

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17572

研究課題名(和文) 網膜循環における網膜血管内皮細胞の新たな重要性をトロンピンを用いて検討

研究課題名(英文) Examination of the new importance of retinal vascular endothelial cells in retinal circulation using thrombin

研究代表者

高橋 賢伍 (Takahashi, Kengo)

旭川医科大学・大学病院・助教

研究者番号：40646064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：トロンピンは血管外からの投与では収縮反応が起こるが、血管内からの投与では起こらないことが分かった。これは、トロンピンの分子量は33.6kDaと大きいため、血液網膜関門が1kDa以上の分子量の物質を通さないという過去の報告に裏付けられる。その結果、血管内からの投与では、平滑筋に作用できず、血管収縮反応は起こらないと考えられた。これらの結果から、当初の計画にあった糖尿病網膜症よりも、血液が血管より漏れ、血管外から作用しうる網膜静脈分枝閉塞症(BRVO)の血流データを収集し、BRVOにおける網膜静脈血流低下には血管径の変化が関与していること、また、血管径の変化が最高矯正視力と関与が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トロンピンは血液網膜関門を通過できず、血管内からは平滑筋に作用できないが、血液が血管より漏れ、血管外から作用しうる網膜静脈分枝閉塞症(BRVO)のような疾患に移おいては、網膜血管を収縮させ血流を悪くする可能性があるが、BRVOの血流データを収集したところ、網膜静脈血流は低下しており、その低下には血管径が細くなっていることが関与していることが分かったが、一方で、網膜静脈の血管径が小さい方が最高矯正視力が良いことがわかった。このことから、BRVOのより良い治療を行うためには網膜静脈径の変化に伴う、網膜静脈組織の構造変化へアプローチすることが重要であることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：It was found that thrombin causes vasoconstriction when administered from the outside of the retinal vessel, but not when administered from the inside of the retinal vessel. This is supported by the previous report that the blood-retinal barrier does not allow passage of substances with a molecular weight above 1 kDa because thrombin has a large molecular weight of 33.6 kDa. As a result, it was considered that intravascular administration failed to act on smooth muscle and vasoconstriction could not occur. From these results, blood flow data of branch retinal vein occlusion (BRVO), which may leak from retinal vessels and act from outside the retinal vessels, is collected rather than the originally planned diabetic retinopathy. It was suggested that the blood flow was related to the change in retinal vein diameter, and the change in the diameter was related to the maximum best-corrected visual acuity.

研究分野：眼科

キーワード：血液網膜関門 トロンピン プロテアーゼ活性化型受容体 PAR 網膜静脈分枝閉塞症 BRVO

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病網膜症(DR)は成人中途失明原因の主因であり、その社会的損失は計り知れず、DRの病態解明、発症予防および治療法の確立は急務である。これまでDRの治療の進展により、血糖、血圧、脂質異常の改善といった内科的治療、網膜光凝固、抗血管内皮増殖因子(VEGF)の硝子体注射、硝子体手術などの外科的治療が確立されている。しかし、DRの発症及び進行を完全には抑制できず、失明に至ることもある。これまでに我々は、2型糖尿病患者の眼循環について臨床研究を行い、DRにおいては、発症前・発症早期より網膜血流が低下していることを報告(Invest Ophthalmol Vis Sci 2010)した。しかしながら、その網膜血流低下のメカニズムについては未解明である。

(2) トロンピンは、凝固カスケード反応が血小板膜上で進行し、Xa因子によりプロトロンピンを活性化することにより生じ、フィブリノゲンを分解し、フィブリン血栓形成に寄与する。その他にも、トロンピンは血管内皮細胞、血管平滑筋細胞に発現しているプロテアーゼ活性化型受容体(PAR)を介して作用する。PARはサブタイプとして、PAR-1~4が報告されており、血管平滑筋細胞にはPAR-1, PAR-2(Circ Res 1998, Thromb Res 2002)、血管内皮細胞にはPAR-1, PAR-2, PAR-4(Am J Physiol 1999, Blood 2003, Pathobiology 2004)が発現していることが報告されている。トロンピンの血管緊張の調節については、これまでに、冠動脈(Thromb Res 1990, Br J Pharmacol 2000, Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003)及び肺動脈(Agents Actions Suppl 1995, J Cardiovasc Pharmacol 2001)においては血管拡張作用を示すという報告がある。また、肺動脈及び脳の動脈について血管収縮作用(Am J Respir Crit Care Med 2010, Thromb Res 1985)を示すという報告もある。臓器により血管の反応が異なることから、トロンピンの反応には臓器特異性があり、血管の反応が変わると考えられる。ウシ網膜では、血管収縮を示すことが報告(Invest Ophthalmol Vis Sci 1990)されている。また、DR患者において硝子体中におけるトロンピン濃度が上昇していることが報告(Curr Eye Res 2016)されていることから、DR患者における網膜血流低下にトロンピンの血管収縮が関与する可能性があるが、網膜循環への関与は未解明であった。

