

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861608

研究課題名(和文) シェアストレスの血液網膜関門へ及ぼす作用の解明

研究課題名(英文) Effect of shear stress on blood retinal barrier

研究代表者

石羽澤 明弘 (ISHIBAZAWA, Akihiro)

旭川医科大学・大学病院・その他

研究者番号：50516705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

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、細胞機能を変化させている。我々はヒト網膜微小血管内皮細胞に、血流低下時の低いシェアストレスを負荷し、炎症分子の遺伝子発現が増加することを報告した。一方で、眼循環における生理的に高いシェアストレスは、タイトジャンクション蛋白の発現を増加させ、内側血液網膜関門の維持への関与を示唆する結果を得た。また、臨床研究において、糖尿病黄斑浮腫を有する患者の内皮機能の低下、糖尿病黄斑浮腫の光干渉断層計(OCT)での形態と腎機能の関連性、糖尿病透析患者における脈絡膜血管障害を報告した。

研究成果の概要(英文)：Vascular endothelium responds to shear stress generated by blood flow and changes their functions. We examined the effect of 'low' shear stress especially in retinal low perfusion, and reported that low shear stress caused up-regulation of proinflammatory genes in human retinal microvascular endothelial cells (HRMECs). Moreover we also showed that relatively high shear stress in physiological retinal circulation increased the expression of ZO-1, which is the tight-junction protein, compared to the relative low shear stress and static condition in HRMECs. On the other hand, we performed several clinical studies about the pathogenesis of diabetic macular edema (DME), and demonstrated that endothelial dysfunction was observed in the patients with DME, and the DME with serous retinal detachment was correlated with chronic kidney disease. Choroidal vascular disorder was also observed in diabetic patients receiving hemodialysis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：シェアストレス 網膜血管内皮 網膜血流 糖尿病網膜症 糖尿病黄斑浮腫

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血管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。これまで我々は、血流により網膜血管内皮に作用する物理的的刺激であるシェアストレス（ずり応力）に注目し、網膜血管には生理的状态において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)、一方で、我々は培養ヒト網膜血管内皮細胞にシェアストレスを負荷する実験系を確立した。この実験系で、網膜血管内皮細胞はシェアストレスに反応してその形態と機能を変化させることを示し、特に生理的に高い網膜血管のシェアストレスは、血管拡張性、抗血栓活性に働いていることを明らかにしてきた(2011, IOVS)。

そこで我々は、次なる課題として、網膜血管内皮における内側血液網膜関門を形成する閉鎖帯 (tight junction : TJ) に注目した。網膜血管内皮は脳血管と同様に、他臓器とは区別される強固な TJ が存在し、嚴重なバリアを形成している。しかし、糖尿病網膜症では、血管内皮増殖因子 (VEGF) など血管透過性因子の影響を受け、TJ は減弱し、網膜浮腫へと繋がる。特に黄斑浮腫は視力予後に直結する重篤な病態である。これまでのヒト臍帯静脈内皮細胞などを用いた研究から、TJ はシェアストレスによる制御も受けることが示唆されているが、網膜血管内皮の極めて重要な特徴である内側血液網膜関門を形成する TJ が、シェアストレスによってどのような影響を受けているのか、詳しい検討はなされていなかった。

2. 研究の目的

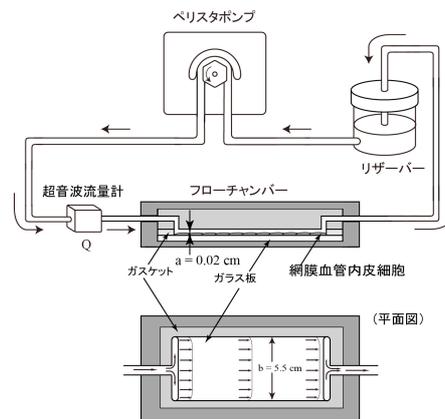
生理的に高い網膜血管のシェアストレスは TJ をより強固にしていると予想され、一方で糖尿病網膜症などの循環障害疾患におけるシェアストレスの低下が、TJ 機能障害に関与している可能性も考えられる。従来の網膜血管内皮細胞を用いた TJ の研究では、血流によるシェアストレスの影響は一切考慮されておらず、シェアストレス負荷でより生体に近い状態の TJ 機能変化を捉えることにより、将来的な生体実験や臨床研究に繋がる新たな知見が得られることが期待される。眼循環研究として、網膜血管内皮のバリア機能に全く新しい側面からアプローチできるこのシェアストレス負荷実験系を用い、TJ とシェアストレスの関連性を解明し、糖尿病黄斑浮腫などでの血管透過性亢進を抑える治療への道筋を拓くことを目的とする。更に、眼科臨床医として、糖尿病黄斑浮腫の病態へ関連する因子の検討、すなわち内皮機

