

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791668

研究課題名(和文)眼内増殖性網膜疾患病態における硝子体細胞の機能解析と新しい治療戦略

研究課題名(英文)The functional analysis of the vitreous derived cells for the new therapeutic strategy of the intraocular proliferative diseases.

研究代表者

西塚 弘一(NISHITSUKA KOICHI)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：60422169

研究成果の概要(和文): 眼内増殖性疾患病態における硝子体細胞の役割をしらべるために、ヒト硝子体組織より細胞系統を樹立した。ブタ硝子体由来細胞を用いて病態において上昇する炎症性サイトカインによる反応を検討したところ、サイトカイン刺激によるヒアルロナン産生調節が認められた。血管内皮細胞と硝子体由来細胞との共培養系による病態実験モデルを作成し、血管内皮細胞増殖反応に硝子体細胞が影響を与えることが観察できた。

研究成果の概要(英文): We established the human vitreous tissue-derived cell strain to investigate the relationship between vitreous derived cells and intraocular proliferative diseases. Inflammatory cytokines increased in intraocular proliferative diseases induced the hyaluronan production regulation on porcine vitreous derived cells. These cells also enhance the proliferation of the vascular endothelial cells on co-culture system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：硝子体細胞、眼内増殖性疾患、ヒアルロナン、糖尿病網膜症、増殖硝子体網膜症、眼細胞生物学

## 1. 研究開始当初の背景

眼内増殖性疾患は難治性疾患であり、外科的治療が功を奏さず失明に至ることもある。これまでの病態研究の対象は主に網膜で

あった。

眼内には硝子体細胞と呼ばれる細胞がわずかながらに存在しているが、これまで病態との関連についての研究はほとんどされ

ていなかった。

硝子体細胞を用いた分子生物学的研究を進めるために、研究者らはブタ硝子体組織より不死化遺伝子を用いて細胞株を樹立した。

ブタ硝子体細胞は、病態にて上昇するTGF- $\beta$ , PDGFによるヒアルロナン産生調節が認められた。ヒアルロナンは細胞外マトリックスのひとつで、細胞の増殖/分化/移動などの生理活性作用をもつといわれており、眼内増殖性疾患におけるサイトカイン・硝子体細胞・ヒアルロナンの関連を調べることが病態の新たな解明となることが期待された。

## 2. 研究の目的

ブタ硝子体由来細胞株を用いて、眼内増殖性疾患にて上昇する炎症性サイトカインIL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, VEGFによる反応性をヒアルロナンを中心に調べる。

ヒト眼組織(硝子体)より、ヒアロサイトの初代培養を試みる。また、不死化遺伝子導入による細胞株樹立を目指す。

## 3. 研究の方法

細胞：硝子体細胞として、我々が以前に樹立したブタ硝子体由来細胞株

(K. Nishitsuka et al. Exp. Eye Res. 2007)を用いた。また、網膜血管内皮細胞との共培養系を作成し、眼内増殖性疾患における硝子体細胞の機能解析を に行った。

遺伝子発現(mRNA)：サイトカイン刺激による種々のターゲット遺伝子の mRNA レベルでの発現調節を RT-PCR にて検討した。

ヒアルロナン産生：サイトカイン刺激によるヒアルロナン産生量を ELISA にて測定した。

ヒト硝子体由来細胞株樹立の試み：倫理委員会承認の上で、臨床検体より得られた硝子体組織の初代培養を行い得られた細胞にヒトパピローマウイルス遺伝子 E6E7 を遺伝子導入し、細胞の株化を試みた。

## 4. 研究成果

ブタ硝子体由来細胞、網膜血管内皮細胞との共培養系による硝子体細胞の機能解析：

ブタ硝子体細胞株と網膜血管内皮細胞を用いて、眼内増殖性疾患における硝子体細胞の機能解析を行った。病態において発現が亢進する種々のサイトカインを用いて、硝子体細胞、網膜血管内皮細胞の反応を調べると同時に、両細胞の共培養系を確立し、より *in vivo* に近い状態での硝子体細胞の血管内皮細胞への影響を調べた。

ブタ硝子体細胞株に IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  を刺激すると、VEGF, IL-6 の mRNA 発現が亢進した

