

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791956

研究課題名（和文） シェアストレスの網膜血管内皮機能に及ぼす影響

研究課題名（英文） Effect of shear stress on retinal vascular endothelial function

研究代表者

石羽澤 明弘 (ISHIBAZAWA AKIHIRO)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号：50516705

研究成果の概要（和文）：

血管内皮細胞には血流に起因するシェアストレスが作用し、これを介して血行動態の変化を捉え、細胞機能を変化させていると考えられている。我々はヒト網膜微小血管内皮細胞に層流のシェアストレスを負荷し、細胞の形態と機能的変化を検討し、網膜細動脈レベルの生理的に高いシェアストレスが、網膜血管内皮細胞に血管拡張的に働き、また抗血栓性の獲得にも寄与していることを報告した。また、我々は静脈～毛細血管レベルの低いシェアストレスの作用を検討し、接着分子や炎症性サイトカイン、凝固因子の遺伝子発現が増加することを報告した。この結果から、低いシェアストレスは網膜血管内皮細胞に炎症促進的に働き、主に静脈レベルでの白血球の接着など、病的循環障害における血管障害の一因となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The vascular endothelium responds to shear stress generated by blood flow and changes functions to regulate blood flow and maintain tissue homeostasis. We examined the effects of laminar shear stress on gene expression in human retinal microvascular endothelial cells (HRMECs) and found that long-term exposure to physiologic shear stress in the retinal arterioles up-regulated vasodilatory and antithrombotic gene expression in the HRMECs. Furthermore, we studied the effect of low shear stress especially in retinal venules and capillaries on proinflammatory gene expression in HRMECs, and showed that relatively low shear stress caused up-regulation of proinflammatory genes in HRMECs. Our results suggested that decreased shear stress due to vascular hypoperfusion might change the phenotypic characterization of the retinal vascular endothelium and be associated with leukocyte-endothelial interactions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：シェアストレス、網膜血管内皮、網膜血流

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症や網膜静脈閉塞をはじめとする網膜循環障害疾患は、成人中途失明の主因であり、その病態解明と発症予防、治療法の確立は急務である。近年、この網膜循環障害

の病態を解明する上で、血管内皮細胞の重要性が注目されている。この内皮細胞には血流に起因する力学的応力であるシェアストレス（ずり応力）が作用している。血管内皮細胞は恒常的にこのシェアストレスにさらさ

れており、これを介して血行動態の変化を捉え、細胞機能を変化させ循環を調節していると考えられている。近年我々は、レーザードップラー眼底血流計を用いて、非侵襲的に網膜血管のシェアストレスを初めて定量的に評価する方法を開発し、網膜細動脈第一分岐で約 60 dyne/cm² (収縮期約 100 dyne/cm²、拡張期約 30 dyne/cm²) と、網膜血管には大動脈 (15 dyne/cm² 程度) など他の臓器の血管よりも高いシェアストレスがかかっていることを初めて明らかにした (2006, IOVS)。また網膜症発症前、早期の網膜症を有する 2 型糖尿病患者では、健常者と比較し網膜血流量が有意に減少し、シェアストレスの指標であるずり速度が低下していることも明らかにしてきた (2010, IOVS)。しかし、網膜循環障害においてシェアストレスが網膜血管内皮機能にどの様に影響するかは未解明であった。

2. 研究の目的

生体では絶えず血管内皮細胞はシェアストレスを受け続けているが、これまでは網膜血管内皮細胞を用いた研究では血流によるシェアストレスの影響は一切考慮されておらず、シェアストレス負荷でより生体に近い条件で実験を行うことにより将来的な生体実験や臨床研究につながる新たな知見が得られることが期待される。流体力学的に設計された流れ負荷装置を用いて、培養ヒト網膜微小血管内皮細胞にシェアストレスを段階的に負荷し、内皮細胞の形態変化と機能変化を検討することにより、眼循環障害の病態を解明、その予防、治療への道筋を拓くことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

実験にはヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMECs) を用いた。培養液には 15%ウシ胎児血清を含む M199 培地を用い、37°C、5% CO₂ 下で培養した。その後、細胞密度 2.0 x 10⁴ /cm² でガラス板 (1%ゼラチンコーティングされたもの) に播種し、confluent になるまで培養のうえ、以下の実験に用いた。

