

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09719

研究課題名（和文）網膜内に析出するフィブリノーゲンに着目した糖尿病黄斑浮腫の病態解明

研究課題名（英文）Research for the pathophysiological investigation of diabetic macular edema focusing on fibrinogen accumulation in the retina.

研究代表者

今井 尚徳 (Imai, Hisanori)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90569211

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、糖尿病黄斑浮腫の病態におけるフィブリノーゲン（Fb）の関与を検討することであった。我々は正常マウスの硝子体腔に高濃度Fbを投与し、網膜機能に与える影響を評価した。Western blotおよび免疫染色の結果、グリア細胞マーカー（GFAP）の発現は有意に亢進し、神経節細胞マーカー（TUBB3）の発現は有意に低下した。さらに網膜電図では各波形の振幅が低下し、網膜機能の低下が示唆された。これらの変化は抗ICAM-1抗体の投与で中和された。これらの結果から、高濃度Fbは網膜に傷害性を持ち、その作用はFb/ICAM-1細胞内シグナル伝達によって調整される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、糖尿病黄斑浮腫（DME）は既知の病態に対する各種治療を駆使した集学的治療によってある程度治療できるようになった。しかし、一定の割合で難治例が存在する。この結果は、未知の病態の存在を示唆する。本研究の目的は、浮腫内に滲出するフィブリノーゲン（Fb）と未知の病態との関連を解明することであった。これまで眼内Fb濃度に着目して病態解明を進める研究は国内外を通じて未だなく、独自性が高い。本研究結果は、DMEの発症・進展機序に新たな知見を与え、創薬の観点からも、学術的・臨床的に意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to investigate the involvement of fibrinogen (Fb) in the pathophysiology of diabetic macular edema. We administered high concentrations of Fb into the vitreous cavity of normal mice and evaluated its impact on retinal function. The results of Western blot and immunostaining showed that the expression of the glial cell marker (GFAP) was significantly upregulated, while the expression of the ganglion cell marker (TUBB3) was significantly downregulated. Furthermore, electroretinography indicated that the amplitude of each waveform decreased, suggesting a decline in retinal function. These changes were neutralized by the administration of an anti-ICAM-1 antibody. These findings suggest that high concentrations of Fb are injurious to the retina and that this effect may be modulated by Fb/ICAM-1 intracellular signaling.

研究分野：糖尿病網膜症

キーワード：フィブリノーゲン ICAM-1 糖尿病黄斑浮腫 糖尿病網膜症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症 (DR) は慢性高血糖に伴う代謝異常が引き起こす網膜組織における Neurovascular Unit (神経-血管-グリアのユニット) の障害である。糖尿病黄斑浮腫 (DME) は、DR による血管透過性亢進、血液網膜柵の破綻、毛細血管瘤の形成、そして網膜硝子体牽引の増悪の結果、血漿成分を中心とした細胞外液が網膜内に滲出することで発生する。最終的には、DME が遷延することで周囲網膜組織は徐々に萎縮し、視機能障害に至る。研究開始当初から現在も変わることなく、DME は、抗血管内皮増殖因子 (VEGF) 硝子体内注射、トリアムシノロン硝子体内もしくはテノン囊下注射、網膜光凝固、そして硝子体手術 (PPV) などの、既知の DME の病態に対する各種治療を駆使した集学的治療によってある程度治療できる。しかし、一定の割合でこれらの既存治療に抵抗する難治 DME が存在することにも変わりはない。この結果は、DME には未知の病態が未だ存在し、その解明は喫緊の課題であることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、難治 DME をターゲットに、DME 内に滲出する血漿成分がどのように病態に関与するのかを検討し、これまで未知であった DME の病態を解明することであった。特に DME 内フィブリノーゲン (Fb) が Neurovascular Unit 全体に及ぼす影響を中心課題として検討した。

3. 研究の方法

まず、Fb 高濃度負荷が、各種網膜細胞に与える影響について細胞実験を用いて検討した。具体的には、rMC-1 (ラット Müller 細胞株) および HMREC (ヒト網膜血管内皮細胞株) を培養し、Fb 高濃度負荷による細胞傷害性を MTT assay を用いて検討した。さらに、HMREC を用いた TransWell 実験を行い、下層への FITC 標識デキストランの漏出量を測定し、血管透過性についても検討した。次に、高濃度 Fb の生体における影響を検討するために、正常マウス硝子体腔に高濃度 Fb 投与し、網膜内各種蛋白発現変化 (TUBB3: 神経節細胞マーカー、GFAP: Müller 細胞マーカー、Iba-1: マイクログリアマーカー) について Western blot および免疫染色を用いて検討した。最終的に、マウス網膜機能への影響を網膜電図を測定し、検討した。

