

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670752

研究課題名(和文) 発現誘導システムで制御するRNA干渉を用いた糖尿病黄斑浮腫の治療

研究課題名(英文) Treatment of diabetic macular edema by VEGF-SiRNA using ligand-inducible system

## 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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、レトロウィルスベクターを遺伝子導入手技に用いて、抗vascular endothelial growth factor (VEGF)作用を持つSiRNAを持続的にかつ誘導性に眼内で発現させて、糖尿病網膜症を治療する方法の開発を試みることである。レトロウィルスベクターによる遺伝子導入は、増殖細胞にのみ行われる。このため、眼球内に増殖細胞を作り出す工夫として、レーザー光凝固を採用した。

VEGF過剰発現により糖尿病網膜症様の網膜変化を生じるKimbaマウスにおいて、VEGF過剰発現およびその抑制効果を経時的に評価する目的で、マウスにおいて蛍光眼底造影、光干渉断層計検査も確立した。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to develop a new method to suppress overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) using SiRNA to treat experimentally induced diabetic retinopathy-like changes. To evaluate the effects of the treatment, we established a method to obtain high resolution images of fluorescein angiography and optical coherence tomography. To induce gene transduction using retroviral vector, we also developed a method to deliver laser burn in mouse retinas to induce cell proliferation that is necessary for gene transduction using this viral vector.

研究分野：眼科学

キーワード：糖尿病黄斑浮腫 VEGF 遺伝子改変マウス RNA干渉

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病黄斑浮腫は、先進国における社会的失明（日常生活に不自由が出る視力低下）の原因として第一位であるが、適切に治療すれば視力を救える疾患である。

1) 抗 VEGF 薬の硝子体注射(ヒト化したマウス抗 VEGF 抗体の Fab fragments)を2年間原則として毎月継続すれば、糖尿病黄斑浮腫は治療可能と大規模臨床スタディーで確認された。

2) 抗 VEGF 薬硝子体注射の大きな問題点は、約 1/3000 回に合併症として失明しうる眼内炎が発生すること。また、単年度で眼疾患だけで約 200 億円の薬剤費を費やすことなどである

3) kimba マウスはヒト型 VEGF 過剰発現により、糖尿病網膜症に類似した網膜浮腫と血管新生をおこすことが報告された。

4) 研究代表者は以前、レトロウイルスベクターを用いて、網膜光凝固斑に選択的に遺伝子導入し、その治療効果を高めることが可能であると報告している。

### 2. 研究の目的

研究のタイトルは「発現誘導システムで制御する RNA 干渉を用いた糖尿病黄斑浮腫の治療」である。

糖尿病網膜症は vascular endothelial growth factor (VEGF)の過剰発現抑制で治療可能であることが定説になりつつある。akimba マウスは高血糖と VEGF の過剰発現で、網膜浮腫を含めた糖尿病網膜症類似の病変を発症する。これを、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入を用いて、siRNA で眼球内の VEGF 発現を抑制することで治療可能か検証する。VEGF の不足で網膜神経細胞が障害されぬよう、siRNA の発現量と期間をテトラサイクリン発現誘導システムで制御する。これにより頻回の硝子体注射を必要としない、安全で安価で有効な糖尿病黄斑浮腫治療法を開発する。

### 3. 研究の方法

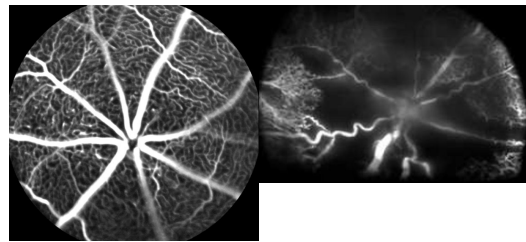
**【akimba マウスの飼育】** akita マウスと kimba マウスはオーストラリアのクレア社に発注する。この交配は研究協力者の今井章が担当し、交配したノックアウトマウス (akimba マウス)を、研究に使用する期間は常時 50 匹程度維持できるように飼育する。飼育およびホモ、ヘテロの識別のために行う、尾から DNA を抽出しての PCR は研究分担者の家里康弘がこれにあたる。劇症型の網膜症を発症する交配マウスである akimba マウスよりも、相対的にゆっくりと進行する kimba マウスを、実際の研究には本研究期間を通じて使用した。

