

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10857

研究課題名(和文) 緑内障濾過手術後濾過胞癒痕機序の解明と新しい術後管理方法の確立

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of wound healing process after glaucoma filtration surgery and establishment of a new postoperative management method

研究代表者

川井 基史 (KAWAI, Motofumi)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：80400109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：房水中MCP-1濃度が高いと緑内障濾過手術成績が不良となることから、MCP-1の濾過胞癒痕化メカニズムに着目した研究を行った。まず、ウサギ濾過胞にMCP-1を長期的に作用させると同部位に癒痕化が生じるか検討した。その結果、同部位に炎症細胞の集積が観察された。さらに、ヒト結膜線維芽細胞とマクロファージを共培養すると線維芽細胞の α -SMA 発現が上昇した。以上より、緑内障濾過手術後、房水中に存在するMCP-1が濾過胞内へ移行し、単球/マクロファージを遊走し、濾過胞癒痕化を促進すると推測された。本研究結果は房水中MCP-1の緑内障手術後濾過胞癒痕化メカニズムを解明する上で重要な結果の一つとなった。

研究成果の概要(英文)：Previous reports have revealed that high aqueous MCP-1 level is related to poor surgical outcome of glaucoma filtration surgery. Therefore, we focused on the effect of MCP-1 on wound healing processes in glaucoma filtration bleb (bleb). Firstly, we applied MCP-1 on the bleb for a long period and investigated its effects on scar formation using rabbit models. As a result, the accumulation of inflammatory cells were observed. Second, we conducted in vitro experiments in that human conjunctival fibroblasts (HConF) and macrophages were co-cultured, and found that significant upregulation of α -SMA in HConF. Taken together, it was indicated that aqueous MCP-1 escape into the bleb after surgery for a long period and causes monocyte-macrophage recruitment, resulting in promoting wound healing reaction in the bleb. The results of current study were one of the important results in elucidating the mechanism of aqueous MCP-1 on wound healing of the bleb after glaucoma filtration surgery.

研究分野：眼科学

キーワード：緑内障 濾過手術 創傷治癒

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

緑内障は本邦での失明原因第一位である。緑内障は高い眼内圧(眼圧)によって視神経が圧迫されることにより視神経と視野障害が慢性的に進行する不可逆性の疾患であり、超高齢化社会を迎える現代において重要な眼疾患である。緑内障進行抑制には神経保護や血流改善なども重要であるが、唯一エビデンスがあるのは眼圧下降治療である。眼圧下降治療の第一選択は薬物治療(点眼)であり、その治療は長期にわたるため点眼を正しく使用することが重要である。しかしながら、薬物治療でも緑内障進行を抑制するのに十分な眼圧下降が得られない場合、さらなる眼圧下降のために手術治療が要求される。

緑内障手術は眼内から眼外へのバイパスを作成し、眼内液(眼房水=房水)を眼外の結膜下へ持続的に導くことで眼圧を下降させる術式である。しかし本術式は、術後過剰な創傷治癒反応によりバイパスが癒着、閉塞すると不成功(=眼圧再上昇)となる弱点がある。緑内障術後の炎症管理は手術を成功させるために重要である。本研究では緑内障手術に影響を及ぼす因子を調べ、それをターゲットとした緑内障術後管理の確立を目指した。

2. 研究の目的

最近の臨床研究で房水中の Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の濃度が高いと緑内障手術の成績が悪いことが報告されているが、そのメカニズムは未解明である。本研究では房水中の MCP-1 がどのようなメカニズムで濾過胞を癒着化へと導き、緑内障手術成績を悪化させているのかを解明したいと考えた。さらに、緑内障手術成績を上げるための新しい術後管理方法や治療薬への臨床応用に展開するための基盤となる研究を行った。本研究では動物実験と細胞実験で緑内障術後濾過胞癒着化メカニズムを解明し、緑内障手術の成績を高めるための臨床へ展開することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 緑内障手術を施したウサギ濾過胞に長期間 MCP-1 を作用させ、同部位に単球/マクロファージが遊走するかを検討する。実際の緑内障手術では濾過胞癒着化は長期的な反応である。房水中の MCP-1 が濾過胞へ及ぼす影響を動物モデルで検討する場合も同様に、MCP-1 を濾過胞に長期間作用させる必要がある。そこで、MCP-1 を溶解ゲル化したものを緑内障手術を施したウサギの濾過胞内に留置(4週間)することにした。その後、ウサギ眼球を摘出して同部位のパラフィン切片を作成し、同部位に単球/マクロファージが遊走しているかどうかの免疫染色を行った。ウサギ緑内障手術モデルは確立してある。濾過手術は臨床でもっともスタンダードに実施される線維柱帯切除術を選択した。

