

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20791289
研究課題名（和文）テノン囊線維芽細胞の制御による癒痕形成の病態解明
研究課題名（英文）Investigation of the mechanism of scar formation by regulation of Tenon's capsular fibroblasts.
研究代表者
本庄 恵 (HONJO MEGUMI)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員
研究者番号：60399350

研究成果の概要（和文）：

緑内障濾過手術において、術後の結膜下癒痕抑制はよりよい術後濾過胞維持に重要である。近年、サリドマイドは血管抑制効果、線維化抑制効果が注目されている。今回我々は、サリドマイドのテノン囊線維芽細胞に対する作用を検討した。サリドマイドは TGF- β によるテノン囊線維芽細胞の筋線維芽細胞転化を有意に抑制し、収縮能、接着、遊走に影響を及ぼすことが明らかとなった。サリドマイドは結膜下癒痕抑制に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

It is important to regulate the subconjunctival postoperative scar formation in order to accomplish better results. Recently, thalidomide has been implicated in pathological wound healing by regulating neovascularization and fibrosis in the scar tissue. In this study, we investigated the role of thalidomide in regulating human Tenon fibroblast (HTF) activities and postoperative scar formation. Thalidomide prevented enhanced contractility, attachment to ECM, migration, and myofibroblastic transdifferentiation which was induced by TGF- β . Thalidomide showed a potential new strategy to regulate the subconjunctival postoperative scar formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物系

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：緑内障・癒痕形成・眼圧・緑内障手術・テノン囊

1. 研究開始当初の背景

緑内障は失明原因として主要な割合を占めるが、現在のところ有効な治療法がなく、その病態解明・治療法の確立が非常に重要である。緑内障は眼圧上昇を病態の中心とし、現時点で唯一有効な臨床的治療は眼圧下降である。眼圧下降治療は薬物治療および観血的手術治療が中心となる。申請者はこれまで緑内障に対して、薬物治療および手術治療の両方の面で多角的に新しい治療法の開発について取り組み、研究成果をあげてきた。臨床的にはもっともよく行われている手術治療は濾過手術であり、濾過手術の手術成績向上のためには、術後の癒痕形成の制御が重要である。今後新たに緑内障治療の発展を目指すために、未だ詳細が明らかでないテノン囊線維芽細胞における癒痕形成を制御している因子を明らかにすることは大変重要であると考えられた。

2. 研究の目的

国内外で最も広く行われている緑内障手術である線維柱帯切除術は、房水のバイパスを作成し、眼外で結膜及び結膜下組織による濾過胞を形成させる濾過手術である。術後に適切な濾過胞を維持することが大変重要であり、結膜及び結膜下テノン囊組織における癒痕形成を抑制する必要がある。これは前房水、結膜及びテノン囊の厚みや増殖能、薬剤反応性の影響をうけるが個人差が大きい。術後、結膜下テノン囊組織は常に前房水の影響下にあり、前房水における生理活性因子として、TGF- β 、IL-6、LPAなどの関与が指摘されている。創傷治療では、サイトカインの影響で線維芽細胞が増殖、毛細血管新生がおこる。細胞外基質が産出され肉芽を形成、次いで線維化癒痕が形成される。また、筋線維芽細胞による収縮が同時期に起こる。このなかで、特にTGF- β は線維芽細胞の癒痕形成に大きく関わっていることが知られており、我々のグループからもTGF- β の緑内障病態との関連を報告してきたが、細胞骨格を介した応答反応、細胞外基質・細胞接着因子への影響などの詳細はまだ明らかにされていない。サリドマイドは1950年代に西ドイツで睡眠剤として発売され、続いてヨーロッパ各地に普及したが、催奇形性を有することがわかり、発売中止になっていた薬物である。その後、サリドマイドの作用メカニズムの研究において抗炎症作用や血管新生抑制作用が次第に明らかになり、がんや炎症性疾患への治療効果が

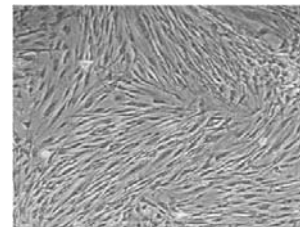
期待されている。骨髄腫細胞では、増殖抑制、接着阻害、サイトカイン分泌抑制、血管新生抑制などの作用が知られている。マウス肺線維症モデルでTHDは有意に線維化を抑制し、培養肺線維芽細胞において、TGF- β 刺激による筋線維芽細胞への転化を抑制されており、今研究では、サリドマイドのテノン囊線維芽細胞に対する作用を検討した。

