

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20262

研究課題名(和文) 難治性黄斑円孔の閉鎖過程におけるミュラー細胞の役割：新たな治療法の開発を目指して

研究課題名(英文) The Role of Inverted Internal Limiting Membrane Flap in Macular Hole Closure

研究代表者

塩出 雄亮 (SHIODE, Yusuke)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：20711097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：黄斑円孔手術において内境界膜弁翻転法のメカニズムを解明した。サル眼の実験的な黄斑円孔に、内境界膜弁翻転法を行うことにより黄斑円孔の閉鎖過程を組織学的に検討した。内境界膜成分である4型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンが、ミュラー細胞(M10-M1)の機能に与える影響について検討した。さらに、ミュラー細胞、およびヒト内境界膜における神経栄養因子の発現について検討した。これらの結果から、黄斑円孔手術の際に内境界膜はミュラー細胞を活性化させミュラー細胞の増殖及び遊走の足場として働くこと、活性化したミュラー細胞から神経栄養因子が発現されることにより、黄斑円孔の閉鎖に寄与する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of macular hole (MH) closure following the inverted internal limiting membrane (ILM) technique. We performed the inverted ILM flap surgical technique as an experimental MH model in monkeys, and investigated the process of MH closure immunohistochemically. We then investigated the effects of type IV collagen, fibronectin, and laminin, which are constituent proteins of the ILM, on the proliferation and migration of cultivated Muller cells(M10-M1). We also investigated the expression of neurotrophic factors in human ILM and M10-M1 cells. From these results, during MH closure, the ILM functioned as a scaffold for the proliferation and migration of Muller cells, and may promote Muller cell activation. Neurotrophic factors produced by activated Muller cells and present on the surface of the ILM may contribute to MH closure.

研究分野：網膜硝子体疾患

キーワード：黄斑円孔 内境界膜 ミュラー細胞 神経栄養因子

1. 研究開始当初の背景

難治性黄斑円孔に対する新たな治療法として、2010年に内境界膜弁翻転法を併用した硝子体手術が、2014年には内境界膜自家移植法を併用した術式が報告された。これらの術式によりこれまで難治性と考えられていた巨大な黄斑円孔、陳旧性の黄斑円孔、続発性の黄斑円孔などの症例の円孔閉鎖率が上昇し、良好な治療成績が得られることが明らかになった。その一方で、これらの術式による円孔閉鎖のメカニズムは不明であった。

黄斑円孔の閉鎖にはすでにミュラー細胞が大きな役割を果たすことが知られていた。我々はミュラー細胞の活性化と円孔の閉鎖との関連を明らかにし、内境界膜がミュラー細胞に与える影響を検討することとした。

2. 研究の目的

難治性黄斑円孔の閉鎖過程には細胞組織学的な未解明であった。また、内境界膜弁翻転法や、内境界膜自家移植法は手術手技が難しいことが問題点であった。本研究では、難治性黄斑円孔の閉鎖過程におけるミュラー細胞の機能を検討することとした。この結果を元に、将来的には新たな術式(手術手技が比較的難しい内境界膜移植法に換わる新たな方法、例えば、内境界膜の主成分である型コラーゲンの製剤を使用したアジュバント療法等)の開発を目指した。

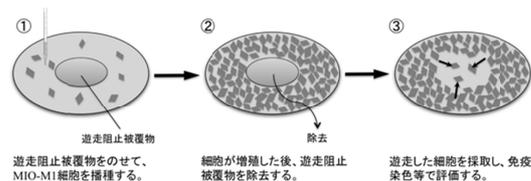
3. 研究の方法

1) 黄斑円孔モデルにおける円孔閉鎖過程の解析を行った。人工的黄斑円孔を作成したカニクイザル眼に、内境界膜翻転術を施行し、術後経過を免疫組織学的に検討した。

2) ミュラー細胞(MIO-M1)の遊走、増殖能の解析を行った。内境界膜の構成成分である、

型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンが、細胞の増殖および遊走に影響を与えるかどうかについて検討した。またミュラー細胞から発現される神経栄養因子および増殖因子(BDNF、CNTF、GDNF、bFGF)について検討した。なお、我々は独自で、培養皿の中央に円形のシリコンを用いて遊走阻止被覆物を作成した遊走アッセイ(Cell exclusion assay)を開発した。円形の遊走阻止被覆物を黄斑円孔に見立てており、細胞が増殖した後、遊走阻止被覆物を除去すると、その空隙に向かって細胞が遊走する(図1)。

