様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２１年　５月２０日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2006～2008
課題番号：１８３９０４６７
研究課題名（和文）血液細胞-血管内皮相互反応制御による網脈絡膜疾患の病態解明と新治療法の開発
研究課題名（英文）Development of new therapy and investigation into the pathology of chorioretinal disorders by controlling the blood cell-endothelial cell interactions

研究代表者
宮本　和明（MIYAMOTO KAZUAKI）
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：９０３５９８１０

研究成果の概要：網脈絡膜疾患の病態形成に、血液細胞と血管内皮の相互反応が重要な役割を果たしていることを示し、その相互反応を制御することで、病態の引き起こす組織障害を軽減させることができることを明らかにした。具体的には、抗血小板薬であるシロスタゾールが網膜虚血再灌流後の網膜における白血球および血小板と血管内皮の相互反応を減弱させ、引き続いて生じる組織障害を抑制すること、誘導型一酸化窒素合成酵素の機能抑制が、眼炎症における白血球-血管内皮相互反応の減弱をもたらすことなどを示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００６年度	7,200,000	2,100,000	9,300,000
２００７年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
２００８年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総　計	14,900,000	4,410,000	19,310,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学
キーワード：網膜循環、白血球-血管内皮相互反応、網膜虚血再灌流障害、網膜静脈閉塞、エンドトキシン誘発ぶどう膜炎、抗血小板薬、誘導型一酸化窒素合成酵素、神経保護作用

１．研究開始当初の背景

(1) 成人の失明原因の主要なものに、糖尿病網膜症や網膜血管閉塞症、ベーチェット病に代表されるぶどう膜炎といった網脈絡膜疾患があげられる。特に糖尿病網膜症は、社会的に働き盛りの約300万人が発症し、毎年約3,000人もの患者の失明を招いており、中途失明の上位を占めている。失明に至らなくとも、視覚障害により多くの患者が日常生活に支障をきたしている。また、ベーチェット病によるぶどう膜炎も、20～40歳代の働き盛りの人に発生しやすいといわれ、重篤な視機能障害をもたらす。近年の眼科治療の進歩により、失明を待つばかりといった悲惨な状況は少なくなったとは言え、それでも重篤な視力障害により、不自由な社会生活を余儀なくされる症例は後を絶たない。このような網脈絡膜疾患に対して、その病態の解明と治療法の確立は眼科臨床の場において最大の急務である。

(2) 眼を灌流している血管のほとんどが小動静脈よりも細い血管であることから、網脈絡膜疾患で血管病変が主体のものはほとんどすべて微小循環の関与する疾患であると言える。微小循環においては血流動態に及ぼす血球成分の影響が大きくなり、病的状態では血球成分と血管内皮との相互反応がその病態形成に非常に大きな役割を果たしていると考えられるが、この血球成分と血管内皮との相互反応は、従来までは組織学的に検討した報告が散見されるのみで、網脈絡膜疾患への血球成分の関わりについてはあまり研究されてこなかった。その理由の一つに、眼疾患への血球成分の関わりを詳細に検討するには、生体眼において血球成分のダイナミックな動きを捉える必要があるが、これまであまり良い方法がなかったことがあげられる。これに応えたのが、我々の開発したアクリジンオレンジ白血球蛍光造影法とCarboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester(CFSE)血小板蛍光造影法で、これらの方法を用いると、生体眼の網膜循環における白血球動態および血小板動態をリアルタイムに観察することができ、従来の方法では見出しえなかった血球成分と血管内皮との相互反応を詳細に検討することが可能となった。

