

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462718

研究課題名(和文) エストロゲン受容体シグナルを応用したぶどう膜炎治療法開発

研究課題名(英文) The effect of 17beta-estradiol for uveitis

研究代表者

藤川 亜月茶 (FUJIKAWA, Azusa)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：60363503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲンの抗炎症作用についてバリア機能を指標として調査をおこなった。TNF- α およびエストロゲン(17 β -Estradiol)、血管内皮増殖因子(VEGF)、もしくはレバミピドを投与して、豚網膜色素上皮(RPE)のTERの変化を調べた。6日目のRPEで、TNF- α 群のみでTER値が60%減少した。14日目では17 β -エストラジオール投与後にTNF- α 刺激を行った群ではTERの低下が見られず、17 β -エストラジオールはTERの低下を防いだと考えた。VEGFで刺激をしたところTERの低下は見られなかった。レバミピド投与後2時間後にTNF- α 刺激を行った群でもTER値は低下していた。

研究成果の概要(英文)：We investigated transepithelial resistance (TER) on porcine retinal pigment epithelium (RPE) after various stimulation added. We used Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), 17 β -estradiol, vascular endothelial growth factor (VEGF), rebamipide as a stimulation. TER has been reduced to 60% after TNF- α added. But if 17 β -estradiol added 2 hour before TNF- α stimulation, the TER was not reduced. We suggest 17 β -estradiol prevents TNF- α damage in RPE. TER wasn't reduced after VEGF added. When rebamipide added 2 hour before TNF- α stimulation, the TER was reduced. We suggest rebamipide doesn't prevent barrier function of RPE.

研究分野：眼科

キーワード：エストロゲン 網膜色素上皮 組織電気抵抗

1. 研究開始当初の背景

ベ-レット病や急性前部ぶどう膜炎などのぶどう膜炎では疫学的に発症の男女差が報告されている (Mishima, et al. Trans. Am. Ophthalmol. Soc. 1979; 77:225) (Ikknur, et al. Am J Ophthalmol, 2004; 138: 373-380)。エストロゲンは、性ホルモンの一種であるが、その働きは多岐に渡っており、特にぶどう膜炎における役割についてはあまり明らかにされていない。エストロゲンにはその受容体であるエストロゲンレセプターを介して作用する経路があり、エストロゲンレセプターが、眼組織に存在する事が報告されている。1998年に Kobayashi らは、ウサギとラットの網膜に、エストロゲンレセプターの mRNA が存在する事を、免疫染色と、in situ hybridization 法にて証明した (Kobayashi, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998; 39: 2105-2110)。また 1999年には、Ogueta らが、人の網膜に、エストロゲンレセプターが存在する事を証明した (Ogueta, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999; 40: 1906-1911)。Miyamoto らの報告によるとラットぶどう膜炎モデルにおいてエストロゲン投与により細胞浸潤が有意に抑制され、E-selectin と IL6 の発現も有意に低下した (Miyamoto N, et al. J Immunol. 1999 ;163:374-9)。また Simoncini らはエストロゲンが受容体を介して直接 PI3-kinase 作用を持つという画期的な報告をした (Simoncini, et al. Nature. 2000; 407: 538-541)。しかし実際にエストロゲンを治療に応用するには女性化などの副作用が予測されるため、エストロゲンの抗炎症作用のメカニズムを解明し必要なシグナルだけを利用することが重要である。

2. 研究の目的

エストロゲンが、ぶどう膜炎にどのような影響をあたえているのかを明らかにし、ぶどう

膜炎の治療に応用できるかを検討する。エストロゲンは性ホルモンの一種であり、ヒトの網膜には、エストロゲンレセプターが存在する。ラットぶどう膜炎モデルにおいてエストロゲン投与により、細胞浸潤の抑制がみられる事が報告されており、エストロゲンが受容体を介して直接 PI3-kinase 作用を持つ事も報告されている。すなわちエストロゲンの抗炎症作用はぶどう膜炎に影響を与える可能性があり、必要なシグナルを解明し、適切な治療を開発していきたい。

3. 研究の方法

細胞レベルで、エストロゲンレセプターの発現、機序を解明し、次に、動物レベルで、エストロゲンが実験的ぶどう膜炎を抑制できるか検討する。

1. 細胞レベルでの検討 脈絡膜血管を形成する内皮・周皮細胞、血管周囲を形成する色素細胞などによる in vitro の系において LPS (リポ多糖)を負荷することにより炎症細胞の浸潤に関与する E-selection や ICAM-1 などの細胞接着分子、IL-6 などの炎症性サイトカイン、LPS 受容体である TLR4 などの発現を検討する。次に TLR4 の下流にあるとされる IKKs や JNK、p38 などのストレス感受性シグナル、NFkB や AP1 などの転写因子の活性化を検討し、その結果に基づき阻害実験を行い接着分子やサイトカインの発現が修飾されるかを検討する。エストロゲンを同時に負荷し同様の検討を行い LPS シグナルとエストロゲンシグナルのクロストークを検討する。

