

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2016.3) 16:36-37.

平成25・26年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題 20) フラクタル理論を用いたマイクログリア形態解析による糖尿病網膜症の超早期診断法の確立

下内 昭人

20) フラクタル理論を用いたマイクログリア形態解析
による糖尿病網膜症の超早期診断法の確立

研究代表者 下内 昭人

【目的】

糖尿病網膜症は、これまで血管障害として考えられてきたが、近年、慢性炎症がより早期に生じていることが示唆されている。しかし、血管障害が出現する前での早期診断法は確立されていない。マイクログリアは、網膜における免疫担当細胞である一方で、糖尿病網膜症などの慢性炎症を基盤とする疾患の病態に深く関与している。また、活性度によって形態を変化させる特徴があり、その形態解析が脳梗塞モデルで有用であることが報告されている¹⁾が、網膜での有用性は明らかになっていない。本研究では、マイクログリア形態解析が網膜の炎症状態の評価に有用かを検討した。

【方法】

C57BL/6J マウスを用いて高酸素負荷網膜血管新生(OIR)モデルを作成し、日齢17(P17)で眼球を摘出した。また、コントロールマウスの眼球をP5、P17で摘出した。マイクログリアはIba1抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で撮影後、過去の報告¹⁾を参考に以下の5項目を算出した。1) form factor (FF; 円形度)、2) branching density (BD; 分枝密度)、3) convexity (CON; 空間的密度)、4) solidity (SOL; 細胞体積)、5) fractal dimension (D_F; 複雑性)

次に、エンドトキシン誘導ぶどう膜炎(EIU)モデルを作成し、リポ多糖(LPS)投与後6、12、24、36時間で眼球を摘出した。マイクログリア形態解析を行い、炎症性サイトカインをqRT-PCRで測定した。

【結果】

正常血管新生期における血管領域(P5c)及び無血管領域(P5p)、OIRにおける病的血管領域(P17NV)及び無血管領域(P17AVA)に存在するマイクログリアは、コントロール(P17con)と比較して形態が活性型に変化し、形態解析ではFF、BD、SOLが有意に高く、D_Fは有意に低かった(図1)。また、P5cにおいて、深層よりも浅層に存在するマイクログリアのほうが有意にその傾向を示した。さらに、同様の傾向を示していたP5cとP17NVを比較したところ、病的血管新生でのマイクログリアのほうがより顕著な変化であった(図

2)。

次にEIUモデルにおいて、炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、iNOS)はLPS投与後6時間をピークに増加し、その後漸減した。一方、マイクログリア形態解析においても、各指標の値は投与後6時間から12時間で最も有意に変化していた(図3)。

【考察】

本研究では、血管新生や無血管領域における活性化したマイクログリアでは、FF、BD、SOLが増加し、D_Fが減少していた。したがって過去の脳梗塞モデルを用いた報告と同様に、網膜においてもマイクログリアの形態変化を定量化することが可能であった。

本研究では、正常血管新生において、深層よりも、血管新生が生じている表層のマイクログリアがより活性化していた。過去の報告では、浅層と深層でのマイクログリアの形態に差がなかったと述べている。しかし、過去の報告では、顕微鏡下での外見のみで区別しており、わずかな変化を捉えられなかったと思われる。一方で、マイクログリア形態解析はわずかな変化を区別することができたと考えられた。さらに本研究では、正常及び病的血管新生におけるマイクログリアの形態のわずかな違いも区別することが可能であった。

また、炎症性サイトカインの変化とマイクログリアの形態変化は連動している傾向があった。マイクログリア形態解析は半自動的に算出できる為、安定した結果が得られる。そして、これまで外見で判断していたマイクログリアの活性度を数値化し、定量化することができる。これらのことから、網膜の炎症状態の評価にマイクログリア形態解析は有用であると思われる。

近年、画像診断技術の発達に伴い、生体内の視細胞を視認出来るようになった。今後マイクログリアを視認できるようになれば、マイクログリア形態解析によって網膜の炎症状態を定量的にリアルタイムで評価することが可能となり、新たな治療薬の評価や糖尿病網膜症の超早期診断に応用できることが期待される。

【文献】

- 1) Soltys Z, et al.: Quantitative morphological study of microglial cells in the ischemic rat brain using principal component analysis. J Neurosci Methods 2005 ; 146 : 50-60.

