

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791824

研究課題名(和文) 翼状片におけるリンパ管新生因子 VEGF-C とその受容体システムの制御

研究課題名(英文) VEGF-C, a lymphangiogenic factor, and its receptor system in pterygium

研究代表者

大口 剛司 (ohguchi, takeshi)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：70579599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、翼状片の上皮下にリンパ管マーカーであるD2-40が多数検出された。D2-40陽性細胞は、リンパ管に相当する内皮細胞に陽性になった。正常結膜ではリンパ管は所々に存在した。定量的に正常結膜に比較し、翼状片にて有意にリンパ管密度が高いことが判明した。加えて、リンパ管にVEGF-Cの受容体であるVEGFR-3が陽性になる事も判明した。さらに我々は、VEGF-Cの発現誘導機序について検討した。本研究では、培養結膜上皮細胞を無血清刺激すると、48時間後有意にVEGF-Cの分泌が亢進することを確認した。炎症性サイトカインであるIL-1 β 添加後48時間で、VEGF-Cの分泌が有意に増加した。

研究成果の概要(英文)：In this study, there were many D2-40, a marker for lymphatic vessels, positive cells beneath the epithelium in human pterygium. D2-40-positive cells were consistent with lymphatic endothelial cells. A few lymphatic vessels were noted in the normal conjunctiva. Quantitative analyses revealed that lymphatic densities were significantly greater in pterygium than normal conjunctiva. Moreover, VEGFR-3 immunoreactivity was detected in the lymphatic vessels as well. We further analyzed the mechanisms underlying the induction of VEGF-C. In this study, VEGF-C secretion was induced 48 hours after serum starvation in cultured conjunctival epithelial cells. VEGF-C secretion was further stimulated 48 hours after treatment with interleukin 1 β , an inflammatory cytokine.

研究分野：翼状片

キーワード：VEGF-C 翼状片

1. 研究開始当初の背景

(1) 翼状片について

翼状片はその発症原因は不明であるが、紫外線や慢性の刺激により、結膜下組織の増殖が加速され、角膜輪部の Bowman 膜のバリアを乗り越えて角膜内へ侵入した結果生じる疾患である。翼状片は角膜上皮基底細胞層と Bowman 膜の間に侵入し、先端部近くで Bowman 膜を破壊して角膜実質浅層組織との間に癒着を形成する。角膜内侵入が 3mm を超えると不正乱視のため著しく視機能が低下する。また、充血や隆起を伴い、美容的にも問題となることも多い。

(2) 翼状片の治療について

通常角膜内侵入が 2mm 程度を超えたら外科的切除が施行される。しかし、術後の再発が問題となることが多い。再発によりさらに高度な充血や隆起の他、瞼球癒着や眼球運動障害などにより重篤な眼障害を引き起こす。翼状片の単純切除では再発率が約 70% と極めて高いため、結膜有茎弁移植や遊離弁移植など術式に工夫が施されている。また放射線照射や代謝拮抗剤であるマイトマイシン C などが用いられることもある。しかし、そのような工夫・処置を行っても 10~20% 程度の再発を認める。さらに放射線照射による強膜潰瘍や白内障、代謝拮抗剤による強膜融解など重篤な副作用があり、外科的治療の限界とその弊害が問題となっている。

(3) Vascular endothelial growth factor (VEGF-C) について

VEGF-C とは哺乳動物で確認されている 5 つの VEGF の 1 つでリンパ管新生に重要であり、そのレセプターは VEGFR-3 である。VEGF-C がレセプターに結合するとチロシンキナーゼが活性化され、細胞内にシグナルが伝達され、主にリンパ管新生および増生に関与する。

(4) 翼状片における VEGF-C の発現

近年、翼状片の発症および進展にリンパ管の関与が示唆されている (Cimpean AM et al. *Oncol Rep* 2011)。我々は翼状片組織 (pterygium) および健常結膜組織 (normal conjunctiva) を用いて、リンパ管のマーカーの一つである抗 D2-40 抗体を用いて免疫組織化学的検討を施行したところ、上皮下の間質に陽性を示すリンパ管が存在することを確認した。加えて、VEGF-C はリンパ管を増生させることが知られている。眼科領域において VEGF-C とそのレセプターである VEGFR-3 は角膜移植後の角膜でのリンパ管増殖に影響し、VEGFR-3 をブロックするとリンパ管増殖を抑制したとの報告がある (Yuen D et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011)。しかしながら翼状片における VEGF-C と VEGFR-3 の発現に関する報告は

