

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592620

研究課題名(和文) 水晶体における血管新生抑制因子の探索と血管新生緑内障の新しい病態概念の確立

研究課題名(英文) The screening of the inhibitory factor for neovascularization in lens and the establishment of new concept for the pathology of neovascular glaucoma

研究代表者

高村 佳弘 (Takamura, Yoshihiro)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：00283193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)： クリスタリンはいずれも、水晶体由来だけでなく硝子体中に存在する硝子体細胞が発現・分泌している可能性が示された。細胞増殖試験によって Bクリスタリンが増殖抑制効果を示す作用本体であるものの、Aクリスタリンとの相互作用により相乗的にVEGFによる新生血管の誘導を抑制しうることを示唆した。つまり、水晶体除去に起因する眼内環境の変化が硝子体細胞の恒常性を破綻させた結果、クリスタリンの発現量が低下し、VEGF量とのインバランスが硝子体内への異常な血管形成を誘導すると考えた。

研究成果の概要(英文)： The result of western blotting and real time PCR indicates that α -crystallins may be derive from not only hyalocyte but leak or secretion from lens. Our study showed inhibitory effect of β -crystalline on cell proliferation statistically and the effect were intensified with α -crystalline in a synergistic manner. The disruption of homeostasis in eyes subsequent to lens removal causes the lower expression of α -crystallins and imbalance of crystalline and VEGF may induce the formation of abnormal capillary to vitreous cavity.

研究分野：眼科

キーワード：血管新生 水晶体 クリスタリン 糖尿病網膜症

1. 研究開始当初の背景

水晶体に血管は存在しない。そして眼虚血がある症例で白内障手術を行った後には血管新生緑内障が起りやすい。この二つの事実から、水晶体には強力な血管新生抑制因子が存在し、白内障手術ではそれらの因子が喪失される事で血管新生が促進される可能性が考えられた。虚血性眼疾患は今なお後天性失明の主要な原因であり、血管新生抑制因子を同定し、臨床応用することが非常に重要であった。

2. 研究の目的

糖尿病網膜症の患者の水晶体を除去すると、血管新生緑内障や硝子体出血など血管が関与する疾患の併発をしばしば経験する。そこで本研究では、硝子体中において、水晶体除去前後で増減する因子の有無を調べ、その因子と血管新生との関係を検討した。

3. 研究の方法

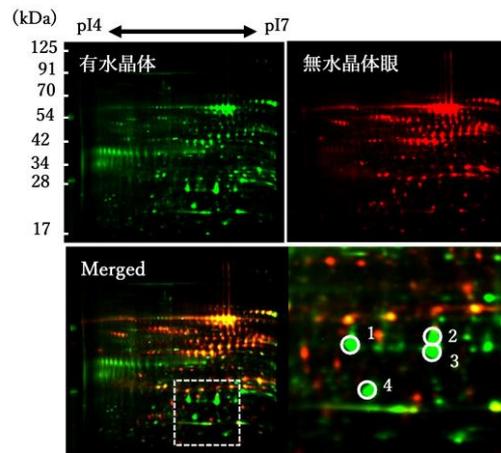
20 週齢の日本白色ウサギ (雌) を使用した。右眼に超音波乳化吸引術を行いさらに後嚢を取り除くことで眼内から水晶体を完全に除去した。1 ヶ月間飼育後、硝子体を回収しタンパク質実験および遺伝子実験に使用した。コントロールとして無処理の左眼の硝子体を用いた。水晶体除去後の硝子体中で消失するタンパク質を網羅的に検出するために、蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動 (2D-DIGE) を行った。スポットのゲル内消化物をマスマスペクトロメトリーにて分析し、候補タンパク質を同定した。同定したタンパク質の量的変化と遺伝子発現を定量化するために、ウェスタン分析およびリアルタイム PCR を行った。さらに、候補タンパク質が VEGF による細胞増殖を抑制することを検討するために、ヒト網膜毛細血管内皮細胞 (Human Retinal Microvascular Endothelial Cells: HRMECs) を用いて細胞増殖試験を行った。

