

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	石羽澤 明弘
<b>学位論文題目</b>			
<b>Effects of Shear Stress on the Gene Expressions of Endothelial Nitric Oxide Synthase, Endothelin-1, and Thrombomodulin in Human Retinal Microvascular Endothelial Cells</b>			
(シェアストレスによるヒト網膜微小血管内皮細胞における遺伝子発現への効果: 特に一酸化窒素合成酵素、エンドセリン-1、トロンボモジュリンについて)			
<b>共著者名</b>			
長岡 泰司、高橋 龍尚、山本 希美子、安藤 譲二、神谷 瞭、吉田 晃敏			
<i>Invest Ophthalmol Vis Sci.</i> 2011 Oct 31;52(11):8496-504.			
<b>研究目的</b>			
<p>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<sup>1)</sup>。近年我々は、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/cm<sup>2</sup>(収縮期約 100 dyne/cm<sup>2</sup>、拡張期約 30 dyne/cm<sup>2</sup>)と、網膜血管には大動脈(15 dyne/cm<sup>2</sup>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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>。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。本研究では、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、すなわち血管緊張調節と抗血栓性に関わる遺伝子の発現を検討した。</p>			

## 材 料 ・ 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% CO<sub>2</sub> 下で培養した。その後、細胞密度  $2.0 \times 10^4 / \text{cm}^2$  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。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。

$$(1) \text{ずり速度} (\dot{\gamma}, 1/\text{秒}): \dot{\gamma} = 6\dot{Q} / (a^2b) \quad [\dot{Q}: \text{流速} (\text{ml}/\text{秒}), a \cdot b: \text{チャンバーの高さと幅} (\text{cm})]$$

$$(2) \text{シェアストレス} (\tau, \text{dyne}/\text{cm}^2): \tau = \mu \cdot \dot{\gamma} \quad [\mu: \text{粘性} (\text{poise})]$$

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 ( $\mu$ ) と流速 ( $\dot{Q}$ ) を変化させて、0、1.5、6、15、30、60、100 dyne/cm<sup>2</sup> のシェアストレスをそれぞれ 24 時間負荷、または 60 dyne/cm<sup>2</sup> のシェアストレスを 0、1、3、6、12、24、48 時間それぞれ負荷した。

### 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、一酸化窒素合成酵素 (eNOS)、エンドセリン-1 (ET-1)、トロンボモジュリン (TM) のそれぞれの遺伝子発現を定量化した。内部標準としてグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) を用い、GAPDH に対する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。

## 成 績

### 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/cm<sup>2</sup> 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/cm<sup>2</sup> まで増加し、angle difference も 15 dyne/cm<sup>2</sup> まで減少したが、30 dyne/cm<sup>2</sup> 以上では 15 dyne/cm<sup>2</sup> と同等の変化であった。60 dyne/cm<sup>2</sup> 負荷での時間的変化は 6 時間以上で有意な細胞の伸展と配向を認めた。

## 2. シェアストレスの大きさによる eNOS・ET-1・TM mRNA の発現変化

2種類の培養液、M199(低粘度)と5%デキストラン含有 M199(高粘度)を用いて、0 から 100 dyne/cm<sup>2</sup> までのシェアストレスを 24 時間負荷した。横軸をシェアストレス、縦軸を各 mRNA 発現量でプロットすると、いずれの遺伝子においても、低粘度群と高粘度群は別々の近似曲線にはならず、単一の曲線または直線で近似された。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/cm<sup>2</sup> でほぼ飽和した。一方で ET-1 mRNA の発現は、低いシェアストレス(1.5 dyne/cm<sup>2</sup>)で有意に増加し、30 dyne/cm<sup>2</sup> 以上で有意に減少した。TM mRNA 発現は 15 dyne/cm<sup>2</sup> 以上で有意に増加し、100 dyne/cm<sup>2</sup> まで直線的に増加した。

## 3. シェアストレス負荷による eNOS・ET-1・TM mRNA の時間的発現変化

網膜細動脈レベルのシェアストレス、60 dyne/cm<sup>2</sup> を 0 から 48 時間負荷した。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。

## 考 案

本研究により、網膜血管内皮細胞(HRMECs)が層流性のシェアストレス負荷に反応し、形態と機能を変化させることが明らかとなった。HRMECs はシェアストレスの大きさ、負荷時間に依存して流れの方向に伸展、配向した。15 dyne/cm<sup>2</sup> では HRMECs はほぼ流れに平行となり、それ以上のシェアストレス負荷でも同様の変化を示した。この結果から、100 dyne/cm<sup>2</sup> といった高いシェアストレスにおいても、HRMECs では流れの方向と強さを感知し、その形態を変化させることが示唆された。