２．研究の目的

(1) 我々の開発した血球成分と血管内皮との相互作用を生体眼でリアルタイムに検討する手法を用いて、網脈絡膜疾患の病態の解明と治療法の確立を目指す。

(2) 我々は以前、血中の血小板数を減少させることが、網膜虚血再灌流障害の軽減をもたらすことを報告し(Nishijima K, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 45: 977, 2004)、血小板が、白血球-血管内皮相互反応を修飾することで網膜虚血再灌流障害の病態形成に重要な役割を果たしている可能性を明らかにした。血小板の機能を抑制することで、疑似血小板減少状態を作ることは可能と考え、ホスホジエステラーゼ3 (PDE3) 活性を特異的に阻害する抗血小板剤であるシロスタゾールに注目した。シロスタゾールには、白血球と血小板、血管内皮相互反応の減弱効果があるとされており(Ito H, et al. Platelets 15: 293, 2004)、シロスタゾールの網膜虚血再灌流障害に対する神経保護作用について、白血球-血管内皮相互反応に着目して検討した。

(3) 白血球-血管内皮相互反応は、炎症の病態形成において重要な役割を果たしている。また炎症時には、誘導型一酸化窒素合成酵素(inducible NO synthase: iNOS)の発現が亢進し、iNOS由来のNOが、白血球-血管内皮相互反応における白血球と血管内皮細胞の接着を司る細胞接着分子であるICAM-1やP-selectinなどの発現を制御することで、炎症の病態形成に深く関わっていることが報告されている。iNOSノックアウトマウスを用いて、眼炎症モデルであるエンドトキシン誘発ぶどう膜炎(Endotoxin-induced uveitis: EIU)の病態形成過程におけるiNOSの果たす役割について検討した。

３．研究の方法

(1) 麻酔下にラットの視神経を露出、結紮し、60分間網膜を虚血状態にした後視神経を解放し、血液を再灌流させることで網膜虚血再灌流障害モデルを作製した。

(2) ラットおよびマウスにリポポリサッカライド(LPS)を投与することで、エンドトキシン誘発ぶどう膜炎を作製し、ぶどう膜炎モデルとした。

(3) アクリジンオレンジ白血球蛍光造影法を用いて白血球網膜循環動態の解析を行った。具体的には、核染色蛍光色素であるアクリジンオレンジを静脈内に投与し、アルゴンブルーレーザーを励起光として走査型レーザー検眼鏡(Scanning laser ophthalmoscope: SLO)で眼底を観察、得られた眼底像を動画(30 frames/秒)として記録し、網膜循環における白血球動態の経時的変化をframe by frame法にて検討した。それぞれの病態モデルにおいて、網膜主幹動静脈、毛細血管における白血球移動速度、網膜血管壁をローリングする白血球数、白血球ローリング速度、網膜毛細血管床に捕捉される白血球密度、硝子体腔へ浸潤する白血球数等について画像解析を行った。

(4) 網膜主幹動静脈における白血球-血管内皮相互作用の解析を行った。網膜主幹動静脈においては、アクリジンオレンジ白血球蛍光造影法では血管壁に接着した白血球を血管内皮細胞と区別することが困難になるため、網膜主幹動静脈における白血球-血管内皮相互作用の解析は、網膜ホールマウント法を用いた。具体的には、細胞表面の糖鎖に結合するConcanavarin AをFluorescein isothiocianate(FITC)にて標識し、これを灌流した後、網膜のホールマウントを作製し、蛍光顕微鏡にて観察することによって行った。血管内皮への接着白血球数、白血球接着部位での血管内皮の変化等について検討した。

(5) Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester(CFSE)血小板蛍光造影法

を用いて血小板網膜循環動態の解析を行った。これは、細胞内に取り込まれたCFSEが細胞内のエステラ-ゼによりアセチル基が加水分解され、本来のフルオレセインが持つ蛍光を示すようになることを利用する生細胞蛍光染色法である。活性エステル部が細胞内蛋白質のアミノ基と結合し細胞内に固定化できることにより細胞外への漏出が少ないため、眼底では純粋に染色細胞のみを評価できる利点がある。具体的には、ドナーラットより血液を採取し、遠心操作にて血小板を分離、CFSE にて染色後、一定量の血小板をレシピエントラットに静注し、SLOで網膜における血小板循環動態を観察した。得られた眼底像を動画(30 frames/秒)として記録し、白血球の場合と同様の画像解析を行った。網膜主幹動静脈及び毛細血管における血小板移動速度、網膜血管壁に接着する血小板数等について検討した。

