

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390396

研究課題名(和文)硝子体の基盤病態の解明と制御機構の研究

研究課題名(英文)Study of biology and regulation of vitreous body

研究代表者

坂本 泰二 (Sakamoto, Taiji)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10235179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：硝子体の生物学的特徴を解明するために、以下の事を行った。硝子体中の分子について、細胞破壊物を中心に解析した。代表的成分として、HMGB-1とhistoneの濃度を測定した。いずれも、網膜剥離や眼内炎で高濃度であった。これらを培養系に添加すると、炎症性サイトカインの産生を増加させたり、アポトーシスなどの細胞死を誘導したりした。このことから、網膜傷害時は網膜機能が損なわれるのみならず、周囲組織にも障害を及ぼすため、速やかにそれらを除く治療が必要である。探索的研究を行った所、ヒアルロン酸が有効なことがわかったため、この原理を用いた新しい手術法を考案した。これらのメカニズムについても、詳細に解析した。

研究成果の概要(英文)：Biology of vitreous body was investigated during the study period. First, molecular profile of vitreous body was evaluated by measuring such molecules as HMGB-1 and histone H3. The results showed that both were rich in the vitreous with retinal detachment. The co-incubation of HMGB-1 and histone H3 with retinal cells increased the production of inflammatory cytokines by these cells. Furthermore, the apoptosis was induced when added excessively. These indicated that the damage in retinal disease does not only cause functional impairment of the damaged retina, but also induces collateral damage to the surrounding retina. To prevent this complication, we found that hyaluronic acid was most effective, which lead to development of novel surgical method termed "soft shell vitrectomy". In each project, the detailed cellular mechanisms such as involvement of toll-like receptors were also studied.

研究分野：眼科学

キーワード：硝子体 ヒアルロン酸 細胞破壊物 炎症 硝子体手術 ヒアルロン酸

1. 研究開始当初の背景

網膜・脈絡膜病変の病態解明、治療研究について、網脈絡膜を対象とした研究は世界中で盛んにされてきたが、硝子体を対象とした研究はほとんどされていなかった。我々は、世界に先駆けて硝子体研究を開始して、硝子体特有の様々な現象を明らかにしてきた。その結果、硝子体は単に細胞が少ない透明な組織ではなく、眼内環境を一定に制御する特殊な組織であることがわかった。免疫学的には、硝子体が眼球の不要な免疫反応を抑制する [vitreous cavity associated immune deviation (VCAID)] という新しい概念を提唱した。また、硝子体細胞 [hyalocyte (HC)] の培養に初めて成功し、その性質を明らかにした。さらに、硝子体腔は閉鎖系であること、クリアランスが悪いこと、炎症反応が起こりにくいことから、細胞移植や遺伝子導入ベクター活用場として、極めて優れていることも証明した。

現在までの我々の研究より、以下の問題点が明らかになっている。硝子体内では、HC という細胞が独特の反応をするが、90%以上を占める基質成分も重要な働きをしている。特に変性蛋白質 (ペプチド) や細胞崩壊産物が、生理的に重要な働きをするようである。現在普及しているプロテオーム解析ではサンプルの前処置が必須であり、変性ペプチドの生理活性作用研究は、捕捉が困難であった。我々は新しい方法を開発して変性蛋白の網羅的解析を可能とした (蛋白デグラドーム)。変性蛋白を含めた蛋白解析と糖鎖解析を合わせて、硝子体環境形成に真に重要な因子を抽出する。これは、「ビトレオーム」という新たな研究概念である。

2. 研究の目的

本申請は、未開拓研究分野である硝子体について、生理・病態解析・治療開発を総合的に行うものであり、新たな研究分野「硝子体学」を開くものといえるこのコンセプトは世界的にも類がなく、オリジナリティーの高い先進的なものといえる。また、硝子体は今後の眼科薬物・遺伝子治療の臨床応用に際して、鍵となる組織であり、本研究領域が内包する産業・医療への波及効果、可能性は極めて大きい。

3. 研究の方法

ビトレオーム研究：硝子体と網膜は一体であり、硝子体研究は網膜各疾患の病態を理解する必要がある。そのため、硝子体中の様々な成分を測定した。硝子体手術時に得られたサンプル硝子体について、目的とするものを (HMGB-1, histone, VEGF など) を ELISA で測定した。それらについて、網膜剥離モデルにおいて、どのように発現している

