

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 3 0 年 6 月 2 5 日現在

機関番号：3 2 6 4 5

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：1 6 K 2 0 3 3 5

研究課題名（和文）眼内増殖疾患に対するDasatinibの臨床応用に向けた効果の解析

研究課題名（英文）The effect of Dasatinib in PVR model

研究代表者

馬詰 和比古（Umazume, Kazuhiko）

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：8 0 5 3 2 2 0 9

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000 円

研究成果の概要（和文）：Dasatinib（Das）の効果を、実験的増殖硝子体網膜症（in vitro PVR）モデルを用いて検討した。結果はシートの伸長は濃度依存性にDasによって有意に抑制された。シート上での免疫組織化学染色の結果、DasatinibによりEMTの抑制が確認された。Collagen gel contraction assayでは、group1およびgroup2において濃度依存性に収縮が抑制された。一方、密な線維化増殖を有したgroup3では、Dasを付加した群にもかかわらずcollagen gelの収縮は抑制されなかった。

研究成果の概要（英文）：To investigate the effect of Dasatinib, a tyrosine kinase inhibitor currently used in the treatment of chronic myeloid leukemia, on an experimental in vitro proliferative vitreoretinopathy (PVR) models. We tested Dasatinib using in vitro PVR model. Dasatinib significantly prevented the enlargement of RPE sheet in a concentration dependent manner. Reduced expression of S100A4 by immunohistochemical staining on cultured RPE sheets confirmed suppression of EMT by Dasatinib. Proliferative membrane in group 3 strongly expressed α -SMA compared with group 1 and group 2 at day 6. Dasatinib inhibited Collagen gel contraction in group 1 and group 2. On the other hand, shrinkage of collagen gel was not suppressed in group 3 with dense fibrosis, despite the addition of Dasatinib. Dasatinib significantly inhibited prevented membrane contraction in PVR model at early stage.

研究分野：網膜硝子体

キーワード：Dasatinib 増殖硝子体網膜症

1. 研究開始当初の背景

これまでに申請者らは大型動物である豚を用いた増殖硝子体網膜症モデルを作成し、増殖硝子体網膜症の病態解明を進めてきた。

その過程で初期の病態には網膜色素上皮細胞が中心となっていた。網膜色素上皮細胞は、網膜内から放たれると形質変化(上皮間葉移行)により線維芽細胞、筋線維芽細胞へ変化することは知られている。

実際に大型動物である豚を用いてもこれらの細胞が増殖膜の構成細胞であることを過去に報告している(Umazume K, et al. IOVS 2012)。モデルを作成する中での課題としては過去に報告されているグリア細胞の関与を証明出来なかったことが挙げられた。そこで培養豚ミューラー細胞を用いても同様の実験を行うと同様に増殖膜を作ることがわかったが、増殖膜の収縮力は網膜色素上皮細胞由来のものに比べると弱かった。

さらに申請者らは新たな増殖硝子体網膜症の治療薬(治療補助薬)としてチロシンキナーゼ阻害薬である Dasatinib の効果を模索した。Dasatinib は現に慢性骨髄性白血病の治療薬として用いられており、眼科への臨床応用の発展が期待された。

豚増殖硝子体網膜症モデルでその Dasatinib の効果を見たところ、一定の抑制効果を確認した(Umazume K, et al. IOVS 2013)

しかしながらその研究では意図的網膜剥離作成の日と同時刻に薬を投与しているため、実臨床とは合致していない点が問題点であった。

2. 研究の目的

増殖硝子体網膜症は外傷に起因する症例と網膜剥離の術後の合併症として現れてくる症例の2つに大きく分かれる。本邦では、外傷に起因する症例は少なく、ほとんどが二次的に発症する。

硝子体手術が発展した現在も増殖硝子体網膜症の治療は難治する。そこで、手術後に合

併症を減らすための治療補助薬として Dasatinib の効果を見ることを目的とした。

さらにその Dasatinib の投与時期についても in vitro 増殖硝子体網膜症モデルを用いて時相の異なる増殖膜での効果を確認した。

3. 研究の方法

網膜色素上皮細胞 sheet growth assay

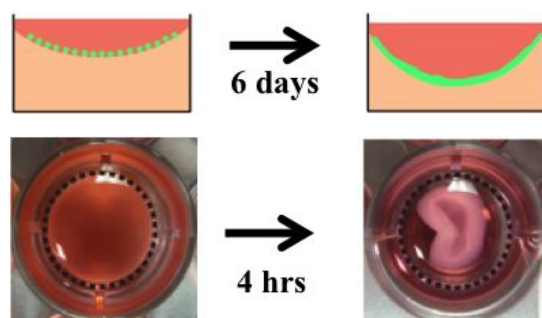
豚眼より網膜色素上皮細胞は Dissape を用いてシート上に摘出し、dish の上に置いた豚の水晶体後嚢で5日培養する。第0日と第5日のシートを撮像し、その伸長を測定する。これは細胞の接着から遊走、増殖までを再現していると考えている。

Dasatinib の負荷は後嚢に網膜色素上皮細胞シートが接着したことを確認できる第1日に行う。

Collagen gel contraction assay

この in vitro PVR モデルは申請者らが過去にβカテニン阻害薬である FH535 の増殖硝子体網膜症の抑制実験に用いたものである(Umazume K, et al. Am J Pathol 2014)

3回継代した培養豚網膜色素上皮細胞を網膜に見立てた豚コラーゲン1の上に播種させ6日培養する。6日後にwellの端をゆっくり剥がして4時間後のコラーゲンゲルの収縮を測定する。



