実験技術

マウス網膜静脈閉塞症モデルの確立

嶋澤 雅光, 西中 杏里, 原 英彰

要約：網膜静脈閉塞症 (retinal vein occlusion : RVO) は、糖尿病網膜症について罹患率の高い網膜血管病変であり、高血圧、糖尿病、高脂血症などが原因で網膜静脈が閉塞されることによって引き起こされる。浮腫や無灌流領域の形成が頻発し、これらの病態の進行は視機能の悪化と密接に関わっていることから、臨床においても重要視されている。薬物治療法として抗血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) 抗体が使用されているが、浮腫や無灌流領域の形成など RVO の病態機序は不明であるため、抗 VEGF 抗体に対して反応性が低い患者や投与により症状が改善した場合でも再発を繰り返す患者が存在する等の問題が指摘されている。したがって、RVO 病態機序の解明による抗 VEGF 抗体の最適な治療タイミングの判断や新たな作用機序を有した治療薬の開発が望まれている。臨床研究では患者背景が異なるため、抗 VEGF 抗体の作用検討や新規治療薬の開発は困難であり、臨床と酷似した病態を有する RVO モデルの作製が必要である。これまで、RVO モデルの作製に関して研究が行われているが、RVO の特徴的な病態である囊胞状の浮腫を再現し抗 VEGF 抗体の治療効果を検討した動物モデルは報告がない。したがって、RVO の病態解明や新規治療薬の探索を行うためには、臨床病態をできる限り正確に反映した動物モデルが必要である。本稿では、マウスを用いた RVO モデルの作製法並びにその評価法について紹介する。さらに、RVO の治療薬として使用されている抗 VEGF 抗体及びカリジノゲナーゼの効果についても紹介する。

1. はじめに

網膜静脈閉塞症 (retinal vein occlusion : RVO) は、高血圧や動脈硬化が原因で網膜静脈が閉塞されることにより浮腫や眼底出血などをきたし、急激な視力低下や視野欠損が引き起こされる疾患である。RVO の患者数は世界において約 1 億 6000 万人と推定されており、日本人の 40 歳以上の平均有病率は約 2.1%, 50 人に 1 人の割合で罹患し男女共に有病率は年齢と共に増加傾向である (1)。罹患率が高いにも関わらず抗 VEGF 抗体薬のみが現在承認されている薬剤である。抗 VEGF 抗体薬であるベバシズマブやラニズマブは、RVO 患者の黄斑浮腫を改善することが知られている (2)。しかしながら、RVO の病態に対する抗 VEGF 抗体の作用に関して不明な点が多いことから、抗 VEGF 抗体に対して耐性をもつ患者や一度改善しても浮腫が再発する患者も存在することが知られている (3)。また、RVO の治療に網脈絡膜の循環障害改善薬であるカリジノゲナーゼが使用される場合もある。RVO において形成される浮腫や無灌流領域に対する抗 VEGF 抗体及びカリジノゲナーゼの作用に関しては不明な点が多く、VEGF 以外を標的とした新しい治療薬の開発が望まれている。RVO の病態解明や新規治療薬の開発が進まない原因の一つとして、囊胞状の浮腫や無灌流領域の形成など臨床において重要な病態を正確に反映した動物モデルが存在していないことが考えられる。これまでに、サル及びマウス等の動物種を用いた RVO モデルに関する研究が報告されている (4, 5)。しかしながら、これらのモデルは RVO 患者の視機能の低下と非常に強く関連している囊胞状の浮腫を有していないこと、早期に閉塞した静脈が再開通すること、レーザー照射により炎症が惹起されていること等の問題点

が挙げられる(6, 7). 以上のことから, RVO の病態解明や新規治療薬の開発において, 臨床病態を正確に反映した動物モデルの確立が急務である. そこで本稿では, 浮腫や無灌流領域等より臨床病態を反映した RVO モデルについてその作製法並びに評価法について我々の確立した手法を基に紹介する.

2. 方法と結果

1) マウス網膜静脈閉塞症モデルの作製

8 週齢雄性 ddY マウスを用い, ケタミン (120 mg/kg) 及びキシラジン (6 mg/kg) の混合麻酔液を筋肉内投与することで麻酔を施した. その後, 光増感剤のローズベンガル (20 mg/kg) を尾静脈内に投与し, トロピカミド・フェニレフリン塩酸塩点眼液 (ミドリン[®]P) をマウスの右眼に点眼し散瞳させた. さらに, 眼球の乾燥を防ぐために精製ヒアルロン酸ナトリウム点眼液 (ヒアレイン点眼液 0.1%) を点眼した. 眼底撮影装置である Micron 4 (Phoenix Research lab., CA, USA) にレーザー照射装置 (MERIDIAN AG., Switzerland) を装着しレーザーを照射した. マウスはアニマルステージに設置し, マウス右眼の視神経乳頭から 3 乳頭径離れた静脈に 10~15 回のレーザー照射 (波長: 532 nm, スポットサイズ: 50 μ m, 照射時間: 5 s, レーザー出力: 50 mW) を行い閉塞させた (図 1A) (8). 1 眼につき静脈 3 本を閉塞させ, 眼底画像においてレーザーを照射した静脈が完全に閉塞していることを確認した. その後以下の手法を用いてマウス網膜静脈閉塞症モデルの病態を経時的に観察した.

