

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861459

研究課題名(和文) 網膜剥離における分子病態の解析

研究課題名(英文) investigation of molecular pathology of retinal detachment

研究代表者

大塚 寛樹 (OTSUKA, HIROKI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員

研究者番号：20611817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：網膜剥離は失明につながる恐れのある重篤な疾患である。近年transwellを利用した網膜色素上皮細胞(RPE)培養により、細胞極性を持ったPRE(polarized RPE)培養が可能である。それを用いてRPEとthrombinの病態への関わりについて検討した。thrombin刺激によりnon-polarized RPEではTERが低下し、tight junction蛋白質の減少を認めた。non-polarized RPEでのみKi-67陽性細胞を認めた。permeability assayではthrombin刺激によりnon-polarized RPEのみ透過性の亢進を認めた。

研究成果の概要(英文)：Retinal detachment is severe disease that can lead to loss of vision. Some patients have poor visual acuity by photoreceptor cell death, regardless of successful surgery. Recently, highly polarized RPE cells were grown on TranswellTM filters. We examined the pathophysiological mechanism of RPE and Thrombin using polarized RPE cells. Thrombin did not significantly affect the TER or the expression of tight-junctional proteins in polarized RPE cells, but decreased it in non-polarized RPE cells. Ki-67 positive cells were observed in non-polarized RPE cells but not in polarized RPE cells. Thrombin increases permeability of RPE in non-polarized RPE but not in polarized RPE.

研究分野：眼科学

キーワード：分子生物学

1. 研究開始当初の背景

網膜剥離はあらゆる年齢に発症する可能性があり、放置すると失明につながる重篤な疾患である。その病態は本来接着している視細胞と網膜色素上皮細胞 (RPE) の間の乖離が起こることである。今日では手術の進歩によって、ほとんどの症例で網膜復位が可能となっている。しかし、視機能の回復という点では十分とはいえず、網膜剥離治療における未解決の課題である。網膜が復位したとしても視力回復を得られない原因として、網膜剥離視細胞の変性や、アポトーシスやネクローシスといった細胞死を生じ、不可逆性の変化を起こしてしまうからである。

今後の網膜剥離の治療におけるブレークスルーは「剥離期間に起こる細胞ダメージを回避すること」であり、現在多くの研究が行われ、例えば網膜剥離の際には erythropoietin、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) などの因子が視細胞死を抑制する働きを持っていることが報告されている。このような眼内の液性因子研究が次の新しい治療の礎となる可能性が高い。

SDF-1 は発生や血球の新生などに重要な因子として同定されたが (Nagasawa et al. Nature 1996)、その他にも血管新生や組織修復に重要な役割を持つことが解明され、現在注目されている。我々はこれまでの研究で、網膜剥離時に眼内で SDF-1 が分泌され、剥離した視細胞に対して保護的な役割を持っていることを世界で初めて報告した (Otsuka et al. Am J Pathol 2010)。

我々は、生体に近い polarized RPE の培養システムを有している。この方法では、上皮側・基底側とコンパートメントを分けて解析が可能のため、より正確な病態解析が可能になると考えられている。

2. 研究の目的

眼内での RPE は網膜の恒常性を保つため

に重要な役割を担っているが、網膜剥離の際に視細胞と接着を失っても、RPE から分泌されるサイトカイン/ケモカインやバリア機能の変化などは少なからず網膜に影響を与えていると考えられる。そこで in vitro で RPE の培養細胞を用いて各種の刺激を受けた際のサイトカイン/ケモカインの動態やバリア機能の変化などを検討する。transwell insert を利用することで形態学的、機能的により生体の RPE に類似した polarized RPE を培養し、より生体に近い環境で剥離した網膜と、RPE の関連性を検討する。

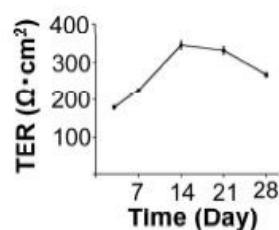
3. 研究の方法

polarized RPE を刺激する因子として thrombin に注目し研究を行った。thrombin は血液凝固カスケードの重要な因子であり、裂孔原性網膜剥離や裂孔原性硝子体出血の際にも病態に影響していると考えられる。

