

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10871

研究課題名(和文) 眼内増殖性疾患における分子メカニズムの解明およびコハク酸の役割

研究課題名(英文) Study on the molecular mechanism of the role of succinate in intraocular proliferative diseases

研究代表者

北岡 隆 (KITAOKA, Takashi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：80234235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、虚血や高血圧環境での眼内構成組織における、より詳細な血管新生のメカニズムの解明ならびに今後の治療への発展を目標とする。網膜の血流はLaser speckle flowgraphyで測定し、網膜光凝固を行うことでVEGFを減少させると、有意に眼底血流が減少し、網膜新生血管の活動性も改善するという結果だった。その血流減少量を測定することによって、効果的な網膜光凝固を定量化できる可能性が示唆された。今後コハク酸の眼底血流への関与を検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, precise mechanism of angiogenesis in the intraocular neovascularization in ischemic and hypertensive environments is studied. The goal is to elucidate the mechanism and develop into future treatment, and the retinal blood flow is measured by Laser speckle flowgraphy. Reduction of VEGF by retinal photocoagulation significantly reduces ocular fundus blood flow and improves the activity of retinal neovascularization. It is suggested that the possibility to quantify effective retinal photocoagulation by measuring its blood flow decrease the activity of neovascularization. It is necessary to investigate the involvement of succinate in fundus blood flow.

研究分野：眼科学

キーワード：眼内増殖性疾患 血管内皮増殖因子 網膜血流 コハク酸 レーザー光凝固

## 1. 研究開始当初の背景

高血圧による網膜病変として、まず網膜細動脈の狭細化および口径不同が生じ、更に高血圧状態の長期間の持続で血管壁が器質的に肥厚し細動脈の狭細は不可逆性となり、血柱反射の亢進・動静脈交叉現象などの硬化所見を伴うようになる。さらに重症化すると、網膜出血・浮腫・軟性白斑・硬性白斑などの網膜病変を呈する。毛細血管閉塞が進行すると、毛細血管瘤、静脈の口径不同、血管吻合などが現れ、まれに新生血管を生じて増殖網膜症を呈することもある。一方、糖尿病網膜症は成人の失明原因として主要な割合を占めているが、毛細血管の障害・脱落により網膜無灌流領域の形成、血管透過性亢進による網膜浮腫（視力低下）や血管新生（緑内障、硝子体出血）などを引き起こす。さらに高血圧の合併によりその病態が悪化することも周知のものである。これまでは VEGF が血管新生の主体をしめることが指摘されてきた。また高血圧や血管への伸展刺激による酸化ストレスや VEGF のメカニズムも報告されてきた。さらに網膜血管新生に VEGF 以外にコハク酸も関与している可能性が報告されてきたことを受け、最近増殖糖尿病網膜症の硝子体中でコハク酸が増加していること、さらに高血圧や伸展刺激時に網膜色素上皮細胞や網膜硝子体中でコハク酸が増加していることを報告した。

## 2. 研究の目的

本研究では、虚血や高血圧環境での眼内構成組織における、コハク酸の血管新生のメカニズムの解明ならびに今後の治療への発展を目標とするが、実際の病的状態（糖尿病網膜症や網膜中心静脈閉塞症および網膜中心静脈分枝閉塞症）での網膜血流の変化（病期による変化やレー

ザー光凝固前後の変化、抗血管内皮増殖因子抗体による治療前後の変化）についても詳細な検討を加える。

## 3. 研究の方法

まず網膜の血管内皮、周皮細胞さらにミュラーグリアの培養を行い、低酸素・伸展刺激における細胞内外の VEGF、コハク酸の動態を確認する。その後シグナル伝達も確認し、阻害実験を行う。さらに網膜組織培養においても同様の確認を行う。動物モデルとして遺伝子改変マウスを用いて *in vivo* での確認を行う。必要に応じて同時進行で研究を遂行する。

高血圧による血管進展が虚血を悪化させる方向に働くことが考えられ、網膜の血管内皮、周皮細胞さらにミュラーグリアの培養を行い、低酸素・伸展刺激における細胞内外の VEGF、コハク酸の動態を確認する。その後シグナル伝達も確認し、阻害実験を行う。さらに網膜組織培養においても同様の確認を行う。また一方で眼内の血管病変においては網膜・脈絡膜の血流動態を Laser speckle flowgraphy で測定することができ、VEGF やコハク酸を測定し、血流動態との関係を調べる。

具体的にはまずマウス（ラット）網膜の血管内皮細胞や周皮細胞、さらにはミュラーグリア細胞の単離を行い、それぞれ primary culture での検討を行う。まず免疫染色さらには RT-PCR にて VEGF やコハク酸レセプターである GPR91 のタンパク level、mRNA level での確認を行う。その後、*in vitro* での虚血状態として低酸素環境下での培養を行い、その medium は細胞外液として検討し、培養細胞自体は TNE buffer のような細胞溶解液と cell scraper を用い、さらにホモジナイズ後遠心分離を行い、上清を細胞抽出液として

検討する。両者ともに VEGF 測定(ELISA 法による)、コハク酸測定(エキクロマトグラフィー、コハク酸測定キット)を行う。低酸素環境の酸素濃度変化や時間変化による検討も行う。