2. 研究の目的

パイロットスタディとして、我々はブタ網膜摘出血管を用いた実験手法を用いて、トロンピンが低濃度で血管収縮作用を、高濃度で血管弛緩作用を示すことを発見した(図1)。しかしながら、正常血液におけるトロンピン濃度は5.5mU/mLであるとの報告(Clin Appl Thromb Hemost 2006)があり、右のグラフから、正常血液トロンピンの濃度においても、血管収縮作用を起こしうることが考えられるが、その関与は明らかになっていない。このメカニズムの解明は糖尿病網膜症など網膜循環障害が関与する眼疾患の病態解明につながりうる。また、網膜血管のPARを介したトロンピンが眼循環調節因子に与える影響を検討することで、トロンピンやPARを標的とした新しい網膜血管治療法の開発を目指す。

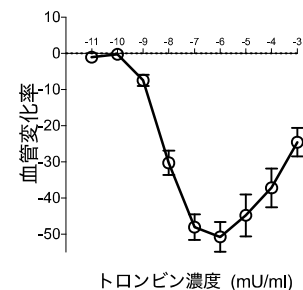


図1. トロンピンに対する網膜動脈血管径の変化率

3. 研究の方法

(1) トロンピンの網膜循環への影響の検討(in vitro 及び in vivo)

ブタ網膜摘出血管の in vitro 実験系は、ブタ網膜より網膜血管を摘出し、両端をピペットに結紮、加圧して生理的基礎緊張を得た上で、薬剤を投与し、ブタ膜血管における収縮、拡張反応の有無を確認する。予備実験ではトロンピンは低濃度で収縮作用、高濃度で弛緩作用が認められた。血管内皮剥離モデル(Invest Ophthalmol Vis Sci 2007)及び各種阻害剤を用い、その収縮及び拡張のメカニズムを詳しく解明していく。また、トロンピンの血管内腔投与を行い、内皮の有無でトロンピンの作用が変わるかどうかを確認し、内皮障害時のトロンピンの網膜循環への影響を解明する。

ネコを用いた in vivo の血流実験系にて、トロンピンの網膜循環への影響を測定する。ネコに全身麻酔をかけ、全身循環を一定に保ち、トロンピンを硝子体へ注射し、もう一方の目をコントロール群としPBSを硝子体へ注射する。それぞれの群にて網膜循環動態をレーザードップラー光干渉断層計を用いて測定する。

(2) PARの役割と網膜及び網膜循環への影響の検討(in vitro 及び in vivo)

PARをターゲットとした創薬が試みられており、PAR-1アンタゴニストである vorapaxar 及び atopaxar は新規抗凝固薬として臨床試験が行われている。その他にも、急性肺損傷における組織修復の促進を目的に PAR-2 をターゲットとした研究も進められており、トロンピンの受容体である PAR についても注目が集まっている。しかし、PARアンタゴニストが網膜血管にどのような作用を与えるか検討されていない。本研究ではブタ網膜摘出血管の in vitro 実験系にて、免疫染色及びウエスタンブロット法を用い、網膜血管における PAR の局在を確認する。網膜血管に、PARの存在が確認されれば、受容体阻害薬を用いて、PARの網膜循環への作用を in vitro 及び in vivo の実験系にて検討する。更に病的モデルの報告として、高血糖状態では PAR-4 の血管

平滑筋での発現が亢進しており、糖尿病群のマウスと非糖尿病群のマウス間で比較すると、PAR4が大動脈、頸動脈において発現の亢進を認められることが報告(Circulation 2014)されている。この報告から、糖尿病網膜症においても同様の変化が起こっていることが示唆される。そこで、糖尿病モデルマウスモデルを用いて、PARの発現の変化を免疫染色及びウエスタンブロット法を用い確認、その後、網膜血管及び網膜色素上皮細胞におけるPARの発現変化についても検討する。

(3) 硝子体出血における硝子体内トロンビン濃度と網膜循環の関連性についての検討

糖尿病網膜症において、硝子体中トロンビン濃度が蛍光学的に上昇していることが報告されている。しかしながら、硝子体出血及び網膜出血によるトロンビンの網膜循環への影響については検討されていない。硝子体出血を伴う糖尿病網膜症で硝子体手術の適応となった患者、そして、コントロール群として、硝子体出血を伴わない糖尿病網膜症、網膜前膜及び黄斑円孔など出血は見られないが硝子体手術の適応となる患者を対象に、手術中に硝子体液を一部採取し、硝子体内トロンビン濃度を測定し、術後、我々の開発したドップラー光干渉断層計(特許番号:2013-184018)を用いて、血流の評価を行い、硝子体中のトロンビン濃度と網膜循環の関連を評価する。