。網膜血管内皮細胞に IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  を刺激すると、IL-6 の mRNA 発現が亢進した。網膜血管内皮細胞は、硝子体細胞と共培養することによって IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , VEGF 刺激下に細胞増殖が亢進した。眼内増殖性疾患の病態において IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , VEGF は硝子体細胞を介して血管内皮細胞の増殖亢進に関与している可能性が示唆された。

## ヒト硝子体由来細胞系統の樹立：

次に硝子体細胞に関連する研究を進めるために、我々はヒト硝子体組織由来細胞株の樹立を目指した。2つのヒト摘出眼より得られた硝子体組織を初代培養した後に、不死化遺伝子(ヒトパピローマウイルス遺伝子 E6E7)を遺伝子導入した後に継代培養を繰り返した。2つの cell strain (HV64, HV65) が得られ、それらは共にコラーゲン1型 A1, コラーゲン2型 A1, CD11b, CD14, CD68, CD204, CD206 を発現していた。ブタ硝子体細胞株において認められた TGF- $\beta$ , PDGF によるヒアルロナン発現調節は HV64, HV65 細胞ではみられなかった。ヒトとブタで硝子体細胞の性質に違いがみられ、種間差の存在や複数種類の硝子体細胞の存在の可能性が示唆された。

## TNF- $\alpha$ によるブタ硝子体細胞の反応性：

眼内増殖性疾患において眼内(硝子体内)で上昇するサイトカインの一つである TNF- $\alpha$  と硝子体細胞・ヒアルロナンの関連を調べるために、TNF- $\alpha$  によるブタ硝子体細胞の反応性を、ヒアルロナン産生、細胞増殖について検討した。ブタ硝子体細胞において、TNF- $\alpha$  刺激による増殖抑制が認められ、ヒアルロナン合成酵素阻害剤である 4-メチルウンベリフェロン(4-MU)によりさらなる細胞増殖抑制を認めた。TUNEL 染色にて細胞増殖抑制はアポトーシスが主体であることが確認できた。TNF- $\alpha$  刺激によるヒアルロナン合成酵素(HAS2)の発現亢進が mRNA レベルで認められ、タンパク質レベルにおけるヒアルロナン産生促進も認められた。TNF- $\alpha$  によるヒアルロナン産生促進は、4-MU にて抑制された。ブタ硝子体細胞において TNF- $\alpha$  によるヒアルロナン産生調節が認められ、眼内増殖性疾患に硝子体細胞・TNF- $\alpha$ ・ヒアルロナンが関与している可能性が示唆された。硝子体細胞において TNF- $\alpha$  によって産生亢進されるヒアルロナンとアポトーシスの関連が病態に関与している可能性がある。

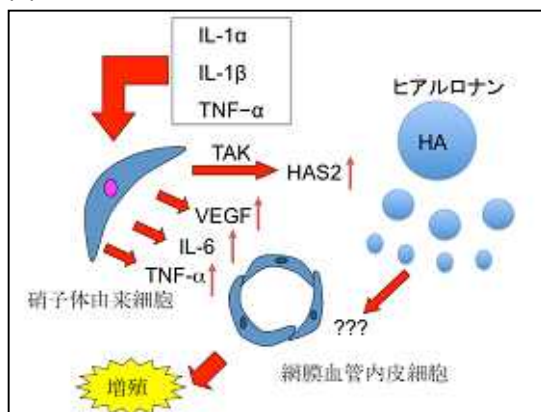
IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  によるブタ硝子体細胞の反応性：

眼内増殖性疾患において眼内（硝子体内）で上昇するサイトカインの中の IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  と硝子体細胞・ヒアルロナンとの関連を調べるために、IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  によるブタ硝子体細胞の反応性を、ヒアルロナン産生、細胞増殖について検討した。ブタ硝子体細胞において、IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  は刺激は細胞増殖に影響を与えなかった。IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  刺激により HAS2 の発現亢進が認められた。これらの反応のシグナル伝達を解析すると、TAK を介していることが判明し、病態の解明・新たな治療などに重要と考えられた。

