

平成22年4月12日現在

研究種目：若手研究 B
研究期間：2008～2009
課題番号：20791294
研究課題名（和文） 角膜血管新生における血小板・血管内皮前駆細胞の動態の同時観察およびその機能解析
研究課題名（英文） Simultaneous observation of platelets and endothelial progenitor cells in corneal neovascularization
研究代表者
山城 健児（YAMASHIRO KENJI）
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：80399617

研究成果の概要（和文）：角膜新生血管内での血小板動態および血管内皮前駆細胞の動態を同時に観察できる実験系を確立した。Heidelberg Retina Angiography（HRA2）を使用した詳細な観察を可能とする系と、実態顕微鏡を用いた広範囲な観察を可能とする系を確立した。両血球ともに新生血管の血管内皮に沿ってローリングし、血管壁に接着する動態が観察された。これらは抗セレクチン抗体等の投与によって抑制された。

研究成果の概要（英文）：We observed platelets and endothelial progenitor cell simultaneously in corneal neovascularization. Fluorescence-labeled cells can be observed using Heidelberg Retina Angiography（HRA2） and stereomicroscope. Both cells roll along and adhere to vessel wall, which can be suppressed with anti-selectin antibody.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

新生血管は社会的失明の主な原因疾患である糖尿病網膜症や加齢黄斑変性の主要病態であり、これまでもこれらの疾患の治療を目的として、新生血管をコントロールするための様々な研究がなされてきている。血管新生の機序の一部として、白血球や血小板が関与することが知られており、その他の血球と

して、血管内皮前駆細胞も血管新生に関与している。しかしこれらの血球が血管新生に関与する際の詳細な機序はまだ解明されておらず、その機序の解明は血管新生をコントロールするための新たなターゲットの解明につながると思われる。

2. 研究の目的

網膜血管における白血球や血小板および血管内皮前駆細胞の動態は観察可能であるが、網膜新生血管におけるこれらの血球動態の研究は、網膜に沿った2次元的な血管新生モデルが存在しないために、血球の新生血管内での詳細な動態の研究は困難であった。そこで、比較的2次元的な進展を生じることが多い角膜新生血管モデルを用いて、さらなる研究を進めることを考えた。

血管内皮前駆細胞が血管新生を生じる際には血小板との相互作用が重要な役割を持っていることが予測されるため、本研究では研究代表者がこれまでに用いてきた様々な角膜新生血管モデルを作成し、その新生血管内での血小板と血管内皮前駆細胞の動態を、現在、網膜観察に使用している HRA2 の観察系を応用して、同時に観察することを目的とした。さらに血球道他のコントロールに關与していると考えられる分子を抗体等でブロックすることによって、その機序を解明し、新生血管のコントロールへとつなげていきたい。

3. 研究の方法

研究代表者はこれまでにハイデルベルグ社の Heidelberg Retina Angiography (HRA2) を使用して、網膜血管内での血小板や血管内皮前駆細胞の動態を観察研究してきた。本研究ではまず始めに、この技術を応用して角膜新生血管内での血球動態を観察する系を確立し、その機能解析を行う。

角膜新生血管はマウスおよびラットの角膜に薬剤や機械的刺激を与えてモデル作成をし、血小板・血管内皮前駆細胞をフルオレセインやローダミンの蛍光色素でラベルし、HRA2 で観察する。さらに同様の実験を行う際に、抗体を投与することによって、これらの血球の動態を司る機序を解明する。

4. 研究成果

ハイデルベルグ社の Heidelberg Retina Angiography (HRA2) を使用した角膜新生血管内での血小板動態、血管内皮前駆細胞動態の観察を可能するための実験系を確立した。また、より広範囲の観察を可能とするために実体蛍光顕微鏡を用いて、角膜新生血管内での血小板動態、血管内皮前駆細胞動態を観察し、動画として記録できる実験系を確立した。