能や腎機能などとの関連性も臨床研究にて明らかにし、糖尿病黄斑浮腫の病態解明と治療へ、基礎と臨床の双方からアプローチする。

3. 研究の方法

(1) シェアストレスによる網膜血管内皮の細胞機能への影響の検証

東京大学医学部医用生体工学システム生理学教室において流体力学的に設計され、研究実績のある平行平板型流れ負荷装置を用いて検証する。具体的には、初代ヒト網膜血管内皮細胞をスライドガラス表面に培養し、ペリスタポンプを用いて定常的な層流によるシェアストレスを細胞に負荷する (下図)。



ポンプの出力、流れる灌流液 (培養液) の粘度を変化させることで、シェアストレスを様々な強度で再現することができる。流れ負荷後の細胞を回収し、RNA・タンパクを精製する。また、小型のチャンバーを用いることで、スライドガラスに培養した細胞を直接免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察することができ、TJ 形成の変化などを形態的に描出することが可能である。

(2) 臨床研究

① 糖尿病黄斑浮腫 (DME) と内皮機能の検討
上記の in vitro の研究と並行し、臨床研究として、糖尿病網膜症を有する患者における、DME の有無での内皮機能を比較する。シェアストレスに対する内皮を介した血管拡張反応である、上腕動脈における血流依存性拡張 (Flow-mediated dilation: FMD) を糖尿病網膜症患者で測定し、DME の有無での内皮機能の差異を比較した。

② 糖尿病黄斑浮腫 (DME) の増悪因子の検討
DME を有する患者における採血、検尿データ、特に腎機能障害、蛋白尿の出現 (慢性腎臓病: CKD) と黄斑浮腫の光干渉断層計 (OCT) における形態の関係性を検討した。また脈絡膜血管障害の糖尿病網膜症への関与を検討するため、透析患者において透析前後での脈絡膜

厚を OCT にて測定し、糖尿病透析患者と非糖尿病透析患者の差異を比較した。

③ OCT angiography を用いた糖尿病網膜症における網膜毛細血管障害の検討
造影剤を用いずに網脈絡膜の微小循環を描出できる OCT angiography を平成 26 年よりいち早く導入し、糖尿病網膜症における網膜毛細血管網の障害を詳細に検討した。

4. 研究成果

(1) まず我々は、血流低下による低灌流時の低いシェアストレス、特に静脈～毛細血管レベルにおける網膜血管内皮への作用を検討した。具体的には、0(static)、1.5(Low flow)、15 dyne/cm²(High flow)のシェアストレスをヒト網膜微小血管内皮細胞に負荷し、特に炎症に関わる遺伝子の発現を検討した。

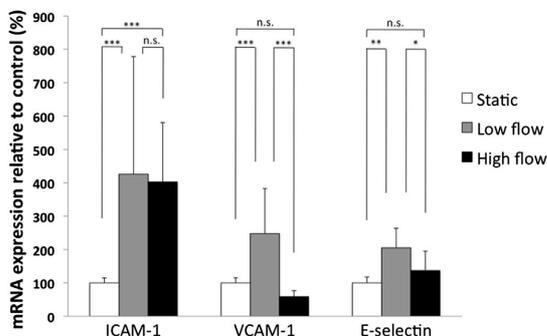
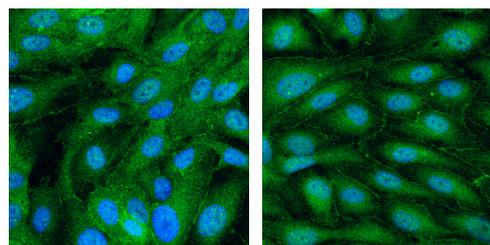


図1 シェアストレス負荷による接着分子の発現変化

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)の遺伝子発現が増加した(図1)、また、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)の遺伝子発現も増加した。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。本研究成果はExperimental Eye Researchに掲載された。

次に、シェアストレスによる網膜血管内皮細胞における TJ 形成への影響を検証した。小型チャンバーにヒト網膜微小血管内皮細胞を培養し、0、1.5、15 dyne/cm²のシェアストレスを24時間負荷した。TJ 蛋白である Z0-1 の免疫染色では、0、1.5 dyne/cm²と比較し、15 dyne/cm²では流れの方向に配向するとともに、Z0-1 の細胞間の発現が増加した(図2)。網膜血管における生理的に高いシェアストレスは、内側網膜血液関門における強固な TJ 形成に関与している可能性が示唆された。本

研究は引き続き詳細な検討を続けていく。



0 dyne/cm² (Static) 15 dyne/cm² (High flow)