これまでに新しい緑内障治療薬研究に関わってきた経験を生かし、本研究では、従来の増殖抑制による癒痕抑制ではなく、分子機構・生理的因子により制御されているテノン囊線維芽細胞の細胞動態の制御を、世界に先駆けて検討することを目的とした。本研究が、テノン囊の創癒機転の解明やより安全な癒痕形成の抑制方法、ひいては新しい治療法の開発の一助になれば、医学上の貢献度は大きいと考えた。

3. 研究の方法

① ヒト培養テノン囊細胞における生理因子への応答反応、細胞外基質の変化の観察・細胞接着因子・発現因子の検討、および病態との関連の評価

ヒト培養テノン線維芽細胞は対象者より事前に同意を得、白内障の手術時に採取し、培養する。培養細胞は3-6継代のものを実験に用いた。



ヒト培養テノン線維芽細胞において、定常状態で発現しているマーカー分子・細胞接着因子・細胞外基質をRT-PCR、免疫組織染色を用いて解析した。

② ヒト培養テノン囊細胞を用いたin vitroでの薬物への反応と病態関連因子の検討

防腐剤である塩化ベンザルコニウム、サリドマイドなどの薬物添加によるヒト培養テノン囊細胞における細胞毒性、細胞増殖能への影響、癒痕形成への反応、増殖因子発現の変化、細胞接着能の変化等を細胞毒性実験、細胞増殖実験、ELISA法、免疫染色を用いて検討した。

サリドマイドについては、MTT assayおよびトリパンプルーテストによりサリドマイド

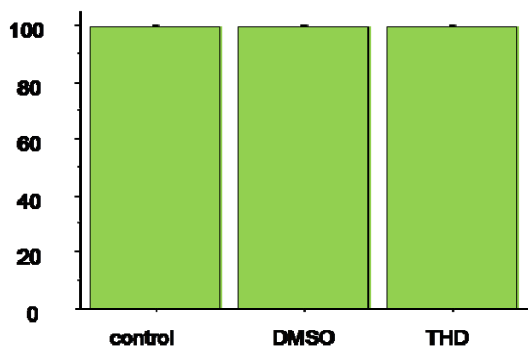
の細胞毒性への影響を検討、TGF-beta1 添加によるテノン囊線維芽細胞の筋線維芽細胞への転化、および筋線維芽細胞収縮に対する影響を免疫染色、コラーゲンゲル包埋三次元培養を用いて検討した。また、細胞外マトリックスへの接着能への影響、細胞遊走への影響を検討した。

4. 研究成果

ヒトテノン囊線維芽細胞に対するサリドマイドの筋線維芽細胞転化抑制作用について

① 細胞毒性・増殖能試験

トリパンブルーテスト、Cell Counting Kit-8 (細胞内脱水素酵素により還元され、水溶性のホルマザンを生成する WST-8 を発色基質とするによる生細胞測定) により、サリドマイドによる有意な細胞毒性、増殖抑制はみとめられなかった。

