



High Intraocular Concentration of Fibrinogen Regulates Retinal Function Via the ICAM-1 Pathway

曾谷，育之

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2025-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第9174号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100496455>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

High Intraocular Concentration of Fibrinogen Regulates Retinal Function Via the ICAM-1 Pathway

高濃度フィブリノーゲンによる ICAM-1 経路を介した網膜組織傷害の検討

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻眼科学 中村誠教授)

曾谷 育之

糖尿病性網膜症 (diabetic retinopathy, DR) は糖尿病患者における重要な合併症の一つであり、網膜虚血や黄斑浮腫を引き起こすことで深刻な視機能障害をきたす疾患である。特に糖尿病性黄斑浮腫 (diabetic macular edema, DME) は、網膜血管の透過性が増加することにより、血清成分が網膜内に蓄積して発症する病態である。現在は DME に対して抗 VEGF 薬硝子体注射、ステロイド局所注射、網膜光凝固及び硝子体手術といった治療が行われているが、これらの治療がすべての症例に効果を示すわけではなく、治療抵抗性の病態が一定の割合で存在する。我々は以前 DME における囊胞様黄斑浮腫 (cystoid macular edema, CME) の囊胞様腔内に存在するフィブリノーゲン塊摘出が、視機能改善および解剖学的改善に有効であることを報告した。このような背景を踏まえ、本研究では DR および DME の病態におけるフィブリノーゲンの役割を解明し、新たな治療ターゲットの可能性を検討することを目的とした。

フィブリノーゲンは血液凝固や炎症反応における中心的な役割を担う血漿タンパク質である。その血中濃度は糖尿病患者や DR 患者において有意に増加することが報告されており、糖尿病性大血管症や微小血管症との関連が指摘されている。そして、硝子体や網膜内といった血管外組織にも漏出し、異常な蓄積を示すことも知られている。血管外組織に漏出したフィブリノーゲンが脳神経組織においてアストロサイトを活性化させ、炎症性サイトカインを産生することで神経障害を引き起こす可能性が指摘されていることから、網膜においても類似したメカニズムが存在するのではないかと考えられる。しかしながら、フィブリノーゲンが網膜機能に具体的にどのような影響を及ぼすのか、またその作用がどの経路を介して発現するのかについては十分に解明されていない。

そこで、本研究では、正常マウスを用い高濃度のフィブリノーゲンが網膜機能に及ぼす影響を解析した。実験は、正常マウスに対し以下の 3 つの条件で硝子体内注射を行い、それぞれの網膜における変化を比較検討した。具体的には、(1) リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、(2) 高濃度フィブリノーゲン (40 mg/mL)、(3) 高濃度フィブリノーゲンと抗 ICAM-1 抗体の混合液をそれぞれ硝子体内注射し、免疫蛍光染色、ウェスタンブロッティング、および網膜電図 (electroretinography, ERG) を用いて、網膜の構造的および機能的変化を評価した。

結果として、免疫蛍光染色、ウェスタンブロッティングのいずれにおいても、高濃度フィブリノーゲンを注射した群では、神経節細胞のマーカーである TUBB3 の発現が顕著に低下し、グリア細胞のマーカーである GFAP および Iba1 の発現が有意に増加した。免疫蛍光染色では、TUBB3 の発現低下が網膜

神経節細胞における損傷を示唆しており、一方で GFAP や Iba1 の発現増加はミューラー細胞およびミクログリアの活性化を示唆する結果と考えられた。さらに、ウェスタンブロッティングの結果は、これらのタンパク質発現変化が統計学的に有意であることを示していた。特に、抗 ICAM-1 抗体を併用した群では、これらの変化が有意に軽減されており、ICAM-1 を介した経路がフィブリノーゲンによる網膜障害の主要なメカニズムである可能性が高いことが示唆された。

加えて、ERG 解析では、高濃度フィブリノーゲン群において positive scotopic threshold response (p-STR) および b 波の振幅が有意に低下しており、網膜機能の低下が確認された。これらの変化は、網膜内の神経活動の抑制および網膜回路全体への影響を反映していると考えられる。特に p-STR の低下は、マウスにおける網膜神経節細胞の機能障害を直接的に示すものであり、b 波の低下は双極細胞や水平細胞といった中間神経層への影響を示している。一方で、抗 ICAM-1 抗体を併用した群では、これらの ERG 波形の振幅の低下が有意に改善しており、抗 ICAM-1 抗体がフィブリノーゲンによる網膜機能障害を効果的に軽減する可能性が示された。