豚網膜色素上皮細胞を transwell insert で培養した polarized RPE を用いて実験を行った。それらを用いて光学顕微鏡による形態の観察、免疫染色、western blot、transepithelial electrical resistance (TER) 測定、ELISA による VEGF 濃度測定を行った。

4. 研究成果

培養した RPE の機能の指標として TER を測定した。細胞を播種して 3 日目では TER は $179.3 \pm 4.8 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 、形態も敷石状であったが、14 日目には $345.5 \pm 10.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ に達し、6 角形の成熟した形態を認めた。そのため 3 日目の細胞を non-polarized RPE、14 日目の細胞を polarized RPE として実験を行った。



thrombin で 24 時間刺激すると容量依存性に non-polarized、polarized RPE の VEGF 分泌を増加させた。また polarized RPE では thrombin による刺激で TER、tight-junction 蛋白質とも変化しなかったのに対して、non-polarized RPE では低下していた。Ki-67 陽性の細胞は polarized RPE では認めなかったが、non-polarized RPE では Ki-67 陽性細胞を認めた。permeability assay では thrombin による刺激で non-polarized RPE のみ透過性の亢進を認めた。

これらの結果から正常な RPE は影響を受けにくい、長期に経過した網膜剥離や加齢黄斑変性などで RPE が極性を失うと、出血やそれに伴う thrombin の影響を受けやすい可能性が示唆された。今後 SDF-1 などの他の因子についても検討する予定である。

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 11 件)

庭田有里、大塚寛樹、坂本泰二：鈍的外傷後に生じた中心性漿液性脈絡網膜症様の漿液性網膜剥離を伴う脈絡膜破裂。臨床眼科。69 巻 9 号、1417-1421、2015 査読あり

Shiihara H, Terasaki H, Yoshihara N, Shirasawa M, Otsuka H, Yamashita T, Yamakiri K, Sonoda S, Sakamoto T. AMOUNT OF RESIDUAL SILICONE OIL IN VITREOUS CAVITY IS SIGNIFICANTLY CORRELATED WITH AXIAL LENGTH. Retina. 2015 査読あり

Terasaki H, Sakamoto T, Shirasawa M, Yoshihara N, Otsuka H, Sonoda S, Hisatomi T, Ishibashi T. Penetration of bevacizumab and ranibizumab through retinal pigment epithelial layer in

vitro. Retina. 35(5):1007-1015. 2015 査読あり

Terasaki H, Shirasawa M, Otsuka H, Yamashita T, Uchino E, Hisatomi T, Sonoda S, Sakamoto T. Different Effects of Thrombin on VEGF Secretion, Proliferation, and Permeability in Polarized and Non-polarized Retinal Pigment Epithelial Cells. Curr Eye Res. 40(9):936-945. 2015 査読あり

大塚寛樹、坂本泰二：【眼科診療のエッセンス Q&A】網膜疾患と硝子体疾患(Q4) 糖尿病黄斑浮腫の薬物治療について教えてください。あたらしい眼科。31 巻臨時増刊号、94-95、2014 査読なし

大塚寛樹、坂本泰二：【高齢者の感覚器障害】眼疾患 診断と最新の治療。臨床と研究。91 巻 9 号、1163-1168、2014 査読なし

大塚寛樹、坂本泰二：【最新臨床高血圧学-高血圧治療の最前線-】臓器障害・合併症評価の 検査 一般必須検査 眼底検査。日本臨床。72 巻増刊 6 最新臨床高血圧学、145-147、2014 査読なし

大塚寛樹、坂本泰二：眼科医の手引 硝子体注射による網膜毒性について。日本の眼科。85 巻 7 号、934-935、2014 査読なし

Yamashita T, Sakamoto T, Yamashita T, Sonoda S, Yamakiri K, Otsuka H, Hisatomi T, Imaki H, Ishibashi T, Dugel PU. Individualized, spectral domain-optical coherence tomography-guided facedown posturing after macular hole surgery: minimizing treatment burden and maximizing outcome. Retina. 34(7):1367-1375. 2014 査読あり