かを、免疫染色などで確認した。

ビトレオームで重要な因子である histone H3 について、どのように作用するのかを培養網膜色素上皮 (RPE) 細胞、神経網膜細胞 R28 について検索した。細胞毒性、炎症性サイトカインの産生をシグナル伝達に注意して検索した。

さらに、これらによる有害作用を防止する方法を硝子体自身に求めた。硝子体と histone H3 を混合することで上記作用がどのようになるかを検索した。

RPE 細胞の影響：硝子体疾患においては、硝子体に出現する RPE 細胞が重要な働きをしている。そのため、RPE の生体作用について研究を行った。特に疾病発生時に出現する紡錘型あるいは非極性 RPE 細胞と、生理的あるいは正常時の極性 RPE 細胞の反応性の違いは全く研究されていなかった。そこで、2種類の細胞を作製し (極性 RPE 細胞、非極性 RPE 細胞) それらの反応性について検討した。それぞれ我々の開発した方法で 2 chamber culture system で培養し、細胞の形態、炎症性分子の影響、および同じ条件をラットで行い VEGF の発現がどのように影響を受けるか検証した。

画像解析研究：硝子体の病態は、少子遅滞自身よりもむしろ網膜の状況に影響をうけることが分かってきたので、硝子体成分と網膜画像 (光干渉断層計、OCT) がどのように関係しているかを検討した。前得られた、硝子体成分と同疾患の画像の関連を調べた。

4. 研究成果

ビトレオーム研究：histone H3 は、網膜剥離眼で明らかに高濃度存在していた (図 1)。

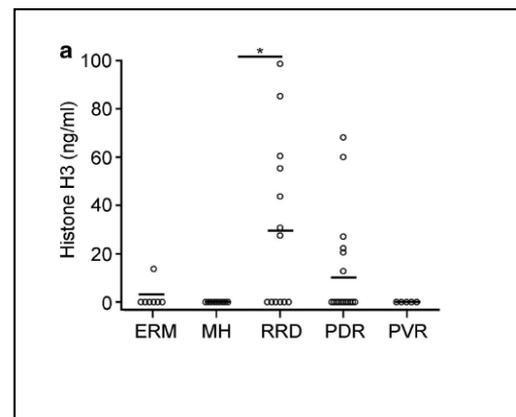


図 1 各疾患における histone H3 濃度。網膜剥離で高値である (RRD)。

これを免疫染色で検討すると、網膜剥離眼の網膜下に histone H3 は多量に存在し、その部には macrophage が多数浸潤して histone H3 を貪食していた (図 2)。

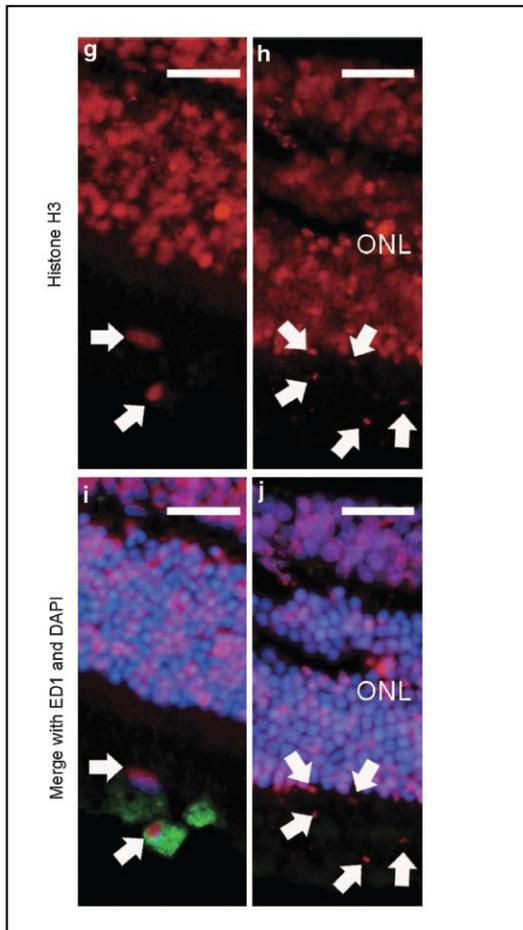


図2 網膜下に赤色の histone が滲出し、macrophage に貪食されている（緑色）。

さらに histone を培養網膜色素上皮細胞に添加すると細胞死を引き起こした。そこでこの有害な作用を抑制するために硝子体と混合すると、histone は凝集塊を形成していた。そこで、硝子体主成分であるヒアルロン酸を添加した所、histone の有害作用が大幅に減少した（図3）。このことは、ヒアルロン酸を用いることで、手術などの有害作用が抑制できることを示したものである。