角膜新生血管モデルとしては上皮傷害モデル、硝酸銀モデル、血管内皮成長因子 (vascular endothelium growth factor; VEGF) ペレットモデルを作成し、それぞれの新生血管における発生期・退縮期および安定

期での血小板・血管内皮前駆細胞の相互作用を動的に観察することを可能として機序の解明を行った。

血小板、血管内皮前駆細胞ともに、進展中の新生血管内およびその根元の血管内で rolling している像が観察できた。さらに血管内皮に接着している像も観察できたことから、新生血管を生じる前に、血流を浴するという段階を経ている可能性が考えられた。

またこれから新生血管が伸張していくであろう部位にも血管内皮前駆細胞が存在したことから、血管内皮前駆細胞が新生血管のガイド役を果たしている可能性も考えられた。

血球のローリングは抗セレクチン抗体の投与によって、抑制され、接着は抗 ICAM-1 抗体によって抑制されたことから、これらの分子がその機序に關与していると考えられた。

これらの研究から得られた結果により、血小板・血管内皮前駆細胞をターゲットとして新生血管をコントロールする効率的な方法が解明されると考えている。この結果を網膜血管・脈絡膜血管に応用することによって、糖尿病網膜症や加齢黄斑変性の新たな治療戦略が得られる可能性がある。

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 12 件)

① Chen W, Stambolian D, Edwards AO, Branham KE, Othman M, Jakobsdottir J, Tosakulwong N, Pericak-Vance MA, Campochiaro PA, Klein ML, Tan PL, Conley YP, Kanda A, Kopplin L, Li Y, Augustaitis KJ, Karoukis AJ, Scott WK, Agarwal A, Kovach JL, Schwartz SG, Postel EA, Brooks M, Baratz KH, Brown WL; Complications of Age-Related Macular Degeneration Prevention Trial (CAPT) Research Group, Brucker AJ, Orlin A, Brown G, Ho A, Regillo C, Donoso L, Tian L, Kaderli B, Hadley D, Hagstrom SA, Peachey NS, Klein R, Klein BE, Gotoh N, Yamashiro K, Ferris Iii F, Fagerness JA, Reynolds R, Farrer LA, Kim IK, Miller JW, Corton M, Carracedo A, Sanchez-Salorio M, Pugh EW, Doheny KF, Brion M, Deangelis MM, Weeks DE, Zack DJ, Chew EY, Heckenlively JR, Yoshimura N, Iyengar SK, Francis PJ, Katsanis N, Seddon JM, Haines JL, Gorin MB, Abecasis GR, Swaroop A. Genetic variants near TIMP3 and high-density lipoprotein-associated loci influence susceptibility to age-related

macular degeneration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 in press 査読有

② Ooto S, Tsujikawa A, Mori S, Tamura H, Yamashiro K, Yoshimura N. Thickness of photoreceptor layers in polypoidal choroidal vasculopathy and central serous chorioretinopathy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2010 in press 査読有

③ Ojima Y, Tsujikawa A, Yamashiro K, Ooto S, Tamura H, Yoshimura N. Restoration of outer segments of foveal photoreceptors after resolution of central serous chorioretinopathy. Jpn J Ophthalmol. 2010 Jan;54(1):55-60. 査読有

④ Hasegawa T, Otani A, Sasahara M, Gotoh N, Ooto S, Tamura H, Yamashiro K, Tsujikawa A, Yoshimura N. Prognostic factors of vitreous hemorrhage secondary to exudative age-related macular degeneration. Am J Ophthalmol. 2010 Feb;149(2):322-329. 査読有

⑤ Tsujikawa A, Ojima Y, Yamashiro K, Ooto S, Tamura H, Nakagawa S, Yoshimura N. PUNCTATE HYPERFLUORESCENT SPOTS ASSOCIATED WITH CENTRAL SEROUS CHORIORETINOPATHY AS SEEN ON INDOCYANINE GREEN ANGIOGRAPHY. Retina. 2010 in press 査読有