さらに、ウェスタンブロッティングにより細胞内蛋白質の発現量を検討した結果、高濃度フィブリノーゲン群では ICAM-1 を介して ERK1 のリン酸化および AP-1 の活性化が誘導されていることが明らかになった。ICAM-1 は ERK1 や AP1 の変化を介した細胞内伝達経路により、各種炎症性サイトカインの産生を誘導し周囲組織への炎症発生に関与することが知られている。本研究の結果は、ICAM-1/fibrinogen 細胞内伝達経路が炎症性サイトカインの産生を引き起こし、それに伴う炎症が網膜神経細胞を損傷するというメカニズムを支持するものである。特に、アストロサイトやミクログリアの活性化により、IL-1 β や IL-6 などの炎症性サイトカインが産生され、それが神経細胞死を引き起こすプロセスが示唆された。また、抗 ICAM-1 抗体の投与によりこれらのシグナル伝達が抑制されることから、ICAM-1 がフィブリノーゲンの関与する網膜障害性において重要な役割を果たしていることが示唆された。

ICAM-1 は、血管内皮細胞や一部の免疫細胞表面に発現する接着分子であり、炎症反応の調節に重要な役割を担う。網膜においては、網膜血管内皮細胞、ミューラー細胞、ミクログリア細胞に発現することが報告されている。本研究の結果から、フィブリノーゲンが ICAM-1 を介してミューラー細胞を活性化させ、炎症性サイトカインの増加を引き起こし、周囲神経組織障害を引き起こすプロセスが示唆された。この過程で特に重要なのは、ERK1 および AP-1 の活性化であり、これらが炎症性サイトカインの産生をさらに促進するフィードバックループを形成

している可能性がある。このような ICAM-1 を中心とした炎症反応は、網膜組織の損傷を進行させる主要な要因として機能している可能性が高い。

これらの結果から、高濃度のフィブリノーゲンが ICAM-1 を介した炎症シグナルを活性化させ、網膜神経細胞に有害な影響を与えることが示唆された。この発見は、DR や DME の病態形成においてフィブリノーゲンが重要な役割を果たしていることを示す可能性がある。また、フィブリノーゲン/ICAM-1 経路を標的とした治療法が、DR や治療抵抗性 DME において有望な治療選択肢となる可能性がある。さらに、ICAM-1 に加え、その下流シグナルである ERK1 や AP-1 も新しい治療ターゲットとして注目される。

本研究の意義は、DR および DME の病態解明に寄与するだけでなく、新たな治療戦略の基盤を提供する点にある。今後は、より臨床に近い糖尿病モデルを用いた研究や、他の関連疾患におけるフィブリノーゲン/ICAM-1 経路の役割を検証することで、この研究の成果をさらに発展させることが期待される。これらの知見は、網膜疾患の治療において新しいアプローチを提供し視機能回復を目指す医療に貢献する可能性が高い。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3483 号	氏 名	曾 谷 育 之
論 文 題 目 Title of Dissertation	高濃度フィブリノーゲンによる ICAM-1 経路を介した網膜組織傷害の検討 High Intraocular Concentration of Fibrinogen Regulates Retinal Function Via the ICAM-1 Pathway		
審 査 委 員 Examiner	主 査 篠 原 正 和 Chief Examiner 副 査 青 井 貴 之 Vice-examiner 副 査 堀 江 隆 也 Vice-examiner		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

【背景・目的】

糖尿病性網膜症 (diabetic retinopathy, DR) は糖尿病患者における重要な合併症の一つであり、網膜虚血や黄斑浮腫を引き起こすことで深刻な視機能障害をきたす疾患である。特に糖尿病性黄斑浮腫 (diabetic macular edema, DME) は、網膜血管の透過性が増加することにより、血清成分が網膜内に蓄積して発症する病態である。現在は DME に対して抗 VEGF 薬硝子体注射、ステロイド局所注射、網膜光凝固及び硝子体手術といった治療が行われているが、これらの治療がすべての症例に効果を示すわけではなく、治療抵抗性の病態が一定の割合で存在する。我々は以前 DME における嚢胞様黄斑浮腫 (cystoid macular edema, CME) の嚢胞様腔内に存在するフィブリノーゲン塊摘出が、視機能改善および解剖学的改善に有効であることを報告した。このような背景を踏まえ、本研究では DR および DME の病態におけるフィブリノーゲンの役割を解明し、新たな治療ターゲットの可能性を検討することを目的とした。

【方法・結果】

本研究では、正常マウスを用い高濃度のフィブリノーゲンが網膜機能に及ぼす影響を解析した。実験は、正常マウスに対し以下の 3 つの条件で硝子体内注射を行い、それぞれの網膜における変化を比較検討した。具体的には、(1) リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、(2) 高濃度フィブリノーゲン (40mg/mL)、(3) 高濃度フィブリノーゲンと抗 ICAM-1 抗体の混合液をそれぞれ硝子体内注射し、免疫蛍光染色、ウェスタンブロッティング、および網膜電図 (electroretinography, ERG) を用いて、網膜の構造的および機能的変化を評価した。