#### 今後の展望

これまでの成果のまとめを図に示した。

図



眼内増殖性疾患病態において上昇するサイトカイン (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) によって、硝子体細胞においてヒアルロナン産生調節が認められた。ヒアルロナンは、分子量によって生理活性が異なるといわれており、病態におけるヒアルロナンの役割を調べるために、今後は臨床検体（硝子体液）中のヒアルロナン定性・定量の検討が必要である。また、実際の病態には網膜色素上皮、網膜、血管などの組織/細胞が存在するため、それらと硝子体細胞とのネットワーク解明のための研究が必要である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Namba H, Kashiwagi Y, Nishitsuka K, Takamura H, Yamamoto T, Yamashita H. Association of PDGF-BB-induced thrombomodulin with the regulation of inflammation in the corneal and scleral stroma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 Nov;51(11):5460-9 査読有  
Tojo N, Kashiwagi Y, Nishitsuka K, Yamamoto S, Asao H, Sugawara N,

Yamashita T, Yamamoto T, Yamashita H. Interactions between vitreous-derived cells and vascular endothelial cells in vitreoretinal diseases Acta Ophthalmol. 2010 Aug;88(5):564-70 査読有  
Kashiwagi Y, Kato N, Sassa T, Nishitsuka K, Yamamoto T, Takamura H, Yamashita H. **Cotylenin A inhibits cell proliferation and induces apoptosis and PAX6 mRNA transcripts in retinoblastoma cell lines.** Mol Vis. 2010 Jun 4;16:970-82. 査読有

西塚弘一、増殖因子によるヒアルロナン代謝の調節、あたらしい眼科、27巻、1415・1416(2010) 査読無  
西塚弘一、眼科医にもわかる生理活性物質と眼疾患の基本 TGF-、臨床眼科、64巻、2020・2023(2010) 査読無

Kashiwagi Y, Nishitsuka K, Takamura H, Yamamoto T, Yamashita H Cloning and characterization of human vitreous tissue-derived cells Acta Ophthalmol. 2009 Oct 30. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

西塚弘一、山本禎子、山下英俊、視力予後が良好であった網膜細動脈瘤破裂後の黄斑部出血に合併した黄斑円孔の1例第34回日本眼科手術学会総会、2011年1月28日京都

西塚弘一、山本禎子、山下英俊 Peripapillary Detachment in Pathogenic Myopia に対する硝子体手術の長期経過 .第64回日本臨床眼科学会総会、2010年11月13日神戸

Nishitsuka K, Konno N, Takamura H, Yamamoto T, Yamashita H. Intraoperative fluoroscopy-guided removal of the orbital foreign body in patient with penetrating ocular injury.: a case report. 25th Asia Pacific Academy of Ophthalmology 2010年9月18日 Beijing (中国)

Nishitsuka K, Kashiwagi Y, Kaneko Y, Yamamoto T, Heldin P, Yamashita H. Effect of tumor necrosis factor-alpha on hyaluronan production and cell proliferation by porcine vitreous derived cell line. 8th International Conference on Hyaluronan 2010年6月9日京都

Nishitsuka K, Kashiwagi Y, Kanno C, Yamamoto T, Takamura H, Yamashita H. Immortalization of Several Human

Eye-Derived Cells Using Human Papilloma Virus 16 E6 and E7. 83st The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual meeting 2010年5月3日 Fort Lauderdale (アメリカ)

西塚 弘一、柏木 佳子、菅野 智華子、山本 禎子、高村 浩、山下 英俊、ヒト眼組織由来不死化線維芽細胞株の性質について、第114回日本眼科学会総会2010年4月15日東京

西塚 弘一、ヒト硝子体組織由来 cell strain の樹立とブタ硝子体組織由来細胞株との比較検討第113回日本眼科学会総会2009年4月16日東京

〔その他〕

山形大学研究者情報 URL:

[http://yudb.kj.yamagata-u.ac.jp/OUTSIDE?ISTActId=SCHKOB0010RIni001&userId=100000187&lang\\_kbn=0](http://yudb.kj.yamagata-u.ac.jp/OUTSIDE?ISTActId=SCHKOB0010RIni001&userId=100000187&lang_kbn=0)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西塚 弘一 (NISITSUKA KOICHI)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：60422169