2. 動物レベルでの検討 遺伝子改変マウスに LPS で endotoxin-induced uveitis を誘導し、上記の結果を in vivo で確認する。遺伝子改変マウスが手に入らない場合は転写因子レベルの検討には decoy 法、細胞質でのシグナルレベルでは各種 dominant-negative, RNAi を用いて阻害実験を行いエストロゲンの抗炎症シグナルを利用したぶどう膜炎の

治療が可能かどうか検討する。

4. 研究成果

網膜色素上皮におけるエストロゲンの抗炎症作用について、バリア機能を指標として調査をおこなった。1) トランスウェルを用いて豚眼RPEを培養し、経上皮電気抵抗値(TER)を用いてバリア機能を測定した。

2) TNF- およびエストロゲン(17

Estradiol)、血管内皮増殖因子(VEGF)、もしくはrebamipideを投与してTERの変化を調べた。

TER測定についてはホットプレートを用いて温度は37度に固定し、各ウェル3回測定し、中央値を採用した。

RPEについては比較的入手が容易である豚眼を用いて、Kimberlyらの方法で採取した。

豚RPEのTER値は3週目で高く、約250 $\cdot \text{cm}^2$ だった。また、VEGFは、生体RPEと同様のパターンを示し、基底側で有意に分泌していた。6日目のRPEで、コントロール群、TNF- 刺激群、17 エストラジオール刺激群、17 エストラジオール投与後2時間後にTNF- 刺激を行った群を比較した。TNF- 群のみでTER値が60%減少した。14日目のRPEで同様の実験を行ったところ、17 エストラジオール投与後にTNF- 刺激を行った群ではTERの低下が見られず、17 エストラジオールはTERの低下を防いだと考えた。次に、VEGFで刺激をしたところTERの低下は見られなかった。VEGFは血管内皮の障害に関連している可能性があるが、細胞壁の障害には影響しないのかもしれない。さらに、角膜上皮のバリア障害を防ぐとの報告があるレバミピドで、TNF- のTER低下を防げるか実験した。TNF- 刺激群、レバミピド刺激群、レバミピド投与後2時間後にTNF- 刺激を行った群を比較した。レバミピド投与後2時間後にTNF- 刺激を行った群でもTER値は低下しており、保護効果はないかもしれない。

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 10 件)

Uematsu M, Mohamed YH, Onizuka N, Ueki R, Inoue D, Fujikawa A, Kitaoka T: Less invasive Corneal Transepithelial Electrical Resistance Measurement Method. Ocular Surf 14: 37-42, 2015 査読有

DOI:10.1016/j.jtos.2015.07.004.

Yamada Y, Suzuma K, Matsumoto M, Tsuiki E, Fujikawa A, Harada T, Kitaoka T: RETINAL BLOOD FLOW CORRELATES TO AQUEOUS VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN CENTRAL RETINAL VEIN OCCLUSION. Retina 35: 2037-2042, 2015 査読有

DOI: 10.1097/iae.0000000000000595

Uematsu M, Mohamed YH, Onizuka N, Ueki R, Inoue D, Fujikawa A, Kitaoka T: A novel in vivo corneal trans-epithelial electrical resistance measurement device. J Pharmacol Toxicol Methods 76: 65-71, 2015 査読有

DOI: 10.1016/j.vascn.2015.08.153.

Kumagami T, Wakiyama H, Kusano M, Kajiyama A, Miura Y, Uematsu M, Yoneda A, Kurihara J, Suzuma K, Kitaoka T: Comparison of corneal safety and intraocular pressure-lowering effect of tafluprost ophthalmic solution with other prostaglandin ophthalmic solutions. J Ocul Pharmacol Th 30: 340-345, 2014 査読有

DOI:10.1089/jop.2013.0132

Onizuka N, Uematsu M, Kusano M, Sasaki H, Suzuma K, Kitaoka T: Influence of different additives and their concentrations on corneal toxicity and antimicrobial effect of benzalkonium chloride. Cornea 33: 521-526, 2014 査読有

DOI:10.1098/ICO.0000000000000086

Kinoshita H, Suzuma K, Maki T, Maekawa Y, Matsumoto M, Kusano M, Uematsu M, Kitaoka T: Cyclic stretch and hypertension increase retinal succinate: potential mechanisms for exacerbation of ocular neovascularization by mechanical stress. Invest Ophthalmol Vis Sci 55: 4320-4326, 2014 査読有

DOI:10.1167/iovs.13-13839

Matsumoto M, Suzuma K, Fukazawa Y,

Yamada Y, Tsuiki E, Fujikawa A, Kitaoka T: Retinal blood flow levels measured by laser speckle flowgraphy in patients who received intravitreal bevacizumab injection for macular edema secondary to central retinal vein occlusion. Retin Cases Brief Rep 8: 60-6, 2014 査読有

DOI:10.1097/ICB.0000000000000005

Yamada Y, Suzuma K, Kumagami T, Fujikawa A, Kitaoka T: Systemic factors influence the prognosis of diabetic macular edema after pars plana vitrectomy with internal limiting membrane peeling. Ophthalmologica 229: 142-146, 2013 査読有