図2 シェアストレス負荷による Z0-1 の発現変化

(2)糖尿病網膜症の病態の検討(臨床研究)
基礎研究と並行し、眼科臨床医として、糖尿病網膜症の病態にせまる臨床研究を以下の通り多数報告した。

①糖尿病黄斑浮腫(DME)と内皮機能の検討
糖尿病網膜症患者において、シェアストレスに対する内皮を介した血管拡張反応である、上腕動脈における血流依存性拡張(FMD)を測定し、DMEの有無での内皮機能の差異を比較した(図3)。DMEを有する患者では有意に(p<0.01)FMDが低く、DMEのない網膜症患者に比較し、内皮機能の低下が示唆された。本研究の成果は研究協力者である高橋賢伍医師がARVO2013で報告した。

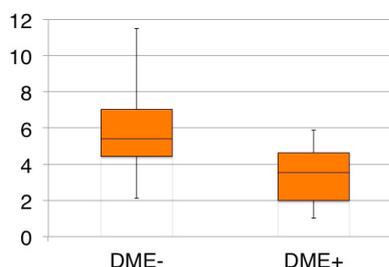


図3 糖尿病黄斑浮腫(DME)の有無でのFMDの比較

②糖尿病黄斑浮腫(DME)の増悪因子の検討
我々は臨床症例で、治療抵抗性であったDMEが、腎移植または透析導入により眼科的には無治療で改善することを報告した(2013年糖尿病眼学会、あたらしい眼科に掲載)。糖尿病性腎症による慢性腎臓病(CKD)は、全身性の溢水をもたらす、DMEの発症にも影響していることが予想されたため、CKDの有無と光干渉断層計(OCT)によるDME形態の関係性を検討した。CKD(+)群ではDMEにおける漿液性網膜剥離(SRD)の発現頻度が有意に高い(p<0.01)ことが明らかとなった。(図4)。



図4 CKDの有無でのDMEの形態の差異

本研究の成果は ARVO2013 にて報告した。これらの結果から、CKD による全身の溢水は、SRD に関与し、網膜下浸出液の原因は脈絡膜にあることが予想された。そこで、脈絡膜の糖尿病網膜症への関与を検討するため、透析患者において透析前後での脈絡膜厚を OCT にて測定し、糖尿病透析患者 (DM) と非糖尿病透析患者 (NDM) の差異を比較した。透析施行後、脈絡膜厚は全例で減少し、DM 群で NDM 群よりも減少率が有意に大きい ($p < 0.01$) ことが明らかとなった (図 5)。この結果は、糖尿病における脈絡膜血管障害を示唆するものであり、糖尿病脈絡膜症による差異を見ていると考えられた。本研究成果は、2014 年日本眼科学会総会、ARVO2014 にて報告した。(ARVO2014 では Travel Grant を獲得した。)

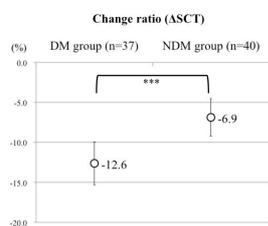


図 5 透析前後の脈絡膜厚変化率の比較

③OCT angiography を用いた糖尿病網膜症における網膜毛細血管障害の検討
造影剤を用いずに網脈絡膜の微小循環を描出できる OCT angiography を平成 26 年よりいち早く導入し、糖尿病網膜症における網膜毛細血管網の障害を詳細に検討した。OCT angiography により糖尿病網膜症の初期変化である毛細血管瘤は、毛細血管の囊状、紡錘状拡張として描出され、蛍光眼底造影検査と同程度の描出率 (93%) であった。網膜新生血管は造影剤の漏出が無いため、鮮明にその微細な異常血管構築を描出することが可能であった (図 6)。本研究の成果は、網膜硝子体学会 2014 (モーニングセミナー)、糖尿病眼学会、ARVO2015 にて報告し、American Journal of Ophthalmology に掲載され、掲載号の表紙を飾った。



図 6 視神経乳頭上の新生血管の OCT angiography

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 9 件)

① Ishibazawa A (1 番目) 他 7 名
Optical Coherence Tomography Angiography in Diabetic Retinopathy: A Prospective Pilot Study. American Journal of Ophthalmology (査読あり) 160(1), 35-44, 2015, DOI: 10.1016/j.ajo.2015.04.021

② 石羽澤明弘 (1 番目) 他 5 名
腎移植または血液透析導入を契機に糖尿病黄斑浮腫が改善した 5 症例. あたらしい眼科 (査読あり) 32(2), 279-285, 2015