(6) 疾患モデルの眼球を採取し、組織切片で網膜各層の厚みを測定・比較することで組織障害の評価を行った。

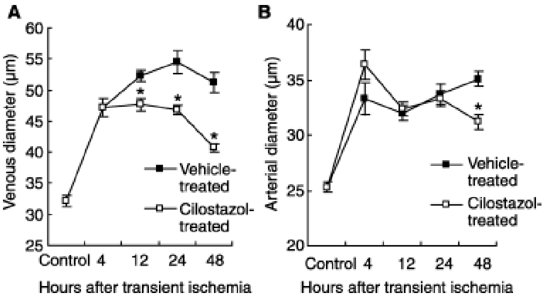
(7) 網膜虚血再灌流モデルラットを作製し、シロスタゾールを0.5% carboxymethyl Cellulose Sodium Salt (CMC)に溶解させたものを虚血作製直前に強制経口投与(100mg/kg/day) し、以降混餌投与した。対照群には、同量の0.5% CMCを虚血作製直前に強制経口投与を行った。これらのモデルラットにおいて、上記の血球細胞-血管内皮相互反応の各パラメータについて検討した。

(8) 再灌流6時間後の網膜を採取し、血液細胞と血管内皮の接着を司るP-selectin、ICAM-1などの細胞接着分子と血管漏出や血管拡張に関与する因子として血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)の発現をreal-time quantitative RT-PCR にて検討した。

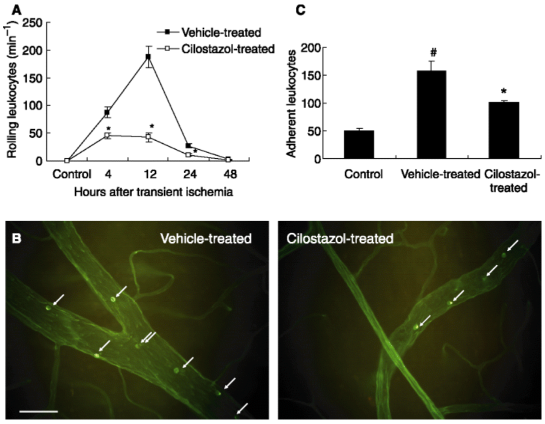
(9) iNOSノックアウトマウスとその正常対照であるC57BL/6マウスにLPSを投与し、ぶどう膜炎モデルを作製した。これらのモデルマウスにおいて、上記の血球細胞-血管内皮相互反応の各パラメータについて検討した。

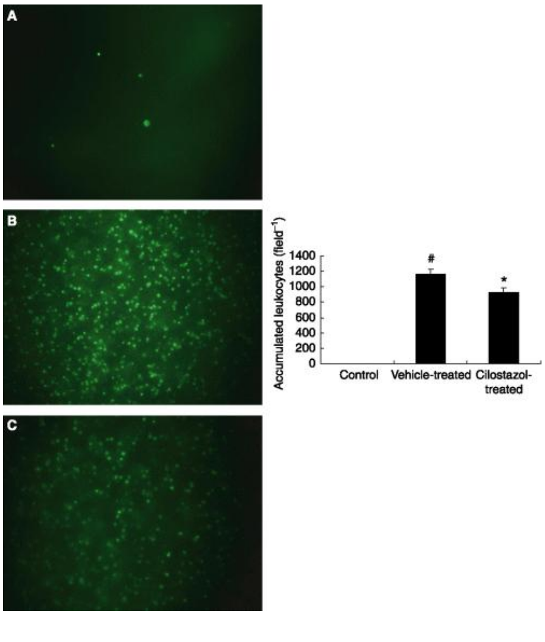
４．研究成果

(1) 網膜虚血再灌流後、主幹網膜血管は動脈も静脈も拡張するが、シロスタゾールの投与により、静脈径は再灌流後12、24、48時間後において有意に拡張が抑制された。一方、シロスタゾールの投与は動脈径の変化にはほとんど影響を及ぼさなかった。



