA マイクロアレイ解析を行い、脈絡膜新生血管の形成に関わる可能性が高い因子に関して比較検討する。また関係する他の因子についても検討する。さらに siRNA 法にてワイルドマウスのミュークリスタリン遺伝子を

抑え、脈絡膜新生血管の形成の差の有無を確認する。

この研究によって得られた知見がミュークリスタリンをターゲットとした新しい加齢黄斑変性治療薬の開発につながる大きな意義のある研究課題になると考えられる。

3. 研究の方法

8-12 週齢のオスのマウスの片眼の眼底（視神経乳頭周囲の網脈絡膜）に半導体レーザーで照射を行い、1, 2, 4 週間後に安楽死させた後眼球摘出を行い、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、組織学的に脈絡膜新生血管を確認する。脈絡膜新生血管の発生が確認できたら、眼球摘出後に網膜を取り除き網膜色素上皮・脈絡膜・強膜を伸展固定させ、脈絡膜新生血管の血管内皮細胞に対する抗体である抗 isolectin 抗体による免疫組織化学染色を行い、染色された脈絡膜新生血管板を共焦点レーザー顕微鏡装置で面積を測定し、経時的变化について確認する。

ミュークリスタリンノックアウトマウスとワイルドタイプのレーザー誘発脈絡膜新生血管モデルを作成し、経時的に眼球を摘出し伸展標本とし isolectin にて免疫組織化学染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて脈絡膜新生血管の面積を測定して比較検討する。脈絡膜新生血管施行眼の施行前、施行後 1、2、4 週間後の時点で網膜組織、脈絡膜新生血管を含む網膜色素上皮、脈絡膜、強膜組織を切り出し、速やかに RNA を抽出する。各時点で 3 匹 6 眼、合計 24 匹 48 眼が必要と予想される。Total RNA 中の poly(A)+mRNA より、T7RNA ポリメラーゼプロモーター配列を含むオリゴ dT プライマーを用いた逆転写反応によって、2 本鎖 cDNA を合成する。この cDNA をテンプレートとして、T7RNA ポリメラーゼによる in vitro transcription 反応を行い、

ビオチン標識された cRNA を調製する。この cRNA と gel matrix 上の DNA オリゴヌクレオチドプローブをハイブリダイズさせ、洗浄し、streptavidin-Cy5 による染色を行う。Axon GenePix Scanner でスキャン後、発現量を解析する。

ミュークリスタリンノックアウトマウスとワイルドマウスを比較することで脈絡膜新生血管形成においてミュークリスタリンと関与する可能性のある遺伝子の候補を検索する。

候補となった脈絡膜新生血管関連因子に関して RT-PCR 法にて解析する。網膜と脈絡膜新生血管を含む網膜色素上皮・脈絡膜・強膜組織をそれぞれ採取し、RNA を精製する。Primer Express ソフトウェアを用いて PCR プライマーと TaqMan プローブを設計し、合成する。得られた total RNA を用い、PRISM7000 定量 PCR 装置にてこれらの遺伝子の発現変動をより詳細に分析する。各時間、3 匹を要し、3 回繰り返す。タンパク発現の確認のために網膜、脈絡膜新生血管を含む網膜色素上皮・脈絡膜・強膜組織をそれぞれ採取し、ウェスタンブロット法にて定性・定量的な解析を行う。タンパク発現部位同定のために免疫組織化学染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて局在を確認する。

候補となった脈絡膜新生血管関連因子に関してノックアウトマウスが入手可能であれば、レーザー誘発脈絡膜新生血管モデルを作成し、ワイルドタイプと各時点で脈絡膜新生血管の面積を比較する。ノックアウトマウスの入手が困難な場合は siRNA 法を用いて、遺伝子レベルで関連因子を抑制し脈絡膜新生血管の形成における関与についてレーザー脈絡膜新生血管モデルを作成して解析を行う。