(2) マクロファージと線維芽細胞の共培養実験に移行し、線維芽細胞が活性化された際の培養上清中のサイトカイン、増殖因子の濃度を測定した。マクロファージは血液から分離した単球に M-CSF を添加し形質転換を誘導することで作成した。線維芽細胞(ヒトデノン線維芽細胞)は購入した。これらを共培養して培養上清の multiplex assay または ELISA を行い、サイトカインや増殖因子の濃度を測定する。上清採取は培養開始後 3 日、7 日を予定している。線維芽細胞の単培養上清をコントロールとした。その後、線維芽細胞の免疫染色で α -SMA と collagen type 1 の発現比較を、またウエスタンブロッティング法にて α -SMA と collagen type 1 の発現定量につき検討を行った。線維芽細胞のみの単培養と比較してマクロファージとの共培養では α -SMA 発現が上昇すると予備実験結果から推測した。これらの実験によって濾過胞癒着化におけるマクロファージと線維芽細胞間の関係を解明できる。線維芽細胞単培養の上清コントロールと比較して濃度の高かった因子については、さらに antagonist 投与で線維芽細胞活性が抑制されるかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) 眼房水(房水)中の MCP-1 濃度が高いと緑内障手術成績が悪化するという過去の臨床研究結果から、MCP-1 の濾過胞癒着化メカニズムに着目した研究を行った。このメカニズムを動物実験と細胞実験で明らかにすることで、緑内障術後の眼圧下降をより安定化させるための新しい術後管理方法や治療薬の臨床応用へ展開したいと考えた。まず、既に確立しているウサギ緑内障手術モデルにおいて、濾過胞に MCP-1 を長期的に作用させると同部位の濾過胞組織に癒着化が生じるか検討した。その結果、同部位に炎症細胞の集積が観察された。(図 1)

(2) ヒト結膜線維芽細胞と M1 または M2 マクロファージを共培養(図 2)すると、M2 マクロファージが α -smooth muscle actin (α -SMA) 発現を上昇させることが確認された。(図 3) また M2 マクロファージの培養上清をコラーゲンゲルに処理すると、M1 マクロファージの培養上清とは異なり、コラーゲンゲルを収縮させた。このことから生体では、緑内障濾過手術後、房水中に高濃度で存在する MCP-1 が濾過胞内へ移行した際に、単球/マクロファージを結膜に遊走し、濾過胞の癒着化(創傷治癒)を促進することが推測された。また、その創傷治癒過程には M2 マクロファージが重要な役割を持つことが明らかとなった。antagonist 投与実験での線維芽細胞活性化については今後検討予定である。

これらの実験結果は、本研究の目的である房水中 MCP-1 がどのようなメカニズムで濾過

胞を癒痕化へと導き、緑内障手術成績を悪化させているのかを解明する上で重要な結果の一つとなった。

図 1

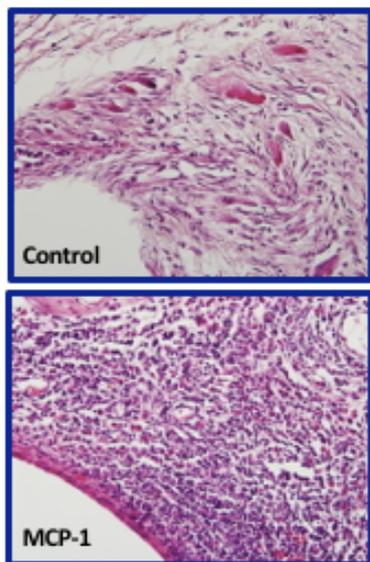


図 2

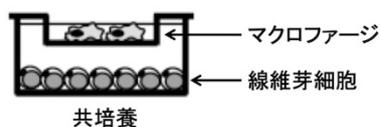
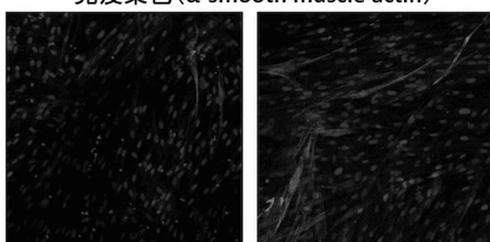


図 3

免疫染色 (α -smooth muscle actin)



5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Kawai M, Kawai N, Nakabayashi S, Kinouchi R, Yoshida A. Comparison of intraocular pressure variability in glaucoma measured

by multiple clinicians with those by one clinician. Int Ophthalmol. 37(1): 95-101, 2017.