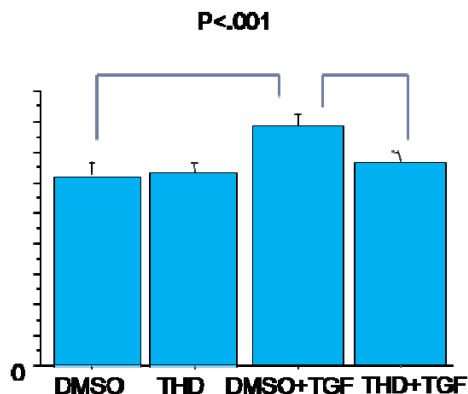


② 細胞遊走

TGF-β1 添加により培養テノン囊線維芽細胞の遊走能低下がみられたが、THD 添加によりその抑制がみられた。

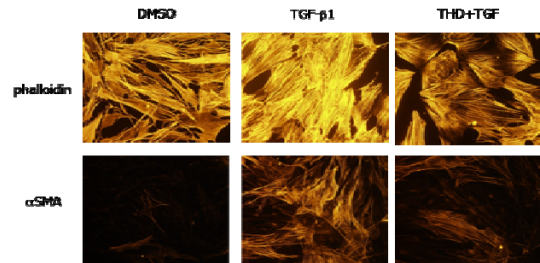
③ 細胞外マトリックスへの接着能

培養ヒトテノン囊線維芽細胞において、TGF-β 添加によりフィブロネクチンへの接着能亢進がみられた。



④ 免疫染色

TGF-β 添加により、アクチンファイバー増生がみられ、サリドマイドはこれを抑制した。線維芽細胞→筋線維芽細胞への転化指標となる αSMA 発現は TGF-β 刺激により亢進、サリドマイドはこの線維芽細胞の筋線維芽細胞への変化を抑制した。



⑤ まとめ

サリドマイドはテノン囊線維芽細胞のフィブロネクチンへの接着を抑制し、筋線維芽細胞への転化を抑制した。サリドマイドは緑内障手術にも良好な影響が期待できると考えられた。

今後、更にサイトカイン反応および in vivo の作用についての検討を進めていきたいと考えており、より安全な形で結膜下テノン囊痕形成を抑制する方法が必要であり、テノン囊や前房水活性を評価することは新しい治療法の開発の一助につながると考えられる。

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 6 件)

- Inomata Y, Fukushima M, Hara R, Takahashi E, Honjo M, Koga T, Kawaji T, Satoh H, Takeya M, Sawamura T, Tanihara H. Suppression of choroidal neovascularization in lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor type 1-deficient mice. Invest Ophthalmol Vis Sci., 2009;50:3970-3976.
- Tanihara H, Inatani M, Honjo M, Toskushige H, Azuma J, Araie M. Intraocular Pressure-Lowering Effects and Safety of Topical Administration of a Selective ROCK inhibitor, SNJ-1656, in Normal Volunteers Archives Ophthalmol., 2008;126:309-315.
- Hirata A, Inatani M, Inomata Y, Yonemura N, Kawaji T, Honjo M, Tanihara H. Y-27632, a Rho-associated protein kinase inhibitor, attenuates neuronal cell death after transient retinal ischemia. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.,

2008:246:51-59.

- ④ 本庄 恵、眼圧下降薬研究の最新情報は、あたらしい眼科、査読無、25 巻、2008、214-216
- ⑤ 本庄 恵、Rho-associated kinase (ROCK) 阻害薬の緑内障治療薬としての可能性、日本眼科学会雑誌、査読有、113 巻、2009、1071-1081
- ⑥ 本庄 恵、沼賀二郎、眼科疾患の特徴、日本医師会雑誌、査読無、138 巻、2009、254-255

〔学会発表〕(計 6 件)

- ① 本庄 恵、ROCK 阻害薬の話題、第 112 回日本眼科学会総会 セミナー、2008 年 4 月 20 日、パシフィコ横浜
- ② 本庄 恵、新規緑内障治療薬の可能性、第 19 回日本緑内障学会 シンポジウム、2008 年 9 月 13 日、大阪国際会議場
- ③ 本庄 恵、Potential role of Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 in glaucoma filtering surgery、第 113 回日本眼科学会総会、2009 年 4 月 18 日、東京国際フォーラム
- ④ Honjo M、Course-25 Experimental models in glaucoma、World Glaucoma Congress 2009、2009 年 7 月 10 日、Hynes Convention Center、Boston
- ⑤ 本庄 恵、亀田隆範、谷原秀信、新家 眞、ヒトテノン囊線維芽細胞に対するサリドマイドの筋線維芽細胞転化抑制作用、第 20 回日本緑内障学会、2009 年 11 月 14 日、沖縄コンベンションセンター
- ⑥ 本庄 恵、Potential role of Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 in glaucoma filtering surgery、Glaucoma Updated treatment Symposium in Tokyo vol.3、2010 年 2 月 20 日、グランドプリンスホテル新高輪

〔図書〕(計 2 件)

- ① 本庄 恵 他、目でみる眼疾患、文光堂、2009、総ページ 260、東京
- ② 本庄 恵 他、眼科研修ノート 眼疾患の診断と治療、診断と治療社、2009、総ページ 532、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本庄 恵 (HONJO MEGUMI)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員
研究者番号：60399350

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者
無