

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592687

研究課題名(和文)SHG顕微鏡による増殖性網膜疾患新規病因タンパクの効率的スクリーニング

研究課題名(英文)An effective screening for proliferative vitreoretinopathy-associated genes

研究代表者

佐々 由季生(SASSA,, Yukio)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：80580315

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)：我々は、増殖組織マイクロアレイ解析を行い、約300の増殖組織特徴的遺伝子群の抽出をしている。今回、新しくコラーゲンの構造を染色することなく観察可能なSHG顕微鏡を用いて、コラーゲン上に網膜色素上皮細胞を培養し、多数の目的タンパクで刺激をすることでコラーゲン再構築への影響を同時にかつ、継時的に観察することができるモデルを開発し、それを用いてペリオスチン・テナシンC等のコラーゲン再構築への作用を評価した。一方で、それらのタンパクの機能について、眼内細胞(網膜血管内皮細胞・網膜色素上皮細胞)を用いて細胞遊走・増殖・管腔形成に促進的に働くことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We recently have revealed the ocular proliferation-associated genes by microarray analysis of intraocular proliferative tissues. We have previously reported a new realtime collagen-remodeling models using the SHG microscope. SHG microscope is based on a nonlinear optical effect known as second-harmonic generation and can image collagen structures without staining. In this project, we use the multi-well culture slides( $\mu$ -Slide Angiogenesis, ibidi) to evaluate the effect of multi proteins on collagen remodeling at once. We evaluated the effect of ocular proliferation-associated proteins including periostin and tenascin C on the collagen remodeling. We also revealed that periostin and tenascin C promoted the retinal cell(retinal endothelial cell and retinal pigment epithelial cell) migration, proliferation and tube-formation.

研究分野：眼科学

キーワード：眼増殖性疾患 網膜色素上皮細胞 SHG光 コラーゲン リモデリング

1. 研究開始当初の背景:

増殖性網膜疾患では網膜前・後面に増殖組織を生じ、その収縮に伴う牽引性網膜剥離が失明の原因となる。我々はコラーゲン線維量・配向を観察できる SHG 顕微鏡を用いて患者増殖膜内コラーゲン線維を評価する全く新しい方法を確立した。また、コラーゲンゲル 3 次元培養細胞系を用いて、新しいコラーゲン線維リモデリング観察系を確立している。さらに、増殖組織マイクロアレイ解析を行い、約 300 の増殖組織特徴的遺伝子群の抽出に成功した。本研究では、新しく確立したこれらコラーゲン評価系を用いて、増殖組織特徴的遺伝子群のうち病態進展の主因子を効率的にスクリーニングする。加えて、臨床硝子体サンプルで発現の再現性を調べ、疾患動物モデルで機能解析を行う。

2. 研究の目的:

本研究の最終目標は増殖組織から得られた新規増殖組織特徴的遺伝子群を基盤とするエビデンスに基づいた新しい診断と治療を開発することである。この目的に向け、研究期間内に以下のことを目的とした。(1) SHG 顕微鏡を用いたコラーゲン線維リモデリングモデルを活用し、現在我々が所有する新規分子標的候補のスクリーニング系を確立する。(2) 臨床増殖組織サンプルを用いて、コラーゲン線維構築という新しい視点から評価した増殖組織の活動性・成熟度と新規病変タンパク発現の関連検討を行う。(3) 新規診断、治療法開発の基盤作成。

3. 研究の方法

(1) これまでの 6cm Dish を用いたゲルでは、大量の候補タンパクを同時にスクリーニングすることには適さないために、まず評価系の縮小化につとめた。最終的にはマイクロスライドを用いた評価系に落ち着いた。RPE 細胞を接着させたコラーゲンゲルの構造を観察するために、15 ウェルマイクロスライド ( $\mu$ -Slide Angiogenesis, ibidi,) を用いてサンプルを作製した。コラーゲンゲルを 10.5  $\mu$ l 注入し、その上に RPE 細胞を播種して 50  $\mu$ l の培養液で培養した。詳細については特許取得のため、本報告書では割愛する。

(2) 増殖膜サンプルを用いた検討では、SHG 顕微鏡及び増殖膜収縮の原因とされる筋線維芽細胞の同定目的で平滑筋アクチン線維染色 (抗  $\alpha$ -SMA) 核染色を用いて、SHG 強度 (I 型コラーゲンの総量・及び配向を反映) と細胞分布との相関について詳細に検討を加えた。