図1 我々の開発した遊走アッセイ



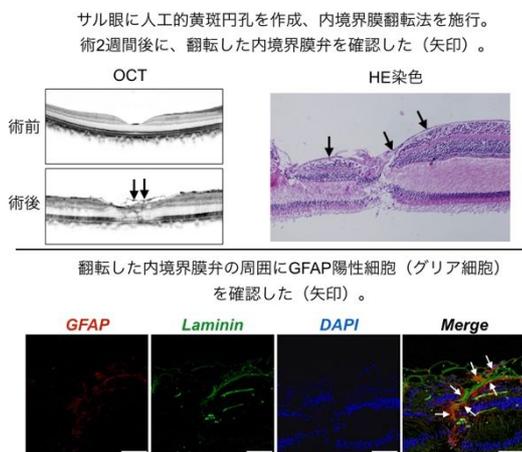
3) 手術時に摘出したヒト内境界膜組織の検討を行った。黄斑円孔患者10例10眼を対象とし、手術時に剥離した内境界膜を採取し、これらの因子の存在の有無を免疫組織化学的に検討した。

4. 研究成果

1) サル眼において、翻転した内境界膜の周囲にGFAP陽性細胞を認めた

内境界膜翻転法を行ったサル眼では黄斑円孔が閉鎖した。免疫染色では、翻転した内境界膜弁に沿って多くのGFAP陽性細胞を認めた(図2)。その中には増殖細胞のマーカーとなるKi67が陽性である細胞も認められた。これは、翻転させた内境界膜弁がミュラー細胞の増殖、遊走の足場となった可能性を示唆した。

図2 サル眼での検討

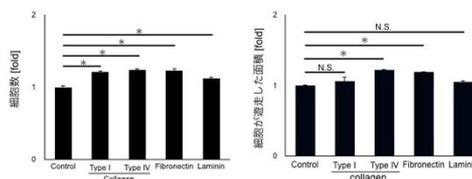


2) 内境界膜の構成成分は、ミュラー細胞の増殖と遊走を促進した

内境界膜の構成成分のうち、IV型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンはMIO-M1細胞の増殖を促進させた。IV型コラーゲンとフィブロネクチンはMIO-M1細胞の遊走を促進させた(図3)。

図3 内境界膜構成成分がミュラー細胞の増殖、遊走におよぼす影響

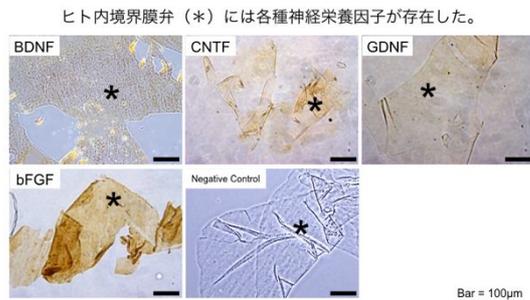
内境界膜の構成成分のうち、4型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンはミュラー細胞の増殖を促進させた。4型コラーゲン、フィブロネクチンはミュラー細胞の遊走を促進させた。



3) ヒト内境界膜に神経栄養因子や増殖因子が存在していた

BDNF、CNTF、GDNF、bFGFが、採取したヒト内境界膜の表面に認められた(図4)。

図4：ヒト内境界膜の免疫組織染色

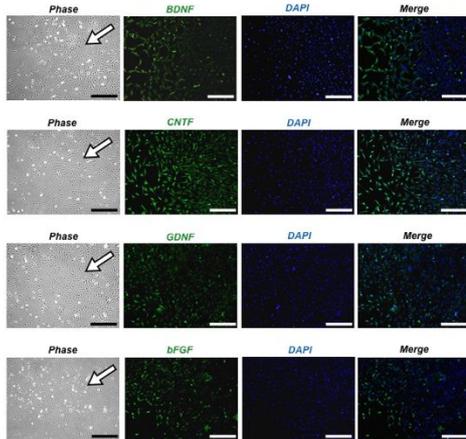


4) 遊走中のミュラー細胞は、神経栄養因子の発現が亢進した

前述の遊走実験系を用いて MIO-M1 細胞を遊走させ、蛍光免疫染色を行った。BDNF、CNTF、GDNF、bFGF の4因子とも、蛍光免疫反応を認めた。また、4因子すべてにおいて遊走細胞における免疫反応は非遊走細胞よりも強かった(図5)。この結果を確認するため、遊走実験系において遊走細胞と非遊走細胞を採取し、BDNF、CNTF、GDNF、bFGF の mRNA の発現量を RT-PCR によって定量した。その結果、4因子すべてにおいて遊走細胞が非遊走細胞よりも発現が有意に亢進しており、免疫染色と一致する結果であった。

