

機関番号：17201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592048

研究課題名 (和文) 網膜血管リモデリングにおける酵素学的硝子体融解法の効果に関する研究

研究課題名 (英文) Effect of enzymatic vitreolysis on the remodeling of the retinal vasculature

研究代表者

平田 憲 (AKIRA HIRATA)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：60295144

研究成果の概要 (和文)：

実験的網膜静脈分枝閉塞症モデルの確立: Brown Norway rat を用い、全身麻酔の後、網膜静脈に対し光凝固を行い、光凝固の後走査型レーザー検眼鏡にて血流の途絶の有無について蛍光眼底造影を行いながら確認した。光凝固後早期(1-3日)には強い網膜滲出性剥離をきたし、約7日目には網膜剥離の消退を認めた。光凝固の照射範囲を1-2象限に限定することで、網膜剥離の程度は軽減した。

実験的 BRVO モデル網膜血管の組織学的検討: 網膜血管内腔は高度に赤血球の凝集性変化が見られた。光凝固後1週間では一部に血管内皮間に間隙が見られた。明らかな transcellular pore は確認されなかった。ラットにおける enzymatic vitreolysis の確立: 0.01IU, 0.05IU, 0.1IU のプラスミンを注入し、網膜の組織学的検討を行った。0.01U のプラスミンでは 25%の後部硝子体剥離作製率であったのに対し、0.05U、0.1U のプラスミンでは高率(50-75%)に後部硝子体剥離が確認できた。

実験的網膜静脈分枝閉塞症モデルでの enzymatic vitreolysis の血管再構築における影響の検証: 0.05U プラスミンを前投与したラットに対し、a で作製した方法と同様に光凝固を行ったところ、網膜剥離の有無では明らかな統計的有意差を認めなかったものの、術後早期の滲出性網膜剥離は軽減する傾向にあった。

Bvacizumab 注入によるラット脈絡膜毛細血管の形態変化: ラット眼内に bevacizumab を注入し、脈絡膜毛細血管の窓構造の変化を検討したところ、投与後 1, 3, 7 日では有意に窓構造が減少した。14, 28 日後には回復し、可逆的変化であると考えられた。

自己骨髄幹細胞移植による enzymatic vitreolysis 処理後の網膜表層の血管再構築に与える効果の検証: 移植細胞は網膜表面に局限しており、明らかな網膜内取り込みは確認されなかった。今後、同様の方法にてサイトカインの輸送効率の向上を目的とした実験を行っていく予定である。

実験的網膜静脈分枝閉塞症モデルでの enzymatic vitreolysis の血管再構築における影響の検証: 本研究はプラスミンによる後部硝子体剥離作製の促進とプラスミンによる血栓溶解作用を目的として行ったものである。結果としては術後の黄斑浮腫改善効果においてプラスミンは通常硝子体手術療法と比べ有意な改善効果は見いだせなかった。

研究成果の概要 (英文)：

A model of branch retinal vein occlusion was made on Brown Norway rat. After laser photocoagulation (PC), the retinas were observed. In early phase (1-3 days), massive exudative retinal detachment was

observed. On day 7, the retinal detachment was absorbed completely. Histologically, the PC treated vessels contained numerous aggregated RBCs in early phase. Some vessels showed endothelial gaps. Intravitreal injection of plasmin in rat eyes showed posterior vitreous detachment in 25% (0.01U) to 50% (0.05–0.1U). Pretreatment of plasmin reduced the severity of retinal detachment after PC. Intravitreal injection of bevacizumab in rat eyes caused decreasing of the number of fenestrae in choriocapillaris transiently until 7days after injection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：プラスミン、後部硝子体剥離、網膜