③ Ishibazawa A (1 番目) 他 4 名
Recurrent Vogt-Koyanagi-Harada disease with sensorineural hearing loss and choroidal thickening. International Ophthalmology (査読あり) 34(3), 679-684, 2014, DOI: 10.1007/s10792-013-9849-9

④ Ono S, Ishibazawa A (7 番目) 他 6 名
Beraprost Sodium, a Stable Prostacyclin Analogue, Elicits Dilatation of Isolated Porcine Retinal Arterioles: Roles of eNOS and Potassium Channels. Investigative Ophthalmology & Visual Science (査読あり) 55(9), 5752-5759, 2014, DOI: 10.1167/iovs.14-14902

⑤ Utsunomiya T, Ishibazawa A (4 番目) 他 4 名
The wound healing process after corneal stromal thinning observed with anterior segment optical coherence tomography. Cornea (査読あり) 33(10), 1056-1060, 2014, DOI: 10.1097/ICO.0000000000000223

⑥ Ishibazawa A (1 番目) 他 3 名
Low shear stress up-regulation of proinflammatory gene expression in human retinal microvascular endothelial cells. Experimental Eye Research (査読あり) 116, 308-311, 2013, DOI: 10.1016/j.exer.2013.10.001

⑦ Shimouchi A, Ishibazawa A (4 番目) 他 3 名
Vitreomacular interface in patients with familial exudative vitreoretinopathy. International Ophthalmology (査読あり) 33(6), 711-715, 2013, DOI: 10.1007/s10792-012-9707-1

⑧ 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

⑨ Tanano I, Ishibazawa A (4 番目) 他 5 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. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* (査読あり) 54(2), 1443-1449, 2013, DOI: 10.1167/iovs.12-10115

[学会発表] (計 14 件)

- ① 石羽澤 明弘、糖尿病網膜症診療における OCT angiography の有用性の検討、第 20 回日本糖尿病眼学会、2015 年 3 月 7 日、東京
- ② 石羽澤 明弘、OCT アンジオグラフィーを用いた糖尿病網膜症診療、名寄眼科講演会、2015 年 3 月 26 日、名寄
- ③ 石羽澤 明弘、腎機能障害を伴った糖尿病黄斑浮腫症例の検討。第 6 回北海道若手糖尿病研究会、2015 年 1 月 24 日、旭川
- ④ 石羽澤 明弘、OCT angiography を用いた糖尿病網膜症診療、第 53 回日本網膜硝子体学会総会・第 31 回日本眼循環学会 合同学会 (モーニングセミナー6)、2014 年 11 月 30 日、大阪
- ⑤ 石羽澤 明弘、腎機能障害を伴った遷延性糖尿病黄斑浮腫の 1 症例、第 7 回北海道眼科医会 臨床懇話会、2014 年 5 月 17 日、札幌
- ⑥ Ishibazawa A. Assessment of choroidal thickness before and after hemodialysis in patients with and without diabetes. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)*, Orlando, 2014. 5. 5, USA
- ⑦ 石羽澤 明弘、糖尿病透析患者と非糖尿病透析患者における透析前後の脈絡膜厚変化の比較、第 118 回日本眼科学会総会 (WOC 2014, APAO 2014 合同開催)、2014 年 4 月 5 日、東京
- ⑧ 石羽澤 明弘、2 型糖尿病患者における糖尿病黄斑浮腫と慢性腎臓病の関連性、第 28 回日本糖尿病合併症学会、2013 年 9 月 13 日、旭川
- ⑨ 高橋 賢伍、石羽澤 明弘、糖尿病黄斑浮腫患者における血管内皮機能障害の検討、第 28 回日本糖尿病合併症学会、2013 年 9 月 13 日、旭川
- ⑩ 石羽澤 明弘、腎移植または血液透析導入を契機に糖尿病黄斑浮腫が改善した 5 症例、第 19 回日本糖尿病眼学会総会、2013 年 8 月 23 日、神戸
- ⑪ 高橋 賢伍、石羽澤 明弘、糖尿病黄斑浮腫における血管内皮機能の検討、第 19 回日本糖尿病眼学会総会、2013 年 8 月 23 日、神戸

⑫ 石羽澤 明弘、感音性難聴と脈絡膜厚の増加で再燃した Vogt-小柳-原田病の 1 症例、フォーサム 2013 大阪 (眼炎症学会)、2013 年 7 月 13 日、大阪

⑬ Ishibazawa A. Association between Diabetic Macular Edema and Chronic Kidney Disease in Patients with Type 2 Diabetes. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)*, Seattle, 2013. 5. 5-9, USA

⑭ Takahashi K, Ishibazawa A. Impaired Vascular Endothelial Function in Patients with Diabetic Macular Edema. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)*, Seattle, 2013. 5. 5-9, USA

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