

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592053

研究課題名（和文）網膜微小循環障害における好中球エラスターゼの役割

研究課題名（英文） The role of neutrophil elastase on the disturbance of retinal microcirculation

研究代表者

吉田 宗徳（YOSHIDA MUNENORI）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60273447

研究成果の概要(和文)：

網膜微小循環障害における好中球エラスターゼ(NE)の役割について主としてエンドトキシン誘発ぶどう膜炎モデルと網膜虚血再灌流モデルを用いて研究した。ぶどう膜炎モデルではNE阻害剤の投与によってぶどう膜炎スコアの減少がみられ、網膜虚血再灌流モデルでは同じく網膜傷害が軽減された。両モデルでは網膜内への白血球の集積も減少した。NE はこれらモデルでの組織傷害および白血球動態に関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：

The role of neutrophil elastase (NE) on the disturbance of retinal microcirculation was investigated. NE antagonist reduced the uveitis score in endotoxin-induced uveitis (EIU) model. It also suppressed the retinal injury caused by retinal ischemia-reperfusion. The accumulation of leukocytes in the retina was reduced in those models when NE was administrated. NE plays an important roles to increase tissue injury as well as the dynamics of leukocyte in retinal microcirculation.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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:網膜微小循環・好中球エラスターゼ

1. 研究開始当初の背景

網膜血管閉塞やぶどう膜炎、糖尿病網膜症などでは網膜、特に黄斑部の浮腫が視力低下の原因となることが多く、それゆえ黄斑浮腫の治療は今日大変重要視されている。これらの疾患ではまず網膜血管が傷害され、その結果網膜血管の透過性が亢進して浮腫を生ずるのだが、その詳しい機序については不明な点も多い。これらの機序を明確にすることは黄斑浮腫の治療を考える上で非常に有益であり、より効果的な新しい治療へと結びつく可能性が高い。私たちは網膜血管障害を白血球動態異常の点から研究してきた。その結果、白血球の網膜血管への粘着、網膜組織への滞留がこれらの病態に関与していると考えている。近年の他分野での研究から好中球エラスターゼ(NE)の組織傷害への重要性が説かれているが、網膜に関してはこの点に着目した研究はほとんど行われていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は病的状態において好中球エラスターゼ(NE)が網膜内白血球動態異常にどのように関与しているか、さらにその結果としての組織障害にどのように関与しているかを調べることである。

3. 研究の方法

(1)動物モデルの作成:エンドトキシン誘発ぶどう膜炎モデル(endotoxin-induced uveitis, EIU)および網膜虚血再灌モデルをラットを用いて作成した。

(2)NE 阻害剤によるぶどう膜炎および虚血再灌流による網膜傷害の抑制:上記モデルにおいて同時に NE 阻害剤を加えたときの抑制効果を検討。

(3)上記モデルにおける白血球動態の検討: acridine orange digital fluorography(AODF)を用

いて上記モデルでの網膜内白血球動態を検討。NE 阻害剤投与時の動態も検討。

(4)上記モデルでの細胞接着因子発現の検討:免疫染色を用いた ICAM-1 発現の変化の検討。

(5)網膜虚血再灌流モデルでの VEGF 発現量の検討:ELISA と RT-PCR を用いて網膜虚血再灌流モデルでの VEGF 発現を検討した。NE 阻害剤の効果も検討。

(6)網膜血管内皮への白血球接着と NE の関係:培養ヒト網膜血管内皮細胞(HREC)にヒト顆粒球を加え、接着力を測定する。NE 阻害剤を添加した時の接着力を比較する。

4. 研究成果

(1)ぶどう膜炎モデル、網膜虚血再灌流モデルでの組織障害の検討

ぶどう膜炎モデルはエンドトキシン誘発ぶどう膜炎(Endotoxin-induced uveitis, EIU)を用いた。Lewis ラット足蹠に LPS を注射することにより EIU モデルを作成した。炎症スコアおよび前房中のタンパク濃度、細胞数はいずれも 24 時間をピークとした。抗好中球エラスターゼ抗体を腹腔内および硝子体内に投与し、炎症の強さの変化を見た。LPS 注射後 24 時間での炎症のスコア(6 点満点)は EIU のみ起こした群で平均 4.8 だったのに対し抗好中球エラスターゼ抗体を硝子体内に投与した群では 3.6 に低下し、前房タンパク濃度は 38%減少した($P<0.01$)。網膜虚血再灌流モデルは S-D ラット視神経鞘を縫合糸で結紮し虚血とした後、1 時間後に開放して作成した。14 日後に眼球摘出し網膜の HE 染色標本を作製したところ、網膜虚血再灌流ラットでは網膜厚は著明に減少していた。抗好中球エラスターゼ抗体を硝子体内に投与すると網膜厚の減少は平均 31%抑制された。

(2)両モデルでの白血球動態に関する検討

(1)で作成したモデルに関して acridine orange

digital fluorography (AODF)を行い、白血球動態を記録した。EIU モデルでは LPS 注射後 24 時間の時点で網膜への白血球の集積が著明にみとめられた。抗好中球エラスターゼ抗体を硝子体内に投与した群では視野あたりの白血球数の平均値が EIU のみの群に比べて 15%減少していた。網膜虚血再灌流モデルにおいても再灌流後 24 時間での 1mm² あたりの白血球集積数は平均 823 から抗好中球エラスターゼ抗体を硝子体内に投与した群では 646 と 22%減少した。