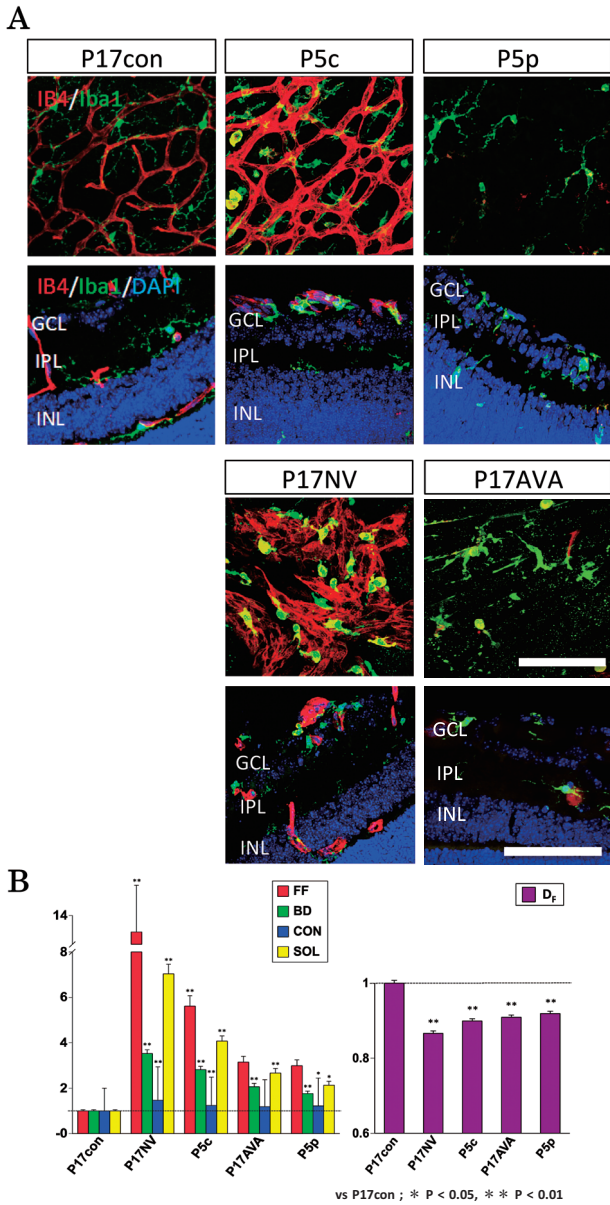


図1 各条件におけるマイクログリアの形態の違い
 (A) 定常状態 (P17con) のマイクログリアは細胞体が小さく、足を長く伸ばした ramified 型である。一方、正常血管新生における血管領域 (P5c) 及び無血管領域 (P5c)、そして病的な血管新生領域 (P17NV) 及び無血管領域 (P17AVA) に存在するマイクログリアは、細胞体が大きく、足も短く変化している。特に P5c と P17NV では活性型である amoeboid 型を呈している。上段：ホールマウント、Scale = 50 μ m、血管は IB4 (赤)、マイクログリアは Iba1 (緑) で染色。下段：凍結切片、Scale = 50 μ m。(GCL；神経節細胞層、IPL；内網状層、INL；内顆粒層) (B) マイクログリア形態解析における P17con を基準とした各群の比較

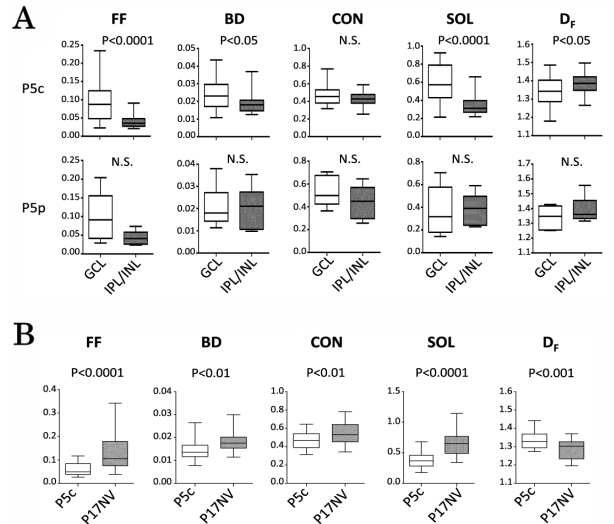


図2 OIR モデルでのマイクログリア形態解析
 (A) 正常血管新生での浅層 (GCL) と深層 (IPL/INL) の層別解析 (B) 正常血管新生 (P5c) 及び病的血管新生 (P17NV) の比較

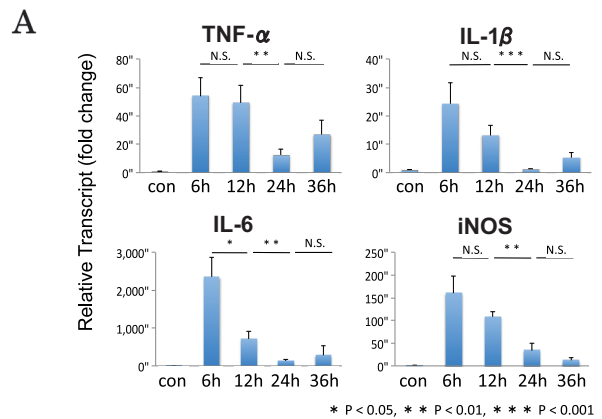


図3 EIU モデルでの qRT-PCR 及びマイクログリア形態解析の結果
 (A) 炎症性サイトカインの経時的変化 (B) マイクログリア形態解析における各測定項目の経時的変化