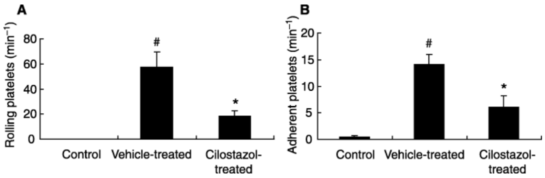
(2) 網膜虚血再灌流障害の急性期には、白血球が血管内皮細胞上を転がるローリング現象や白血球の血管内皮への強固な接着、白血球の血管外への遊走など、ダイナミックな白血球-血管内皮相互反応が生じるが、シロスタゾールの投与により、ローリング現象は最大77.6% (P<0.01)、白血球の血管内皮への接着は36.1% (P<0.01)、白血球の網膜毛細血管床への集積は20.4% (P<0.01) の抑制がみられた。



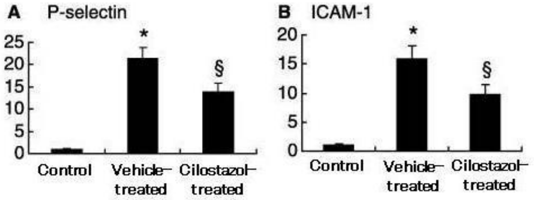


(3) 網膜虚血再灌流障害の急性期には、白血

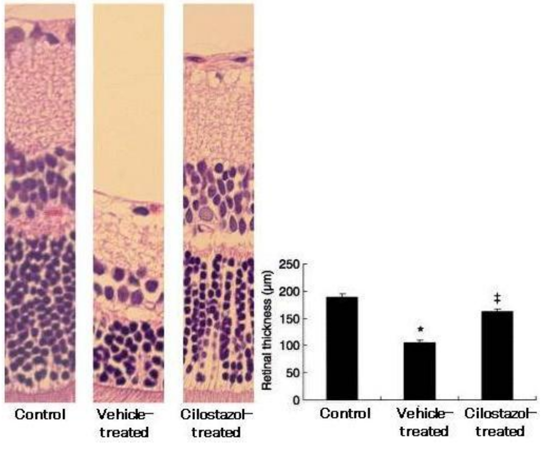
球と同様、血小板も網膜血管壁を転がるローリング現象や血管内皮への接着などの血小板-血管内皮相互反応が生じるが、シロスタゾールの投与により、再灌流後 12 時間後において、ローリング現象は 68.0% (P<0.01)、血管内皮への接着は 57.6% (P<0.01)の抑制がみられた。



(4) 網膜虚血再灌流障害においては、白血球ローリングを司る細胞接着分子である P-selectin、および白血球と血管内皮との強固な接着に関与する細胞接着分子である ICAM-1 の網膜での遺伝子発現が亢進するが、シロスタゾールの投与によりともに有意に抑制された(P<0.05)。

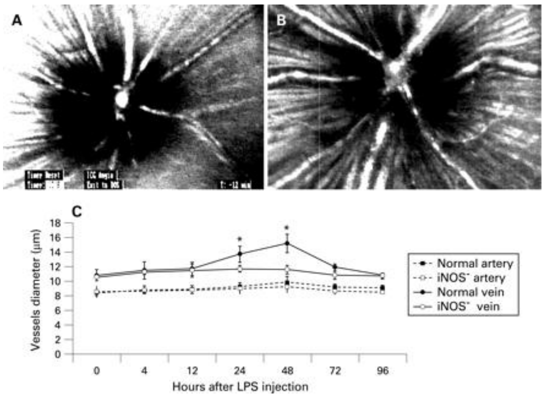


(5) 網膜虚血作製後 2 週間後に網膜組織障害について検討したところ、網膜虚血再灌流によって菲薄化した網膜厚が、シロスタゾールの投与により有意に改善した(P<0.0001)。