(2) シェアストレス負荷

流体力学的に設計された平行平板型流れ負荷装置を用いた (図 1)。この装置では、0.2 cm 離して平行に並べた 2 枚の平板の間を培養液が灌流するチャンバー構造を作製し、アクリル板に対向して、0.2 cm のテフロンガasket を挟み、細胞が培養されたガラス板を設

置した。チャンバーの入口、出口をシリコンチューブと連結、ローラー・チューブポンプで送液し、リザーバーの培養液を灌流した。培養液は細胞の上を流れて、層流のシェアストレスが作用する。シェアストレスは以下の式で計算した。

$$\textcircled{1} \text{ ずり速度 } (\gamma, 1/\text{秒}): \quad \gamma = 6Q / (a^2b)$$

[Q : 流速 (ml/秒) , $a \cdot b$: チャンバーの高さと幅 (cm)]

$$\textcircled{2} \text{ シェアストレス } (\tau, \text{dyne/cm}^2):$$

$$\tau = \mu \cdot \gamma \quad [\mu: \text{粘性 (poise)}]$$

灌流する培養液には M199 培地と、5%デキストラン (分子量 148,000) を含む M199 培地 (粘性約 4 倍) の 2 種類を用い、粘性 (μ) と流速 (Q) を変化させて、様々な程度のシェアストレスを負荷した。

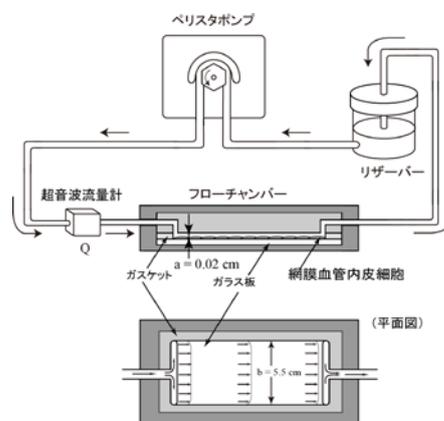


図 1: 平行平板型流れ負荷装置

(3) 内皮細胞形態変化の評価

シェアストレス負荷後、チャンバーからガラス板を取り出し、倒立顕微鏡でガラス板の任意の場所の細胞形態を観察した。流れによる細胞伸展の定量化のため、内皮細胞の長軸長/短軸長から、aspect ratio を求めた。また細胞配向の定量化のため、内皮細胞の長軸と流れのなす角、angle difference を求めた。

(4) 遺伝子発現解析 (リアルタイム RT-PCR)

細胞を回収し、全 RNA を抽出し、相補的 DNA へ逆転写 (RT) した。RT 反応後、リアルタイム PCR 装置を用いて、核酸染色試薬 SYBR Green による PCR 法で各遺伝子発現量の相対的コピー比を求め、シェアストレス負荷サンプルと静的コントロールサンプルとを比較した。

(5) 統計学的処理

シェアストレス負荷群と静的コントロール群との間で、分散分析 (one-way ANOVA)

後、Bonferroni 法で多重比較を行った。危険率 5%未満を統計学的有意とした。

4. 研究成果

(1) シェアストレス負荷による HRMECs の形態変化

静的状態では内皮細胞は多角形で無作為な敷石状に配列していた。シェアストレス負荷により、内皮細胞は 15 dyne/cm² まではシェアストレス依存的に紡錘形に伸展し、流れと平行に配向を示した。aspect ratio は 15 dyne/cm² まで増加し、angle difference も 15 dyne/cm² まで減少したが、30 dyne/cm² 以上では 15 dyne/cm² と同等の変化であった。60 dyne/cm² 負荷での時間的变化は 6 時間以上で有意な細胞の伸展と配向を認めた (図 2)。このような形態は、生体内での網膜細動脈内皮の形態に極めて類似しており、培養網膜血管内皮細胞はシェアストレス負荷により、より生体内に近い形態へ変化することが明らかとなった。

