

TABLE 1. Patient Characteristics and Circulation Time Before and After Treatment

Case	Age	Sex	A/V Crossing Site	Duration (Month)	NPA	Pre-VA	Final VA	Pre- ΔT_{50} (second)	Post- ΔT_{50} (second)
1	54	M	A on V	2	-	0.3	0.8	0.77	0.09
2	48	F	V on A	3	+	0.06	0.09	1.41	0.50
3	50	M	A on V	3	+	0.08	0.9	2.17	0.82
4	73	M	A on V	2	+	0.4	0.9	3.62	0.89
5	70	F	A on V	3	-	0.3	0.3	0.54	0.26
6	65	F	A on V	3	+	0.4	1.0	0.10	0.01
7	68	F	A on V	5	+	0.04	0.08	1.6	0.23
8	57	M	A on V	6	+	0.1	1.0	1.93	0.28
9	59	M	A on V	6	+	0.2	0.9	1.93	0.54
10	75	F	A on V	3	-	0.5	0.8	1.60	1.10
11	67	F	A on V	4	-	0.2	0.7	4.20	3.31
12	47	F	V on A	3	+	0.2	1.0	0.23	0.22
13	58	F	V on A	9	+	0.3	0.3	0.10	0.10
14	60	F	V on A	4	+	0.07	0.1	1.24	1.04
15	84	F	A on V	6	-	0.3	0.3	1.47	1.23
16	76	F	V on A	3	+	0.2	0.7	0.18	0.23
17	71	M	A on V	3	+	0.4	0.7	0.56	0.78
18	58	M	A on V	4	-	0.1	0.5	0.84	1.27

A = arteriole; A/V = arteriovenous; duration (month) = duration from the onset of visual impairment to surgery; NPA = nonperfusion area before surgery; Post- ΔT_{50} = postoperative ΔT_{50} ; Pre- ΔT_{50} = preoperative ΔT_{50} ; V = venule; VA = visual acuity.

increased in the remaining seven eyes. In only one of the five eyes with venules overlying arterioles at the responsible A/V crossing sites, ΔT_{50} decreased by 20% or more after the surgery. In contrast, 10 of the 13 eyes with arterioles overlying venules showed decrease by 20% or more in ΔT_{50} after the surgery. Age, sex, and preoperative visual acuity did not differ between the 11 eyes showing improvement and the seven eyes showing no change or aggravation. However, the mean duration of the disease was slightly higher in the latter (4.6 months) than in the former (3.7 months).

Macular edema and hemorrhage improved after the surgery in all eyes, whereas visual acuity improved by 2 or more lines in 15 eyes and did not worsen in any eye. In the 11 eyes showing improvement in perfusion, the logMAR visual acuity was 0.75 ± 0.37 before the surgery and 0.29 ± 0.41 after the surgery. Eight of the 11 eyes had a final visual acuity of 0.6 or better. In contrast, in the seven eyes without improvement in perfusion, the logMAR visual acuity was 0.71 ± 0.27 before the surgery and 0.38 ± 0.34 after the surgery. Three of the seven eyes had a final visual acuity of 0.6 or better.

DISCUSSION

VITRECTOMY ALONE COULD BE EFFECTIVE FOR RESOLUTION of macular edema and hemorrhage and for improvement in visual acuity.¹⁰⁻¹² Unless A/V crossing sheathotomy can improve delay in venular perfusion, it has no additional

values and does not differ from vitrectomy alone. The present study was performed to confirm effects of A/V crossing sheathotomy on affected retinal circulation, and the results obtained showed improvement in the perfusion in the affected venule early after the surgery. However, definite improvement in circulation was observed only in 11 of the 18 eyes, and no change or aggravation was observed in the remaining 7 eyes. In the 7 eyes, the resolution in edema and hemorrhage and improvement in visual function may be the effects of vitrectomy alone. In addition, the natural course of branch retinal vein occlusion is relatively good, and impaired circulation is compensated for by the development of collateral circulation. It is well known that retinal edema and hemorrhage associated with branch retinal vein occlusion finally disappear, and vision improves without treatment in some cases.¹³ Therefore, the improvement might be due to the natural course. The slight aggravation in delay in the perfusion in cases 17 and 18 may show an adverse effect that this technique impairs venular perfusion, though no definite injury was observed during the surgery in either case.

As a parameter of delay in perfusion, ΔT_{50} obtained by the dye dilution method was used. Koyama and associates⁹ reported that ΔT_{50} had the highest reproducibility as a parameter to evaluate the mean retinal circulation time, showing a measurement error of approximately 9%. Therefore, we considered postoperative changes by 20% or more to be significant. In the present study, to directly clarify the efficacy of this technique, delay in venous perfusion distal

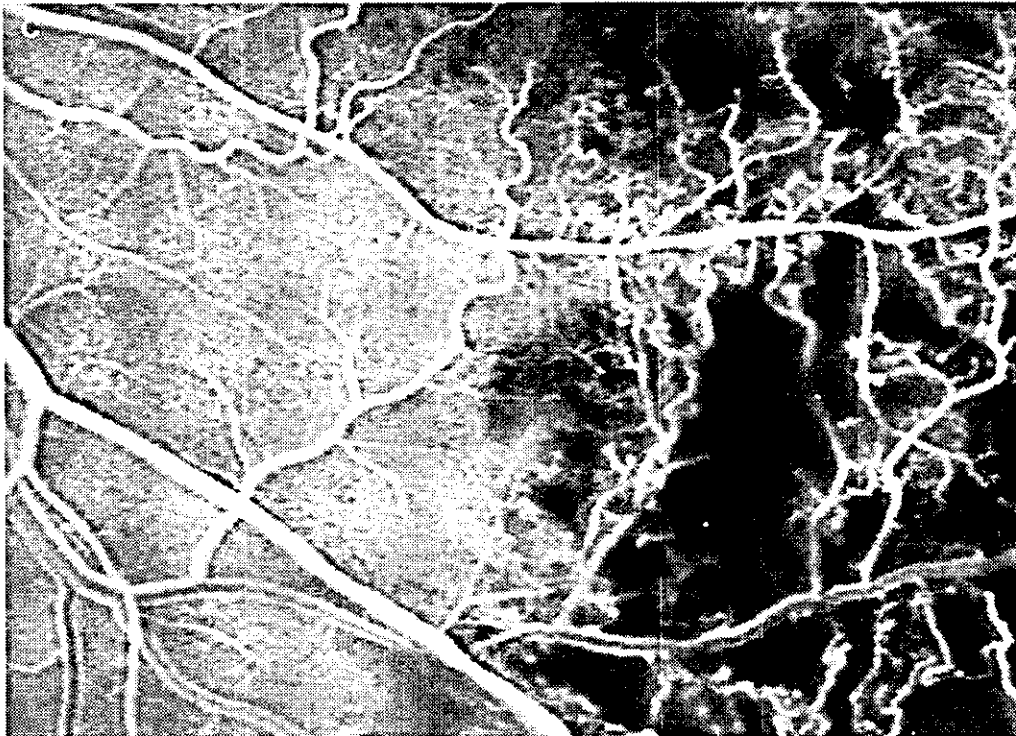
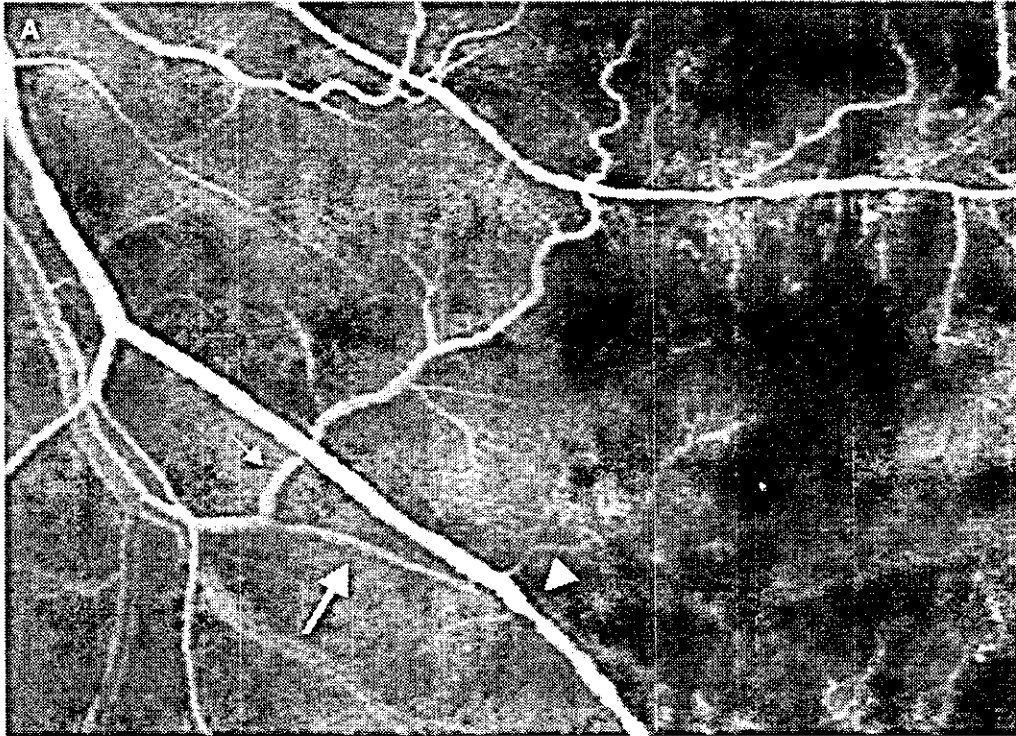