DOI: 10.1159/000345494

Yamada Y, Suzuma K, Fujikawa A, Kumagami T, Kitaoka T: Imaging of laser-photocoagulated diabetic microaneurysm with spectral domain optical coherence tomography. Retina-J-Ret Vit Dis 33: 726-731, 2013 査読有

DOI: 10.1097/IAE.0b013e3182753960

Yamada Y, Suzuma K, Ryu M, Tsuiki E, Fujikawa A, Kitaoka T: Systemic factors influence the prognosis of diabetic macular edema after pars plana vitrectomy with internal limiting membrane peeling. Curr Eye Res 38: 1261-1265, 2013 査読有

DOI: 10.3109/02713683.2013.820327

〔学会発表〕(計 15 件)

Azusa Fujikawa: Evaluation of scleral buckling with chandelier illumination for rhegmatogenous retinal detachment ARVO 2016 5.1-4 Seattle USA

Fujikawa A, Kinoshita H, Matsumoto M, Tsuiki E, Suzuma K, Kitaoka T: The visual outcome and prognostic factors in open globe ocular injuries. ARVO 2015 5.3-7 Denver USA

Inoue D, Uematsu M, Yasser HM, Onizuka N, Ueki R, Fujikawa A, Sasaki H, Kitaoka T: Acute corneal toxicity of Xalatan and some generics. ARVO 2015 5.3-7 Denver USA

Matsumoto M, Suzuma K, Tsuiki E, Fujikawa A, Kitaoka T: Retinal blood flow levels after intravitreal ranibizumab for diabetic macular edema. 15th EURETINA Congress Nice 2015 9.17-19 Nice France

Matsumoto M, Suzuma K, Tsuiki E, Fujikawa A, Kitaoka T: Retinal blood flow levels measured by Laser Speckle Flowgraphy significantly increased

after vitrectomy for diabetic macular edema. ARVO 2014 5.4-8, Orlando, USA

Onizuka N, Uematsu M, Suzuma K, Kitaoka T: Correlation of retina circulation and blood pressure before and after panretinal photocoagulation for diabetic retinopathy. ARVO 2014 5.4-8, Orlando, USA

Kinoshita H, Suzuma K, Kaneko J, Mandai M, Kitaoka T, Takahashi M: Generation of ciliary epithelium from mouse ES and iPS cells. ARVO 2014 5.4-8, Orlando, USA

Yoneda A, Suzuma K, Maekawa Y, Tsuiki E, Wakiyama H, Kitaoka T: Retinal and choroidal blood flow changes after switching therapy from ranibizumab to aflibercept in exudative age-related macular degeneration. ARVO 2014 5.4-8, Orlando, USA

Ueki R, Maeda N, Fuchihata M, Koh S, Kitaoka T, Nishida K: Differentiation of forme fruste keratoconus from normal cornea using parameters of corneal tomography, aberration, and biomechanics. ARVO 2014 5.4-8, Orlando, USA

Uematsu M, Onizuka N, Ueki R, Suzuma K, Kitaoka T: Benzalkonium chloride of alkyl chain length C12 is safer for corneal epithelium. 13th congress of the International Society ocular 2014 10.9-12 金沢文化ホール(石川県・金沢市)

Fujikawa A, Suzuma K, Yamada K, Inoue D, Kitaoka T: Optical coherence tomography and ultra-wide-field autofluorescence imaging are the useful tools to understand the changes in peripheral retinal lesions. (ARVO) 2013 5.5-9, Seattle USA

Tsuiki E, Suzuma K, Maekawa Y, Kitaoka T: Blood flow changes of the retina and choroid after vitrectomy for epiretinal membrane measured by laser speckle flowgraphy. (ARVO) 2013 5.5-9, Seattle USA

Matsumoto M, Suzuma K, Yamada Y, Tsuiki E, Fujikawa A, Kitaoka T: Retinal blood flow levels measured by Laser Speckle Flowgraphy in central retinal vein occlusion as a predictive factor for ischemia and visual loss. (ARVO) 2013 5.5-9, Seattle USA

Tsuiki E, Suzuma K, Matsumoto M, MCB MD DOMS, Kitaoka T: Oral Kallidinogenase Improved Retinal Blood Flow Levels and Visual Acuity in Diabetic Macular Edema Patients. AAO 2013 11.16-19 New Orleans USA

Fujikawa A, Suzuma K, Yamada K, Inoue D, Kitaoka T: An Assessment of

the Lesion in Peripheral Retina Using
Optical Coherence Tomography and
Ultra-Wide-Field Autofluorescence
Imaging. The 8th APVRS Congress
2013 12.6-8,名古屋国際会議場(名古屋市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤川 亜月茶 (FUJIKAWA, Azusa)
長崎大学・病院(医学系)・講師
研究者番号：60363503

(2) 研究分担者

築城 英子 (TSUIKI, Eiko)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
講師
研究者番号：30363493

(3) 研究分担者

北岡 隆 (KITAOKA, Takashi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
教授
研究者番号：80234235

(3) 研究分担者

鈴間 潔 (SUZUMA, Kiyoshi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
客員研究員
研究者番号：80335265