4. 研究成果

無処理眼の硝子体から得られた多数のスポットのうち、4 つが水晶体除去後の硝子体において完全に消失していた (図 1)。

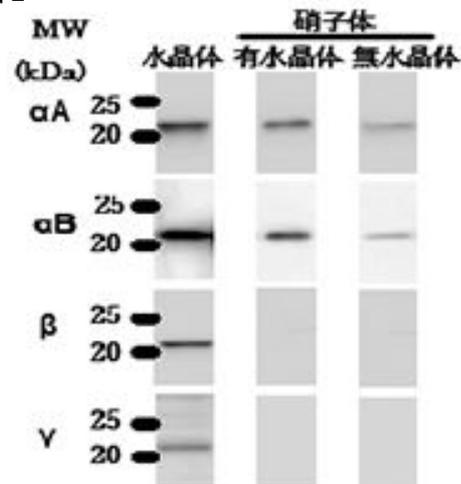
質量分析の結果、3 つがウサギ A クリスタリン、1 つがウシ由来のタンパク質であることを示唆した。そこで我々はクリスタリンに着目した。

図 1



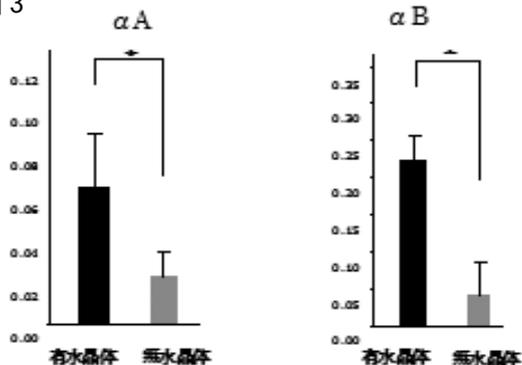
クリスタリンはファミリーを形成していることから、ホモログである B についても検討した。無処理眼の硝子体と水晶体除去後の硝子体での A および B クリスタリンの発現をタンパク質レベルで検討したところ、水晶体除去後の硝子体において発現量が減少した (図 2)。

図 2



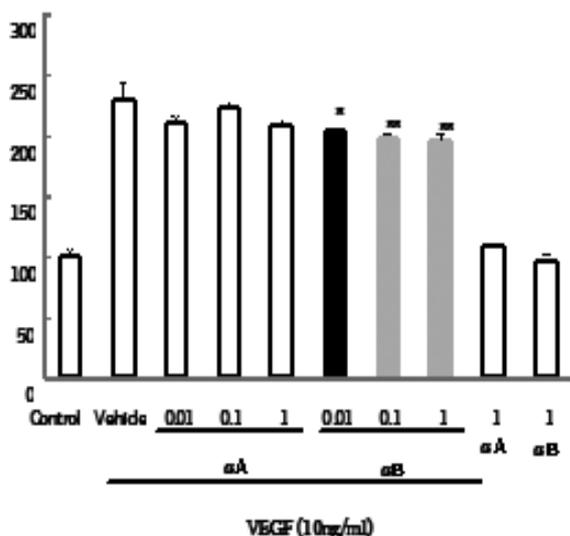
硝子体から RNA を採取し、遺伝子レベルでの比較も行ったところ、A および B クリスタリンの発現量は、無水晶体眼の方が有意に低かった (図 3)。

図 3



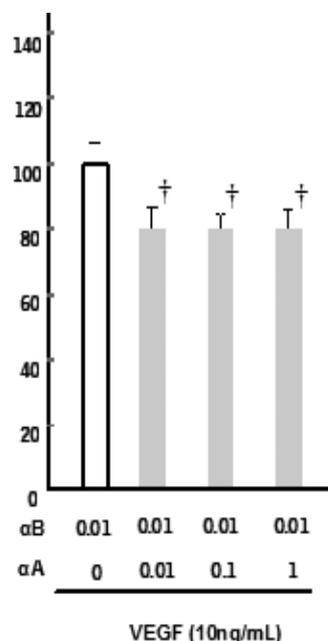
A および B クリスタリンは、HRMECs の細胞増殖に影響を与えなかった。HRMECs を VEGF 存在下で培養した際にはその細胞増殖は増大した。この VEGF 誘導の増殖性の惹起において B クリスタリン細胞増殖抑制効果を示した。この効果は、A クリスタリンでは認められなかった (図 4)。

図 4



VEGF 誘導の増殖性の惹起における B クリスタリン細胞増殖抑制効果は、A クリスタリンとの同時添加によってさらに強められた。しかし、A クリスタリン単独では抑制効果を示さなかった。(図 5)。

