

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20971

研究課題名（和文）メカニカルストレスが網膜に及ぼす影響の電気生理学および細胞生物学的検討

研究課題名（英文）Electrophysiological and cell biological analysis of the effect of mechanical stress for retina

研究代表者

野田 拓志（Noda, Hiroshi）

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：80909961

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：黄斑局所ERGにおいて、ERM眼は正常僚眼と比較してb波、OPsの振幅が有意に低下し、潜時が有意に延長した。またb波、OPsの振幅と最大網膜皺襞深度の間に有意な負の相関関係を認めた。最大網膜皺襞深度と内顆粒層の厚みは有意な正の相関関係を示し、外顆粒層+外網状層の厚みについては弱い正の相関関係を示した。

MIO-M1細胞およびrMC-1細胞に動的な伸展刺激を加えると、伸展と直交する方向に細胞形態が伸長して配列する形態変化を認めた。関連因子として伸展刺激によるalpha smooth muscle actinおよびtype 3 collagen、fibronectinの経時的な発現上昇を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性ERMでは網膜牽引力依存性に網膜内層における機能的・構造的な変化が生じている可能性が示唆された。分子生物学的な観点からも、ミュラー細胞が機械的刺激に対して何らかの応答をしていることが明らかとなり、臨床的な知見を支持する結果と考えられた。しかし、その詳細なメカニズムについては明らかとなっておらず、今後のさらなる研究によって網膜牽引を伴う黄斑疾患の病態が解明されれば、病態に基づいた手術適応基準の策定や新たな手術手技開発の基盤となる研究成果が得られると期待される。

研究成果の概要（英文）：Using focal macular ERG, the amplitude of b-waves and oscillatory potentials was lower and implicit time of these was longer in ERM eyes compared to the followed eyes. The maximum depth of retinal folds significantly correlated with the relative amplitudes of b-waves and oscillatory potentials and the mean INL thickness and ONL+OPL thickness.

MIO-M1 cells and rMC-1 cells got morphological change and extend vertically for dynamic stretch stimulation. As related factors, alpha smooth muscle actin, type 3 collagen and fibronectin appeared with stretch stimulation over time.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜 メカニカルストレス ミュラー細胞 電気生理学 細胞生物学

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 網膜にかかる牽引力を定量化する手法の開発

黄斑上膜 (Epiretinal membrane, ERM) は本邦で最も頻度の高い黄斑疾患である。ERM が網膜を牽引し、網膜の構造を障害することで、視力低下や歪視を来たすが、ERM による網膜の牽引 (= メカニカルストレス) が視機能を障害する機序の詳細は不明であった。最新の swept-source OCT を用いると、網膜を俯瞰的に捉えた en face 画像を高い解像度で構築する事ができ、ERM の牽引によって生じた網膜皺襞を可視化できる。申請者らは、弾性薄膜に対する圧縮応力と圧縮応力によって生じる皺襞の振幅が比例することに着目し、網膜皺襞の最大の深さ (最大網膜皺襞深度) を測定することで、網膜にかかる牽引力を定量評価できることを報告した (Hirano et al. Am J Ophthalmol, 2018、Hirano et al. Retina, 2019)。さらに、最大網膜皺襞深度が歪視の程度と相関することを明らかにした (Hirano et al. Retina, 2019)。

### (2) ミュラー細胞に対するメカニカルストレスと視機能

網膜の主要なグリア細胞であるミュラー細胞は網膜の構造を支える柱として機能する。そのため、網膜構造の変化の影響を受けやすい細胞であると考えられている。実際に、ミュラー細胞にメカニカルストレスを加えると、各種増殖因子や炎症性サイトカインの発現が亢進することが知られている。一方で、ERM 患者において、内顆粒層の厚みと歪視が関連することが知られている (Okamoto et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012)。そこで申請者は、内顆粒層を構成するミュラー細胞に対してメカニカルストレスが及ぼす影響を検討することで、歪視等の視機能障害の病態を明らかにできるのではないかと着想した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、最大網膜皺襞深度によって臨床的に推定されるメカニカルストレスとメカニカルストレスが網膜に及ぼす電気生理学的影響・構造的変化との関連を調べることと、培養ミュラー細胞に伸展刺激を与えることで引き起こされる変化を細胞生物学的に検討することである。

最大網膜皺襞深度の測定は、網膜にかかる牽引力を客観的かつ定量的に評価する手法である。また、網膜の機能的解析としての黄斑局所網膜電図 (ERG)・網膜の構造的解析としての網膜の各層厚の計測 (内顆粒層、外顆粒層+外網状層) 行うことは、黄斑の機能・構造的変化を客観的・定量的に評価するという点で科学的に精度の高い検討であるといえる。これらの客観的・定量的評価を組み合わせることで、臨床的に極めて有用な結果が得られることが期待された。