FIGURE 2. (A) Early phase of preoperative fluorescein angiography. Laminar flow is not observed in the venules distal to the responsible atrioventricular crossing site (arrowhead). Adverse dye filling (large arrow) in the venule proximal to the crossing site from a more proximal branch (small arrow) is seen. (B) Venous phase of preoperative fluorescein angiography. Narrowing in the venule (arrow) proximal to the crossing site is observed. (C) Early phase of postoperative fluorescein angiography. Laminar flow appeared in the venule distal to the crossing site simultaneous with that in the normal venule. No backflow in the venule proximal to the crossing site is seen. (D) Venous phase of postoperative fluorescein angiography. The vascular diameter increases in the venule (arrow) proximal to the crossing site.

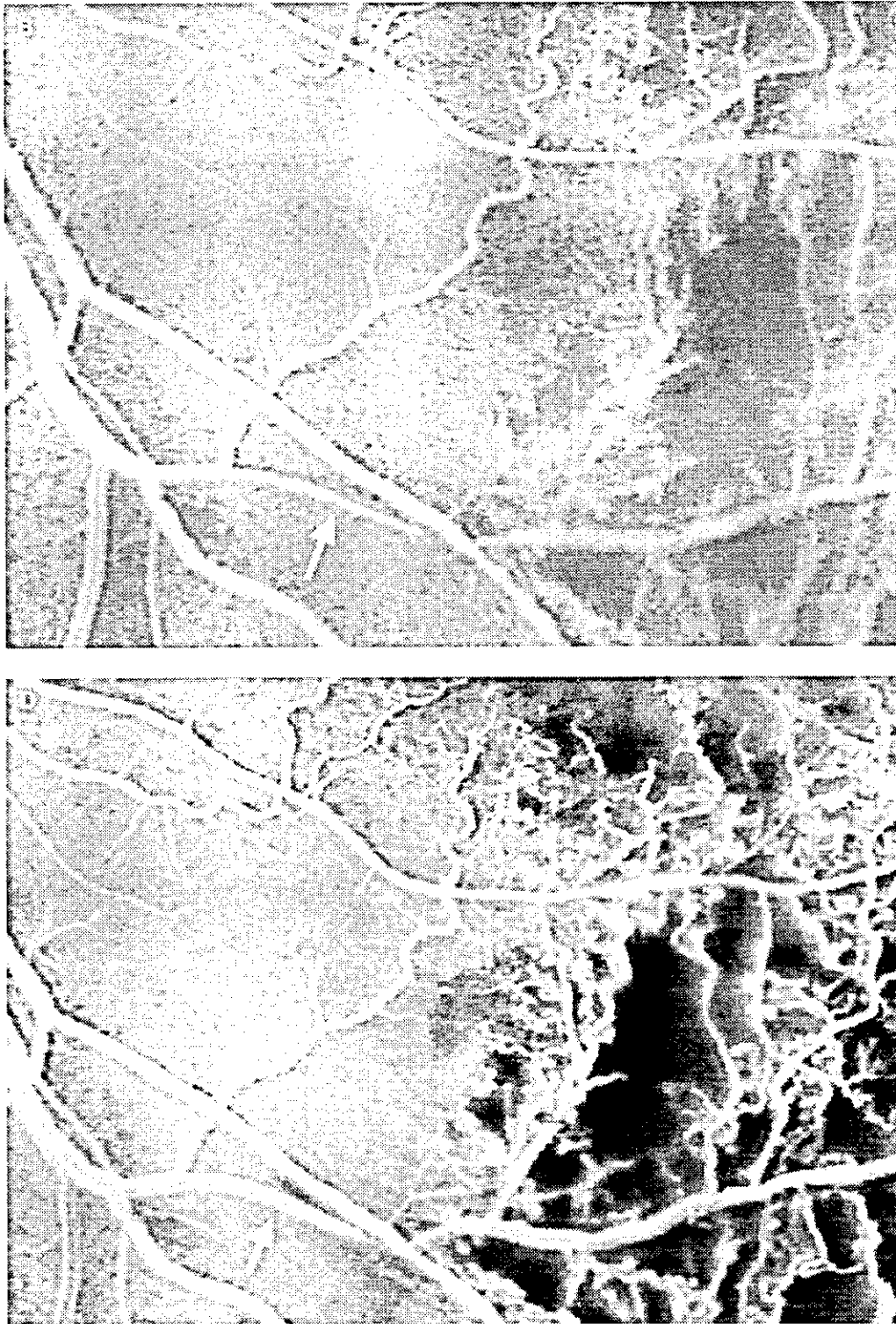


FIGURE 2. Continued.

to the A/V crossing site was evaluated using $\Delta T50$. However, further studies by measurement of blood flow in the macula are needed. Indeed, in the 18 eyes in the present study, there was no close association between improvement in delay in venular perfusion and postoperative visual acuity.

If there is a shunting vessel occurring from the occluded venule to the normal venule on which fluorescence intensities were measured, after A/V sheathotomy, the amount of shunting may lessen, and the postoperative $\Delta T50$ may decrease more than it really is. Thereafter, eyes with collateral vessels were excluded from the subjects.