2) 網膜断層撮影及び画像解析ソフトを用いた定量解析

光干渉断層計 (optical coherence tomography: OCT) を用いて, レーザー照射 1, 3 及び 7 日後に網膜断層撮影を行った (図 1B). ケタミン及びキシラジンの混合

麻酔液を筋肉内投与後, ミドリン[®]P 及びヒアレインを点眼し, 1 眼につき 20 ヲ所網膜層を撮影した. 撮影した OCT 画像は専用定量ソフトである「In Sight」を用いて自動的に網膜層を検出し, その厚さを定量し 20 枚の網膜層の厚さの平均をその個体の網膜層厚とした. 照射 1 日後に浮腫の形成が確認され (図 2A), 網膜全層厚は約 1.6 倍程度肥厚化した (図 2B) (8).

3) 網膜組織標本の作製

レーザー照射 1, 3 及び 7 日後にマウスの眼球を摘出し, 4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.4) を 2 μ l 硝子体内投与し, 同液にて 48 時間 4°C で固定した. その後 70% エタノール 2 時間, 90% エタノール 1 時間, 無水エタノール 1 時間 $\times$ 5 回, キシレン 1 時間 $\times$ 3 回, 融解パラフィン 4.5 時間の順に浸透させた. さらにパラフィンにて眼球を包埋しミクロトームを用いて厚さ 5 μ m の切片を作製し, カバーガラスにのせ 37°C にて 1 日乾燥した. パラフィン切片はキシレンに浸してパラフィンを洗浄後, 段階的にアルコール濃度を下げた溶液に浸し蒸留水に浸透した後, ヘマトキシリン液, エオジン液に浸して段階的にアルコールで脱水しキシレンで透徹しオイキットを用いて封入した. 切片は HS オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-9000; Keyence, Osaka, Japan) を使用して撮影し, 視神経乳頭中心から 240 μ m 間隔で網膜内顆粒層 (inner nuclear layer: INL) 及び網膜外顆粒層 (outer nuclear layer: ONL) の厚みを Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を使用して定量した. RVO 群において INL 厚は照射 1 日後に肥厚化が認められ, 3 日後には Normal 群と同程度, 7 日後には Normal 群よりわずかに菲薄化している傾向が認められた. 一方, ONL 厚ではいずれの群においても肥厚化は認められなかったが, 7 日後の RVO 群におい

図 1 実験装置

A: レーザー照射装置, B: 光干渉断層計 (OCT).

図2 網膜静脈閉塞症モデルにおける網膜断層の経時的変化

A: 網膜層の代表例, B: 網膜全層厚, 結果は平均値±標準誤差 (n = 4~7) で表す. (文献8より一部改変)

て菲薄化が認められた (図 3A~C) (8).

4) 網膜フラットマウント標本の作製

照射 1, 3, 7 及び 30 日後にケタミン及びキシラジンの混合麻酔液を筋肉内投与し, phosphate buffered saline (PBS) で溶解した分子量 2×10^6 の fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran 溶液 (20 mg/kg) を尾静脈内投与した. マウスの眼球を摘出し, 4% パラホルムアルデヒド含有 0.1 M PB 液中で 7 時間固定した. 固定した眼球は $1 \times$ PBS に浸しながら顕微鏡下で角膜及び水晶体を切除し, 色素上皮から網膜を分離し網膜を強膜から完全に剥離した. 網膜を四分円に切り平面状態にした後 Fluoromount で封入し網膜フラットマウント標本作製し, Metamorph (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA, USA) を用いて撮影を行った. 各画像は網膜血管の表層から下層までを $14.2 \mu\text{m}$ 間隔で連続撮影し, 解析ソフトウェア Image J を用いて行った. 照射 1 日後において無灌流領域の形成が認められた (図 4A). また網膜全面積に対する無灌流領域の面積の割合を算出した結果, 照射 1 日後には網膜全体に対して約 20% 程度の割合の無灌流領域が形成された (図 4B) (8).