## 【実験的マウスの網膜浮腫(網膜血管透過性の亢進)の確認】

### 1) Evans Blue 法

ストレプトゾトシンで誘導した糖尿病マウスには、眼底の観察や写真撮影で確認出来る網膜および全身の浮腫は発現しない。そこで、わずかな網膜浮腫を検出するためには、網膜血管の透過性亢進を、Evans Blue 法を用いた。<sup>3)</sup> 具体的には 30mg/kg の Evans Blue を静注して、血漿中の Evans Blue 濃度や、摘出した網膜の重量などから血管外に漏出した Evans Blue の量を測定して、網膜血管の透過性亢進の指標とした。

### 2) マウスにおける超広角蛍光眼底撮影法



図左 HRA(Heidelberg Retinal Angiography)によるマウスの眼底の蛍光眼底造影写真。図右 OPTOS を用いた広角蛍光眼底造影写真

我々は HRA 眼底撮影装置(図左)あるいは OPTOS 眼底撮影装置を用いて(図右)、マウスの眼底造影を生体で行う事に成功した。図左は正常マウス、図右は酸素性網膜症のマウス蛍光眼底造影所見である。これにより、一つの固体で血管透過性亢進の変化を経時的に観察することができるようになった。<sup>1)</sup> このことにより、より客観的に詳細な網膜血管の透過性亢進が観察できた。

### 3) マウスにおける optical coherence tomography(OCT)観察法

図は、正常マウスにおいて撮影できた swept source OCT 画像である。図のように、網膜の内顆粒層、外顆粒層、外境界膜、inner segment/ outer segment junction line など総てが観察できる。従って、網膜浮腫による視細胞の障害の評価も可能となった。



図 swept source optical coherence tomography(SS-OCT)画像 マウス網膜の層構造が明瞭に描出された。

#### 4. 研究成果

1) 上記のような検査方法を用いて、我々は再現性をもって網膜浮腫を発現するマウスを安定して維持飼育することができる体制を築けた。さらに、上記のように糖尿病黄斑浮腫患者の診療において、評価に用いる検査の総てを、マウスで使えるようにする方法を確立した。

2) 本研究ではレトロウイルスベクターを遺伝子導入手技として用いた。導入された遺伝子の発現は長期間維持されるが、遺伝子導入効率をあげる事が、一つの大きな課題となる。レトロウイルスベクターは、増殖する細胞にのみ、遺伝子を導入するので、眼球内に増殖細胞を作り出す工夫として、レーザー光凝固を採用した。まず、信州大学の動物舎で、マウスに網膜のレーザーを行うシステムを構築した。ヒトに用いるレーザーで、マウスを散瞳して、カバーグラスを接眼レンズとして角膜に接触させることで眼底観察が可能であり、通常のレーザーシステムを用いて、網膜のレーザー凝固が可能であった。さらに、網膜神経線維層を破壊せず、外層のみに障害をとどめる凝固条件を検討し、第一報として報告した。(Effect of Laser wavelength on delivering appropriate laser burns through the opaque lens using a pattern scan laser. Hirano T, Murata T. Ophthalmic Res. 2014;51(4):204-9

3) 次に、糖尿病網膜症類似の病変を発症する、網膜で VEGF(vascular endothelial growth factor)を過剰発現するマウスである Kimba マウスで、蛍光眼底造影、光干渉断層計の所見を採る主義を確立した。眼底撮影には前置レンズを、マウス用のコンタクトレンズを工夫し作成すること、散瞳を撮影直前に先行前房の混濁を避けることなどの工夫で、ヒトを撮影した場合と同程度の、精度の高い画像を撮影可能となった。特に、蛍光眼底造影で、無灌流領域を検出できるようになったので、眼底所見と併せて、摘出眼より灌流正常の部位と、無灌流領域をわけて、標本を採取できるようになった。