4. 研究成果

In vitro 実験において、MTT assay の結果、rMC-1 および HMREC に対する Fb 高濃度負荷によって、いずれの細胞においても、活性低下を確認し、高濃度 Fb の細胞傷害性を確認した。また、HMREC を用いた TransWell 実験において、下層への FITC 標識デキストランの漏出は、Fg 高濃度負荷によって有意に増加しており、高濃度 Fb 投与によって血管透過性が亢進することを示唆する結果を得た。

In vivo 実験において、10 週齢の C57BL-6J マウス硝子体腔に高濃度 Fb を投与した場合、Western blot および免疫染色の結果、GFAP、Iba-1 の発現は有意に亢進し、TUBB3 の発現は有意に低下する結果を得た。さらに高濃度 Fb 投与によって、網膜電図では各波形 (a 波、b 波、op 波、positive STR) の振幅が低下し、網膜機能の低下が示唆された。

Fb は ICAM-1 のリガンドでもあることから、上記の各実験において抗 ICAM-1 抗体を同時投与する群を設定しさらに詳細について検討した。その結果、In vitro 実験において、MTT assay にて確認された高濃度 Fb による rMC-1 および HMREC 活性低下は抗 ICAM-1 抗体投与によって中和される結果を得た。さらに、HMREC を用いた TransWell 実験において確認された下層への FITC 標識デキストランの漏出量増加も抗 ICAM-1 抗体投与によって中和される結果を得た。In vivo 実験においても、Western blot および免疫染色にて確認された GFAP (図 1)、Iba-1 (図 2) の発現亢進、そして TUBB3 (図 3) の発現低下も、抗 ICAM-1 抗体投与によって中和された。

図 1 Western blot: GFAP 発現変化

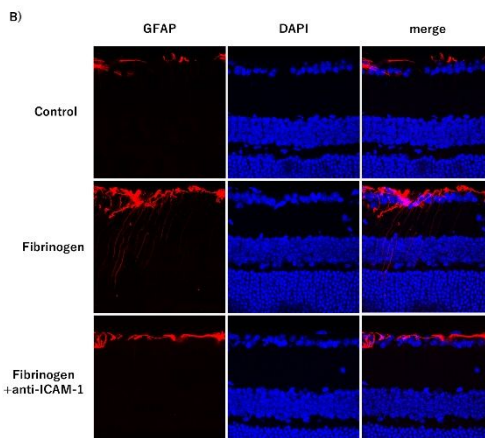


図 2 Western blot: Iba-1 発現変化

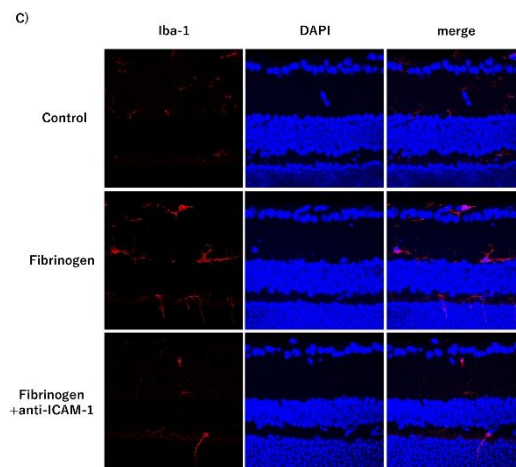
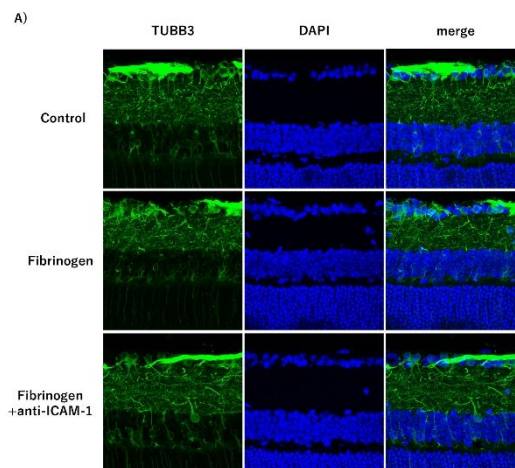
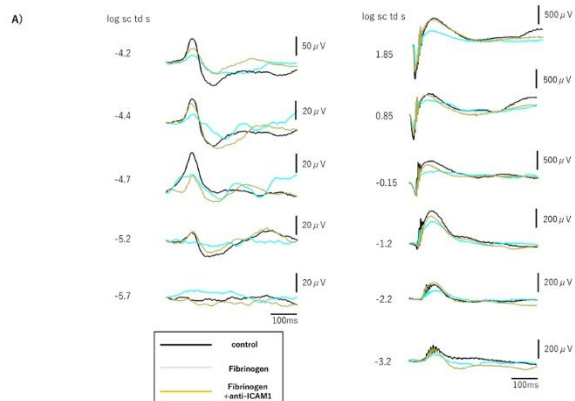