結果として、免疫蛍光染色、ウェスタンブロッティングのいずれにおいても、高濃度フィブリノーゲンを注射した群では、神経節細胞のマーカーである TUBB3 の発現が顕著に低下し、グリア細胞のマーカーである GFAP および Iba1 の発現が有意に増加した。免疫蛍光染色では、TUBB3 の発現低下が網膜神経節細胞における損傷を示唆しており、一方で GFAP や Iba1 の発現増加はミューラー細胞およびミクログリアの活性化を示唆する結果と考えられた。さらに、ウェスタンブロッティングの結果は、これらのタンパク質発現変化が統計学的に有意であることを示していた。特に、抗 ICAM-1 抗体を併用した群では、これらの変化が有意に軽減されており、ICAM-1 を介した経路がフィブリノーゲンによる網膜障害の主要なメカニズムである可能性が高いことが示唆された。

加えて、ERG 解析では、高濃度フィブリノーゲン群において positive scotopic threshold response (p-STR) および b 波の振幅が有意に低下しており、網膜機能の低下が確認された。これらの変化は、網膜内の神経活動の抑制および網膜回路全体への影響を反映していると考えられる。特に p-STR の低下は、マウスにおける網膜神経節細胞の機能障害を直接的に示すものであり、b 波の低下は双極細胞や水平細胞といった中間神経層への影響を示している。一方で、抗 ICAM-1 抗体を併用した群では、これらの ERG 波形の振幅の低下が有意に改善しており、抗 ICAM-1 抗体が網膜機能障害を効果的に軽減する可能性が示された。

さらにウェスタンブロッティングにより細胞内蛋白質の発現量を検討した結果、高濃度フィブリノーゲン群では ICAM-1 を介して ERK1 のリン酸化および AP-1 の活性化が誘導されていることが明らかになった。ICAM-1 は ERK1 や AP1 の変化を介した細胞内伝達経路により、各種炎症性サイトカインの産生を誘導し周囲組織への炎症発生に関与することが知られている。本研究の結果は、ICAM-1/fibrinogen 細胞内伝達経路が炎症性サイトカインの産生を引き起こし、それに伴う炎症が網膜神経細胞を損傷するというメカニズムを支持するものである。特に、アストロサイトやミクログリアの活性化により、IL-1 β や IL-6 などの炎症性サイトカインが産生され、それが神経細胞死を引き起こすプロセスが示唆された。また、抗 ICAM-1 抗体の投与によりこれらのシグナル伝達が抑制されることから、ICAM-1 が網膜障害性において重要な役割を果たしていることが示唆された。

ICAM-1 は、血管内皮細胞や一部の免疫細胞表面に発現する接着分子であり、炎症反応の調節に重要な役割を担う。網膜においては、網膜血管内皮細胞、ミュラー細胞、ミクログリア細胞に発現することが報告されている。本研究の結果から、フィブリノーゲンが ICAM-1 を介してミュラー細胞を活性化させ、炎症性サイトカインの増加を引き起こし、周囲神経組織障害を引き起こすプロセスが示唆された。この過程で特に重要なのは、ERK1 および AP-1 の活性化であり、これらが炎症性サイトカインの産生をさらに促進するフィードバックループを形成している可能性がある。このような ICAM-1 を中心とした炎症反応は、網膜組織の損傷を進行させる主要な要因として機能している可能性が高い。

これらの結果から、高濃度のフィブリノーゲンが ICAM-1 を介した炎症シグナルを活性化させ、網膜神経細胞に有害な影響を与えることが示唆された。この発見は、DR や DME の病態形成においてフィブリノーゲンが重要な役割を果たしていることを示す可能性がある。また、フィブリノーゲン/ICAM-1 経路を標的とした治療法が、DR や治療抵抗性 DME において有望な治療選択肢となる可能性がある。さらに、ICAM-1 に加え、その下流シグナルである ERK1 や AP-1 も新しい治療ターゲットとして注目される。

【考察】

本研究の意義は、DR および DME の病態解明に寄与するだけでなく、新たな治療戦略の基盤を提供する点にある。今後は、より臨床に近い糖尿病モデルを用いた研究や、他の関連疾患におけるフィブリノーゲン/ICAM-1 経路の役割を検証することで、この研究の成果をさらに発展させることが期待される。これらの知見は、網膜疾患の治療において新しいアプローチを提供し視機能回復を目指す医療に貢献する可能性が高い。

本研究は、糖尿病黄斑浮腫について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった高濃度フィブリノーゲンによる ICAM-1 経路を介した網膜組織障害について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。