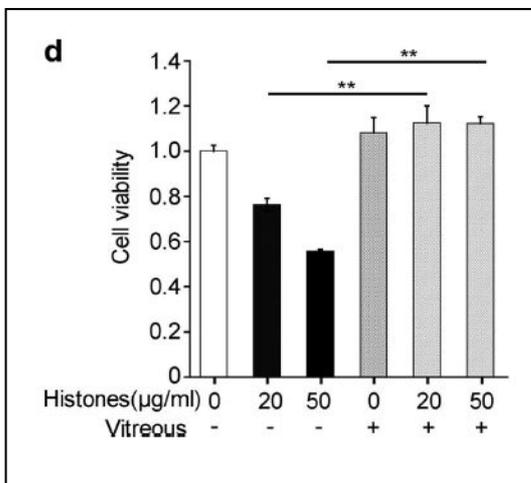


図3 ヒアルロン酸による histone 誘導性細胞傷害の抑制作用

RPE 細胞の研究：

RPE 細胞を極性細胞 (polarized cell) と非極性細胞 (non-polarized cell) に分けて性質を調べると、大きな構造上の差が見られた（図4）。

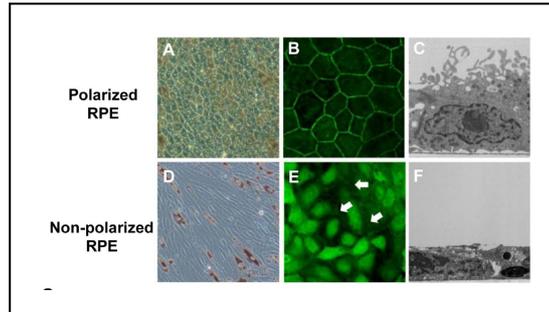


図4 極性細胞（上段）は敷石状の形態を取、細胞の周辺に ZO-1 が綺麗に分布する（上段中）。絨毛構造も十分に発達している（上段右）。それに比べて、非極性細胞はそれらがいずれも発達していない。

それらの細胞を用いて、組織壊死因子 (TNF-α) に対する反応性を調べた。その結果、極性細胞では VEGF の分泌が減少するのに対して、非極性細胞では VEGF の分泌が増加した（図5）。

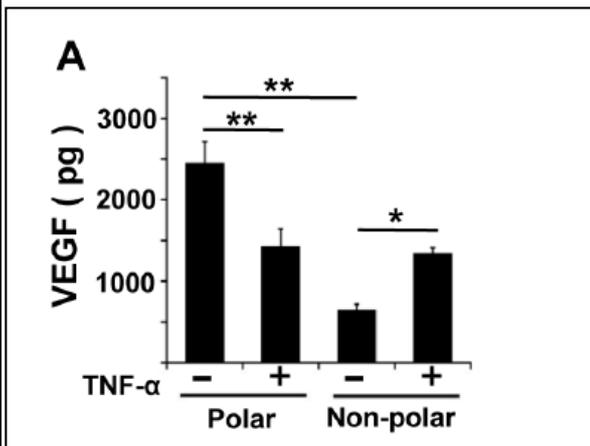


図5 TNF-α 刺激による VEGF 分泌の差。極性細胞と非極性細胞は TNF-α に対する反応性が逆である。

従来、炎症下では RPE 細胞は VEGF 分泌を亢進して血管新生を引き起こすとされてきたが、正常の状態ではむしろ減少させた。そのメカニズムを解明するために、数多くの細胞内シグナルについて検討した。その結果、以下の事がわかった。非極性細胞では、常に転写因子 Nf-κB がドライブされているが、Nf-κB は VEGF を誘導する、JNK 系に対して抑制的に働く。TNF-α で刺激すると、JNK, Nf-κB いずれも刺激するが、Nf-κB の刺激は既に最大に