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞症を代表とする網膜循環障害による眼疾患は患者数が多いにも拘らず、現在でも視機能を維持する上で治療に苦慮する代表的疾患群である。なかでも続発する黄斑浮腫はその頻度も多く、現在でも治療方法が確立していないのが現状である。従来からの光凝固療法や後部硝子体剥離を目的とした硝子体手術、最近多くの施設で行われるようになったトリアムシロンの硝子体腔内やテノン嚢下注入、抗 VEGF 抗体の硝子体腔内注入など様々な外科的、内科的治療が報告されているものの、その効果については短期的効果のみであるか、あるいは統計学的エビデンスを持たないのが現状である。眼科における網膜循環障害に対する治療概念は循環障害により虚血に陥った網膜から産生される VEGF などのサイトカイン放出による二次的な障害、例えば血管透過性の亢進、血管内皮の増殖、新生血管の発生を抑制することに主眼がおかれていて、途絶した血管を回復させ、本来の

機能を回復させるという根本的治療概念とは異なっている。特に bevacizumab 注入に代表される特定のサイトカイン抑制をターゲットとした治療法は、サイトカインの持つ本来の生理的機能をも侵しかねない危険性をはらんでいる。一方で、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞症などは側副血行路の発達により自然治癒する例も散見されることより、適切な環境下では新生血管や既存の血管の拡張により少なくとも循環の改善が期待できる可能性があるといえる。硝子体網膜界面が新生血管の増殖の足場となることは既に明白である。硝子体網膜界面に対する薬物療法として、硝子体を直接液化し (synchysis)、さらに網膜硝子体界面の接着を外すことで (syneresis)、手術せずとも後部硝子体剥離を作製する試みも行われている。これらの方法を酵素による硝子体融解 (enzymatic vitreolysis) と呼ぶが、実験的には 1970 年代にコラゲナーゼやヒアルロニダーゼを用いた硝子体の液化の試みが行われ、以来現在までさまざまな薬剤が基礎研究、あるいは臨床応用に用いられている。現

在ではプラスミン(plasmin)、ディスパーゼ(dispace)などの非特異的酵素やコンドロイチナーゼ(chondroitinase)、ヒアルロニダーゼ(hyaluronidase)などの基質特異性のある酵素、さらには網膜表面の硝子体接着部位に競合する新しい非酵素性薬物も開発されている。なかでもプラスミンは限られた施設ではあるが現在最も積極的に手術に使用されており、我が国でも複数の大学を中心とする施設で臨床応用が行われている。プラスミンは分子量 91,000 のアミノ酸 484 個と 230 個の 2 本鎖のよりなる非特異的蛋白分解酵素である。前駆体であるプラスミノゲン(plasminogen)がストレプトキナーゼ(streptokinase)やウロキナーゼ、t-PA などのプラスミノゲン活性化因子によって変換されて生成される。実験的には、家兎眼の硝子体腔に注入することで、硝子体の液化、後部硝子体剥離が起こることが報告されている。プラスミンを用いる利点として、①前駆体のプラスミノゲンが患者の自家血から抽出されるため未知の感染の危険性がないこと、②プラスミンを硝子体腔内に注入すると自己分解あるいは硝子体内の抗プラスミン酵素による分解をうけ約 15 分で活性がピークに達し、その後 1-2 時間で活性が低下し始めその後 24 時間のうちに活性はほぼゼロとなるため長期にわたる組織障害の可能性が少ないことがあげられる。申請者はすでに倫理委員会の承認のもとプラスミンを用いた硝子体手術を施行し、特に増殖糖尿病網膜症、未熟児網膜症において手術時間の有意な短縮と合併症の軽減が得られることを確認し報告している(Tsukahara et al. Am J Ophthalmol 2007, Hirata et al Retina in press)。またプラスミンの硝子体腔内投与により内境界膜のラミニン、フィブロネクチンの分解がみとめられたという報告もある。さらに我々は黄斑円孔手術中に採取した硝子体液の解析では MMP-2 の活性上昇が見られることを明らかにした(Takano, Hirata et al Am J Ophthalmol, 2005)。

t-PA の硝子体腔内注入が網膜静脈分枝閉塞症に続発する黄斑浮腫に有効であるとの報告が見られるが、その機序として内因性プラスミンの生成による血栓溶解作用、後部硝子体剥離の形成に伴う硝子体腔内の酸素分圧の上昇などが関与すると考えられている。我々の臨床経験においても網膜中心静脈閉塞症に対する硝子体手術の際に t-PA を投与することで、有意な黄斑浮腫の改善効果が得られた(未発表データ)。しかしながら、これまで網膜硝子体界面の変化が網膜循環に与える効果についての実験的検証はなされていない。証申請者はこれまで enzymatic vitreolysis に関する基礎的、臨床的データを蓄積しており、enzymatic vitreolysis の新たな可能性を探る目的で本研究を申請するものである。