伸展刺激を加える際には、6 well の silicon bottomed plate に confluent に培養し、flexercell strain unit を用いてコンピューター制御のもと機械的伸展刺激を加える。伸展刺激も伸展時間変化や振幅変化による検討を行う。さらには低酸素環境と伸展刺激の組み合わせも条件検討できる。VEGF やコハク酸が増加していればチロシンキナーゼや MAP キナーゼ、PKC、PI3 キナーゼ、カルシウムなどに対する種々の酵素阻害薬を用い、VEGF ならびにコハク酸におけるシグナル伝達の所在を明らかにする。また、Akt などの細胞生存シグナルと酸化ストレス、JNK などの細胞死シグナル、エリスロポエチン、PDGF、IGF などの増殖因子、Fas などの細胞死誘導因子、Ang1、ephrin などの血管安定化因子等についての発現も検討し、その結果に基づき阻害実験の追加を行うことで、複数の因子の細胞増殖に対する反応、修飾を検討する。細胞レベルでの結果を踏まえて、網膜組織や動物モデルでの検討を行う。

細胞レベルでの確認後、その結果を踏まえてマウス(ラット)網膜の組織培養を行う。

細胞と同様に、網膜組織においても VEGF、GPR91 の免疫染色を行うことで、組織での局在を観察することができる。低酸素環境、機械的伸展刺激の負荷を行い、網膜組織としての反応を確認する。さらに細胞死シグナルの活性化を抑制、細胞生存シグナルの活性化を促進するべく dominant-negative, RNAi, 特異的器質配列を持つペプチドの micro-injection な

どの手技を用いて操作し、single cell レベルの動態まで解析する。

さらに動物モデルとして、VEGF やコハク酸レセプターの遺伝子改変マウスを用い、in vivo での検討を行う。

実際の臨床における CRVO や BRVO のような虚血性疾患や高血圧関連疾患での手術患者の硝子体サンプルも検討する。

また臨床の場での実際の血流変化を知るには Laser speckle flowgraphy を用いる。これは血流の早い血管ではレーザーを当てた場合にその反射像がブレやすくなることを用いた血流速度測定装置であり非侵襲的に測定可能である。

#### 4. 研究成果

高血圧による網膜病変として、まず網膜細動脈の狭細化および口径不同が生じ、更に高血圧状態の長期間の持続で血管壁が器質的に肥厚し細動脈の狭細は不可逆性となり、血柱反射の亢進・動静脈交叉現象などの硬化所見を伴うようになる。手術時に採取した硝子体、前房水、血液中のコハク酸濃度は、増殖糖尿病網膜症では、対照より有意に高く、また硝子体 > 前房水 > 血液となっており、血液中からの流入は否定的であった。高血圧を模した血管内皮進展では、虚血時と同様に伸展刺激時においても、細胞内さらには硝子体中のコハク酸濃度は増加し、VEGF とも共同して眼内環境の悪化を引き起こしていると考えられた。

今回遺伝子改変マウスを用いる研究まで到達することはできなかったが、その分実際の臨床の場で血流速度を測定することができた。

その網膜の血流であるが、Laser speckle flowgraphy で測定すると、レーザー網膜光凝固を行うと、有意に眼底血流が減少し、その減少はレーザー光凝固の量に比

例するという結果であった。また VEGF を減少させると血流は有意に減少し、網膜新生血管の活動性も改善するという結果だった。その血流減少量を測定することによって、効果的な網膜光凝固を定量化できる可能性が示唆された。今後コハク酸の眼底血流への関与を検討する必要がある。

## 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 2 件 )

1. Yamada Y, Suzuma K, Onizuka N, Uematsu M, Mohamed YH, Kitaoka T: Evaluation of retinal blood flow before and after panretinal photocoagulation using pattern scan laser for diabetic retinopathy. Curr Eye Res 42: 1707-1712, 2017 査読有
2. Yamada Y, Suzuma K, Matsumoto M, Tsuiki E, Fujikawa A, Harada T, Kitaoka T: Retinal blood flow correlates to aqueous vascular endothelial growth factor in central retinal vein occlusion. Retina 35: 2037-2042, 2015 査読有

[ 学会発表 ] ( 計 3 件 )

1. Tsuiki E, Suzuma K, Mohamed YH, Yamada Y, Matsumoto M, Kitaoka T: Oral kalligeninase improved chorioretinal blood flow levels and significantly reduced subfoveal choroidal thickness in diabetic macular

edema patients. Invest Ophthalmol Vis Sci: E-abstract C0060, 2016

2. Yoneda A, Suzuma K, Maekawa Y, Tsuiki E, Kitaoka T: Comparison of retinal and choroidal blood flow changes after treatment with ranibizumab or aflibercept in exudative age-related macular degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci: E-abstract 4597 - B0238, 2015
3. Matsumoto M, Suzuma K, Tsuiki E, Fujikawa A, Kitaoka T: Retinal blood flow levels after intravitreal ranibizumab for diabetic macular edema. 15th EURETINA Congress – Nice 2015, France, pp.96, 2015

[ 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 ]  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

北岡 隆 (KITAOKA, Takashi)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・  
教授  
研究者番号：80234235

(2)研究分担者

築城 英子 (TSUIKI, Eiko)  
長崎大学・病院(医学系)・講師  
研究者番号：30363493

木下 博文 (KINOSHITA, Hirofumi)  
長崎大学・病院(医学系)・助教  
研究者番号：50530466

松本 牧子 (MATSUMOTO, Makiko)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・  
助教  
研究者番号：70437903

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし