

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：37111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890231

研究課題名（和文）網膜・硝子体界面におけるコラーゲン線維の第2高調波発生光イメージング

研究課題名（英文）Multiphoton Images of fibrosis in vitreoretinal diseases using a SHG microscope.

研究代表者 佐々 由季生 (SASSA YUKIO)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：80580315

研究成果の概要（和文）：

新規生体内コラーゲン線維観察系である第2高調波発生光（SHG 光）顕微鏡を用いて、手術摘出標本・3次元網膜色素上皮細胞培養コラーゲンを評価した。増殖糖尿病網膜症や増殖硝子体網膜症、網膜前膜ではSHG光を検出できた。また、摘出標本SHG光を発生面積及びSHG平均輝度として定量化可能となり、増殖糖尿病網膜症では増殖膜SHG平均輝度と膜成熟度との相関が示唆された。3次元コラーゲン培養系ではTGF $\beta$ 2刺激後にSHG平均輝度及び面積が無刺激培養系と比較して統計学的に有意に上昇した。この培養系はリアルタイムに評価ができ、新しい線維化モデルとして有用である。

研究成果の概要（英文）：

Multiphoton microscopy (MPM) can image tissue and cellularized collagen gels using endogenous second-harmonic generation (SHG) to provide unique information about collagen content and microstructure. We observed preretinal fibrovascular membranes, inner limiting membrane obtained from patients and retinal pigment epithelium (RPE) cultured collagen gels using a SHG microscope. SHG signals were detected from preretinal tissue obtained from patients with proliferative vitreoretinopathy (PVR), proliferative diabetic retinopathy (PDR) and idiopathic epiretinal membrane (iERM). We evaluated SHG signals as the area fraction and mean intensity. Mean SHG signal intensity of fibrovascular membranes obtained from PDR patients had a trend to increase in the progress of fibrosis based on the fundus photographs. In 3D cultured collagen gel model, TGF beta2 stimulation significantly increased both SHG area fraction and mean SHG signal intensity compared to non-stimulant control. Since we can evaluate SHG signal changes without any fixation or staining, this cellularized collagen gel model may be useful to evaluate fibrosis in real time.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：コラーゲンリモデリング、第2高調波発生光生体顕微鏡、網膜色素上皮細胞、増殖糖尿病網膜症、増殖硝子体網膜症、黄斑前膜

#### 1. 研究開始当初の背景

これまで生体内で観察することが不可能であった硝子体中コラーゲン線維の三次元的な配向情報を、新しく皮膚及び骨組織でのコラーゲン線維観察用に開発された第2高調波発生光（SHG光）顕微鏡を用いることで調べる。

#### 2. 研究の目的

SHG顕微鏡を用いて増殖性網膜疾患（増殖糖尿病網膜症や増殖硝子体網膜症）その他黄斑円孔や網膜前線維症などのコラーゲン線維配向を観察・定量を試みる。また、その配向を三次元的に再構成することで、硝子体-感覚網膜界面にかかる力学的情報を導きだし、硝子体内のバイオメカニクスを明らかにすることで、コラーゲン線維の配向情報という世界的に試みられていない側面から解析を行う。

#### 3. 研究の方法

反射型・透過型のSHG顕微鏡を用いて硝子体手術時に採取された増殖膜、網膜前膜・内境界膜を観察し、SHG発生面積、平均発生輝度を評価した。実験動物を用いた研究ではマウス酸素網膜症モデルを作製して、フラットマウント後の網膜前増殖組織及びホルマリン固定後の薄切切片におけるSHG輝度について観察した。薄切切片ではコラーゲンの局在を明らかにする目的でマッソン・トリクローム染色後標本との比較を行った。*in vitro*系ではコラーゲングル上に増殖性網膜疾患の原因細胞の一つである網膜色素上皮細胞を散布し、TGF $\beta$ 2、ペリオスチンなどの線維化関連タンパクにて刺激を加えて、コラーゲングルのSHG輝度の変化を評価した。

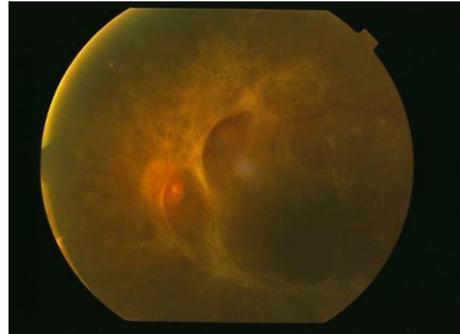
#### 4. 研究成果

増殖性網膜疾患及び網膜前膜摘出標本ではSHG光を得ることができたが、黄斑円孔から摘出した内境界膜ではSHG光を得ることができなかった。また、増殖糖尿病網膜症からの摘出増殖膜のSHG光発生面積及び輝度を2次的に定量することに成功した。この評価法と術前眼底所見を比較して、SHG光が増殖膜の成熟度と相関する傾向があり、新しい評価方法

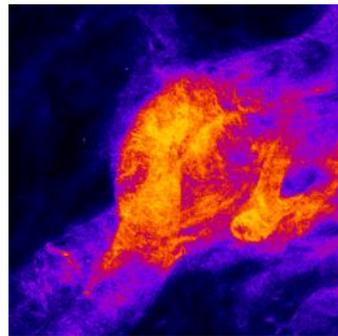
として有用である可能性がある。

図1: 増殖糖尿病網膜症患者増殖膜 SHG 像・定量結果

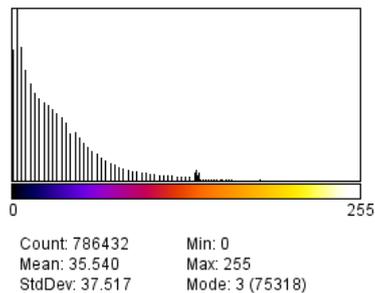
眼底写真



抽出増殖膜 SHG 像



SHG 輝度ヒストグラム



酸素負荷網膜症モデルを用いた系では、マッソン・トリクローム染色で認めたコラーゲン線維を SHG 顕微鏡で観察することはできなかった。酸素負荷網膜症は網膜症発症後病変が退縮する可塑性のある疾患であり、病変部の線維化の進行を認めない疾患である。この結果は増殖糖尿病網膜症で観察された増殖膜の成熟度と SHG 平均輝度が相関するという結果に合致してい

た。

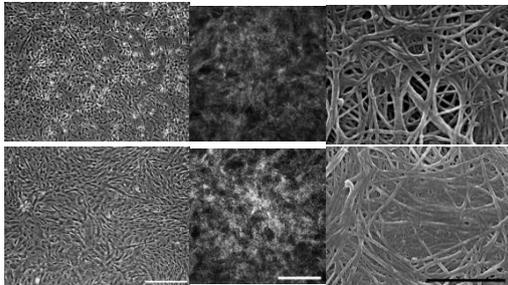
3次元網膜色素上皮細胞培養コラーゲンの系では線維化促進因子であるTGFβ2刺激後にSHG平均輝度及び面積が無刺激培養系と比較して統計的に有意に上昇した。この培養系は固定などの必要が無くリアルタイムに網膜色素上皮細胞によるコラーゲンリモデリングを観察することができ、新しい線維化モデルとして有用であることを明らかにした。詳細は第116回日本眼科学会総会で報告した。

図2: TGFβ2刺激ヒト網膜色素上皮細胞培養

8日後Collagen GelのSHG変化

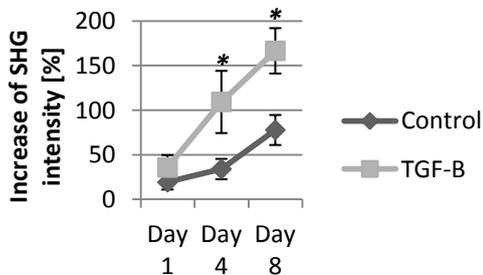
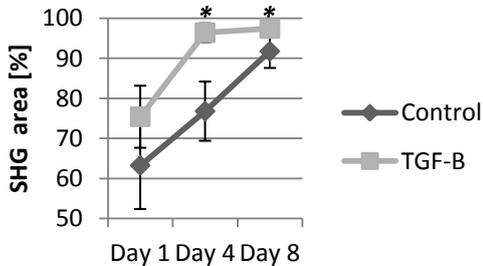
(上段: コントロール、下段: TGFβ2刺激)

位相差顕微鏡 SHG顕微鏡 SEM



Scale Bar (SB): 500um SB:100um

SB:1um



\*p<0.05, n=3

## 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5件)

- ① Ishikawa K, Yoshida S, Nakao S, Sassa Y, Asato R, Kohno R, Arima M, Kita T, Yoshida A, Ohuchida K, Ishibashi T. :Bone marrow-derived monocyte lineage cells recruited by MIP-1β promote physiological revascularization in mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Lab Invest.*, 92, 2012, 91-101, 査読有
- ② Hata Y, Nakao S, Kohno RI, Oba K, Kita T, Miura M, Sassa Y, Schering A, Ishibashi T. :Role of tumour necrosis factor-α (TNFα) in the functional properties of hyalocytes. *Br J Ophthalmol.*, 95, 2011, 261-5, 査読有
- ③ Yoshida S, Ishikawa K, Asato R, Arima M, Sassa Y, Yoshida A, Yoshikawa H, Narukawa K, Obika S, Ono J, Ohta S, Izuhara K, Kono T, Ishibashi T. :Increased expression of periostin in vitreous and fibrovascular membranes obtained from patients with proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 92, 2011, 5670-8, 査読有
- ④ Sassa Y, Kawano YI, Yamana T, Mashima T, Ishibashi T. :A change in treatment from etanercept to infliximab was effective to control scleritis in a patient with rheumatoid arthritis. *Acta Ophthalmol.* 90, 2011, e161-2, 査読有
- ⑤ Sassa Y, Hata Y :Role of antiangiogenic class of drugs in the management of ocular diseases: Focus on anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) *Clinical Ophthalmology*, 26, 2010, 275-283, 査読有

[学会発表] (計8件)

- ① 佐々由季生, 吉田茂生, 石川桂二郎, 安里良, 向野利一郎, 後藤純信, 石橋達朗, 向野利寛 :重シリコンの実験動物への使用経験, 九大眼科学会, H24年2月11日, 福岡市
- ② 佐々由季生, 佐伯有祐, 佐藤理沙, 原田一宏, 向野利寛, 吉田茂生, 石川桂二郎, 安里良, 有馬充, 宮崎勝

徳、江内田 寛、大島 裕司、石橋 達朗：  
糖尿病網膜症における Tenascin-C、  
Fibronectin と Periostin の相関，第 17  
回日本糖尿病眼学会総会，H23 年 12 月 2  
日，東京

- ③ Yukio Sassa, Shigeo Yoshida, Keijiro Ishikawa, Ryo Asato, Mituru Arima, Yusuke Saeki, Risa Sato, Kazuhiro Harada, Katsunori Miyazaki, Hiroshi Enaida, Yuji Oshima, Toshihiro Kono:The significant relationship between Fibronectin, Tenascin-C and Periostin in the eyes of the patients with diabetic retinopathy.,The 4th Joint Meeting of Korea-China-Japan Ophthalmologists,H23年11月5日,ソウル, 韓国
- ④ 佐々 由季生:糖尿病網膜症とサイトカイン-新規病因タンパクの検索-,第29回北九州九大眼科同門会,H23年6月4日,北九州市
- ⑤ 佐々 由季生・安里 良・佐伯 有佑・向野 利寛:若年者網膜剥離の治療成績,福岡大学眼科研究会,H23年5月21日,福岡市
- ⑥ Yukio Sassa, Shigeo Yoshida, Ryo Asato, Keijiro Ishikawa, Yuusuke Saeki, Toshihiro Kohno, Tatsuro Ishibashi:The concentration changes of VEGF and MCP-1 in the Eyes of the patients with proliferative diabetic retinopathy. (The second vitrectomy cases), ARVO annual meeting 2011,平成23年5月2日, Fort Lauderdale, Florida, U. S. A.
- ⑦ 佐々 由季生、安里 良、佐伯 有祐、向野 利寛、吉田 茂生、石川 桂二郎、石橋 達朗:増殖糖尿病網膜症硝子体再手術症例における VEGF 及び MCP-1 の関与,49 回日本網膜硝子体学会総会,2010年11月26日,大阪
- ⑧ Yukio Sassa, Shigeo Yoshida, Ryo Asato, Keijiro Ishikawa, Yuusuke Saeki, Toshihiro Kohno, Tatsuro Ishibashi:The concentration changes of VEGF and MCP-1 in the eyes of the patients with proliferative diabetic retinopathy. (The second vitrectomy cases), The 3rd Japan-Korea-China annual meeting,2010年9月15日,北京

〔図書〕(計1件)

- ① 佐々 由季生・村田 敏規:文光堂,眼科学第2版,2011,P407

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

佐々 由季生 (SASSA YUKIO)  
福岡大学・医学部・助教  
研究者番号:80580315

### (2)研究分担者:なし

### (3)連携研究者:なし