以上の結果によりシロスタゾールは、網膜虚血再灌流後の網膜における細胞接着分子の発現を抑制することで、白血球および血小板と血管内皮との相互反応を減弱させ、引き続いて生じる組織障害を抑制すると考えられた。

(6) ぶどう膜炎発症後、主幹網膜血管は動脈も静脈も拡張するが、静脈においてその程度が強い。iNOS ノックアウトマウス群では、ぶどう膜炎発症後 24、48 時間後において静脈の拡張が有意に抑制された。動脈については、有意な変化はみられなかった。



A,B はともに正常対照マウスの眼底像で、A はぶどう膜炎発症前、B はぶどう膜炎発症後 48 時間後である。B では著明な網膜血管の拡張がみられる。

(7) ぶどう膜炎発症の急性期には、白血球が血管内皮細胞上を転がるローリング現象や白血球の血管内皮への強固な接着、白血球の血管外への遊走など、ダイナミックな白血球-血管内皮相互反応が生じるが、iNOS ノックアウトマウス群では、正常対照マウス群に比べて、白血球のローリング現象(図 1)は最大 98.2% (P<0.0001)、遊走白血球数(図 2)は最大 74.0% (P<0.0001)の抑制がみられた。

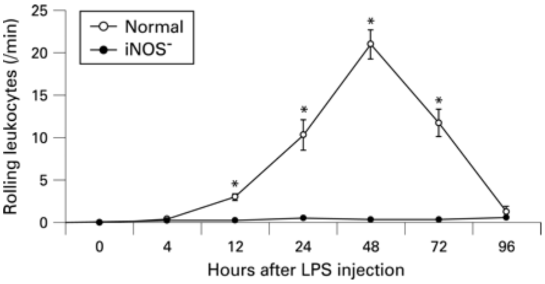


図 1 ぶどう膜炎発症の網膜主幹静脈におけるローリング白血球数の時間経過

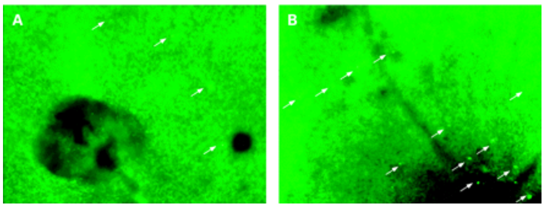
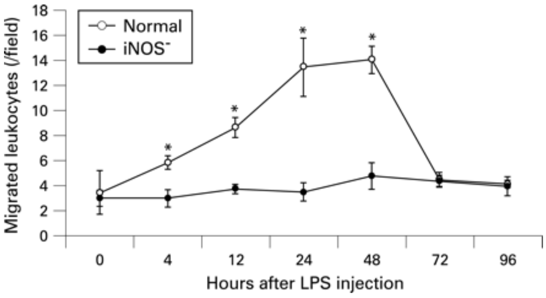


図 2 ぶどう膜炎発症後 48 時間後の網膜における遊走白血球(矢印)
A: iNOS ノックアウトマウス、B: 正常対照マウス
iNOS ノックアウトマウスにおいて、網膜遊走白血球数の有意な減少がみられた。時間経過

をグラフにすると以下の通りであり、iNOS ノックアウトマウス群において、遊走白血球数は最大 74.0% (P<0.0001)の抑制がみられた。



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）

〔雑誌論文〕（計１２件）

① Iwama D, Miyahara S, Tamura H, Miyamoto K, Hirose F, Yoshimura N. Lack of iNOS attenuates leukocyte-endothelial cell interactions in retinal microcirculation. Br J Ophthalmol. 92: 694-698, 2008, 査読有り

② Yamaike N, Tsujikawa A, Ota M, Sakamoto A, Kotera Y, Kita M, Miyamoto K, Yoshimura N, Hangai M. Three-dimensional imaging of cystoid macular edema in retinal vein occlusion. Ophthalmology 115: 355-362, 2008, 査読有り