本研究では、流れ負荷による HRMECs の遺伝子発現変化を検討する上で、流れの効果として、物理的的刺激であるシェアストレスの効果と、灌流液中の生理活性物質の細胞への到達量が増える効果の2つを考慮した。灌流液の粘性を一定にし、流速のみを変化させて流れを負荷すると、この2つの効果を鑑別することは困難である。そこで本研究では、低粘度と高粘度の2種類の灌流液を用い、粘性と流速を変化させて検討を行った。横軸をシェアストレス、縦軸を各 mRNA 発現量でプロットすると、eNOS、ET-1、TM のいずれの遺伝子においても、低粘度群と高粘度群は別々の近似曲線にはならず、一本の曲線または直線で近似された。この結果から、HRMECs でのこれらの遺伝子の発現変化は、シェアストレスの力学的強度に依存して変化していることが示唆された。

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/cm<sup>2</sup>)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では、網膜血管内皮は血管拡張性、抗血栓性に作用していると考えられた。我々は2型糖尿病患者の臨床研究において、発症前・早期の網膜症患者で網膜血流、ずり速度が低下していることを報告しており<sup>3)</sup>、糖尿病状態では網膜血管のシェアストレスがすでに低下している可能性が考えられる。このシェアストレスの変化が糖尿病網膜症の発症、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。




## 結 論

1. 網膜血管内皮細胞は力学的応力であるシェアストレスに反応し、その大きさ、時間に依存して流れの方向に伸展、配向する。
2. 網膜血管内皮細胞の eNOS と TM 遺伝子発現は、シェアストレスの大きさ、時間に依存して増加する。
3. 網膜血管内皮細胞の ET-1 遺伝子発現は、低いシェアストレスで増加し、一方で高いシェアストレスでは減少する。
4. 以上の結果から、網膜細動脈レベルの生理的なシェアストレスでは、網膜血管内皮細胞は血管拡張性に働き、また抗血栓性にも寄与している可能性が示唆された。

## 引 用 文 献

1. Ando J, Yamamoto K. Vascular mechanobiology: endothelial cell responses to fluid shear stress. *Circ J* 2009;73:1983-1992.
2. Nagaoka T, Yoshida A. Noninvasive evaluation of wall shear stress on retinal microcirculation in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:1113-1119.
3. Nagaoka T, Sato E, Takahashi A, Yokota H, Sogawa K, Yoshida A. Impaired retinal circulation in patients with type 2 diabetes mellitus: retinal laser Doppler velocimetry study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:6729-6734.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	石羽澤 明弘
<p>審査委員長 <u>新越 洋</u> </p> <p>審査委員 <u>高草木 薫</u> </p> <p>審査委員 <u>籠川 浩幸</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p><b>Effects of Shear Stress on the Gene Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase, Endothelin-1, and Thrombomodulin in Human Retinal Microvascular Endothelial Cells (シェアストレスによるヒト網膜微小血管内皮細胞における遺伝子発現への効果：特に一酸化窒素合成酵素、エンドセリン-1、トロンボモジュリンについて)</b></p>			
<p>血液循環障害を来す疾患は、高齢化社会で益々重要性が増している。循環障害を規定するファクターは種々あるが、近年血管内皮細胞へのシェアストレスの分子機序が注目されてきているが、その詳細は明らかでない。眼科学領域においては人の失明の重要な原因としてあげられている。本学眼科学講座に於いて、網膜細動脈におけるシェアストレスを測定した結果、他の全身血管に比較してシェアストレスが高いことを報告している。石羽澤氏は、この点に注目し、糖尿病性網膜症や血液循環障害の分子機序として血管内皮細胞へのシェアストレスに着目し解析を進めた。In vitro 培養系で網膜血管内非細胞にシェアストレスを与えると、そのストレスに依存して血管内非細胞の形態が in vivo を mimic するように変化し、その変化がほぼ全身血管系のシェアストレスの垂たちまできるとプラトーに達することを見いだした。一方で、が一酸化窒素合成酵素、エンドセリン-1、トロンボモジュリンの遺伝子発現を解析すると、その発現レベルは網膜細動</p>			

脈のシェストレスに相当する高い値までストレス値に依存的に変化することを明らかにした。この結果は、網膜細動脈が高いシェストレスを恒常的に受けていることの意義を分子レベルで見いだした世界で初めての結果として高く評価される。糖尿病性網膜症をはじめとする網膜循環疾患ではシェストレスが変化することが報告されているが、全身血液循環における正常のシェアストレスのレベル程度までの変化であり、その変化の意義がこれまではっきりしていなかったが、本研究結果で初めて分子レベルで高いシェストレスの変化に大きな意義があることが明らかになった点できわめて意義が高い。また、石羽澤氏は、実験手法を熟視し、世界スタンダードな手技で実験を試行するとともに、研究の意義をきわめてよく理解し、すでに発展系の実験を介しており、本学の学位として価値が高い研究と評価された。