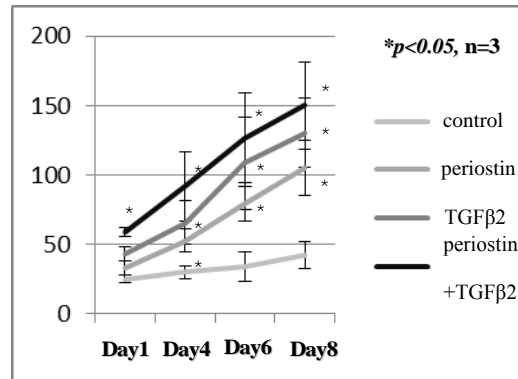
(3) 候補増殖因子のうちで、有望なテナシン C、ペリオスチンについて増殖糖尿病網膜症硝子体内の濃度、及びテナシンの網膜血管内皮細胞への影響について、増殖、遊走、管腔形成への影響について検討を加えた。同時に、ペリオスチンについては、九州大学吉田講師のチームと連携を図り、ペリオスチンの核酸医薬を用いて脈絡膜レーザー血管新生モデ

ルの線維化抑制効果について検討を加えた。

4. 研究成果

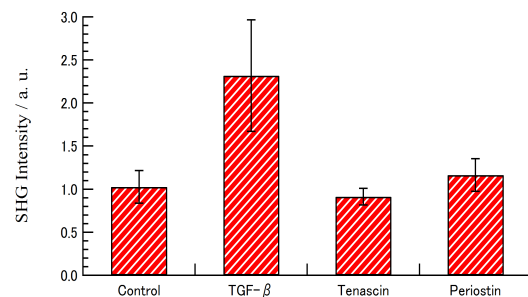
(1) 6cm Dish を用いた検討では、ペリオスチン刺激により、SHG 輝度の上昇を認め、ペリオスチンが RPE 細胞を介して、コラーゲン再構築を促進する事が、明らかとなった。

図 1 . SHG 輝度の変化率 (%)



マイクロウェルスライドを用いて評価系を縮小した際に、ウェル内のゲルの表面の歪みが 6cm Dish と比較して大きくなるために、SHG 輝度を評価する際に、SHG 輝度のばらつきとして問題となった。そのため、コラーゲンゲル表面の解析を行い、比較的歪みの少ない範囲を撮像に適している領域をウェルの中心から一定の部位で評価とした。またコラーゲンゲル内の撮像面積の至適化を行い、一定の撮像面積の撮像を三か所行うことが、ゲル間の輝度の偏りを抑えることに有効である事が明らかとなった。その評価系を用いて、TGF $\beta$ 、ペリオスチン、テナシン C について検討を加えた結果、TGF $\beta$  のみが SHG 輝度を有意に促進した。(図 2)

図 2 . マイクロウェルスライドを用いた SHG 輝度の変化率

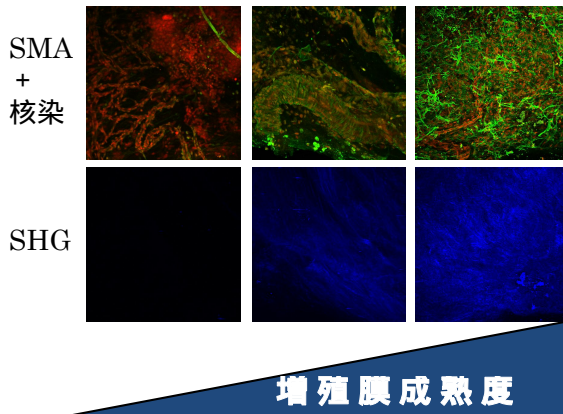


このマイクロウェルを用いたコラーゲン再構築モデルの作製に、予定より多くの時間を要した。今後は、この改善した系を用いて他の増殖組織特徴的タンパク群について検討を行う予定である。

(2) ヒト摘出増殖膜のコラーゲン構成と筋線維芽細胞分布について  
増殖糖尿病網膜症患者で、視神経乳頭周囲にわずかにできた増殖膜からアーケード血管に沿って白色の線維化を伴った増殖膜まで、増殖膜の成熟に伴い、増殖膜内の SHG 輝度と  $\alpha$ -SMA 陽性細胞の分布について検討を加えた。SHG 輝度と  $\alpha$ -SMA 陽性