4. 研究成果

豚網膜摘出動脈を用いて、トロンビン(5 mU/ml)は、血管外からの投与では収縮反応が起こるが、血管内からの投与では起こらないことが分かった(図2)。これは、血液網膜関門が1kDa以上の分子量の物質を通さないという過去の報告に裏付けられる。トロンビンの分子量は33.6kDaと大きいため、血液網膜関門を通過することができない。そのため、血管内からの投与では、平滑筋に作用できず、血管収縮反応は起こらないと考えられた。過去の報告では網膜動脈においてトロンビンは受容体を介さず、独自の酵素的反応により、血管へ作用すると報告されていたが、Protease-activated receptor-1(PAR-1)のブロッカーを用いて、PAR-1を介して収縮反応を示すことが分かった(図3)。同様に各々のブロッカーを用いて、収縮反応はProtein kinase CおよびRho associated protein kinaseが関与することが分かった。更に、高濃度のトロンビンは網膜動脈を弛緩させる。そのメカニズムはendothelial nitric oxide synthase 依存性であることも分かった。これらの内容をまとめて、国際学会で報告した後、国際学術誌Current Eye Researchに投稿し受理された¹。

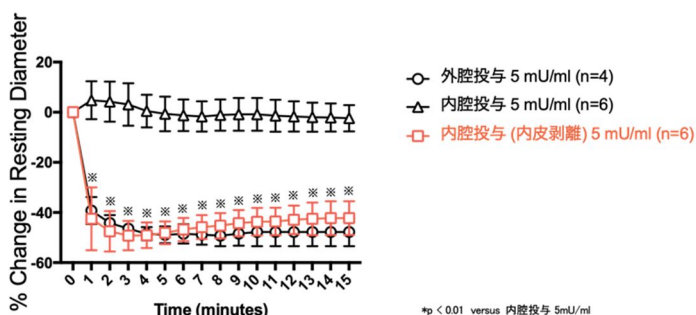


図2. トロンビン網膜動脈血管径の変化率(血管外投与 vs 血管内投与)

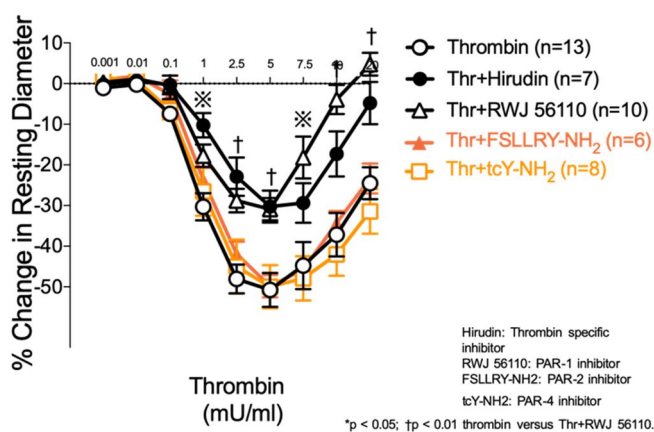


図3. トロンビン網膜動脈血管径の変化率(PARの役割)

で得られた結果から、臨床研究では当初の実施計画にあった、糖尿病網膜症よりも、血液が血管より漏れ、血管外から作用しうる網膜静脈分枝閉塞症(BRVO)の方が、トロンビンの影響を受けやすいと考えた。BRVOも硝子体中トロンビン濃度の上昇が既に報告されており、BRVOの患者における網膜静脈の血流データを収集し、BRVOにおける網膜静脈血流の低下については血流速度よりも血管径の変化が関与していること、また、血管径の変化が最高矯正視力と関与が示唆されることを国際学会にて報告した。現在は、その内容をまとめて、英語論文として投稿中である(in submission)。

<引用文献>

1. Takahashi K* et al., Curr Eye Res. 2018; Thrombin-Induced Responses Via Protease-Activated Receptor 1 Blocked by the Endothelium on Isolated Porcine Retina Arterioles

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi Kengo, Omae Tsuneaki, Ono Shinji, Kamiya Takayuki, Tanner Akira, Yoshida Akitoshi	4. 巻 43
2. 論文標題 Thrombin-Induced Responses via Protease-Activated Receptor 1 Blocked by the Endothelium on Isolated Porcine Retinal Arterioles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Eye Research	6. 最初と最後の頁 1374 ~ 1382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/02713683.2018.1496266	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 高橋 賢伍
2. 発表標題 ドップラOCT flowmeterで異常な血流速度波形を呈した網膜静脈分枝閉塞症の2例
3. 学会等名 眼循環学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋 賢伍
2. 発表標題 New importance of endothelium on retinal arterioles - examination of thrombin-induced vasoconstriction and function of endothelium-
3. 学会等名 日本眼科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋 賢伍
2. 発表標題 Thrombin causes biphasic regulation of vascular tone in porcine retinal arteries
3. 学会等名 ARV02017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋 賢伍
2. 発表標題 Characteristics of Retinal Blood Flow, Velocity and Vessel Diameter of eyes with Branch Retinal Vein Occlusion as revealed by Doppler Optical Coherence Tomography Flowmeter
3. 学会等名 ARVO2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----