2. 研究の目的

本研究では、3年間の研究期間に、網膜静脈閉塞症の実験モデルの確立から臨床研究までを視野にいれ、研究を行う予定である。初年度では実験的網膜静脈分枝閉塞症モデルラットを用いて、網膜循環障害に対する正常なレスポンスを形態学的、分子生物学的に究明する。初年度後半から次年度にかけて、enzymatic vitreolysis による血管の再構築に与える影響を同様のモデルを用い検証する。特に再疎通までの経時的変化、血管構築の差異、網膜に発現するサイトカインの差異を検証する。さらに骨髓幹細胞移植による血管再構築における効果も検証する。最終年度では基礎的データを踏まえ、網膜静脈閉塞症患者を対象に enzymatic vitreolysis を併用した硝子体手術を施行する。患者 20 名をランダムに 2 グループにわけ、1 群は通常硝子体切除法を、もう 1 群は enzymatic vitreolysis 併用硝子体切除を行う。術後の黄斑浮腫の経時変化、蛍光眼底造影による血管再疎通の有無とその程度を比較検討する。

3. 研究の方法

平成 20 年度

実験的網膜静脈分枝閉塞症モデルの確立 (modified from Genevois et al. IOVS 2004)

Brown Norway rat を用い、ketamin,xylazine にて全身麻酔の後、網膜静脈に対し光凝固を行う。スリットランプ下に前置レンズを用い眼底を観察した後、上方の網膜静脈に対し、約4乳頭径はなれた部位でレーザー光凝固を施行する。2-5 発の範囲で完全な網膜静脈の変則を確認する。光凝固の後走査型レーザー検眼鏡にて血流の途絶の有無について蛍光眼底造影を行いながら確認する。

実験的 BRVO モデル網膜血管の組織学的検討
(modified from Hirata et al. Am J Physiol 1995, Thurston et al. Am J Physiol 1996)) 網膜組織の検討には一般的な切片作製による検討に加え、レクチン染色による血管内染色法により光学顕微鏡的な血管構築の変化を観察する。またさらに微細構造の観察のために透過型電子顕微鏡による観察と、我々が過去におこなったvibratome によるマイクロスライス法を用いた網膜血管の内腔の走査型電子顕微鏡に夜観察も行う。血管内皮の構造特に血管透過性亢進の原因となる内皮細胞間の gap 構造、fenestration の有無、vesico-vacuolar organella の有無を調べる。側副路の有無は血管内皮の構造観察とともに基底膜、pericyte の存在とその構造についても検討する。

ラットにおける plasmin 投与による enzymatic vitreolysis の確立

本研究ではラット眼にプラスミンを注入し、ガスタンポナーデを行うことを前提にその至適濃度、量を検討する。まず、0.01IU, 0.05IU, 0.1U のプラスミンを注入し、網膜の組織学的検討を行い、網膜毒性の有無、網膜表面の硝子体線維の残存の状態、さらにプラスミンによって誘導される active MMP-2 の定量化を行う。至適濃度を決定

した後に SF6 ガスを注入したガスタンポナーデ法による後部硝子体剥離作製の検討を行う。SF6 ガス注入後 15 分、30 分、60 分での網膜表面の観察を行い、ガスタンポナーデの至適時間を決定する。

実験的網膜静脈分枝閉塞症モデルでの enzymatic vitreolysis の血管再構築における影響の検証

で作製した実験的網膜静脈分枝閉塞症モデルにおいてプラスミン投与およびガスタンポナーデによる後部硝子体剥離による網膜硝子体界面の変化と内境界膜の MMP-2 による変化にともなう、血管再構築の変化を同様に観察する。①で行ったと同様に血管内皮の構造(内皮細胞間の gap 構造、fenestration の有無、vesico-vacuolar organella の有無)と血管の成熟化の指標となる基底膜、pericyte の存在とその構造についても比較検討する。また、血管形成に関与するサイトカインのなかでも特に神経形成にも関与するとされる ephrins, netrin、Neuropilin、R-cadherin、VEGF の発現の有無について網膜内の発現を免疫組織科学的手法で、また硝子体腔内の放出量について ELIZA を用い測定する。