細胞の分布に正の相関があることを明らかにしている。今後はこの評価系を用いて、局所における増殖組織特徴的遺伝子群タンパク発現とコラーゲン分布・SMA 陽性細胞分布について組織学的評価を行う予定である。

**図 3. 増殖膜内のコラーゲン分布と SMA 陽性細胞分布相関**

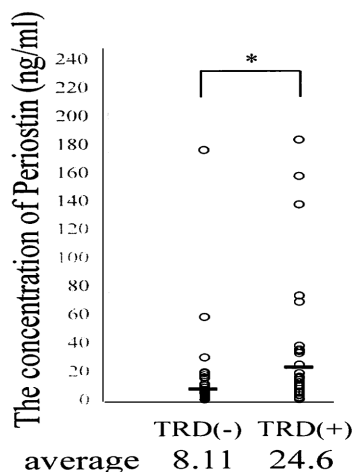


(図 3 . ヒト増殖膜中のコラーゲンと平滑筋様細胞の分布の可視化 / 石原七海, 佐々由季生, 福島修一郎, 荒木勉 第 24 回バイオロンティア講演会 京都市 より抜粋)

(3)網膜色素上皮細胞 (RPE 細胞) を用いて、ペリオスチンの機能解析を行い、ペリオスチンが細胞の遊走を促進することが明らかとなった。(発表論文 5、6 参照) また、ペリオスチンの核酸医薬を九州大学吉田講師と共同で作製し、脈絡膜レーザー血管新生モデルの線維化抑制効果を持つことを明らかとした。(発表論文 10 参照)

テナシン C については網膜血管内皮細胞を用いた検討で、細胞増殖、遊走、管腔形成を促進することが明らかとなっている。(第 119 回日本眼科学会にて発表、2015 年 4 月、札幌市)

一方で、硝子体内のペリオスチン濃度と増殖糖尿病網膜症の病態との関連について検討を加え、増殖糖尿病網膜症でも、牽引性網膜剝離を伴う症例で、硝子体内のペリオスチン濃度が高いことが明らかとなっている。



(図 4 . The Concentration of Periostin Increased in the Tractional Retinal Detachment Cases with Proliferative Diabetic Retinopathy. Rie Takahashi, Yukio Sassa, Shigeo Yoshida, Yusuke Saeki, Tatsuro Ishibashi, Toshihiro Kono. ARVO2014 オランダ、アメリカ より抜粋)

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 14 件)

佐々由季生、秋山 雅人、吉田茂生、佐伯有祐、高橋理恵、光武智子、向野利寛: 増殖糖尿病網膜症に対する硝子体手術 10 年後視力予後因子の統計学的検討増殖糖尿病網膜症長期視力予後因子 臨床眼科 (in press), 査読有

Yoshida S, Kubo Y, Kobayashi Y, Zhou Y, Nakama T, Yamaguchi M, Tachibana T, Ishikawa K, Arita R, Nakao S, Sassa Y, Oshima Y, Kono T, Ishibashi T. Increased vitreous concentrations of MCP-1 and IL-6 after vitrectomy in patients with proliferative diabetic retinopathy: possible association with postoperative macular oedema. Br J Ophthalmol. (in press) 査読有

向野 利寛、佐々 由季生: 糖尿病患者の管理 網膜症 臨床と研究 ; 92(1),63-68,2015 査読有

Ishikawa K, Yoshida S, Kobayashi Y, Zhou Y, Nakama T, Nakao S, Sassa Y, Oshima Y, Niuro H, Akashi K, Kono T, Ishibashi T. Microarray analysis of gene expression in fibrovascular membranes excised from patients with proliferative diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci.;56(2):932-46. 2015 , 査読有

Nakama T, Yoshida S, Ishikawa K, Kobayashi Y, Zhou Y, Nakao S, Sassa Y, Oshima Y, Takao K, Shimahara A, Yoshikawa K, Hamasaki T, Ohgi T, Hayashi H, Matsuda A, Kudo A, Nozaki M, Ogura Y, Kuroda M, Ishibashi T. Inhibition of choroidal fibrovascular membrane formation by new class of RNA interference therapeutic agent targeting periostin. Gene Ther.;22(2):127-37. 2015 , 査読有

Yoshida S, Kobayashi Y, Nakama T, Zhou Y, Ishikawa K, Arita R, Nakao S, Miyazaki M, Sassa Y, Oshima Y, Izuhara K, Kono T, Ishibashi T. Increased expression of M-CSF and IL-13 in vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy:

implications for M2 macrophage-involving fibrovascular membrane formation. Br J Ophthalmol. ;99(5):629-34. 2015 , 査読有