本研究ではさらに網膜の中でもメカニカルストレスを受容しやすいと考えられるミュラー細胞に着目し、培養ミュラー細胞を用いた細胞生物学的検討を行った。このように、本研究では臨床的に頻度が高く重篤な疾患を臓器・組織レベルから細胞・分子レベルまで重層的に検討することを目的としている。

本研究では、社会的要請の高い疾患について、科学的に質の高い手法や実験材料を用いて国際的に通用する研究を行うことを目標とした。網膜牽引が網膜や視機能を障害するメカニズムが明らかになり、その障害の治療や予防が可能になれば、患者の生活の質の向上に大きく貢献することになり、社会的意義は極めて大きいと考えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 臨床的に推定される網膜牽引力と黄斑機能との関連の電気生理学的検討

臨床的に手術適応となった ERM、硝子体黄斑牽引症候群、黄斑偽円孔、分層黄斑円孔などの黄斑疾患について、術前および術後 1 ヶ月、術後 6 ヶ月において、Swept-source OCT を用いて最大網膜皺襞深度を測定した。同時期に、黄斑局所 ERG を施行し、各波形成分 (a 波、b 波、律動様小波 (OPs)) の振幅・潜時の計測を行った。また、視力、歪視 (M-CHARTS) についても評価した。得られた結果から、網膜牽引力 (最大網膜皺襞深度) と黄斑機能 (黄斑局所 ERG) との関連、および視機能異常 (視力、M-CHARTS) との関連を調べた。

#### (2) 伸展刺激がミュラー細胞に及ぼす影響の細胞生物学的検討

培養ミュラー細胞 (MIO-M1 (ヒト) および rMC-1 (ラット)) をストレッチチャンパーで培養し、伸展刺激を与える。一定時間の伸展刺激後に細胞の形態変化を観察した。また、細胞が発現する各種因子の変動を定量 PCR およびウェスタンブロットにより評価した。さらに、牽引の時間、強度、種類 (静的牽引または周期的牽引) が前述の因子に及ぼす影響を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) 網膜牽引力と黄斑局所 ERG 所見、網膜層構造との関連

特に片眼性の ERM 症例については正常僚眼との間で黄斑局所 ERG の各波形成の比較、最大網膜皺襞深度と黄斑局所 ERG の各波形成成分との関係を解析した。また、片眼・両眼性を問わず特発性 ERM 症例について、最大網膜皺襞深度と内顆粒層および外顆粒層+外網状層の厚みとの関係を調べた。

その結果、ERM 眼は正常僚眼と比較して b 波、OPs の振幅が有意に低下し (それぞれ  $P = 0.012$ ,  $P = 0.001$ )、b 波、OPs の潜時が有意に延長した (それぞれ  $P = 0.021$ ,  $P = 0.002$ )。a 波については ERM 眼における振幅・潜時の有意な変化は認めなかった ( $P = 0.092$ ,  $P = 0.932$ )。

次に、ERM によって変化を生じた b 波、OPs について最大網膜皺襞深度との関係を解析したところ、b 波、OPs の振幅と最大網膜皺襞深度の間に有意な負の相関関係を認めた (それぞれ  $r = -0.657$ ,  $P = 0.015$ ,  $r = -0.569$ ,  $P = 0.042$ )。

また最大網膜皺襞深度と内顆粒層の厚みは有意な正の相関関係を示し、外顆粒層+外網状層の厚みについては弱い正の相関関係を示した (それぞれ  $r = 0.604$ ,  $P < 0.001$ ,  $r = 0.210$ ,  $P = 0.007$ )。以上の結果から、特発性 ERM では網膜牽引力依存性に網膜内層における機能的・構造的な変化が生じている可能性が示唆された。

#### (2) 伸展刺激がミュラー細胞に与える影響

MIO-M1 細胞および rMC-1 細胞に動的な伸展刺激 (20%、30Hz) を加えることで、伸展と直交する方向に細胞形態が伸長して配列する形態変化を認めた。静的伸展刺激ではこの変化は観察されなかった。

細胞骨格や細胞外マトリクスに変化が起きている可能性を考え、これらに関連する因子について調べた。その結果、伸展刺激による alpha smooth muscle actin および type 3 collagen の経時的な発現上昇を定量 PCR により、fibronectin の経時的な発現上昇をウェスタンブロットにより認めた。alpha smooth muscle actin および type 3 collagen については、5% 伸展よりも 20% 伸展した場合で有意に発現上昇しており、伸展強度依存性に発現が上昇する可能性が示唆された。さらに、これらの因子の発現変化に関わるシグナル伝達経路の候補として、MAPK 経路

や Rho/ROCK 経路などに関連する因子の評価を行った。しかし、再現性のある結果が得られず、機械ストレス応答に関連するシグナル伝達経路を見出すことはできなかった。

以上より、ミュー細胞が機械的刺激に対して何らかの応答をしていることが分子生物学的な観点からも明らかとなり、(1)で得られた臨床的な知見を支持する結果と考えられた。しかし、その詳細なメカニズムについては明らかとなっておらず、今後さらなる研究を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------