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. 55(6):3979-3985. 2014 査読あり
Sonoda S, Sakamoto T, Yamashita T, Shirasawa M, Otsuka H, Sonoda Y. Retinal morphologic changes and concentrations of cytokines in eyes with diabetic macular edema. Retina. 34(4):741-748. 2014 査読あり

〔学会発表〕(計 12 件)

大塚寛樹、坂本泰二、黄斑剥離を伴う裂孔原性網膜剥離に対する硝子体手術後の残存網膜下液の検討、第 54 回網膜硝子体学、2015 年 12 月 4 日、東京国際フォーラム (東京都、千代田区)

大塚寛樹、坂本泰二、網膜剥離データベースによる現在と 16 年前の裂孔原性網膜剥離に対する初回手術の比較、第 119 回日本眼科学会総会、2015 年 4 月 16 日、ロイトン札幌、札幌芸術文化の館 (北海道、札幌市)

芳原直哉、寺崎寛人、大塚寛樹、園田祥三、久富智朗、石橋達朗、坂本泰二、極性をもつ網膜色素上皮細胞におけるアフリベルセプトの透過性、第 119 回日本眼科学会総会、2015 年 4 月 16 日、ロイトン札幌、札幌芸術文化の館 (北海道、札幌市)

椎原秀樹、寺崎寛人、芳原直也、大塚寛樹、山下敏史、山切啓太、園田祥三、坂本泰二、シリコンオイル抜去術後の残存シリコンオイルと眼軸長の関係性、第 119 回日本眼科学会総会、2015 年 4 月 16 日、ロイトン札幌、札幌芸術文化の館 (北海道、札幌市)

山下敏史、大塚寛樹、山切啓太、園田祥

三、坂本泰二、大型黄斑円孔への inverted internal limiting membrane flap technique 手術後の早期ガス下光干渉断層計所見と長期経過、第 119 回日本眼科学会総会、2015 年 4 月 16 日、ロイトン札幌、札幌芸術文化の館 (北海道、札幌市)

大塚寛樹、白澤誠、吉永和歌子、喜井裕哉、園田祥三、坂本泰二、Ranibizumab あるいは Aflibercept 硝子体注射後 1 年間の経過、第 68 回臨床眼科学会、2014 年 11 月 13 日、神戸国際展示場 (兵庫県、神戸市)

大塚寛樹、園田祥三、坂本泰二、色素上皮裂孔周囲の光凝固が奏功した多発性後極部網膜色素上皮症の 1 例、第 53 回網膜硝子体学会、2014 年 11 月 28 日、大阪国際会議場 (大阪府、大阪市)

椎原秀樹、寺崎寛人、白澤誠、芳原直也、大塚寛樹、山下敏史、山切啓太、園田祥三、坂本泰二、シリコンオイル抜去眼の術後超音波検査所見、第 53 回網膜硝子体学会、2014 年 11 月 28 日、大阪国際会議場 (大阪府、大阪市)

大塚寛樹、山下敏史、坂本泰二、黄斑円孔 stage1B に対して硝子体手術を施行した 2 症例、第 84 回九州眼科学会、2014 年 6 月 27 日、久留米大学 (福岡県、久留米市)

山下敏史、大塚寛樹、山切啓太、園田祥三、坂本泰二、ガス下での光干渉断層計 (OCT) 像と通常 OCT 像の差について、第 118 回日本眼科学会総会、2014 年 4 月 2 日、東京国際フォーラム (東京都、千代田区)

庭田有理、大塚寛樹、坂本泰二、外傷後に中心性漿液性脈絡膜網膜症を生じた一症例、第 118 回日本眼科学会総会、2014 年 4 月 2 日、東京国際フォーラム (東京都、千代田区)

寺崎寛人、芳原直也、白澤誠、大塚寛樹、
園田祥三、坂本泰二、極性をもつ網膜色
素上皮細胞における抗VEGF薬の透過性
のメカニズム、第118回日本眼科学会総
会、2014年4月2日、東京国際フォーラ
ム（東京都、千代田区）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 寛樹 (OTSUKA HIROKI)

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院 医員

研究者番号：20611817

(2) 研究分担者 無

(3) 連携研究者 無