DOI: 10.1007/s10792-016-0217-4

- ② Kawai M, Inoue T, Yoshida A, Tanihara H. Early Postoperative Changes in Aqueous Monocyte Chemoattractant Protein-1 Levels after Phacoemulsification. Data in Brief. 9:922-925, 2016. DOI: 10.1016/j.dib.2016.11.005
- ③ Futakuchi A, Inoue T, Fujimoto T, Inoue-Mochita M, Kawai M, Tanihara H. The Effects of Ripasudil (K-115), a Rho Kinase Inhibitor, on Activation of Human Conjunctival Fibroblasts. Exp Eye Res. 149:107-115, 2016. DOI: 10.1016/j.exer.2016.07.001
- ④ Shobayashi K, Inoue T, Kawai M, Iwao K, Ohira S, Kojima S, Kuroda U, Nakashima K, Tanihara H. Postoperative changes in aqueous monocyte chemotactic protein-1 levels and bleb morphology after trabeculectomy vs. Ex-PRESS shunt surgery. PLoS One. 10(10): e0139751, 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0139751
- ⑤ Nakabayashi S, Kawai M, Yoshioka T, Song YS, Tani T, Yoshida A, Nagaoka T. Effect of Intravitreal Rho kinase inhibitor Ripasudil (K-115) on feline retinal microcirculation. Exp Eye Res. 139:132-135, 2015. DOI: 10.1016/j.exer.2015.07.008
- ⑥ Kawai-Tsuboi N, Kawai M, Minami Y, Yoshida A. A study of the association between patterns of eye drop prescription and medication usage in glaucoma subjects. J Glaucoma. 24(3):202-206, 2015. DOI:10.1097/IJG.0b013e31829e1b8b
- ⑦ 横山 一弘, 高橋 淳士, 川井 基史, 中林 征吾, 長岡 泰司, 吉田 晃敏. 前眼部光干涉断層計 (CASIA) が毛様体解離範囲の同定に有用であった低眼圧黄斑症の 1 例. 臨床眼科 70(9): 1455-1460, 2016. 査読有り
- ⑧ 福島 亜矢子, 井上 俊洋, 川井 尚子, 川井 基史, 岩尾 美奈子, 平川 沙織, 小島 祥, 笠岡 奈々子, 正林 耕平, 大平 さおり, 高橋 枝里, 稲谷 大, 谷原秀信. 開放隅角緑内障における緑内障点眼薬配合剤への切り替え効果の前向き検討. 眼科臨床紀

要 8(2): 88-93, 2015. 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

- ① 阿部 友紀, 石羽澤 明弘, 山口 亨, 池守 涼太, 川井 基史, 吉田 晃敏. パノラマ OCT angiography を用いた緑内障の検討. 第 121 回 日本眼科学会総会, 東京, 2017 年 4 月 6 日
- ② 神谷 隆行, 長岡 泰司, 川井 基史, 中林 征吾, 大前 恒明, 大野 晋治, ターナー 晶, 吉田 晃敏. リパスジル (K-115) は網膜細動脈を拡張させる -摘出網膜動脈での検討-. 第 121 回 日本眼科学会総会, 東京, 2017 年 4 月 6 日
- ③ 木ノ内 玲子, 石子 智士, 花田 一臣, 林 弘樹, 三上 大希, 守屋 潔, 銭丸 達也, 川井 基史, 吉田 晃敏. 留萌研究による解放隅角緑内障の危険因子の検討. 第 121 回 日本眼科学会総会, 東京, 2017 年 4 月 6 日
- ④ 善岡 尊文, 川井 基史, 谷 智文, 神谷 隆行, 中林 征吾, 秋葉 正博, 吉田 晃敏. 半視野障害の緑内障における網膜血流. 第 121 回 日本眼科学会総会, 東京, 2017 年 4 月 6 日
- ⑤ 吉田 光一, 川井 基史, 宇都宮 嗣了, 石羽澤 明弘, 長岡 泰司, 田崎 嘉一, 吉田 晃敏. 水流機械刺激による線維柱帯細胞の遺伝子発現変化の検討. 第 27 回日本緑内障学会, 横浜, 2016 年 9 月 18 日
- ⑥ 川井 基史. 臨床医による緑内障基礎研究の実践. (シンポジウム 6 - 実践! 緑内障基礎研究のノウハウ). 第 27 回日本緑内障学会, 横浜, 2016 年 9 月 18 日
- ⑦ 中林 征吾, 川井 基史, 長岡 泰司, 善岡 尊文, 宋 勇錫, 谷 智文, 吉田 晃敏. ROCK 阻害薬リパスジル (K-115) のネコ硝子体注入による網膜微小循環への影響. 第 26 回日本緑内障学会, 名古屋, 2015 年 9 月 11 日
- ⑧ 中林 征吾, 川井 基史, 吉田 晃敏. ブレブニードリング後に発症した悪性緑内障の 1 例. 第 119 回日本眼科学会総会, 札幌, 2015 年 4 月 16 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川井基史 (KAWAI, Motofumi)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80400109

(2) 研究分担者

中林征吾 (NAKABAYASHI, Seigo)
旭川医科大学・大学病院・診療助教
研究者番号: 00451469

坪井尚子 (TSUBOI, Naoko)
旭川医科大学・大学病院・医員
研究者番号: 40548848