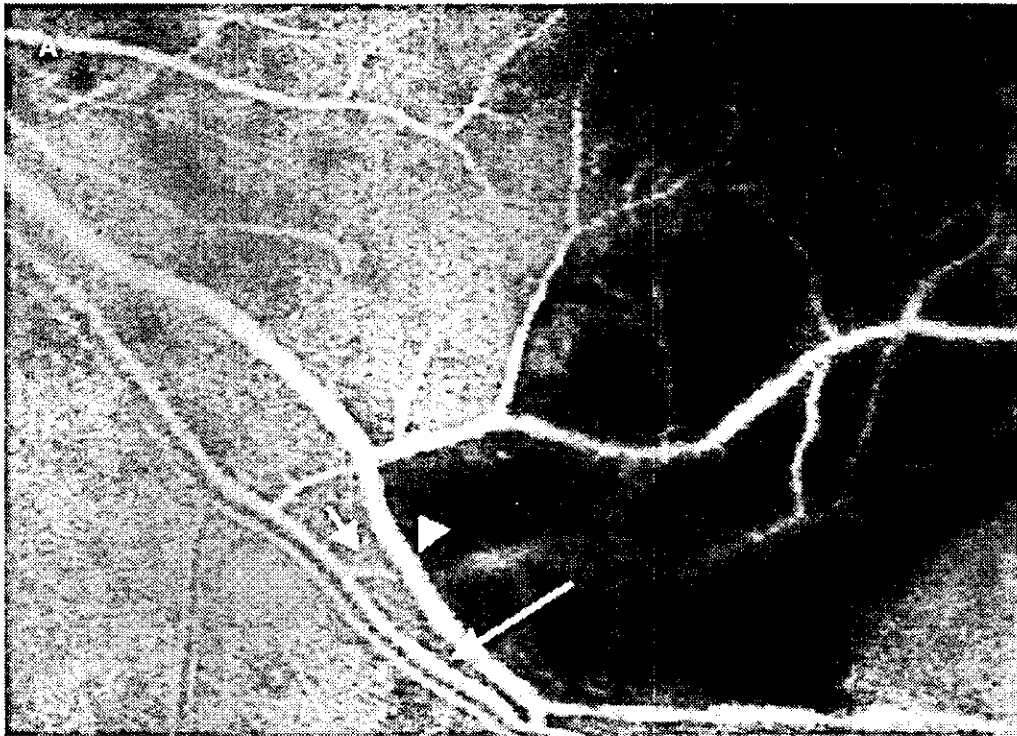


FIGURE 3. (A) Early phase of preoperative fluorescein angiography. Dye filling from the normal venule (large arrow) peripheral to a venule (small arrow) proximal to the responsible crossing site (arrowhead) reached earlier than that from the affected venule. (B) Venous phase of postoperative fluorescein angiography. Filling delay in the affected venule improved, and the venule (arrow) proximal to the crossing site is normally filled earlier than the peripheral normal venule.

Improvement in the perfusion appeared to be achieved in the eyes showing the arteriole overlying the venule. Improvement in delay in the perfusion was observed in only one of the five eyes showing the venule overlying the arteriole. In all five eyes, because the venule overlying the arteriole was small-sized, the venule might be a collateral vessel, not a preexisting vessel. Another possibility is that A/V separation was technically difficult and incomplete for the small-sized venule. In contrast, the improvement in venular circulation in 10 of the 13 eyes with the arteriole overlying the venule suggests that such A/V arrangement is a good indication for A/V crossing sheathotomy. Other preoperative factors predicting postoperative improvement in impaired perfusion might be the short duration of the disease. These factors should be considered in the timing of surgery and case selection.

The results in our study suggest that A/V crossing sheathotomy is effective in reduction of venous compression. Contrary to our expectation, the technique was easy to perform, and no severe complications were observed. However, in cases showing marked fibrosis in the vascular adventitia, A/V separation is sometimes difficult, and other methods such as cutting with scissors should be considered in such cases.

In conclusion, although randomized, controlled studies are needed to confirm the effect of A/V crossing sheathotomy on visual function, this technique is effective for improving delay in the perfusion in the occluded venule and may allow recovery to normal perfusion in selected cases.

REFERENCES

1. Weinberg D, Dodwell DG, Fern SA. Anatomy of arteriovenous crossings in branch retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 1990;109:298-302.
2. Opremcak EM, Bruce RA. Surgical decompression of branch retinal vein occlusion via arteriovenous crossing sheathotomy: A prospective review of 15 cases. *Retina* 1999;19:1-5.
3. Branch Vein Occlusion Study Group. Argon laser photocoagulation for macular edema in branch vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 1984;98:271-282.
4. The Branch Vein Occlusion Study Group. Argon laser photocoagulation for macular edema in branch vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 1985;99:218-219.
5. Vilser W, Jutte A, Seewald D, et al. Measurements of retinal microcirculation in retinal vessel occlusion before and after treatment. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1986;224:179-183.
6. Gaun S, Kasuga Y, Arai J, et al. Effect of vitrectomy for macular edema secondary to branch retinal vein occlusion [in Japanese]. *Ganka Shujutu (J Jpn Soc Ophthalmic Surg)* 2001;14:117-121.
7. Riva CE, Fekete GT, Ben-Sira I. Fluorescein dye-dilution technique and retinal circulation. *Am J Physiol* 1978;234:315-322.
8. Mihara K. Retinal arterial circulation times measured by a scanning laser ophthalmoscope and image analysis system. *Folia Ophthalmol Jpn* 1996;47:1393-1397.
9. Koyama T, Matsuo N, Shimizu K, et al. Retinal circulation times in quantitative fluorescein angiography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1990;228:442-446.
10. Tachi N, Hashimoto Y, Ogino N. Vitrectomy for macular edema combined with retinal vein occlusion. *Doc Ophthalmol* 1999;97:465-469.
11. Takase M, Yanase J, Ogino N, et al. Efficacy of internal limiting membrane maculorhexis for macular edema caused by branch retinal vein occlusion [in Japanese]. *Ganka Shujutu (J Jpn Soc Ophthalmic Surg)* 2001;14:121-124.
12. Saika S, Tanaka T, Miyamoto T, et al. Surgical posterior vitreous detachment combined with gas/air tamponade for treating macular edema associated with branch retinal vein occlusion: Retinal tomography and visual outcome. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001;239:729-732.
13. Finkelstein D. Ischemic macular edema. Recognition and favorable natural history in branch retinal vein occlusion. *Arch Ophthalmol* 1992;110:1427-1434.