(3) EIU モデルの網膜を回収し作成したフラットマウントにて免疫組織化学を用いて網膜血管内皮における ICAM-1 の発現を検討した。ICAM-1 の免疫染色性は投与後 24 時間で上昇しており、NE 阻害薬投与によって染色性の低下傾向は見られたが、有意な変化はみられなかった。網膜虚血再灌流モデル(SD ラット視神経結紮、1 時間後開放)に関しても同様の結果が得られた。

(4) 網膜虚血再灌流モデルにおける VEGF の発現と NE 阻害剤による抑制効果の検討
網膜虚血再灌流を起こしたラットから硝子体を採取し、ELISA を用いて硝子体中の VEGF 濃度を測定した。虚血再灌流後 24 時間で採取した硝子体中には VEGF 濃度の増加がみられた。いっぽう、NE 阻害剤を投与した虚血再灌流群では硝子体中の VEGF は 36%減少していた。また、同じときに採取した網膜から RNA を抽出し RT-PCR 法によって VEGF-A の mRNA を測定したところ、同様に虚血再灌流時には VEGF-A の mRNA には強い発現増加が見られたが、NE 阻害剤投与によって減少が見られた。

(5) 白血球の網膜血管内皮細胞に対する接着性に対する NE の役割に注目して研究を進めた。研究方法として培養ヒト網膜血管内皮細胞 (HREC) を用い、これをシート状に培養したのちに健常人から採取したヒト白血球を加え一定時間培養し、接着細胞を計測する方法を用いた。

培養中に高グルコース負荷を与えると、HREC に接着する白血球数は増加した。高グルコースに加え NE 阻害剤を添加したところ、わずかに接着数が減少したものの、有意差はなかった。以上の結果から HREC と白血球の接着性にはあまり NE が関与していない可能性が考えられた。NE による組織傷害を説明する一つの可能性として、HREC に対する NE の作用による HREC での細胞内活性酸素産生を検討した。培養 HREC に NE を添加したのち、HREC の細胞内活性酸素測定を行った。NE を添加した HREC では細胞内の活性酸素の上昇がみとめられた。白血球の網膜血管内皮細胞に対する接着性に対する NE の役割に注目して研究を進めた。研究方法として培養ヒト網膜血管内皮細胞 (HREC) を用い、これをシート状に培養したのちに健常人から採取したヒト白血球を加え一定時間培養し、接着細胞を計測する方法を用いた。培養中に高グルコース負荷を与えると、HREC に接着する白血球数は増加した。高グルコースに加え NE 阻害剤を添加したところ、わずかに接着数が減少したものの、有意差はなかった。以上の結果から HREC と白血球の接着性にはあまり NE が関与していない可能性が考えられた。NE による組織傷害を説明する一つの可能性として、HREC に対する NE の作用による HREC での細胞内活性酸素産生を検討した。培養 HREC に NE を添加したのち、HREC の細胞内活性酸素測定を行った。NE を添加した HREC では細胞内の活性酸素の上昇がみとめられた。

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 4 件)

① Ashikari M, Tokoro M, Itaya M, Nozaki M, Ogura Y. Suppression of laser-induced choroidal

neovascularization by nontargeted siRNA. Invest Ophthalmol Vis Sci.; 51(7): 3820-3824,2010. (査読あり)

②Hattori T, Matsubara A, Taniguchi K, Ogura Y. Aldose reductase inhibitor fidarestat attenuates leukocyte-endothelial interactions in experimental diabetic rat retina in vivo. Curr Eye Res.;35: 146-154,2010. (査読あり)

③Hirano Y, Sakurai E, Matsubara A, Ogura Y. Suppression of ICAM-1 in retinal and choroidal endothelial cells by plasmid small-interfering RNAs in vivo. Invest Ophthalmol Vis Sci. ;51: 508-515, 2010. (査読あり)

④Miyaki K, Matsubara A, Nishiwaki A, Tomida K, Morita H, Yoshida M, Ogura Y. Pitavastatin attenuates leukocyte-endothelial interactions induced by ischemia-reperfusion injury in the rat retina. Curr Eye Res.; 34: 10-17, 2009. (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

①Y. Hirano, A. Ito, M. Nozaki, Y. Ogura Pascal Laser Photocoagulation Induces Less Vegf Expression in Murine Retina Than Conventional Laser Treatment May 5, 2010 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida, USA

②Nagai, Y. Hirano, M. Yoshida, Y. Ogura. Incidence of the Complications After Intravitreal Injections May 5, 2010 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida, USA

③D. Ozone, Y. Hirano, J. Ueda, T. Yasukawa, M. Yoshida, Y. Ogura. Surgical Results of 25 Gauge Vitrectomy for Proliferative Diabetic Retinopathy May 3, 2010 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida, USA

④服部知明、松原明久、谷口香織、小椋祐一郎:糖尿病ラットにおける網膜白血球集積に対するアルドース還元酵素阻害薬の抑制効果.

第112回日本眼科学会総会 2008年4月18日、横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 宗徳 (YOSHIDA MUNENORI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号:60273447

(2)研究分担者

小椋 祐一郎 (OGURA YUICHIRO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号:70191963

櫻井 英二 (SAKURAI EIJI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号:30305528
(H20年度のみ)