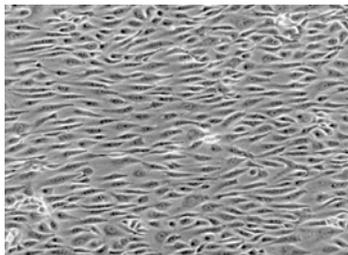


図 2 : 60 dyne/cm² を 24 時間負荷した後の HRMECs の形態変化

(2) シェアストレスによる各遺伝子の発現変化

0 から 100 dyne/cm² までのシェアストレスを 24 時間負荷した。内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) mRNA 発現はシェアストレスの大きさに依存して増加し、60 dyne/cm² でほぼ飽和した (図 3A)。一方でエンドセリン-1 (ET-1) mRNA の発現は、低いシェアストレス (1.5 dyne/cm²) で有意に増加し、30 dyne/cm² 以上で有意に減少した (図 3B)。トロポモジュリン (TM) mRNA 発現は 15 dyne/cm² 以上で有意に増加し、100 dyne/cm² まで直線的に増加した (図 3C)。また、網膜細動脈レベルのシェアストレス、60 dyne/cm² を 0 から 48 時間負荷すると、eNOS mRNA、TM mRNA は 6 時間以降で有意に増加し、24 時間負荷で最大となった。一方 ET-1 mRNA は 6 時間以降で有意に減少し、48 時間で静的状態 (0 時間) の 10%以下まで減少した。

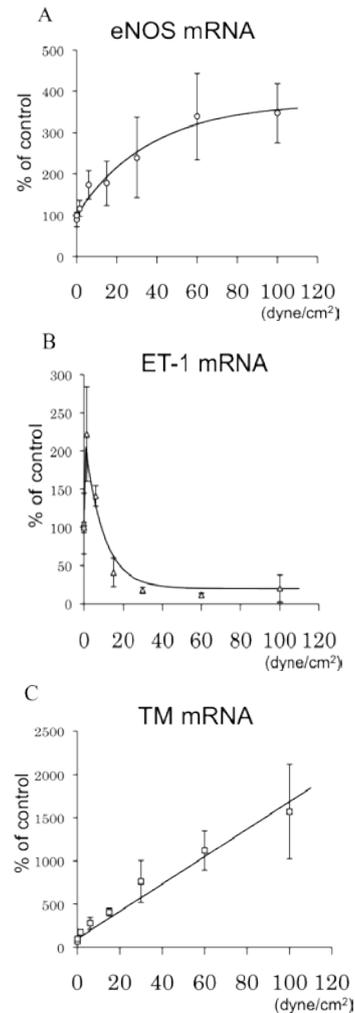


図 3: シェアストレスによる HRMECs の遺伝子発現変化

本研究において、血管拡張物質である一酸化窒素 (NO) の合成酵素 eNOS の mRNA の発現はシェアストレスの増加とともに増加し、網膜細動脈レベルのシェアストレス (60 dyne/cm²) でほぼ飽和した。NO は網膜細動脈の基礎緊張に関与しており、この結果から網膜細動脈において内皮細胞は、生理的状态で eNOS を高いレベルで発現し、NO を産生していることが推測された。

また強力な血管収縮物質である、ET-1 の mRNA は、高いシェアストレスでは著明に抑制され、網膜血管の生理的状态では ET-1 は最小限の発現に抑えられていることが推測された。一方で ET-1 mRNA は低いシェアストレスでは発現が増加しており、これは網膜血管の低灌流などでシェアストレスが低下した際に、内皮細胞が血管を収縮させて、至適なシェアストレスを維持しようとする反応の一端であると推測された。

血管内皮細胞膜に発現する TM は血管局所における抗血栓性物質であり、本研究の結果、TM mRNA はシェアストレスの増加に伴い、直

線的に増加した。網膜は終末動脈構造であり、血栓による血管閉塞は即ちその支配領域の無灌流を意味する。この結果から、網膜血管内皮は高いシェアストレスのもとに TM を発現し、血管表面の抗血栓性を高めている可能性が示唆された。