24. 糖尿病黄斑浮腫に対するステロイド硝子体投与の奏功機序

田村 寛、桐生純一、宮本和明、勝田英人、宮原晋介、広瀬文隆、武蔵国弘、吉村長久
(京都大)

研究要旨 最近糖尿病黄斑浮腫に対する治療として、トリアムシノロン・アセトニドを始めとしたステロイドの硝子体投与が行われ、その有効性が注目されているが、その奏功機序に関してはあまり明らかにされていない。今回我々は糖尿病モデルラットを用い、ステロイド硝子体投与の黄斑浮腫改善機序について検討したので報告する。6週令のLong-Evansラットにストレプトゾトシンを腹腔内投与して糖尿病ラットを作製した。糖尿病発症3週間後に硝子体内にデキサメサゾン(0.4%)を $10\mu\text{l}$ 投与し、その2日後にアクリジンオレンジ白血球蛍光造影法にて網膜循環における白血球動態を観察した。網膜血管の透過性はFITC標識デキストランを用いた方法で測定した。また、intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)の遺伝子発現をRT-PCRで、その発現タンパク量は酵素免疫測定法(ELISA)で測定した。無処置の糖尿病ラットにおいて有意に増加した網膜内への白血球捕捉とデキストランの硝子体漏出量、ICAM-1の遺伝子発現とタンパク量は、デキサメサゾンの投与によりそれぞれ有意に減少した(68%、 $p=0.0001$)(39%、 $p=0.0046$)(70.0%、 $p<0.0001$)(44%、 $p=0.0003$)。糖尿病モデルラットにおいて、ステロイドの硝子体投与は網膜への白血球捕捉をICAM-1の発現抑制を通じて抑制し、同時に網膜血管漏出も抑制した。ステロイド硝子体投与による糖尿病黄斑浮腫の改善は、網膜白血球捕捉抑制を介した作用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

日本における失明原因の筆頭に挙げられる糖尿病網膜症の中でも、ひととき重篤な視力障害の原因となっている糖尿病黄斑浮腫に対する、ステロイド硝子体注射の奏功機序の解明。

B. 研究方法

6週令のLong-Evansラットにストレプトゾトシンを腹腔内投与して糖尿病ラットを作製した。糖尿病発症3週間後に硝子体内にデキサメサゾン(0.4%)を $10\mu\text{l}$ 投与し、その2日後にアクリジンオレンジ白血球蛍

光造影法にて網膜循環における白血球動態を観察した。網膜血管の透過性はFITC標識デキストランを用いた方法で測定した。また、intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)の遺伝子発現をRT-PCRで、その発現タンパク量は酵素免疫測定法(ELISA)で測定した。尚、実験動物の取り扱いに関しては、ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.に準拠して行った。

C. 研究結果および考察

無処置の糖尿病ラットにおいて、有意に増

加していた網膜内への白血球捕捉とデキストランの硝子体漏出量、ICAM-1 の遺伝子発現とタンパク量は、デキサメサゾンの投与によりそれぞれ有意に減少した (68%、 $p=0.0001$) (39%、 $p=0.0046$) (70.0%、 $p<0.0001$) (44%、 $p=0.0003$)。この結果から、糖尿病モデルラットにおけるステロイドの硝子体投与は、網膜への白血球捕捉を ICAM-1 の発現抑制を通じて抑制し、同時に網膜血管漏出も抑制したと考えられる。ステロイド硝子体投与による糖尿病黄斑浮腫の改善は、網膜白血球捕捉抑制を介した作用である可能性が示唆された。

D. 評価

1) 達成度：実験開始当初の予想された結果は得られたと考えられる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義：奏功機序が明らかにされないまま、臨床の現場ではトリアムシロンの硝子体注射が行われているが、その機序の一因が解明されることにより、予想されていなかった副作用への対応やより効果的な投薬方法や薬剤の選択が可能となると考えられる。

3) 今後の展望について：現在までに有力な機序と想定されてきた VEGF との相関関係等についてさらなる検討が必要と考えられる。

E. 結論

糖尿病モデルラットにおいてデキサメサゾンの硝子体注射を行い、充進した網膜血管の透過性を減少させることができた。この際、網膜における ICAM-1 の遺伝子発現と網膜への白血球集積も減少していた。デキサメサゾン注射による血管透過性の改善は、

ICAM-1 の発現から白血球集積を経た経路を阻害することによるものでもある可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyahara S, Kiryu J, Yamashiro K, Miyamoto K, Hirose F, Tamura H, Katsuta H, Nishijima K, Tsujikawa A, Honda Y. : Simvastatin inhibits leukocyte accumulation and vascular permeability in the retinas of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Am J Pathol.* 2004 May;164(5):1697-706.

2. 学会発表

1. 第 21 回眼循環学会@旭川 田村寛、桐生純一、宮本和明、勝田英人、宮原晋介、広瀬文隆、武蔵国弘、吉村長久：ステロイド硝子体投与による糖尿病黄斑浮腫の改善機序

2. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2004 @Florida H. Tamura, J. Kiryu, K. Miyamoto, K. Nishijima, H. Katsuta, S. Miyahara, F. Hirose, K. Musashi, Y. Honda : Changes of inflammatory mediators and leukocyte-endothelial cell interactions in ocular inflammation of diabetic rats.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

1. 参考文献

なし

25. Peroxisome proliferator activated receptor・リガンド (rosiglitazone)の糖尿病モデルラット網膜血管透過性に対する影響

柳 靖雄、村中公正、高橋秀徳、玉置泰裕、新家 眞
(東京大)

研究要旨 糖尿病治療薬として用いられるチアゾリジン誘導体の rosiglitazone は核内受容体 Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)のリガンドである。今回、糖尿病ラット網膜における血管透過性亢進に対する rosiglitazone 経口投与の影響を検討するため、brown norway ラットをストレプトゾトシン(STZ)の腹腔投与で糖尿病化し、rosiglitazone (3mg/kg)および基剤(蒸留水)を21日間経口投与した。網膜血管に付着した白血球数を計測し、網膜血管からの漏出を検討した結果、rosiglitazone 投与により、網膜血管への白血球の付着および網膜血管からの漏出は、基剤投与に比べそれぞれ90%、95%の減少が観察された。更に、網膜における VEGF および ICAM-1 のタンパク量を ELISA 法で測定した結果、rosiglitazone 投与は VEGF の発現量には影響をおよぼさなかったが、ICAM-1 の発現の20%抑制が観察された。これらの観察結果から rosiglitazone は ICAM-1 を制御し網膜血管透過性を糖尿病モデル動物の網膜における血管内白血球付着および血管透過性亢進を抑制している事が示唆された。

A. 研究目的

実験的糖尿病モデルや、ヒトの糖尿病網膜症において網膜色素上皮、および網膜血管内皮に存在するバリアーが障害される事が原因で網膜浮腫が惹起される事が知られている。最近の研究ではこの過程に炎症が関与している事が知られている¹。すなわち、ヒトやラットの糖尿病網膜症モデルにおいて網膜血管への白血球の付着が観察されており、この白血球の網膜血管への付着が網膜血管透過性を悪化させる事が確認されている²。また、接着分子の機能を阻害する事によって白血球の血管壁への付着および血管透過性の亢進を抑制できる事が分かっている³。

糖尿病治療薬として用いられるチアゾリジン誘導体の rosiglitazone は核内受容体

Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)のリガンドである。PPAR γ は、炎症や、血管新生に関わる因子である⁴が、糖尿病モデル動物網膜における機能は分かっていない。今回、糖尿病ラット網膜における血管透過性亢進に対する rosiglitazone 経口投与の影響を検討した。

B. 研究方法

brown norway ラットをストレプトゾトシン(STZ)の腹腔投与(60mg/kg)で糖尿病化し、投与7日後、血糖が250mg/dl以上示した動物を糖尿病化したとみなした。この糖尿病ラットに、rosiglitazone (3mg/kg)および基剤(蒸留水)を毎日経口投与した。