まだない。本研究では、翼状片組織と健常結膜組織における VEGF-C と VEGFR-3 の発現について病理学的検討をすることを目的とした。VEGF-C と VEGFR-3 の発現局在を明らかにすることにより、それらを標的とした新たな治療戦略につながる可能性がある。

2. 研究の目的

翼状片とは結膜組織が角膜内へ侵入した疾患である。その発症には紫外線などの影響が示唆されているが、その原因は不明である。近年、翼状片の発症および進展にリンパ管が関与していることが示唆されている。今回、翼状片組織におけるリンパ管およびその増生に関与する血管内皮増殖因子 (VEGF-C) の病理学的検討を行うことによって、翼状片に対する新たな治療戦略の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 翼状片組織を外科的に切除し、リンパ管のマーカーである D2-40 およびその増生に関与する VEGF-C、VEGFR-3 の発現局在を免疫染色など免疫組織化学的手法を用いて明らかにする。

(2) VEGF-C のタンパク発現量を Western blotting 法で検討する。

(3) VEGF-C の発現を誘導する因子である Cyclooxygenase-2 (COX-2) の免疫染色を行う。

(4) 翼状片上皮細胞の培養を行い、抗 VEGF-C 抗体を投与し、培養上清を採取する。そして、リンパ管内皮の培養細胞株にふりかけ、その増殖能の変化を検討する。

4. 研究成果

本研究では、翼状片の上皮下にリンパ管マーカーである D2-40 が多数検出された。D2-40 陽性細胞は、リンパ管に相当する内皮細胞に陽性になった。一方、正常結膜では、D2-40 陽性リンパ管は、所々に存在した。定量的には、正常結膜と比較し、翼状片にて有意にリンパ管密度が高いことが判明した。加えて、リンパ管に VEGF-C の受容体である VEGFR-3 が陽性になる事も判明した。従い、翼状片の発生、進展に VEGF-C/VEGFR-3 経路が関与していることが示唆された。さらに我々は、VEGF-C の発現誘導機序について検討した。Cox-2 は増殖性病変において、プロスタグランジン経路を介して、主として PGE2 を増加させ、結果的に種々の炎症性サイトカインの誘導に関わる。実際既報では、VEGF-C の発現誘導に TNF-alpha や interleukin (IL)-1beta が重要な役割を果たすことが報告されている。本研究では、培養結膜上皮細胞を用いて、TNF-alpha、IL-1beta を添加し、24~48 時間後に上清

を回収し、VEGF-C の蛋白濃度を測定した。まず始めに上皮細胞を無血清刺激すると、刺激後 48 時間で有意に VEGF-C の分泌が亢進することを確認した。次に、上述の炎症性サイトカインの刺激実験を行った。IL-1beta 添加後 48 時間で、VEGF-C の分泌が有意に増加した。一方、TNF-1alpha 添加後の VEGF-C の有意な発現変化はみられなかった。従い、現在われわれは、IL-1beta 中和抗体を用いて、IL-1beta 添加後の VEGF-C の分泌が抑制されるか検討している。

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 6 件)

1. 仲昌彦、山本麻梨亜、金学海、横山千秋、石嶋漢、北市伸義、大口剛司、新田卓也、新明康弘、陳進輝、石田晋. 原発開放隅角緑内障患者に対する 0.03%ピマトプロスト切り替えによる眼圧下降効果と安全性の検討. 臨床眼科 68: 219-224, 2014、査読有
2. Fukuhara J, Kase S, Ohashi T, Ando R, Dong Z, Noda K, Ohguchi T, Kanda A, Ishida S. Expression of vascular endothelial growth factor C in human pterygium. *Histochem Cell Biol.* 2013; 139: 381-389、査読有 doi: 10.1007/s00418-012-1019-z
3. Ohguchi T, Kojima T, Ibrahim OM, Nagata T, Shimizu T, Shirasawa T, Kawakita T, Satake Y, Tsubota K, Shimazaki J, Ishida S. The effects of 2% rebapimide ophthalmic solution on the tear functions and ocular surface of the superoxide dismutase-1 (Sod1) knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54: 7793-7802、査読有 doi: 10.1167/iov.13-13128.
4. 石垣さやか、新明康弘、山口淑子、溝口亜矢子、阿部朋子、大口剛司、宇野友絵、辻野奈緒子、陳進輝、石田晋. Goldmann 動的視野検査が Humphrey 静的視野検査 (30-2) よりも早期発見に有効であった緑内障の 3 例. あたらしい眼科 30: 1160-1164, 2013、査読有
5. Lennikov A, Kitaichi N, Fukase R, Murata M, Noda K, Ando R, Ohguchi T, Kawakita T, Ohno S, Ishida S. Amelioration of ultraviolet-induced photokeratitis in mice treated with astaxanthin eye drops. *Mol Vis.* 18: 455-464, 2012、査読有