今回は時相を変えた増殖膜をみるために3つのグループに分けて検討した。

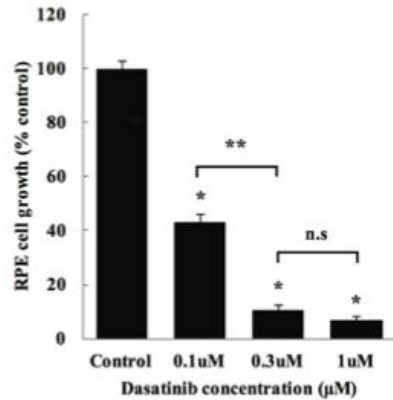
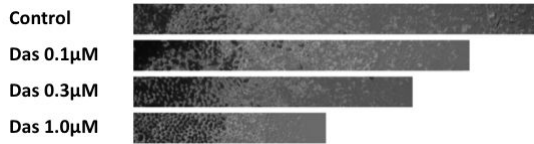
Group1 細胞をゲル上に播種させたと同時に Dasatinib を付加

Group2 細胞を第3日に付加

Group3 細胞を第5日に付加

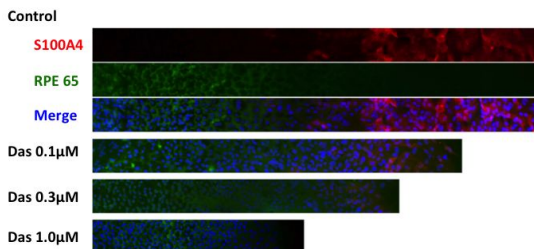
4. 研究成果

網膜色素上皮細胞 sheet growth assay



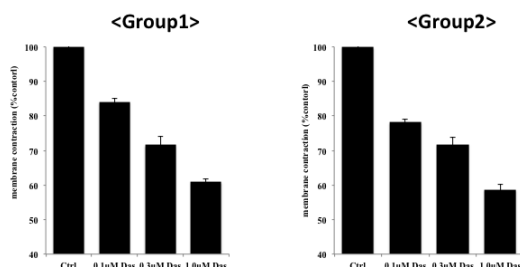
Dasatinib の濃度依存性に網膜色素上皮細胞シートの伸長を阻害した。

また分化型網膜色素上皮細胞のマーカーを RPE65 とし、上皮間葉移行のマーカーを S100A4 とした免疫組織化学染色の結果を以下に示す。

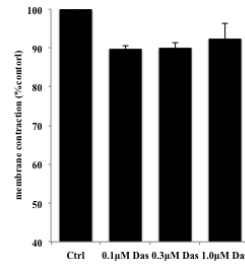


濃度依存性に Dasatinib により上皮間葉移行が阻害されていたことが実証された。

Collagen gel contraction assay



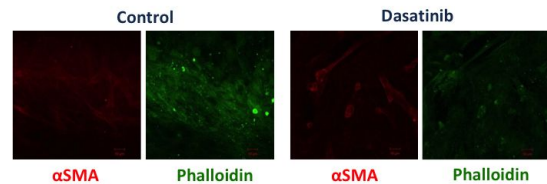
<Group3>



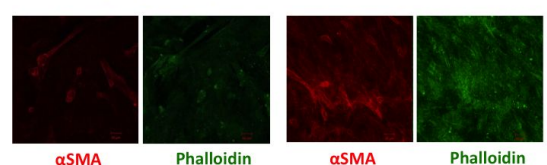
増殖膜が構成される前の第 0 日に付加した Group1 群と増殖膜が単層である Group2 群では Dasatinib による収縮抑制が確認された。一方で Group3 では Dasatinib による収縮抑制は確認されなかった。

さらに収縮に関与する筋線維芽細胞のマーカーである αSMA とアクチンストレスファイバーを示す phalloidin による免疫組織化学染色の結果を以下に示す。

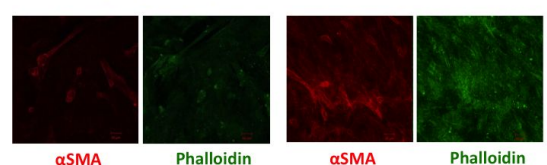
Group 2 (Dasatinibをday 3に付加)



Group 2 (Dasatinib)



Group 3 (Dasatinibをday 5に付加)



group3 では Dasatinib を付加しても筋線維芽細胞の発現や密なアクチンストレスファイバーの構造変化を抑制することは出来ず、そのためにコラーゲンの収縮が抑制されなかった。

これらの研究結果を踏まえると多層になっている増殖膜の細胞外マトリックス阻害や筋線維芽細胞への形質変化を Dasatinib が抑制していないと考えられた。

近年、光干渉断層計の画像解析が鮮明化している。実臨床の場では、眼底検査をするときに光干渉断層計を加えて、増殖膜の多層化に

注意を払い、この治療補助薬となりうる Dasatinib を付加することが求められる。
現在、in vivo モデルでも同様の検査を行っており、今後、成果がでたところで論文報告をする予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 2017 年日本眼科学会総会

実験的増殖硝子体網膜症における Dasatinib の抑制効果

馬詰和比古 松島亮介 田宮重雄 後藤 浩

2. 2017 年 ARVO

The effect of Dasatinib in PVR model

Kazuhiko Umazume, Ryosuke Matsushima, Shigo Matsushima, Hiroshi Goto

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

馬詰 和比古 (Umazume, Kazuhiko)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号: 80532209

()

研究者番号:

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()