21日後、ローダミン-ConA 還流の後に PBS で心臓還流を行い、白血球をラベルした後、

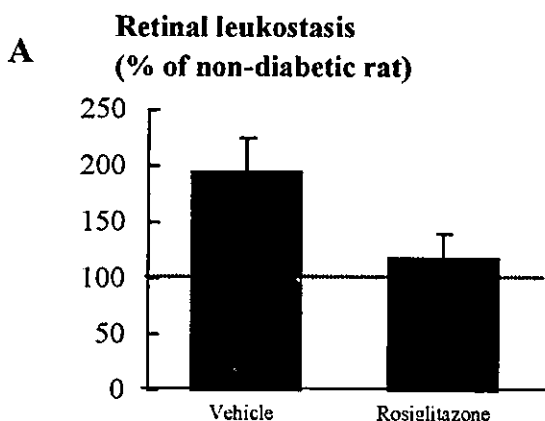
網膜伸展標本を作製し、蛍光顕微鏡で観察する事によって網膜血管に付着した白血球数を計測した。さらに、FITC-dextran(50mg/ml in PBS, 50mg/kgBW)を静注10分後にPBSで心臓還流を行い眼球摘出し、網膜に含まれるFITCを抽出し、蛍光プレートリーダーで測定し、網膜血管からの漏出を検討した。更に、網膜におけるVEGFおよびICAM-1のタンパク量をELISA法で測定した。

(倫理面への配慮)

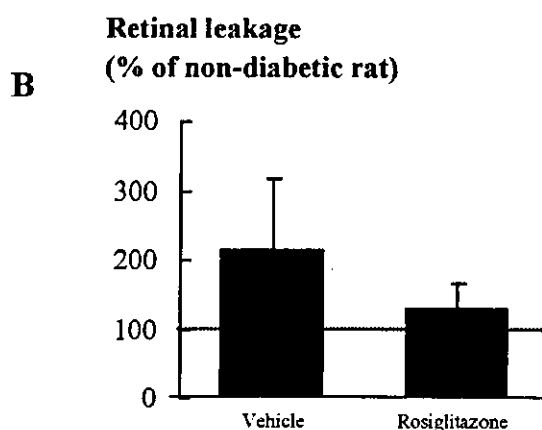
全ての動物実験はARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Researchに則り行った。

C. 研究結果

糖尿病モデルラット網膜における網膜血管への白血球の付着は非糖尿病ラットと比較すると92%増加しており、rosiglitazone投与により、基剤投与に比べ90%減少した(Figure1)。



また、糖尿病モデルラット網膜における網膜血管への網膜血管の透過性は非糖尿病ラットと比較すると105%増加しており、rosiglitazone投与により、基剤投与に比べ、95%減少した(Figure2)。



また、VEGFおよびICAM1のタンパク量は非糖尿病ラット網膜と比較してそれぞれ15%、23%上昇していた。rosiglitazone投与はVEGFの発現量には影響をおよぼさなかったが、ICAM1の発現は20%抑制した。一方、非糖尿病化ラットではrosiglitazone投与は網膜血管への付着白血球数および網膜血管からの漏出に影響を及ぼさず、VEGFおよびICAM-1の発現に有意な影響を与えなかった。

D. 考察

本研究ではPPAR γ のアゴニストが糖尿病モデル動物眼底で網膜血管の血管壁の付着および網膜血管の透過性を抑制する事が示された。本研究結果からは、少なくともICAM-1のタンパクレベルでの発現抑制が関与していると考えられた。PPAR γ リガンドがICAM-1の発現を抑制しているメカニズムは不明であるが、これまでにPPAR γ はNf κ -Bを介して抗炎症作用を発揮する事が分かっている⁵ことから、我々も網膜におけるrosiglitazoneのICAM-1発現抑制にはNF- κ Bが関与している可能性が高いと考えている。これまでにCOX-2 inhibitorや、anti-ICAM-1 antibodyなど様々なコンパウンドが糖尿病モデル網膜において網膜血管の透過性亢進を抑制する事が知られている。

いずれも網膜血管の漏出の抑制効果も 38% から 85.6%程度^{3,6}であり、今回の結果と同等であった。これらの結果を考えあわせると、PPAR γ リガンドは糖尿病モデル網膜において比較的強力な網膜血管漏出抑制作用を有するといえると考えられた。

今後の更なる研究が必要であると思われるが、PPAR γ のリガンドは糖尿病網膜症における血管透過性の亢進に対し抑制的に作用すると考えら、有力な糖尿病網膜症の治療薬となりうると考えられた。

E. 結論

rosiglitazone は ICAM-1 を制御し網膜血管透過性を糖尿病モデル動物の網膜における血管内白血球付着および血管透過性亢進を抑制している事が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Adamis, A.P. Is diabetic retinopathy an inflammatory disease? *Br J Ophthalmol* 16, 363-365, 2002.
2. Miyamoto, K., Hiroshiba, N., Tsujikawa, A. & Ogura, Y. In vivo demonstration of increased leukocyte entrapment in retinal microcirculation of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 2190-2194, 1998.
3. Miyamoto, K. et al. Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10836-10841, 1999.
4. Rosen, E.D. & Spiegelman, B.M. PPAR γ : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 276,37731-37734 2001.
5. Wang, C. et al. Inhibition of cellular proliferation through IkappaB kinase-independent and peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 21, 3057-3070, 2001.
6. Sima, J., Zhang, S.X., Shao, C., Fant, J. & Ma, J.X. The effect of angiostatin on vascular leakage and VEGF expression in rat retina. *FEBS Lett* 564, 19-23 2004.

26. siRNAによる網膜血管内皮細胞のICAM-1発現制御

加藤亜紀、久納紀之、西脇晶子、桜井英二、小椋祐一郎
(名古屋市大)

研究要旨 small interfering RNAによって特定の mRNA を不活化する技術は種々の遺伝子発現を制御するために非常に有効な手段である。今回われわれは、培養網膜血管内皮細胞において、ICAM-1を標的とする siRNA を細胞内に導入し、細胞を刺激して接着分子の発現を増強させ、ICAM-1の発現をたんぱく質、および mRNA レベルで定量した。その結果、酵素抗体法において、ICAM-1 標的 siRNA を導入した細胞の ICAM-1 の発現は対照細胞の $70.2 \pm 1.84\%$ で有意に抑制されていた。定量 PCR においても mRNA 発現量は $51.3 \pm 16.8\%$ に有意に抑制されていた。以上の結果より siRNA は培養網膜血管内皮細胞において ICAM-1 発現抑制が可能であり、siRNA を用いた遺伝子発現制御は、網脈絡膜における血管新生や虚血障害に対する新しい治療法として今後期待できると考えられた。

A. 研究目的

加齢黄斑変性における脈絡膜新生血管のように多くの病的血管新生は炎症や虚血などの刺激により単球や、マクロファージから放出された VEGF や b-FGF といったサイトカインによって引き起こされると考えられている。また血管新生の過程においては白血球—血管内皮相互作用が深く関与しており、この相互作用においては ICAM-1 や P-selectin といった接着因子が重要な役割を果たしている。実験的脈絡膜新生血管においても、ICAM-1 や E-セレクトリン、CD-44 といった血管内皮細胞表面の接着分子が強く発現していることが報告されており¹、ICAM-1 関連遺伝子のノックアウトマウスでは脈絡膜新生血管が抑制されることも報告されている²。さらに加齢黄斑変性の患者から採取された脈絡膜新生血管膜においても ICAM-1 E-selectin の発現が亢進していたとの報告がある³。そのため、接着因子の発