Kobayashi Y, Yoshida S, Nakama T, Zhou Y, Ishikawa K, Arita R, Nakao S, Miyazaki M, Sassa Y, Oshima Y, Izuhara K, Kono T, Ishibashi T. Overexpression of CD163 in vitreous and fibrovascular membranes of patients with proliferative diabetic retinopathy: possible involvement of periostin. Br J Ophthalmol.;99(4):451-6. 2014 , 査読有

Hisatomi T, Notomi S, Tachibana T, Sassa Y, Ikeda Y, Nakamura T, Ueno A, Enaida H, Murata T, Sakamoto T, Ishibashi T. Ultrastructural changes of the vitreoretinal interface during long-term follow-up after removal of the internal limiting membrane. Am J Ophthalmol. ;158(3):550-6.e1. 2014 , 査読有

眼疾患と遺伝子 ゲノムワイド遺伝子発現解析による眼内増殖性疾患の責任遺伝子同定と治療への展開: 吉田 茂生, 石橋 達朗, 石川 桂二郎, 佐々 由季生, 中尾 新太郎, 喜多 岳志, 有田 量一, 荒川 聡, 安里 良, 中間 崇仁, 有馬 充, 秋山 雅人, 小林 義行, 周 也荻, 衛藤 雅予, 藤澤 公彦, 江内田 寛, 大島 裕司, 武田 篤信, 宮崎 勝徳, 安田 美穂, 吉村 武, 村上 祐介, 平川 沙弥香, 立花 崇, 新納 宏昭, 赤司 浩一, 中村 崇規, 桑野 信彦, 向野 利寛, 野崎 実穂, 小椋 祐一郎, 小倉 淳, 池尾 一穂, 五條堀 孝, 工藤 明, 松田 彰, 出原 賢治, 黒田 雅彦, 高梨 正勝, 臼井 正彦, 門田 幸二, 久納 紀之, 深野 泰史, 吉川 寿徳, 高尾 和正, 笹田 衣子, 三浦 弘子, 林 宏剛, 大木 忠明, 濱崎 智洋, 小野 純也, 鍵本 忠尚 日本眼科学会雑誌 , 118(3) ,241-282,2014 , 査読有

Ishikawa K, Yoshida S, Nakao S, Nakama T, Kita T, Asato R, Sassa Y, Arita R, Miyazaki M, Enaida H, Oshima Y, Murakami N, Niino H, Ono J, Matsuda A, Goto Y, Akashi K, Izuhara K, Kudo A, Kono T, Hafezi-Moghadam A, Ishibashi T. Periostin promotes the generation of fibrous membranes in proliferative vitreoretinopathy. FASEB J.;28(1):131-42. 2014 , 査読有

Asato R, Yoshida S, Ogura A, Nakama T, Ishikawa K, Nakao S, Sassa Y, Enaida H, Oshima Y, Ikeo K, Gojobori T, Kono T, Ishibashi T. Comparison of gene expression profile of epiretinal membranes obtained from eyes with proliferative vitreoretinopathy to that of secondary

epiretinal membranes. PLoS One. ;8(1):e54191. 2013 , 査読有

Arima M, Yoshida S, Nakama T, Ishikawa K, Nakao S, Yoshimura T, Asato R, Sassa Y, Kita T, Enaida H, Oshima Y, Matsuda A, Kudo A, Ishibashi T. Involvement of periostin in regression of hyaloidvascular system during ocular development. Invest Ophthalmol Vis Sci. Sep 21;53(10):6495-503. 2012 , 査読有

毛様体扁平部濾過手術を施行した血管新生緑内障の術後成績の検討: 佐伯有祐 佐々 由季生 安里 良 向野利寛 眼科手術 , 25/4,577-581 , 2012 , 査読有

Yoshida S, Nakama T, Ishikawa K, Arima M, Tachibana T, Nakao S, Sassa Y, Yasuda M, Enaida H, Oshima Y, Kono T, Ishibashi T. Antiangiogenic shift in vitreous after vitrectomy in patients with proliferative diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci.;53(11):6997-7003. 2012 , 査読有

{学会発表}(計6件)