5) 抗 VEGF 抗体の作用

照射直後にマウス抗 VEGF 抗体 ($200 \mu\text{g/mL}$) を $2 \mu\text{L}$ 硝子体内に投与し, クラビットを点眼した. 溶媒群には PBS を $2 \mu\text{L}$ 硝子体内投与した. 照射 1 日後にヘマトキシリン・エオジン染色による組織評価を行っ

た. 照射 1 日後に Vehicle 群において INL 厚の肥厚化が認められたが, 抗 VEGF 抗体投与群においてその肥厚化が改善された. 一方, 抗 VEGF 抗体投与群の ONL 厚は Normal 群との間に明らかな差は認められなかった (図 5A~C) (8). また照射直後及び 7 日後にマウス抗 VEGF 抗体 ($200 \mu\text{g/mL}$) を $2 \mu\text{L}$ 硝子体内に投与し, 投与 1 日後及び 7 日後に網膜伸展標本作製した. 照射 1 日後, 抗 VEGF 抗体投与群において無灌流領域の面積は減少したが, 照射 7 日後においては面積が増加した (図 5D~G) (8).

6) カリジノゲナーゼの作用

カリジノゲナーゼは, 末梢投与によって VEGF₁₆₅ 自体を切断する網脈絡膜循環改善薬である (9). 照射前後 (照射 2 日前より 1 日 2 回投与及び照射直後, 12 時間後に投与) 及び照射後 (照射直後及び 12 時間後に投与) に, カリジノゲナーゼ ($10 \mu\text{g/mL}$) を 10 mL/kg 尾静脈内に投与した. 照射 1 日後にヘマトキシリン・エオジン染色による組織評価を行った. 照射 1 日後に Vehicle 群において INL 厚の肥厚化が認められたが, カリジノゲナーゼ投与群においてその肥厚化が改善した (図 6A, B) (10). また照射直後及び 12 時間後, 照射 7 日後に 1 日 2 回カリジノゲナーゼ ($10 \mu\text{g/mL}$) を尾静脈内に投与し, 投与 1 日後に網膜伸展標本作製した. 両方の投与タイミングにおいて, 無灌流領域の面積は減少した (10).

図3 網膜静脈閉塞症モデルにおける組織学的変化

A: 網膜組織標本の代表例。*は浮腫形成部位, 矢印は網膜層の剥離部位を示す。Scale bar=50 μm。B: 内顆粒層 (INL) 厚。C: 外顆粒層 (ONL) 厚。結果は平均値±標準誤差 (n=5) で表す。(文献8より一部改変)

図4 網膜静脈閉塞症モデルにおける無灌流領域の変化

A: 網膜伸展標本の代表例, 線は無灌流領域を示す。B: 無灌流領域の面積変化, 結果は平均値±標準誤差 (n=5) で表す。(文献8より一部改変)

図5 網膜静脈閉塞症モデルに対する抗 VEGF 抗体の作用
 A: 網膜組織標本の代表例, Scale bar=50 μm. B: 内顆粒層 (INL) 厚. C: 外顆粒層 (ONL) 厚, 結果は平均値±標準誤差 (n=5) で表す. D: 抗 VEGF 抗体投与直後の網膜伸展標本の代表例, 線は無灌流領域を示す. E: 抗 VEGF 抗体投与直後の無灌流領域の面積変化, 結果は平均値±標準誤差 (n=4~8) で表す. F: 抗 VEGF 抗体投与7日後の網膜伸展標本の代表例, 線は無灌流領域を示す. G: 抗 VEGF 抗体投与7日後の無灌流領域の面積変化, 結果は平均値±標準誤差 (n=4 または 5) で表す. (文献 8 より一部改変)

3. おわりに

以上の結果より, 嚢胞状の浮腫や無灌流領域の形成

図6 網膜静脈閉塞症モデルに対するカリジノゲナーゼの作用
 A: 網膜組織標本の代表例. B: 内顆粒層 (INL) 厚. Scale bar = 50 μm. 結果は平均値±標準誤差 (n=4 または 5) で表す. (文献 10 より転載)

等の網膜静脈閉塞症の臨床病態に類似したマウスモデルを確立することができた. 本モデルを用いて, 今後さらに病態機序の解明を行うことによって, 網膜静脈閉塞症の新たな治療薬の創製につなげたい.

著者の利益相反: 原 英彰 (ノバルティスファーマ株式会社, 株式会社三和化学研究所).

文 献

- 1) Yasuda M, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010;51:3205-3209.
- 2) Mir TA, et al. Ophthalmology. 2016;123:625-634.
- 3) Isola V, et al. Clin Ophthalmol. 2013;7:455-460.
- 4) Ebner A, et al. PLoS One. 2015;10:e0119046.
- 5) Zhao T, et al. Mol Vis. 2011;17:1044-1055.
- 6) Sun C, et al. Exp Eye Res. 2013;113:105-116.
- 7) Genevois O, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004;45:594-600.
- 8) Fuma S, et al. Sci Rep. 2017;7:43509.
- 9) Nakamura S, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011;31:1041-1048.
- 10) Nishinaka A, et al. J Pharmacol Sci. 2017;134:86-92.