現を抑制することにより CNV の成長を抑制することが期待される。

遺伝子の発現を抑制する方法として近年、RNA interference (RNAi) が注目されている。今回われわれは、培養網膜血管内皮細胞において、ICAM-1 を標的とする small interfering RNA (siRNA) を細胞内に導入し、細胞を刺激して接着分子の発現を増強させ、ICAM-1 の発現をたんぱく質、および mRNA レベルで定量した。

B. 研究方法

蛍光色素標識 siRNA

コラーゲンコートディッシュ上でヒト網膜血管内皮細胞を培養し、スライドチャンバーにまいた。翌日 $3 \mu\text{l}$ の蛍光色素結合 siRNA ($10 \mu\text{M}$) と $2 \mu\text{l}$ の lipofectamine (1mg/ml) を用いて siRNA-lipofectamine 複合体作製し、細胞に導入した。24 時間後培養液を吸引、PBS で細胞を洗浄し、蛍光

顕微鏡で観察した。

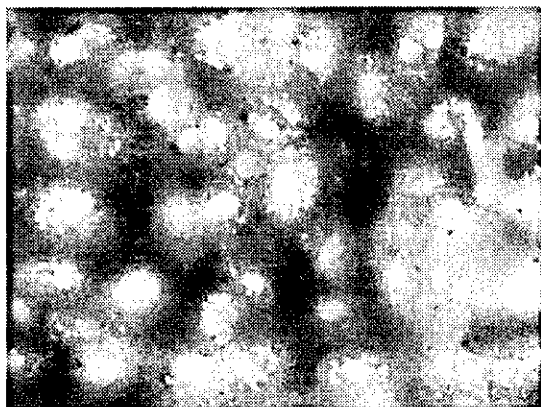


図1 蛍光色素標識 siRNA

ICAM1 siRNA 導入

培養した網膜血管内皮細胞を 24 ウェルプレートに 5×10^5 程度まいた。蛍光色素標識 siRNA と同様に、翌日 $3 \mu\text{l}$ の ICAM-1 標的 siRNA ($10 \mu\text{M}$) と $2 \mu\text{l}$ の lipofectamine (1mg/ml) を用いて siRNA-lipofectamine 複合体作製し、細胞に導入し、24 時間作用させた。同時に IL-1 β (200ng/ml) を作用させた。

たんぱく質、mRNA の発現量の定量

siRNA 導入 24 時間後、細胞を採取した。採取した細胞を溶解し human ICAM-1 ELISA kit を用いて細胞膜に存在する ICAM-1 たんぱく質の定量を行った。さらに別の細胞から total RNA を抽出し、得られた RNA の濃度を測定し、RNA 量をそろえた後、cDNA を作製、real-time PCR を行い ICAM1 mRNA 量を定量した。

C. 研究結果

蛍光色素標識 siRNA

蛍光色素標識 siRNA は 24 時間後、網膜血管内皮細胞に取り込まれ、核およびその周辺に強い蛍光が見られた。(図 1)

酵素抗体法

酵素抗体法において、ICAM1 の発現は対照

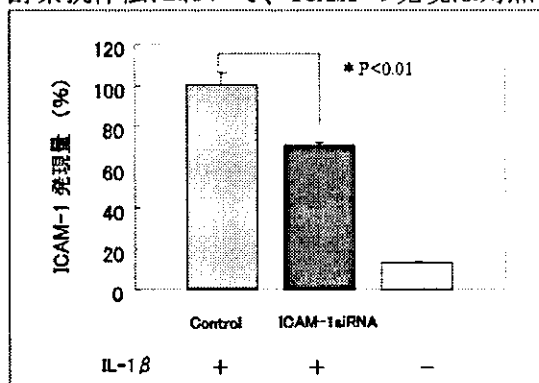


図2 たんぱく質量

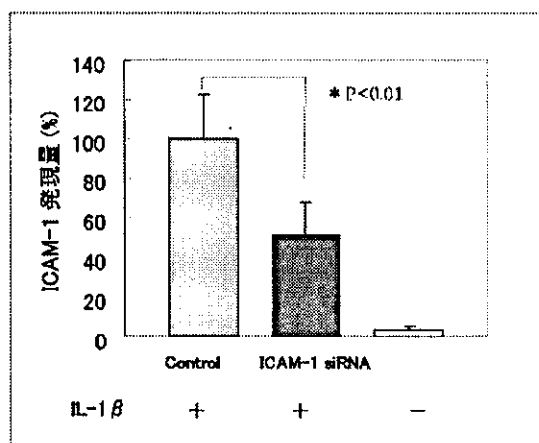


図3 mRNA 量

細胞を 100% とした時、siRNA 導入細胞 $70.2 \pm 1.84\%$ であり、有意に発現が抑制されていた (図 2)。

定量 PCR

定量 PCR においても ICAM1 の mRNA 量は対照細胞の $51.3 \pm 16.8\%$ で有意に抑制されていた (図 3)。

D. 考察

遺伝子の発現を抑制する手法は多く存在するが、核酸を用いて標的遺伝子の発現を抑制する方法には、すでに治験段階に入っているアンチセンス DNA や、リボザイムに対し、近年、siRNA が注目されている。1998

年に線虫で発見された RNAi は短い二本鎖 RNA (siRNA) によって特定の遺伝子を不活化する技術で⁴、2001 年には哺乳動物でも可能であることが報告された⁵。RNAi はアンチセンス DNA より有効性、配列特異性とも優れており、臨床への応用が期待される。本研究においても in vitro において siRNA によって血管内皮細胞の遺伝子発現が制御可能なことを示しており、血管新生を分子レベルで制御できる可能性を示唆している。in vivo においては、抑制効果は短い、細胞内へのデリバリーが困難、など実際の臨床応用には課題も多いが、この技術は先進諸国の失明原因の上位を占める加齢黄斑変性や変性近視などの脈絡膜血管新生にも応用可能と考えられ、臨床的な貢献が大きいと思われる。

E. 結論

siRNA は培養網膜血管内皮細胞において ICAM1 遺伝子発現制御が可能であり、網脈絡膜血管新生や網膜虚血障害に対する新しい治療法として今後期待できると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato A, et al. Feasibility of drug delivery to the posterior pole of the rabbit eye with an episcleral implant. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45: 238-44, 2004

2. 学会発表

1. 加藤亜紀 他: siRNA による網膜血管内皮細胞の ICAM-1 発現制御 第 109 回日本眼科学会総会, 京都市, 2005 (予定)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

1. 参考文献

1. Shen WY, et al. Expression of cell adhesion molecules and vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularisation in the rat. *Br J Ophthalmol.* 82: 1063-1071, 1998
2. Sakurai E, et al. Targeted disruption of the CD18 or ICAM-1 gene inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44: 2743-2749, 2003
3. Yeh DC, et al. Expression of leukocyte adhesion molecules in human subfoveal choroidal neovascular membranes treated with and without photodynamic therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45: 2368-2373, 2004
4. Fire A, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 19:391:806-811, 1998

5.Elbashir SM, et al. Duplexes of
21-nucleotide RNAs mediate RNA
interference in cultured mammalian
cells. *Nature* 24; 411:428429, 2001

27. 眼球組織に発現する血管新生抑制因子 Chondromodulin-I (ChM-I) に 相同性を有する新規膜貫通蛋白 Tenomodulin (TeM) の C末端機能ドメインによる血管新生抑制作用