:増殖糖尿病網膜症術前・術後因子の術10年後視力へ与える影響について統計学的解析:佐々 由季生, 佐伯有祐, 高橋理恵, 光武智子, 向野利寛 , 第53回日本網膜硝子体学会総会 , 2014年11月28~30日,大阪府大阪市 , 大阪国際会議場

:網膜剥離症例に対する HeavySIL™ の使用経験: 佐々 由季生 高橋 理恵 光武智子 佐伯 有祐 向野 利寛 , 第41回福岡大学眼科研究会 , 2014年5月17日 , 福岡県福岡市 , 福岡大学メディカルホール

:The significant relationships between Fibronectin, Tenascin-C and Periostin in the eyes of the patients with diabetic retinopathy.:Yukio Sassa, Shigeo Yoshida, Keiji Ishikawa, Ryo Asato, Mituru Arima, Yusuke Saeki, Risa Sato, Kazuhiro Harada, Masanori Miyazaki, Hiroshi Enaida, Yuji Oshima, Toshihiro Kono, Tatsuro

Ishibashi , *ARVO annual meeting2013,5,5*  
~ *9,North America,Washington State*  
*Convention Center*

:第 2 高調波発生光顕微鏡を用いたペリオ  
スチンによるコラーゲン線維リモデリング  
佐々由季生、吉田茂生、福島修一郎、斉藤徹  
也、石川桂二郎、佐伯 有祐、高橋 理恵、  
中間崇仁、安井武史、荒木勉、向野利寛、石  
橋達朗 , *第 117 回日本眼科学会総会* , 2013  
年 4 月 4~7 日 , 東京都千代田区 , 東京国際フ  
ォーラム

:New method for evaluating 3D collagen  
remodeling by SHG microscope.:Yukio  
Sassa, Shigeo Yoshida , Shuichiro  
Fukushima , Tetsuya Saito,  
KeijiIshikawa, Toshihiro Kono, Tatsuro  
Ishibashi, Takeshi Yasui, Tsutomu Araki ,  
*The 5th Joint Meeting of*  
*Korea-China-Japan Ophthalmologists* ,  
2012 年 11 月 17 ~ 18 日 , 福岡県福岡市 , ホ  
テル日航福岡

: 第 2 高調波発生光 (SHG 光) 顕微鏡を用  
いたコラーゲン線維再構築の経時的変化:  
佐々 由季生、吉田 茂生、福島 修一郎、  
斉藤 徹也、田仲 亮介、藤澤 一樹、石川  
桂二郎、安里 良、有馬 充、向野 利寛、  
安井 武史、荒木 勉、石橋 達朗 , *第 116*  
*回日本眼科学会総会* , 2012 年 4 月 5 ~ 8 日 ,  
東京都千代田区 , 東京国際フォーラム

〔図書〕(計 1 件)

:Biological agents in the inflammatory  
eye disease. :Yukio Sassa, Atsunobu  
Takeda, Shigeo Yoshida, Yo-ichi Kawano,  
Toshihiro Kono, Tatsuro Ishibashi , *Nova*  
*Science Publishers, Inc* , 259-266 , 2012 年

〔産業財産権〕  
○出願状況 (計 1 件)

名称 : 第二次高調波光を用いた新規コラーゲ  
ン線維化評価モデル

発明者 : 佐々 由季生、向野 利寛、石橋達  
朗、吉田 茂生、福島 修一郎、荒木 勉、  
安井 武史

権利者 : 学校法人 : 福岡大学  
種類 : 公開特許公報 ( A )  
番号 : 特願 2 0 1 2 - 1 8 6 9 5 1 ( P 2 0  
1 2 - 1 8 6 9 5 1 )  
出願年月日 : 平成 2 4 年 8 月 2 7 日  
国内外の別 : 国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐々 由季生 ( SASSA,Yukio )  
福岡大学 医学部 講師 )  
研究者番号 : 80580315

(2)研究分担者

吉田 茂生 ( YOSHIDA,Shigeo )  
九州大学 医学部 講師  
研究者番号 : 50363370

石橋 達朗 ( ISHIBASHI,Tatsuro )  
九州大学 医学部 教授  
研究者番号 : 30150428

福島 修一郎 ( FUKUSHIMA,Syuuichiro )  
大阪大学 基礎工学部 助教  
研究者番号 : 40362644

安井 武史 ( YASUI,Takeshi )  
徳島大学 工学部 教授  
研究者番号 : 70314408

向野 利寛 ( KONO,Toshihiro )  
福岡大学 医学部 教授  
研究者番号 : 40117106