これらの手法を用いて、siRNA で眼球内の VEGF 活性を抑制することを直接的に試みることができるようになった。特に、real time PCR, western blot での VEGF 産生および活性の抑制を確認できることは、今後の研究で極めて有用な手技となると期待される。

#### 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4件)

- 1) Hirano T, Murata T, Hayashi T. Physiological significance of recombination-activating gene 1 in neuronal death, especially optic neuropathy. FEBS J. 2015 Jan;282:129-41 査読有り
- 2) Imai A, Toriyama Y, Iesato Y, Hirano T, Murata T. En face swept-source optical coherence tomography detecting thinning of inner retinal layers as an indicator of capillary nonperfusion. Eur J Ophthalmol. 2015 Mar-Apr;25(2):153-8 査読有り
- 3) Hirano T, Iesato Y, Murata T. Multicolor pattern scan laser for diabetic retinopathy with cataract. Ophthalmic Res. 2014;52(2):65-73 査読有り
- 4) Hirano T, Iesato Y, Imai A, Toriyama Y, Kikushima W, Murata T. Effect of Laser wavelength on delivering appropriate laser burns through the opaque lens using a pattern scan laser. Ophthalmic Res. 2014;51(4):204-9 査読有り

[学会発表](計8件)

- 1) Takao Hirano, Yuichi Toriyama, Motoharu Tokimitsu, Toshiyuki Kyomoto, Dai Chiba, Toshinori Murata A multi-center clinical study evaluating the effectiveness of intravitreal ranibizumab in combination with photocoagulation for diabetic macular edema The 8<sup>th</sup> Joint Meeting of Japan-China-Korea Ophthalmologists 2015年10月17-18日 福岡
- 2) 平野 隆雄、鳥山 佑一、松田 順繁、平林 一貴、今井 章、家里 康弘、時光 元温、千葉 大、京本 敏行、村田 敏規  
糖尿病黄斑浮腫に対する抗 VEGF 薬硝子体注射後の血漿 VEGF 濃度の検討  
第119回日本眼科学会総会 2015年4月16-19日 札幌

- 3) Takao Hirano, Yuichi Toriyama,  
Toshinori Murata  
Navilas® Navigated Laser System  
Treatment Asia ARV02015 2015年2  
月16-19日 横浜
- 4) Yuichi Toriyama, Takao Hirano,  
Toshinori Murata  
Comparison of Pnaretinal Navigated  
and Conventional Pattern Scan Laser  
Photocoagulation for Diabetic  
Retinopathy  
Asia ARV02015 2015年2月16-19日  
横浜
- 5) Toshinori Murata  
Intravitreal Therapeutic Concept  
for Diabetic Macular Edema  
WOC2014 APAO2014 118<sup>th</sup> JOS Tokyo  
April 2-6, 2014 Tokyo
- 6) Takao Hirano, Yasuhiro Iesato,  
Masaaki Tanaka, Dai Chiba, Toshinori  
Murata  
Use of Non-Invasive Skin  
Autofluorescence As an Indicator of  
Diabetic Retinopathy Severity  
WOC2014 APAO2014 118<sup>th</sup> JOS Tokyo  
April 2-6, 2014 Tokyo
- 7) Yuichi Toriyama, Akira Imai, Wataru  
Kikushima, Toshinori Murata  
Detection of Non Perfusion Area in  
Diabetic Retinopathy by Swept Source  
OCT  
WOC2014 APAO2014 118<sup>th</sup> JOS Tokyo  
April 2-6, 2014 Tokyo
- 8) Toshinori Murata, Akira Imai, Wataru  
Kikushima, Masaaki Tanaka, Takao  
Hirano  
A Noninvasive Detection Method of  
Nonperfusion in Retinal Vein  
Occlusion Using Swept-Source Optical  
Coherence Tomography  
WOC2014 APAO2014 118<sup>th</sup> JOS Tokyo  
April 2-6, 2014 Tokyo

## 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

家里 康弘 (IESATO, Yasuhiro)  
信州大学・医学部・助教 (特定雇用)  
研究者番号：00708357

### (3) 研究協力者

今井章 (IMAI, Akira)  
信州大学・大学院医学系研究科・大学院生