働いているので相対的には JNK をドライブする力の方がまさり結果的に VEGF の産生が更新する。一方極性細胞では、Nf-kB はほとんど働いていない。そこに Nf-kB 刺激作用が働くと、JNK への抑制が強く働き、結果的に VEGF 産生が抑制されるのである (図 6)。

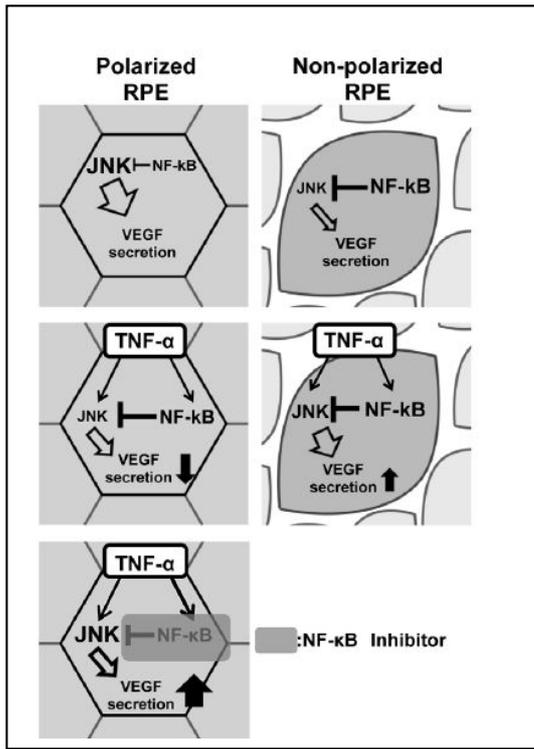


図 6 極性細胞と非極性細胞の反応性の違いを示した図

画像診断と硝子体成分：

糖尿病網膜症患者の硝子体液を採取して、VEGF, IL-6, IL-8 の量を測定した。OCT 画像を黄斑浮腫の形態によって、diffuse 型、cyst 型、subretinal fluid 型に分けて相関を取った。その結果、subretinal fluid 型と IL-6 について有意な相関がみられた。そこで、SRD の輝度を測定し、(図 7) 相関を調べた。

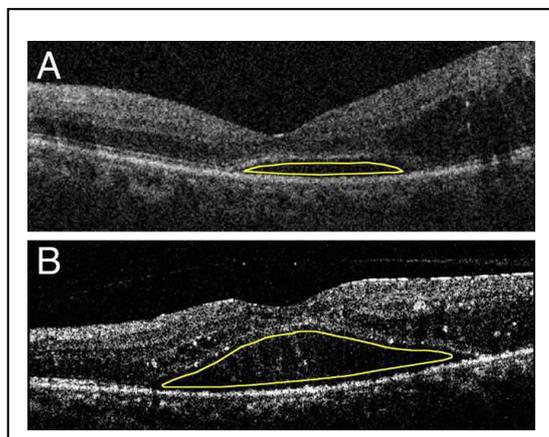


図 7 OCT 画像のうちで subretinal fluid の

輝度を測定して (黄色線で囲まれた所) 相関を調べた

その結果、VEGF の濃度と subretinal fluid の濃度に有意な相関を認めた (図 8)。

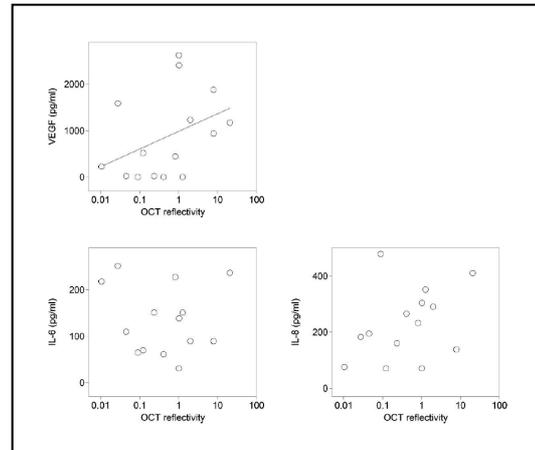


図 8 OCT 輝度と硝子体各因子の相関。VEGF とのみ相関を示し、それ以外とは相関を示さなかった。

つまり、硝子体の環境を知るには、硝子体液取る必要性は必ずしもなく、OCT 画像により、大まかな推定ができることになる。これは、臨床現場においては、患者への負担が減る優れた方法である。

