

# 木下 博文 論文内容の要旨

## 主 論 文

Cyclic Stretch and Hypertension Increase Retinal Succinate: Potential Mechanisms for Exacerbation of Ocular Neovascularization by Mechanical Stress

伸展刺激と高血圧による網膜内コハク酸の増加:機械的ストレスによる眼内血管新生増悪の機序

木下博文、鈴間 潔、真木俊英、前川有紀、松本牧子、草野真央、上松聖典、北岡 隆

Investigative Ophthalmology & Visual Science • Vol. 55 No. 7 4320-4326, 2014

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
主任指導教員: 北岡 隆教授

### 緒 言

現在血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) 阻害剤が、眼内血管新生の病態に対し臨床応用されているが、2008年に網膜血管新生へのコハク酸の関与を示唆する論文が報告された。それを受け、我々は増殖糖尿病網膜症の硝子体中でコハク酸濃度が増加していることを以前報告したが、さらに本研究では高血圧をモデルとして細胞や組織への伸展刺激による細胞内コハク酸の動態を検討した。

### 対象と方法

ヒト網膜色素上皮細胞である ARPE19 を、コラーゲン I でコーティングされた 6 ウェルのフレキシブルボトム培養プレートに培養し、コンピューター制御による機械的伸展刺激を 0~24 時間、0~15% 振幅で加え、細胞内コハク酸濃度を F キットコハク酸または高速液体クロマトグラフ質量分析法にて測定した。さらに酵素阻害剤を投与して機械的伸展刺激を加えることにより、コハク酸の細胞内伝達経路を推測した。動物実験では、12 週齢の SHR ラット (高血圧モデル) と WKY ラット (正常血圧モデル) を用いて、1 週間環境に慣らしたのちに血圧を測定し、さらに 1 週間後に SHR ラットの 100 mg/kg/day カプトプリル投与群と非投与群、WKY ラット群の血圧と網膜硝子体中のコハク酸濃度を測定した。

## 結 果

まず、最大振幅である 15%振幅で機械的伸展刺激の時間を 0~24 時間で検討したところ、細胞内コハク酸濃度は 2 時間 ;  $38.0 \pm 7.0$  mg (コハク酸) /g (total protein) 以上で対照 (機械的伸展刺激なし ;  $18.2 \pm 8.2$  mg/g) と比較し、有意な増加を認めた ( $P < 0.05$  Dunnett test)。この結果を踏まえ、2 時間の機械的伸展刺激で振幅を 0~15%で検討したところ、振幅 10% ;  $25.3 \pm 5.7$  mg/g 以上で、対照と比較し有意に増加しており ( $P < 0.05$  Dunnett test)、時間・振幅依存性に機械的伸展刺激により細胞内コハク酸濃度が増加していることが確認できた。また、クエン酸回路においてコハク酸の次の代謝産物であるフマル酸も検討したところ、同様に機械的伸展刺激により細胞内フマル酸濃度は増加していた。

さらに Ca キレーターである BAPTA/AM の前投与により、機械的伸展刺激後の細胞内コハク酸濃度は  $17.2 \pm 6.2$  mg/g と有意な減少を認めた ( $P < 0.01$  Tukey test)。また既報同様に機械的伸展刺激による VEGF の増加も確認できた。

カプトプリル投与前の SHR ラットの収縮期血圧 ;  $187.7 \pm 13.8$  mmHg は WKY ラット ;  $132.8 \pm 9$  mmHg と比較し有意に上昇しており ( $P < 0.01$  Tukey test)、1 週間 100 mg/kg/day カプトプリル投与群の収縮期血圧 ;  $165.4 \pm 35.4$  mmHg は、非投与群 ;  $204.7 \pm 24.1$  mmHg と比較し有意に減少していた ( $P < 0.05$  Tukey test)。カプトプリル非投与 SHR ラットの網膜硝子体中コハク酸濃度は  $16.5 \pm 3.3$  mg/g で、WKY ラット ;  $12.7 \pm 3.3$  mg/g やカプトプリル投与 SHR ラット ;  $12.4 \pm 1.7$  mg/g と比較し有意に増加していた ( $P < 0.05$  Tukey test)。同様にカプトプリル非投与 SHR ラットの網膜硝子体中フマル酸濃度も WKY ラットと比較し、 $6.0 \pm 6.0$ -fold と有意に増加していた ( $P < 0.05$  Tukey test)。

## 考 察

機械的伸展刺激は近年、遺伝子発現やタンパク合成、細胞の分化などに重要な因子であることがわかってきている。さらに VEGF は腫瘍や虚血、機械的伸展刺激時に血管新生に重要な役割を持つが、コハク酸も眼内血管新生に関与している可能性が示唆されている。眼内血管新生をきたす代表疾患として糖尿病網膜症や加齢黄斑変性が挙げられるが、それ以外にも高血圧網膜症や高血圧に関連した網膜静脈閉塞症といった疾患も挙げられる。そのため、今研究では高血圧からの伸展刺激を模した形で、細胞には機械的伸展刺激を加えて、動物は高血圧モデルラットを用いてコハク酸濃度を検討した。これまで虚血時におけるコハク酸増加の報告はあるが、機械的伸展刺激によるコハク酸増加の報告は我々が知る限りなく、今研究により時間・振幅依存性に細胞内コハク酸濃度が増加し、さらにはその機械的伸展刺激によるコハク酸増加は Ca 依存性であることが示唆された。今後の高血圧に伴う網膜血管病変のメカニズム解明につながるものと期待する。