③ Ota M, Tsujikawa A, Murakami T, Yamaike N, Sakamoto A, Kotera Y, Miyamoto K, Kita M, Yoshimura N. Foveal photoreceptor layer in eyes with persistent cystoid macular edema associated with branch retinal vein occlusion. Am J Ophthalmol. 145: 273-280, 2008, 査読有り

④ Ota M, Tsujikawa A, Kita M, Miyamoto K, Sakamoto A, Yamaike N, Kotera Y, Yoshimura N. Integrity of foveal photoreceptor layer in central retinal vein occlusion. Retina 28: 1502-1508, 2008, 査読有り

⑤ Iwama D, Miyamoto K, Miyahara S, Tamura H, Tsujikawa A, Yamashiro K, Kiryu J, Yoshimura N. Neuroprotective effect of cilostazol against retinal ischemic damage via inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions. Journal of Thrombosis and Haemostasis 5: 818-825, 2007, 査読有り

⑥ Ota M, Tsujikawa A, Murakami T, Kita M, Miyamoto K, Sakamoto A, Yamaike N, Yoshimura N. Association between integrity of foveal photoreceptor layer and visual acuity in branch retinal vein occlusion. Br J Ophthalmol. 91: 1644-1649, 2007, 査読有り

⑦ Murakami T, Tsujikawa A, Ohta M, Miyamoto K, Kita M, Watanabe D, Takagi H, Yoshimura N. Photoreceptor status after resolved macular edema in branch retinal vein occlusion treated with tissue plasminogen activator. Am J Ophthalmol. 143: 171-173, 2007, 査読有り

⑧ Yamaike N, Kita M, Tsujikawa A, Miyamoto K, Yoshimura N. Perimetric sensitivity with the Micro Perimeter 1 and retinal thickness in patients with branch retinal vein occlusion. Am J Ophthalmol. 143: 342-344, 2007, 査読有り

⑨ Murakami T, Takagi H, Kita M, Nishiwaki H, Miyamoto K, Ohashi H, Watanabe D, Yoshimura N. Intravitreal tissue plasminogen activator to treat macular edema associated with branch retinal vein occlusion. Am J Ophthalmol 142: 318-320, 2006, 査読有り

⑩ Miyahara S, Kiryu J, Miyamoto K, Hirose F, Tamura H, Yoshimura N. Alteration of leukocyte-endothelial cell interaction during aging in retinal microcirculation of hypertensive rats. Jpn J Ophthalmol. 50: 509-514, 2006, 査読有り

〔学会発表〕（計２１件）

① Iwama D, Miyahara S, Tamura H, Miyamoto K, Hirose F, Yoshimura N. Lack of iNOS attenuates leukocyte-endothelial cell interactions in retinal microcirculation. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2008 Annual Meeting, Fort Lauderdale, USA. 2008.4.27-5.1

② 山池紀翔，辻川明孝，喜多美穂里，宮本和明，坂本篤，太田将文，小寺由里子，吉村長久．網膜静脈閉塞症に対するベバシズマブ硝子体投与による網膜感度変化．第 112 回日本眼科学会総会，横浜，2008.4.17-20

③ 岩間大輔，宮原晋介，田村寛，宮本和明，広瀬文隆，吉村長久．炎症時網膜での白血球動態における iNOS の役割．第 112 回日本眼科学会総会，横浜，2008.4.17-20

④ 太田将文，辻川明孝，喜多美穂里，宮本和明，王英泰，坂本篤，小寺由里子，吉村長久，山池紀翔．網膜静脈閉塞症に伴う黄斑浮腫症例に対する bevacizumab の硝子体内投与後６ヶ月成績．第 47 回日本