図5 遊走中のミュラー細胞における神経栄養因子の発現

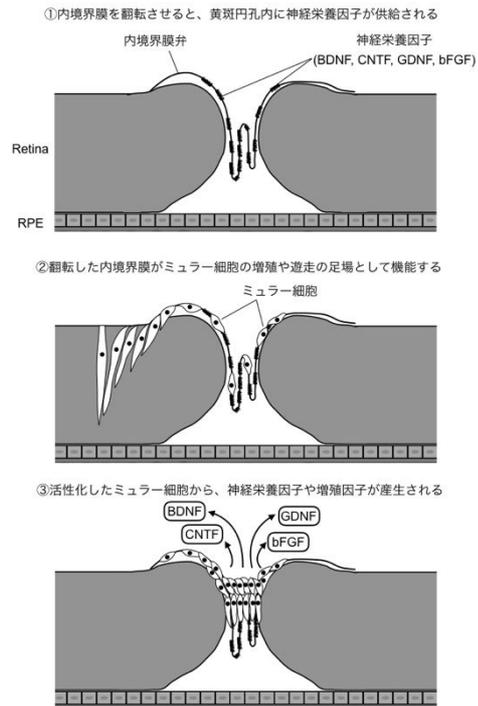
遊走の先端にあるミュラー細胞は、神経栄養因子を強く発現した。
(矢印：細胞が遊走する方向)



以上の結果から、難治性黄斑円孔に対する内境界膜翻転法や内境界膜自家移植の奏効メカニズムとして、翻転した内境界膜がミュラー細胞の増殖や遊走の足場として機能する可能性、活性化したミュラー細胞からは神経栄養因子や増殖因子が産生されること、そして、内境界膜そのものにも神経栄養因子や増殖因子が存在し、黄斑円孔内に置かれた内境界膜弁によって神経栄養因子や増殖因子が円孔に提供される可能性を示した(図6)。

これらの結果は、内境界膜翻転法や内境界膜自家移植による難治性黄斑円孔の閉鎖には、円孔内に置かれた内境界膜弁とミュラー細胞の間の相互作用や、神経栄養因子や増殖因子等の液性因子が関与することを示唆するものと考えた。

図6:黄斑円孔治癒過程における内境界膜弁の役割



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2件、すべて査読有り)

1) Shiode Y, Morizane Y, Matoba R, Hirano M, Doi S, Toshima S, Takahashi K, Araki R, Kanzaki Y, Hosogi M, Yonezawa T, Yoshida A, Shiraga F.

The Role of Inverted Internal Limiting Membrane Flap in Macular Hole Closure. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2017;58(11):4847-4855.

2) Shiode Y, Morizane Y, Matoba R, Hirano M, Doi S, Toshima S, Araki R, Hosogi M, Takahashi K, Kanzaki Y, Yonezawa T, Shiraga F.

A novel cell exclusion zone assay with a barrier made from room temperature vulcanizing silicone rubber.

PLoS One. 2017 Dec 21;12(12):e0190198.

〔学会発表〕(計1件)

1) 平成30年4月 第122回 日本眼科学
会総会(大阪)

発表者名: 塩出雄亮, 森實祐基, 平野雅幸,
土居真一郎, 戸島慎二, 荒木亮一, 高橋耕介,
松前洋, 神崎勇希, 細木三佳, 米澤朋子, 白
神史雄

発表演題: 細胞外基質が細胞遊走に及ぼす影
響の評価を目的とした細胞遊走アッセイ

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者 塩出 雄亮 (SHIODE, Yusuke)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号: 20711097

(2) 研究分担者 なし
研究者番号:

(3) 連携研究者 なし
研究者番号:

(4) 研究協力者

森實祐基, 的場 亮, 平野雅幸, 土居真一郎,
戸島慎二, 高橋耕介, 荒木亮一, 神崎勇希,
細木三佳, 米澤朋子, 吉田篤史, 白神史雄