自己骨髄幹細胞移植による enzymatic vitreolysis 処理後の網膜表層の血管再構築に与える効果の検証

ラット骨髄細胞をラット大腿骨より採取し 10% 胎児牛血清 (FBS) 添加 DMEM 培地にて培養し、間葉系幹細胞 (MSC) を分離する。種々の量 (5000 ~ 5000000 個) の MSC を、enzymatic vitreolysis 処理した網膜静脈分枝閉塞症モデルラットの硝子体腔内に投与する。処置後 1,3 日, 1,2,4 週の眼底変化、特に網膜血管再構築の有無とその効果ならびに MSC 注入による合併症の有無を眼底検査、蛍光眼底造影および組織学的に検討する。

平成 22 年度

続発黄斑浮腫を伴う網膜静脈分枝閉塞症患者

における enzymatic vitreolysis 併用硝子体切除の血管再構築における影響の検証

硝子体手術を要する硝子体網膜疾患の中でも、重篤な黄斑浮腫(矯正視力 0.1 以下、光干渉断層像による網膜黄斑容積 3.5mm³ 以上)を伴う網膜中心静脈閉塞症、もしくは網膜静脈分枝閉塞症を有する症例を対象にプラスミン併用硝子体手術を、randomized study にてプラスミンを用いない通常の方法にて行った手術成績と比較検討する。研究を開始するに当たり、既に承認を受けている難治性の増殖性網膜硝子体疾患に対する本学の倫理委員会申請を、基礎データの結果とともに再申請し、プラスミン併用硝子体手術の適応変更の了承を得た後に行う。各群 10 症例を目標とする。術前の状態(各疾患毎の病期、術前視機能)、手術操作(手術時間、術中合併症の有無および頻度)、術後の状態(術後感染の有無および頻度、術後炎症の程度、晩期合併症の有無、術後視機能)について比較検討する。実際の手技として、①術眼の消毒ののち、4%キシロカイン点眼麻酔下にて患者自己血清から精製したプラスミンを 30-ゲージ針にて、0.1-0.2ml 硝子体内に注入する。②15 分-30 分間の待機中に白内障手術を施行し、硝子体手術へ移る。術後の炎症対策、感染予防法は通常の手術に準じる。⑦術後は術翌日から細隙灯顕微鏡、眼底鏡による術後炎症の評価、視機能評価を行う。術後1週間、4週間、3か月、6か月、12か月の視力の推移と黄斑浮腫の改善度、蛍光眼底造影による、蛍光漏出の程度、新生血管の有無、側副血行路の有無を記載し、比較検討する。

4. 研究成果

a. 実験的網膜静脈分枝閉塞症モデルの確立: Brown Norway rat を用い、全身麻酔の後、網膜静脈に対し光凝固を行う。スリットランプ下に前置レンズを用い眼底を観察した後、上方の網膜

静脈に対し、約 4 乳頭径はなれた部位でレーザー凝固を施行。光凝固の後走査型レーザー検眼鏡にて血流の途絶の有無について蛍光眼底造影を行いながら確認した。光凝固後早期(1-3日)には強い網膜滲出性剥離をきたし、約7日目には網膜剥離の消退を認めた。光凝固の照射範囲を1-2象限に限定することで、網膜剥離の程度は軽減した。

b. 実験的 BRVO モデル網膜血管の組織学的検討: 網膜組織の検討には一般的な切片作製による検討に加え、レクチン染色による血管内染色法により光学顕微鏡的な血管構築の変化を観察した。またさらに微細構造の観察のために透過型電子顕微鏡による観察と、マイクロスライス法を用いた網膜血管の内腔の走査型電子顕微鏡による観察を行った。網膜血管内腔は高度に赤血球の凝集性変化が見られた。光凝固後1週間では一部に血管内皮間に間隙が見られた。明らかな transcellular pore は確認されなかった。