大島佑介^{1) 3)}、田代 文²⁾、宮崎純一²⁾、宿南知佐³⁾、開 祐司³⁾、田野保雄¹⁾

(¹⁾ 大阪大、²⁾ 大阪大幹細胞制御医学、³⁾ 京都大再生医科学研究所)

研究要旨 軟骨および眼球組織に特異的に発現する血管新生抑制因子 Chondromodulin-I (ChM-I) のC末端機能ドメインに高い相同性を有する新規の膜貫通蛋白質 Tenomodulin (TeM) が腱、靭帯のみならず、眼球組織では角膜、強膜などの血管に乏しい強靭結合組織に特異的に発現することを確認した。さらに、TeM および ChM-I の機能ドメインにおける血管新生抑制ならびに抗腫瘍効果を調べる目的で、ヒトTeM のC末端領域 (Glu²⁰² - Val³¹⁷) あるいはヒトChM-I (Glu²¹⁵ - Val³³⁴) を発現分泌するウイルスベクターを構築し、血管内皮細胞ならびにメラノーマ腫瘍株に遺伝子導入を行った。*in vitro*では、VEGF 刺激下におけるヒト網膜血管内皮細胞ならびにヒト臍帯静脈血管内皮細胞のDNA合成能と管腔形成能を測定し、また、*in vivo*では、メラノーマ腫瘍株によるマウス皮下腫瘍形成の経時的変化を定量的に評価した。TeM (Glu²⁰² - Val³¹⁷) あるいはChM-I (Glu²¹⁵ - Val³³⁴) を産生する血管内皮細胞では、DNA合成能が抑制され、管腔形成能が著しく阻害された。さらに、腫瘍形成実験において、TeM (Glu²⁰² - Val³¹⁷) あるいはChM-I (Glu²¹⁵ - Val³³⁴) を恒常的に産生する腫瘍株注入群では、コントロール群に比較して、栄養血管の侵入抑制を介した腫瘍塊の増殖阻害効果が確認された。TeM はChM-Iの機能ドメインと相同性を有するC末端領域を介して、血管新生を抑制することが示唆された。

A. 研究目的

近年の分子生物学の研究の進歩により、様々な新生血管関連の網膜硝子体疾患には血管新生増殖因子と抑制因子が深く関与していることが明らかになった。眼内に生理的に存在する血管新生増殖因子として、血管内皮細胞成長因子 (VEGF) や血小板増殖因子 (PDGF) などが知られているが、生理的に存在する血管新生抑制因子として、色素上皮由来因子 (PEDF) の他、知るところが少ない。本研究では、軟骨および眼球組織に特異的に発現する血管新生抑制因子 Chondromodulin-I (ChM-I) のC末端機能ド

メインに高い相同性を有する新規の膜貫通蛋白質 Tenomodulin (TeM)の眼球組織における発現ならびにC末端機能ドメインの生理活性について検討した。

B. 研究方法

胎児ならびに生後4週齢マウスにおけるTeMの遺伝子発現ならびに蛋白発現をノーザンブロット法、ウェスタンブロット法、*in situ hybridization*法ならびに免疫組織染色法にて確認した。また、TeM および ChM-I の機能ドメインにおける血管新生抑制ならびに抗腫瘍効果を調べる目的で、ヒトTeM

のC末端領域 (Glu²⁰² - Val³¹⁷) あるいはヒトChM-I (Glu²¹⁵ - Val³³⁴) を発現分泌するウイルスベクターを構築し、血管内皮細胞ならびにメラノーマ腫瘍株に遺伝子導入を行い、*in vitro* では、VEGF 刺激下におけるヒト網膜血管内皮細胞ならびにヒト臍帯静脈血管内皮細胞の DNA 合成能と管腔形成能を測定し、また、*in vivo* では、メラノーマ腫瘍株によるマウス皮下腫瘍形成の経時的変化を定量的に評価した。

C. 研究結果

胎児眼球では、TeM は睫組織である外眼筋附着部、強角膜、水晶体線維細胞に遺伝子発現しており、免疫組織染色により水晶体線維細胞と網膜内層ならびに網膜色素上皮層にタンパクが局在することが判明した (図1)。

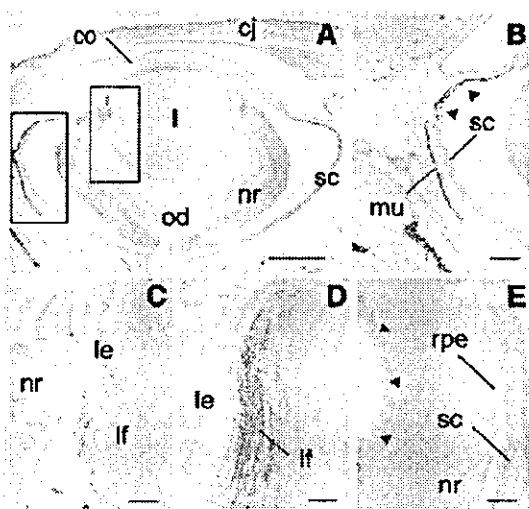


図1 A-C: *in situ* hybridization, D, E: 免疫組織染色法.

生後4週齢マウスにおける遺伝子発現の組織分布をみると、*in situ* hybridization 法により TeM 遺伝子は角膜実質、網膜神経節細胞、網膜色素上皮細胞層ならびに強膜に発

現することが判明し (図2)、さらに眼球の組織抽出物による western blot の結果から、TeM タンパクは糖鎖修飾の違いから 40kD と 45kD に検出され、主に膜型タンパク質と存在することが明らかになった。

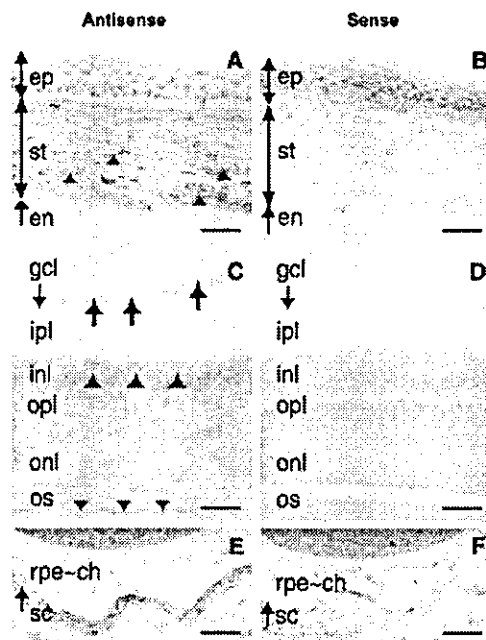


図2 4週齢マウスにおける TeM 遺伝子発現

TeM (Glu²⁰² - Val³¹⁷) あるいは ChM-I (Glu²¹⁵ - Val³³⁴) を産生する血管内皮細胞では、DNA 合成能が抑制され、管腔形成能が著しく阻害された (図3)。

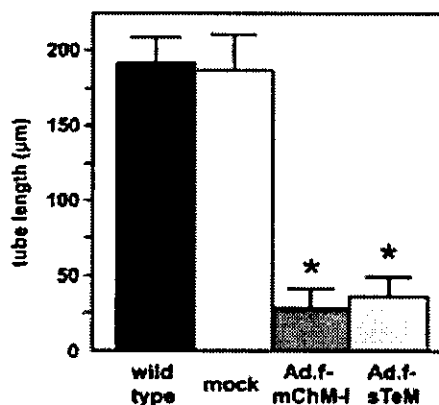


図3 管腔形成の定量測定 (*: P<0.05)