以上の結果から、網膜細動脈レベルのシェアストレスは、網膜血管内皮に血管拡張的に働き、かつ抗血栓性の獲得に寄与していると考えられた。

(3) 病的に低いシェアストレスでの遺伝子発現変化

静脈～毛細血管レベルの低いシェアストレス、特に静脈～毛細血管における血流低下による低灌流時の網膜血管内皮への作用を検討した。具体的には、0、1.5、15 dyne/cm²のシェアストレスをHRMECsに負荷し、特に炎症に関わる遺伝子の発現を検討した。

静的状態の0 dyne/cm²、または15 dyne/cm²の比較的高いシェアストレスを負荷した群と比較し、1.5 dyne/cm²の低いシェアストレスを負荷した群では、接着分子(ICAM-1、VCAM-1、E-selectin)、炎症性サイトカイン(IL-6、IL-8、MCP-1、PDGFなど)や凝固因子(組織因子やPAI-1など)の遺伝子発現が増加した。この結果から、低いシェアストレスは網膜血管内皮細胞に炎症促進的に働き、主に静脈レベルでの白血球の接着など、病的循環障害における血管障害の一因となっている可能性が示唆された。

これらシェアストレスによる網膜血管内皮細胞の機能変化が、糖尿病網膜症や網膜静脈分枝閉塞症など網膜循環障害疾患の発症、伸展にどのように関わるか、今後この実験系は、これらの病態の解明と治療法の開発に貢献できる可能性が考えられる。

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7件)

(1) Ishibazawa A, Nagaoka T 1番目 他5名 Effects of shear stress on the gene expressions of endothelial nitric oxide synthase, endothelin-1, and thrombomodulin in human retinal microvascular endothelial cells. Investigative Ophthalmology & Visual Science 査読あり 52(11), 8496-8504, 2011, doi: 10.1167/iovs.11-7686.

(2) Aoki T, Ishibazawa A 9番目 他13名 PGE2-EP2 receptor signaling in endothelium is activated by hemodynamic stress and induces cerebral aneurysm through an amplifying loop via NF- κ B. British Journal of Pharmacology 査読あり 163, 1237-1249, 2011, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01358.x.

(3) 吉田晃敏、石羽澤明弘 8番目 他31名 第116回 日本眼科学会総会 特別講演II 網膜の微細な形態・機能解析への挑戦とその輝かしい未来 日眼会誌. 査読無し 117(3), 212-245, 2013

(4) Sogawa K, Ishibazawa A, 7番目 他7名 Association between diabetic retinopathy and flow-mediated vasodilation in type 2 DM. Current Eye Research 査読あり 37(5), 446-451, 2012, doi: 10.3109/02713683.2012.654883

(5) Sogawa K, Ishibazawa A, 6番目 他5名 Relationship between choroidal thickness and choroidal circulation in healthy young subjects. American Journal of Ophthalmology 査読あり 153(6), 1129-1132, 2012, doi: 10.1016/j.ajo.2011.11.005.

(6) Tanano I, Ishibazawa A 4番目 他4名 Dilation of porcine retinal arterioles to cilostazol: roles of eNOS phosphorylation via cAMP/protein kinase A and AMP-activated protein kinase and potassium channels. 査読あり 54(2), 1443-1444, 2013, doi: 10.1167/iovs.12-10115.

(7) Tanano I, Ishibazawa A, 7番目 他6名 Impaired Systemic Vascular Endothelial Function in Patients with Branch Retinal Vein Occlusion. Current Eye Research 査読あり 38(1), 114-118, 2013, doi: 10.3109/02713683.2012.738460.

[学会発表] (計2件)

(1) Akihiro Ishibazawa, **Low Shear Stress Up-Regulates Pro-Inflammatory Gene Expression in Human Retinal Microvascular Endothelial Cells**, ARVO2012, 2012年05月08日, アメリカ合衆国・フロリダ州フォートローダーデール市

(2) Akihiro Ishibazawa, **Role of Shear Stress On Gene Expression of eNOS, ET-1, and Thrombomodulin in Retinal Microvascular Endothelium**,
ISER2012, 2012年07月23日, ドイツ・ベルリン市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石羽澤 明弘 (ISHIBAZAWA AKIHIRO)
旭川医科大学・大学病院・医員
研究者番号：50516705

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：