網膜硝子体学会総会・第 25 回日本眼循環学会合同学会，京都，2008.11.28-30
⑤ 太田将文，辻川明孝，喜多美穂里，宮本和明，坂本篤，山池紀翔，小寺由里子，吉村長久．網膜静脈分枝閉塞症に伴う黄斑浮腫症例の初診時 OCT 所見と治療後の視力予後との関連．第 24 回日本眼循環学会，高松，2007.7.13-14
⑥ 辻川明孝，太田将文，山池紀翔，坂本篤，小寺由里子，宮本和明，喜多美穂里，吉村長久．網膜静脈分枝閉塞症に伴う遷延嚢胞様黄斑浮腫症例の OCT 所見と視機能との関連．第 24 回日本眼循環学会，高松，2007.7.13-14
⑦ 山池紀翔，辻川明孝，喜多美穂里，宮本和明，坂本篤，太田将文，小寺由里子，吉村長久．網膜静脈閉塞症に伴う黄斑浮腫に対する bevacizumab 硝子体投与の効果．第 61 回日本臨床眼科学会，京都，2007.10.11-14
⑧ 辻川明孝，山池紀翔，坂本篤，太田将文，宮本和明，喜多美穂里，吉村長久．網膜静脈閉塞症に対する bevacizumab 硝子体注入後の再発例の検討．第 46 回日本網膜硝子体学会総会，青森，2007.11.23-25
⑨ 鈴間潔，村上智昭，渡部大介，宮本和明，喜多美穂里，吉村長久，高木均．糖尿病網膜症を合併した網膜中心静脈閉塞症に対する tPA 硝子体投与．第 29 回日本眼科手術学会総会，東京，2006.1.27-29
⑩ 宮本和明．シンポジウム 11「糖尿病網膜症−病態解明と治療への応用−」，糖尿病網膜症の病態形成における白血球の関与．第 110 回日本眼科学会総会，大阪，2006.4.13-16
⑪ 宮本和明．特別講演，網膜虚血再灌流障害における血小板の役割．第 84 回日本神経学会近畿地方会，大阪，2006.6.24
⑫ 山池紀翔，板谷正紀，太田将文，西村衛，坂本篤，村上智昭，辻川明孝，宮本和明，喜多美穂里，安野嘉晃，巻田修一，谷田貝豊彦，吉村長久．フーリエドメイン OCT による網膜静脈分枝閉塞症に伴う嚢胞様黄斑浮腫の 3 次元像観察．第 23 回日本眼循環学会，山梨，2006.6.30-7.1
⑬ 太田将文，辻川明孝，村上智昭，宮本和明，喜多美穂里，坂本篤，山池紀翔，西村衛，高木均，吉村長久．黄斑浮腫を伴った BRVO に対する tPA 硝子体投与後における視細胞層の評価と視力予後．第 23 回日本眼循環学会，山梨，2006.6.30-7.1
⑭ 西村衛，辻川明孝，喜多美穂里，宮本和明，村上智昭，坂本篤，山池紀翔，太田将文，吉村長久．網膜静脈分枝閉塞症における foveal capillary ring と中心窩網膜厚・視力との関連．第 45 回日本網膜硝子体学会総会，東京，2006.12.1-3
⑮ 太田将文，辻川明孝，村上智昭，喜多美穂里，宮本和明，坂本篤，山池紀翔，西村衛，吉村長久．網膜静脈分枝閉塞症に伴う黄斑浮腫治療後の視細胞層の評価と視力予後．第 45 回日本網膜硝子体学会総会，東京，2006.12.1-3

〔図書〕（計１件）
① 吉村長久，宮本和明，山本哲也，下村嘉一，三村治，黒坂大次郎．図解眼科．金芳堂、2008、231 ページ

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）

○取得状況（計０件）

〔その他〕
なし

６．研究組織
(1)研究代表者
宮本　和明（MIYAMOTO　KAZUAKI）
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：９０３５９８１０
(2)研究分担者
大谷　篤史（OTANI　ATSUSHI）
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：３０３１４２２２
辻川　明孝（TSUJIKAWA　AKITAKA）
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：４０４０２８４６

(3)連携研究者
なし