さらに、腫瘍形成実験において、TeM (Glu²⁰² - Val³¹⁷) あるいは ChM-I (Glu²¹⁵ - Val³³⁴) を恒常的に産生する腫瘍株注入群では、コントロール群に比較して、栄養血管の侵入抑制を介した腫瘍塊の増殖阻害効果が確認された。(図4, 5)

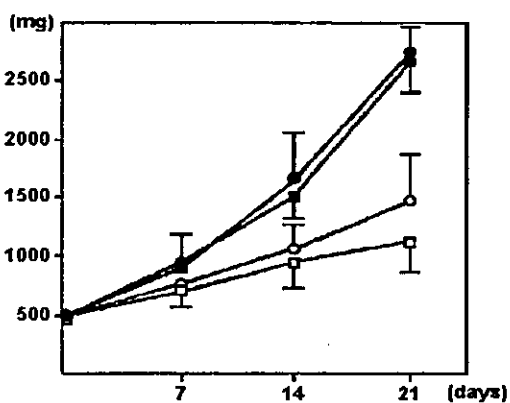
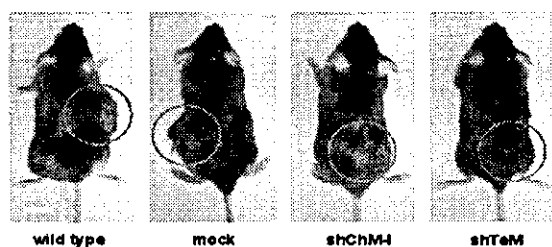


図4 腫瘍形成の定量測定 (*: P<0.05)

D. 考察

ChM-I に高い相同性を有する TeM の遺伝子発現は、全身の腱・靭帯組織のみならず、眼球では、角膜・強膜などの血管に乏しい強靭結合組織、さらに、水晶体や網膜神経節細胞層にも認められた。TeM は ChM-I の機能ドメインと相同性を有する C 末端領域を介して、血管新生を抑制することが示唆された。

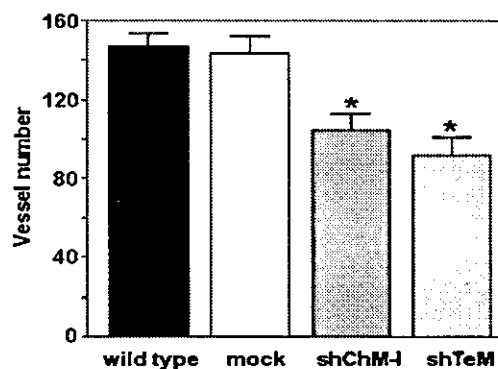
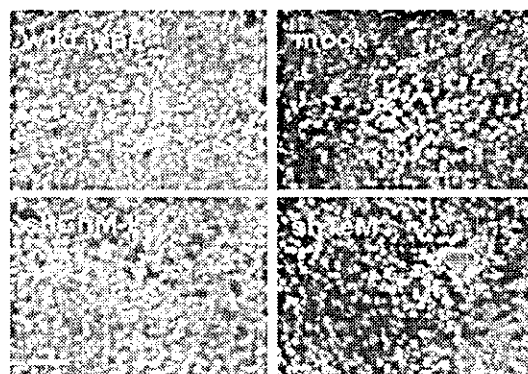


図5 腫瘍塊内の侵入血管の定量測定 (*: P<0.05)

E. 結論

TeM は ChM-I に共通した血管新生抑制に関わる機能ドメイン構造を有し、胎生期より全身の無血管組織に発現することから、生体形成における生理的な血管侵入バリアーとして機能することが予測される。眼球における両者の発現パターンの特異性から、TeM と ChM-I は相補的に眼球的透明性の維持に深く関わることを示唆され、糖尿病性網膜症などの血管新生疾患の病態との関わりを解明、さらには、新たな治療法への応用の可能性が期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Oshima Y, et al. Expression and anti-angiogenic function analysis of Tenomodulin, a tendon and eye specifically expressed glycoprotein sharing homology with Chondromodulin-I. Annual Meeting of the Association of Research in Vision & Ophthalmology (ARVO) Fort Lauderdale, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

1. 参考文献

1. Oshima Y, Sato K, Tashiro F, Miyazaki JI, Nishida K, Hiraki Y, Tano Y, Shukunami C. Anti-angiogenic action of the C-terminal domain of tenomodulin that shares homology with chondromodulin-I. *J Cell Sci*;117: 2731-2744, 2004

28. 血管新生における ephrinB2/Eph シグナル経路の役割

勝田英人¹⁾²⁾、植村明嘉¹⁾²⁾、桐生純一¹⁾、西川伸一²⁾、吉村長久¹⁾

(¹⁾京都大、²⁾理研神戸)

研究要旨 膜結合型のリガンド/受容体である ephrinB2/Eph は双方向シグナル伝達が特徴的で、細胞同士の反発作用を介して神経系の軸索誘導や胎節形成などに役立っている。近年、血管系の発生においてもそれらが重要な役割を果たしていることが示唆されているが、それらの具体的な機能はまだ未解明の部分が多い。そこで我々はマウス新生児網膜および成体マウス角膜新生血管モデルの免疫組織化学的解析を行い、さらに ephrinB2 条件的過剰発現マウスを用いた機能的解析を試みた。網膜・角膜のいずれにおいても ephrinB2 および EphB4 の発現パターンは血管新生の進行に伴いダイナミックに変化した。ephrinB2 の異所性過剰発現による影響は血管新生の初期段階では明らかでなかったが、定常状態にある血管網においては異常な形態変化が惹起された。この結果から、ephrinB2 は血管網が形成された後の血流動態を反映して可塑的に誘導され、定常状態にある血管において血管網の恒常性維持に関わっていると考えられた。本研究により、血管新生に関わる分子のメカニズムの一部を解明することができたと考えられる。

A. 研究目的

血管新生は、生体各組織へ酸素や栄養分の供給を行う「血管」が新たに形成される過程であり、様々な生理的あるいは病理的局面において重要な意味を持っている。この研究の目的は、血管新生、特に高次のネットワーク形成に関与する分子の機構を明らかにすることで、ひいては病理的局面においてそれを制御し、種々の疾患に対する新たな治療の開発に役立てようとするものである。

ephrinB2 は膜結合型のタンパクで、同じく膜結合型タンパクである Eph 受容体に結合し細胞間シグナル伝達を行う。受容体側だけでなくリガンド側にも逆方向のシグナルが発生するという双方向シグナル伝達の特徴的で、細胞同士が接触した際の反発作用

を介して神経系の軸索誘導や胎節形成に役立っていることなどが報告されている。近年、血管系において動脈に ephrinB2 が、静脈に EphB4 がそれぞれ選択的に発現していることが示され、それらのノックアウトマウスの解析から血管発生においても重要な役割を果たしていることが示唆されているが、未だその具体的な機能を解明するには至っていない。そこで我々は血管新生におけるそれらの役割を明らかにすべく解析を行った。

B. 研究方法

生理的新生血管のモデルとしてマウス新生児の網膜を、病理的新生血管は成体マウスの角膜新生血管モデルを用いて解析を行った。主にホールマウント免疫染色法を用い