図 3 Western blot: TUBB3 発現変化



また、網膜電図において確認した各波形(a 波、b 波、op 波、positive STR)の振幅低下も、抗 ICAM-1 抗体投与によって中和された(図 4)。

図 4 網膜電図結果



これらの結果から、本研究において、高濃度 Fb は網膜傷害性に作用することが示唆された。さらに、Fb による網膜傷害は Fb/ICAM-1 細胞内シグナル伝達によって調整されている可能性も示唆された。今後、この Fb/ICAM-1 細胞内シグナル伝達について詳細をさらに検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Iwane Yukako, Imai Hisanori, Yamada Hiroko, Sotani Yasuyuki, Oishi Mariko, Nakamura Makoto	4. 巻 13
2. 論文標題 Removal of Subfoveal Massive Hard Exudates through an Intentional Macular Hole in Patients with Diabetic Maculopathy: A Report of Three Cases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Case Reports in Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 649 ~ 656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000526150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 岩根友佳子, 今井尚徳, 曾谷育之, 山田裕子, 大石麻利子, 中村誠	4. 巻 40
2. 論文標題 継続通院困難な糖尿病黄斑症患者に対して硝子体手術と黄斑部への外科的介入が奏効した1例	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 あたらしい眼科	6. 最初と最後の頁 95 ~ 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sugimoto Masahiko, Kondo Mineo, Yasuma Taro, D' Alessandro-Gabazza Corina N., Toda Masaaki, Imai Hisanori, Nakamura Makoto, Gabazza Esteban C.	4. 巻 11
2. 論文標題 Increased expression of Protein S in eyes with diabetic retinopathy and diabetic macular edema	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-89870-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Zolov Sergey N., Imai Hisanori, Losiewicz Mandy K., Singh Ravi S.J., Fort Patrice E., Gardner Thomas W.	4. 巻 296
2. 論文標題 Insulin-like growth factor-2 regulates basal retinal insulin receptor activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100712 ~ 100712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100712	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamada Hiroko, Imai Hisanori, Tetsumoto Akira, Hayashida Mayuka, Otsuka Keiko, Miki Akiko, Kusahara Sentaro, Nakamura Makoto	4. 巻 11
2. 論文標題 Cystotomy with or without fibrinogen clot removal for refractory cystoid macular edema secondary to branch retinal vein occlusion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-88149-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Maki Hitomi, Imai Hisanori, Yamada Hiroko, Tetsumoto Akira, Hayashida Mayuka, Otsuka Keiko, Miki Akiko, Nakamura Makoto	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 The long-term effect of cystotomy with fibrinogen clot removal for a cystoid macular edema secondary to idiopathic macular telangiectasia type 1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RETINAL Cases & Brief Reports	6. 最初と最後の頁 Ahead of Print
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ICB.0000000000001117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 今井尚徳
2. 発表標題 画像診断を利用した増殖糖尿病網膜症に対する硝子体手術
3. 学会等名 第61回日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井尚徳
2. 発表標題 抗VEGF治療に抵抗するDMEに対する嚢胞様腔内壁切開術・フィブリノーゲン塊摘出
3. 学会等名 第76回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hisanori Imai
2. 発表標題 The effect of cystotomy for treatment refractory diabetic macular edema
3. 学会等名 FUJIRETINA
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井尚徳
2. 発表標題 網膜血管病に続発する嚢胞様黄斑浮腫と組織内フィブリノーゲンの関連
3. 学会等名 第128回京都眼科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井尚徳
2. 発表標題 難治嚢胞様黄斑浮腫に対する嚢胞様腔内壁切開の長期成績
3. 学会等名 第44回日本眼科手術学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hisanori Imai
2. 発表標題 The effect of cystotomy for treatment refractory diabetic macular edema
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今井尚徳
2. 発表標題 難治糖尿病黄斑浮腫に対する外科治療
3. 学会等名 第75回日本臨床眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三木 明子 (Miki Akiko) (10726988)	神戸大学・医学部附属病院・助教 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------