c. ラットにおける enzymatic vitreolysis の確立: 0.01IU, 0.05IU, 0.1U のプラスミンを注入し、網膜の組織学的検討を行った。至適濃度を決定した後に SF6 ガスを注入したガススタンプナーデ法による後部硝子体剥離作製の検討を行った。0.01U のプラスミンでは 25%の後部硝子体剥離作製率であったのに対し、0.05U, 0.1U のプラスミンでは高率(50-75%)に後部硝子体剥離が確認できた。

d. 実験的網膜静脈分枝閉塞症モデルでの enzymatic vitreolysis の血管再構築における影響の検証: 0.05U プラスミンを前投与したラットに対し、a で作製した方法と同様に光凝固を行ったところ、網膜剥離の有無では明らかな統計的有意差を認めなかったものの、術後早期の滲出性網膜剥離は軽減する傾向にあった。

e. Bvacizumab 注入によるラット脈絡膜毛細血管の形態変化: ラット眼内に bevacizumab を注入し、

脈絡膜毛細血管の窓構造の変化を検討したところ、投与後 1,3,7 日では有意に窓構造が減少した。14,28 日後には回復し、可逆的变化であると考えられた。

f. 自己骨髄幹細胞移植による enzymatic vitreolysis 処理後の網膜表層の血管再構築に与える効果の検証:本実験は enzymatic vitreolysis による細胞移植の効率性向上を目的とするものであったが、移植細胞は網膜表面に限局しており、明らかな網膜内取り込みは確認されなかった。今後、同様の方法にてサイトカインの輸送効率の向上を目的とした実験を行っていく予定である。

g. 実験的網膜静脈分枝閉塞症モデルでの enzymatic vitreolysis の血管再構築における影響の検証:本研究はプラスミンによる後部硝子体剥離作製の促進とプラスミンによる血栓溶解作用を目的として行なったものである。結果としては術後の黄斑浮腫改善効果においてプラスミンは通常の硝子体手術療法と比べ有意な改善効果は見いだせなかった。

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 5 件)

①Souma M, Hirata A, Takahashi T, Okinami S. Relapse of Vogt-Koyanagi-Harada disease during IFN- α and ribavirin therapy in a case of chronic viral hepatitis C. Case Reports in Ophthalmol. in press 査読有

②Hirata A, Okinami S, Hayashi K. Occurrence of capsular delamination in the dislocated in-the-bag intraocular lens. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. In press 査読有

③Kawazoe M, Hirata A, Okinami S. A case of progressive hemifacial atrophy. Fluorescein and indocyanine green angiographic findings. J

Pediatr. Ophthalmol. Strabismus 46: 56-58, 2009 査読有

④Shimomura Y, Hirata A, Okinami S. Changes in choriocapillaris fenestration of rat eyes after intravitreal bevacizumab injection. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 247: 1089-1094, 2009 査読有

⑤Hirata A, Kubo M, Okinami S. Severe retinal atrophy due to retinal and choroidal vascular occlusion secondary to triamcinolone injection into the nasal mucosa. Jpn J Ophthalmol. 52: 510-511, 2008 査読有

[学会発表](計 3 件)

①Hirata A, Okinami S, Hayashi K. Capsular delamination in the dislocated in-the-bag intraocular lens revealed by scanning electron microscopy. American Academy of Ophthalmology. 2009, 10, 25 San Francisco

②石川慎一郎, 中林條, 平田憲, 岩切亮, 下村由起子, 沖波聡 網膜虚血再灌流モデルラットにおける Bcl-2c 経路に対する siRNA による神経保護の検討. 第 113 回日本眼科学会総会 2009.4.16 東京国際フォーラム

③平田憲, 沖波聡, 林研. 嚢内固定眼内レンズ脱臼例の走査電子顕微鏡的観察. 第 114 回日本眼科学会総会 2010 年 4 月 16 日 名古屋国際会議場

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

平田 憲(AKIRA HIRATA)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号:60295144