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 48 件)

Sonoda S, Sakamoto T, Yamashita T, Uchino E, Kawano H, Yoshihara N, Terasaki H, Shirasawa M, Tomita M, Ishibashi T. Luminal and stromal areas of choroid determined by binarization method of optical coherence tomographic images. Am J Ophthalmol (in press). 査読有

Yoshihara N, Sakamoto T, Yamashita T, Yamashita T, Yamakiri K, Sonoda S, Ishibashi T. Wider retinal artery trajectories in eyes with macular hole than in fellow eyes of patients with unilateral idiopathic macular hole. Plos One (in press). 査読有

Yamashita T, Sakamoto T, Yoshihara N, Terasaki H, Kii Y, Tanaka M, Nakao K. Circumpapillary course of retinal pigment epithelium can be fit to sine wave and amplitude of sine wave is significantly correlated with ovality ratio of optic disc. Plos One (in press). 査読有

Okubo A, Unoki K, Sameshima M, Sakamoto T. Focal choroidal excavation with changes

in shape and alterations of inner retina during long follow-up in an eye with polypoidal choroidal vasculopathy. *Clin Exp Optom* (in press). 査読有

Shirasawa M, Sakamoto T, Terasaki H, Yamashita T, Uchino E, Sonoda S. Objective determination of optimal number of spectral-domain optical coherence tomographic images of retina to average. *PLoS One*. 2014 Oct 22;9(10):e110550. doi:10.1371/journal.pone.0110550. eCollection 2014. PMID: 25337716. 査読有

Sonoda S, Sakamoto T, Yamashita T, Shirasawa M, Uchino E, Terasaki H, Tomita M. Choroidal structure in normal eyes and after photodynamic therapy determined by binarization of optical coherence tomographic images. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(6):3893-9. doi: 10.1167/iovs.14-14447. PMID: 24894395. 査読有

Sonoda S, Sakamoto T, Yamashita T, Otsuka H, Shirasawa M, Kakiuchi N, Uchino E, Terasaki H, Kawano H. Effect of intravitreal triamcinolone acetonide or bevacizumab on choroidal thickness in eyes with diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Jun 6;55(6):3979-85. doi: 10.1167/iovs.14-14188. 査読有

Kida T, Kozai S, Takahashi H, Isaka M, Tokushige H, Sakamoto T. Pharmacokinetics and Efficacy of Topically Applied Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in Retinochoroidal Tissues in Rabbits. *PLoS One*. 2014 May 5;9(5):e96481. 査読有

Kawano H, Ito T, Yamada S, Hashiguchi T, Maruyama I, Hisatomi T, Nakamura M, Sakamoto T. Toxic effects of extracellular histones and their neutralization by vitreous in retinal detachment. *Lab Invest*. 2014 May;94(5):569-85. 査読有

Yamashita T, Tanaka M, Kii Y, Nakao K, Sakamoto T. Association between retinal thickness of 64 sectors in posterior pole determined by optical coherence tomography and axial length and body height. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Nov 13;54(12):7478-82. doi: 10.1167/iovs.13-12586. 査読有

Matsuo Y, Sakamoto T, Yamashita T, Tomita M, Shirasawa M, Terasaki H. Comparisons of choroidal thickness of normal eyes obtained by two different spectral-domain OCT and one swept-source OCT instruments. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Nov

19;54(12):7630-6. doi: 10.1167/iovs.13-13135. 査読有

Sonoda S, Sakamoto T, Shirasawa M, Yamashita T, Otsuka H, Terasaki H. Correlation between reflectivity of subretinal fluid in OCT images and concentration of intravitreal VEGF in eyes with diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Aug 9;54(8):5367-74. doi: 10.1167/iovs.13-12382. 査読有

Yamashita T, Kii Y, Tanaka M, Sakamoto T. Relationship between position of peak retinal nerve fiber layer thickness and retinal arteries on sectoral retinal nerve fiber layer thickness. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Aug 13;54(8):5481-8. doi: 10.1167/iovs.12-11008. 査読有

Sonoda S, Sakamoto T, Yamashita T, Shirasawa M, Otsuka T, Sonoda Y. Retinal Morphological Changes and Concentrations of Cytokines in Eyes with Diabetic Macular Edema. *Retina*. 2014 Apr;34(4):741-8. doi: 10.1097/IAE.0b013e3182a48917. 査読有