図 5



クリスタリンはいずれも、水晶体由来だけでなく硝子体中に存在する硝子体細胞が発現・分泌している可能性が示された。細胞増殖試験によって B クリスタリンが増殖抑制効果を示す作用本体であるものの、A クリスタリンとの相互作用により相乗的に VEGF による新生血管の誘導を抑制しうることを示唆した。つまり、水晶体除去に起因する眼内環境の変化が硝子体細胞の恒常性を破綻させた結果、クリスタリンの発現量が低下し、VEGF 量とのインバランスが硝子体内への異常な血管形成を誘導すると考えた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 10 件)

1. Arimura S, Takihara Y, Miyake S, Iwasaki K, Gozawa M, Matsumura T, Tomomatsu T, Takamura Y, Inatani M. Randomized Clinical Trial for Early Postoperative Complications of Ex-PRESS Implantation versus Trabeculectomy: Complications Postoperatively of Ex-PRESS versus Trabeculectomy Study (CPETS). Sci Rep. 2016, in press. (査読有)
2. Gozawa M, Takamura Y, Miyake S, Yokota S, Sakashita M, Arimura S, Takihara Y, Inatani M.

Prospective observational study of conjunctival scarring after phacoemulsification. **Acta Ophthalmol**. 2016, in press. (査読有)

3. Yokota S, Takihara Y, Arimura S, Miyake S, Takamura Y, Yoshimura N, Inatani M. Altered Transport Velocity of Axonal Mitochondria in Retinal Ganglion Cells After Laser-Induced Axonal Injury In Vitro. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 56:8019-25:2015. (査読有)

4. Takamura Y, Tomomatsu T, Matsumura T, Arimura S, Gozawa M, Takihara Y, Inatani M. Correlation between central retinal thickness after successful macular hole surgery and visual outcome. **Jpn J Ophthalmol** 59:394-400:2015. (査読有)

5. Takihara Y, Inatani M, Eto K, Inoue T, Kreymerman A, Miyake S, Ueno S, Nagata M, Nakanishi A, Iwao K, Takamura Y, Sakamoto H, Satoh K, Kondo M, Sakamoto T, Goldberg JL, Nabekura J, Tanihara H. In vivo imaging of axonal transport of mitochondria in the diseased and aged mammalian CNS. **Proc Natl Acad Sci USA** 112:10515-10520:2015. (査読有)

6. Matsumura T, Takamura Y, Tomomatsu T, Arimura S, Gozawa M, Takihara Y, Inatani M. Changes in matrix metalloproteinases in diabetes patients' tears after vitrectomy and the relationship with corneal epithelial disorder. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 56:3559-3564:2015. (査読有)

7. Tomomatsu Y, Tomomatsu T, Takamura Y, Gozawa M, Arimura S, Takihara Y, Inatani M. Comparative study of combined bevacizumab/targeted photocoagulation vs bevacizumab alone for macular oedema in ischaemic branch retinal vein occlusions. **Acta Ophthalmol**, 2015. (査読有)

8. Takamura Y, Tomomatsu T, Matsumura T, Arimura S, Gozawa M, Takihara Y, Inatani M. Correlation between central retinal thickness

after successful macular hole surgery and visual outcome. **Jpn J Ophthalmol**, 2015, 59:394-400. (査読有)

9. Takamura Y, Tomomatsu T, Matsumura T, Takihara Y, Kozai S, Arimura S, Yokota S, Inatani M. Vitreous and aqueous concentrations of brimonidine following topical application of brimonidine tartrate 0.1% ophthalmic solution in humans. **J Ocul Pharmacol Ther** 31:282-285:2015. (査読有)

10. Arimura S, Takamura Y, Takihara Y, Matsumura T, Tomomatsu T, Inatani M. Determinants of anterior chamber angle narrowing after mydriasis in the patients with cataract. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol** 253:307-312:2015. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

1. 第54回 日本白内障学会総会、名古屋、2015年
白内障術後の硝子体において発現量が減少する因子の同定
有村尚悟、三宅誠司、高村佳弘、後沢誠、松村健大、瀧原祐史、友松威、稲谷大

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

高村 佳弘(TAKAMURA Yoshihiro)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：00283193

(2)研究分担者

稲谷 大(INATANI Masaru)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：40335245