⑥ Yamashiro K, Tsujikawa A, Miyamoto K, Oh H, Otani A, Tamura H, Ooto S, Sasahara M, Iwama D, Yoshimura N. Sterile endophthalmitis after intravitreal injection of bevacizumab obtained from a single batch. Retina. 2010 Mar;30(3):485-90. 査読有

⑦ Nakanishi H, Gotoh N, Yamada R, Yamashiro K, Otani A, Hayashi H, Tsujikawa A, Shimada N, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Saito M, Saito K, Iida T, Matsuda F, Yoshimura N. ARMS2/HTRA1 and CFH polymorphisms are not associated with choroidal neovascularization in highly myopic eyes of the elderly Japanese population. Eye (Lond). 2010 in press 査読有

⑧ Nakanishi H, Yamada R, Gotoh N, Hayashi H, Yamashiro K, Shimada N, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Saito M, Iida T, Matsuo K, Tajima K, Yoshimura N, Matsuda F. A

genome-wide association analysis identified a novel susceptible locus for pathological myopia at 11q24.1. PLoS Genet. 2009 Sep;5(9):e1000660. 査読有

⑨ Hayashi H, Yamashiro K, Tsujikawa A, Ota M, Otani A, Yoshimura N. Association between foveal photoreceptor integrity and visual outcome in neovascular age-related macular degeneration. Am J Ophthalmol. 2009 Jul;148(1):83-9. 査読有

⑩ Gotoh N, Nakanishi H, Hayashi H, Yamada R, Otani A, Tsujikawa A, Yamashiro K, Tamura H, Saito M, Saito K, Iida T, Matsuda F, Yoshimura N. ARMS2 (LOC387715) variants in Japanese patients with exudative age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. Am J Ophthalmol. 2009 Jun;147(6):1037-41. 査読有

⑪ Nakanishi H, Yamada R, Gotoh N, Hayashi H, Otani A, Tsujikawa A, Yamashiro K, Shimada N, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Saito M, Saito K, Iida T, Matsuda F, Yoshimura N. Absence of association between COL1A1 polymorphisms and high myopia in the Japanese population. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 Feb;50(2):544-50. 査読有

⑫ Yamashiro K, Tsujikawa A, Nishida A, Mandai M, Kurimoto Y. Recurrence of polypoidal choroidal vasculopathy after photodynamic therapy. Jpn J Ophthalmol. 2008 Nov-Dec;52(6):457-62. 査読有

[学会発表] (計5件)

① 山城健児、後藤謙元、中西秀雄、林寿子、仲田勇夫、三谷康正、吉村長久. ARMS2 遺伝子A69S多型の迅速検出キットの開発および加齢黄斑変性診療における臨床応用. 第113回 京都眼科学会. 2009.9.6. 京都

② 山城健児、中川聡子、辻川明孝、大谷篤史、田村寛、大音壮太郎、佐々原学、吉村長久. 網膜色素線条に生じた脈絡膜新生血管の特徴. 第113回 日本眼科学会総会. 2009.4.16-19. 東京

③ 山城健児、中川聡子、辻川明孝、大谷篤史、田村寛、大音壮太郎、佐々原学、吉村長久. 網膜色素線条に生じた脈絡膜新生血管の特徴. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業 網膜脈

絡膜・視神経萎縮症調査研究班 班会議.
2008.1.18-19. 名古屋

④山城健児、西田明弘、万代道子、栗本康夫.
光線力学療法によって良好な視力が得られた加齢黄斑変性の長期予後. 第112回 日本眼科学会総会. 2008.4.17-20. 神奈川

⑤山城健児、辻川明孝、林寿子、太田将文、田村寛、大谷篤史、吉村長久. 光線力学療法を施行し長期経過観察した加齢黄斑変性の網膜断層所見と視力の相関. 第112回 京都眼科学会. 2008.6.1. 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山城 健児 (YAMASHIRO KENJI)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：80399617