Terasaki H, Kase S, Shirasawa M, Otsuka H, Hisatomi T, Sonoda S, Ishida S, Ishibashi T, Sakamoto T. TNF- α decreases VEGF secretion in highly polarized RPE cells but increases it in non-polarized RPE cells related to crosstalk between JNK and NF- κ B pathways. *PLoS One*. 2013 Jul 29;8(7):e69994. doi: 10.1371/journal.pone.0069994. 査読有

Otsuka H, Kawano H, Sonoda S, Nakamura M, Sakamoto T. Particle-induced endophthalmitis: Possible mechanisms of sterile endophthalmitis after intravitreal triamcinolone. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Mar 11;54(3):1758-66. doi: 10.1167/iovs.12-11247. 査読有

Shirasawa M, Sonoda S, Terasaki H, Arimura N, Otsuka H, Yamashita T, Uchino E, Hisatomi T, Ishibashi T, Sakamoto T. TNF- α disrupts morphologic and functional barrier properties of polarized retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res*. 2013 May;110:59-69. doi: 10.1016/j.exer.2013.02.012. Epub 2013 Feb 27. PMID: 23454586. 査読有

Notomi S, Hisatomi T, Murakami Y, Terasaki H, Sonoda S, Asato R, Takeda A, Ikeda Y, Enaida H, Sakamoto T, Ishibashi T. Dynamic increase in extracellular ATP accelerates photoreceptor cell apoptosis via ligation of P2RX7 in subretinal hemorrhage. *PLoS One*. 2013;8(1):e53338. doi: 10.1371/journal.pone.0053338. Epub 2013 Jan 8. 査読有

Yamashita T, Yamashita T, Kawano H, Sonoda

Y, Yamakiri K, Sakamoto T. Early Imaging of Macular Hole Closure: A Diagnostic Technique and Its Quality for Gas-Filled Eyes with Spectral Domain Optical Coherence Tomography. *Ophthalmologica*. 2013;229(1):43-9. doi: 10.1159/000343061. 査読有

Terasaki H, Shirasawa M, Yamashita T, Yamashita T, Yamakiri K, Sonoda S, Sakamoto T. Comparison of Foveal Microstructure Imaging with Different Spectral Domain Optical Coherence Tomography Machines. *Ophthalmology*. 2012 Nov;119(11):2319-27. 査読有

② Sonoda S, Tachibana K, Yamashita T, Shirasawa M, Terasaki H, Uchino E, Suzuki R, Maruyama K, Sakamoto T. Selective gene transfer to the retina using intravitreal ultrasound irradiation. *J Ophthalmol*. 2012;2012:412752. doi: 10.1155/2012/412752. 査読有

② Nakao K, Abematsu N, Mizushima Y, Sakamoto T. Optic disc swelling in Vogt-Koyanagi-Harada Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Apr 18;53(4):1917-22. 査読有

③ Yamashita T, Yamashita T, Shirasawa M, Arimura N, Terasaki H, Sakamoto T. Repeatability and reproducibility of subfoveal choroidal thickness in normal eyes of Japanese using different SD-OCT devices. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Mar 1;53(3):1102-7. 査読有

〔学会発表〕(計 50 件)

〔図書〕(計 3 件)

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1 件)

名称：眼球組織への生理活性薬剤導入のための組成物および装置

発明者：坂本泰二、園田祥三

権利者：鹿児島大学

番号：特許登録番号整理番号：05P002 特第 4992071 号

出願年月日：

取得年月日：平成 24 年 5 月 18 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

坂本 泰二 (SAKAMOTO Taiji)

鹿児島大学医歯学総合研究科教授
研究者番号：10235179

(2)研究分担者

丸山 征郎 (MARUYAMA Ikuro)

鹿児島大学医歯学総合研究科教授
研究者番号：20082282

橋口 照人 (HASHIGUCHI Teruto)

鹿児島大学医歯学総合研究科教授
研究者番号：70250917

高尾 尊身 (TAKAO Sonshin)

鹿児島大学学内共同利用施設等
研究者番号：80171411

小財 健一郎 (KOSAI Kenichirou)

鹿児島大学医歯学総合研究科教授
研究者番号：90301663