各々経時的に組織サンプルを採取し、RNA を精製し、RT-PCR を施行し、ミュー

クリスタリンの発現変化を比較検討する。

ミュークリスタリンタンパク発現の確認のために網膜、脈絡膜新生血管を含む網膜色素上皮・脈絡膜・強膜組織をそれぞれ採取し、ウェスタンブロット法にて定量的な解析を行う。

ミュークリスタリンタンパク発現部位同定のために免疫組織化学染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて局在を確認する。

4 . 研究成果

8-12 週齢のオスのマウス (C57BL/6J) の片眼の眼底(視神経乳頭周囲の網脈絡膜)に半導体レーザー (810nm;Oculight SLx; Iris Medical Instruments, Mountain View, CA) を用いてレーザー照射 (照射条件 125 μ m spot size, 130mW intensive, 50ms duration; 当初は 75 μ m spot size, 130mw intensity, 100ms duration の予定であったが、さまざまな条件を施行して予定と変更した) を行った。一週間後に尾静脈よりフルオレセインを静脈注射したあと、蛍光眼底造影検査を行い、脈絡膜新生血管からの漏出による過蛍光を確認した。2 週間後に安楽死させた後、眼球摘出を行い、4%パラホルムアルデヒドによる灌流固定後、パラフィン包埋、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。光学顕微鏡にて組織学的に脈絡膜新生血管を確認し、マウスによるレーザー誘発脈絡膜新生血管モデルを確立することができた。

同様にマウスレーザー誘発脈絡膜新生血管モデルを作成し、眼球摘出後に網膜を取り除き網膜色素上皮・脈絡膜・強膜を伸展させた。4%パラホルムアルデヒドで 1 時間固定して脈絡膜新生血管の血管内皮細胞に対する抗体である抗 isolectin 抗体による免疫組織化学染色を行い、染色された脈絡膜新生血管版を共焦点レーザー顕微鏡装置 (TCS SP2; Leica) で 1 μ m 厚ごとスキャ

ニングし、体積（当初は面積を予定していたが変更した）を測定することまで確立できた。

8-12 週齢のオスのマウス（ミュークリスタリンノックアウトマウス、ワイルドタイプマウス）の片眼の眼底（視神経乳頭周囲の網脈絡膜）半導体レーザー（810nm;Oculight SLx; Iris Instruments, Mountain View, CA）を用いてレーザー照射（照射条件 125 μm spot size, 130mW intensity, 50ms duration）を行った。2週間後に安楽死させた後、眼球摘出した。眼球より網膜を取り除き網膜色素上皮・脈絡膜・強膜を伸展させた。4%パラホルムアルデヒドで1時間固定して脈絡膜新生血管の血管内皮細胞に対する抗 isolectin 抗体による免疫組織化学染色を行い、染色された脈絡膜新生血管版を共焦点レーザー顕微鏡装置（TCS SP2; Leica）で1 μm 厚ごとスキャンし、体積を測定した。

ミュークリスタリンノックアウトマウスとワイルドタイプのレーザー誘発脈絡膜新生血管の体積の比較を行ったところ、ミュークリスタリンノックアウトマウスでは脈絡膜新生血管の平均体積が $304966.667 \pm 97439.221 \mu\text{m}^3$ 、ワイルドタイプマウスでは脈絡膜新生血管の平均体積が $472200 \pm 91741.812 \mu\text{m}^3$ であった。しかし、両方の脈絡膜新生血管の体積に統計学的に有意差（ $p=0.24$ ）を確認することができなかった。

また面積でも比較してみたが、ミュークリスタリンノックアウトでは脈絡膜新生血管の平均面積が $38367.571 \pm 21183.565 \mu\text{m}^2$ 、ワイルドタイプマウスでは脈絡膜新生血管の平均面積が $28386.833 \pm 31380.325 \mu\text{m}^2$ で、両方の脈絡膜新生血管の面積に統計学的有意差（ $p=0.51$ ）を確認することができなかった。

この研究では脈絡膜新生血管の形成へのミュークリスタリンの関与を確認すること

ができなかった。

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）

6. 研究組織
(1)研究代表者

今井弘毅（IMAI, Hiroki）
信州大学・医学部・助教
研究者番号：50568409