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3291518/>

6. 佐藤出、北市伸義、廣瀬茂樹、高野睦子、赤沼正堂、唐尚子、田邊章浩、木下平次郎、堀江幸弘、木嶋理紀、大口剛司、仲昌彦、新田卓也、新明康弘、陳進輝、石田晋. プロスタグランジン製剤・遮断薬からトラボプロスト・チモロールマレイン酸塩配合液への切替え効果. 特集 第 65 回日本臨床眼科学会講演集. 臨眼 66: 675-678, 2012、査読有

[学会発表](計 21 件)

1. Nozaki M, Shinmei Y, Uno T, Ando R, Ohguchi T, Nitta T, Chin S, Ishida S. Surgical results of eyes with aniridic glaucoma. AAPOS-JAPO-JASA Joint Meeting in Kyoto, 2014/11/30-12/1, Kyoto International conference Center (Kyoto, Japan)
2. 木嶋理紀、新明康弘、清水啓史、藤谷顕雄、大口剛司、新田卓也、陳進輝、石田晋. 外傷性毛様体解離に対して毛様体縫着術を施行した 3 例. 第 68 回日本臨床眼科学会、2014/11/13-16、神戸ポートピアホテル (神戸市)
3. 田川義晃、大口剛司、野田航介、岩田大樹、水内一臣、田川義継、石田晋. BUT 短縮型ドライアイの寒冷刺激によるシルマー試験の検討. 第 68 回日本臨床眼科学会、2014/11/13-16、神戸ポートピアホテル (神戸市)
4. 野崎真世、新明康弘、田川義晃、宇野友絵、大口剛司、新田卓也、陳進輝、石田晋. 先天性無虹彩症による発達緑内障に対し 360° suture trabeculotomy 変法を施行した一例. 第 68 回日本臨床眼科学会、2014/11/13-16、神戸ポートピアホテル (神戸市)
5. 田川義晃、陳進輝、田川小百合、宇野友絵、横山千秋、大口剛司、新田卓也、新明康弘、南場研一、石田晋. 治療に苦慮した乾鱗ぶどう膜炎による続発緑内障の一例. 第 25 回日本緑内障学会、2014/9/19-21、大阪国際会議場 (大阪市)
6. 横山千秋、新明康弘、品川真有子、田川義晃、宇野友絵、大口剛司、新田卓也、陳進輝、石田晋. 線維柱帯切除術中に発症した悪性緑内障の一例. 第 25 回日本緑内障学会、2014/9/19-21、大阪国際会議場 (大阪市)
7. 北尾仁奈、大口剛司、岩田大樹、水内一臣、野村友希子、田川義継、石田晋. 眼所見を中心に粘膜病変のみ呈した Stevens-Johnson 症候群の 1 例. 第 161 回北海道眼科集談会、2014/9/13、北海道大学 (札幌市)
8. 田川小百合、陳進輝、田川義晃、宇野友絵、横山千秋、大口剛司、新田卓也、新

- 明康弘、南場研一、石田 晋、滝田亜かり。治療に苦慮した乾癬ぶどう膜炎による続発緑内障の一例、第 161 回北海道眼科集談会、2014/9/13、北海道大学（札幌市）
9. 田川義晃、大口剛司、福元達也、清水啓史、山本哲平、水内一臣、田川義継、石田 晋。Exophiala dematitidis による結膜感染症の 1 例、フォーサム 2014 東京、2014/7/4-6、東京国際フォーラム（東京都千代田区）
 10. Kinoshita S, Noda K, Takashina S, Dong Y, Atsumi I, Obata H, Matsunaga T, Ohguchi T, Kanda A, Ishida S. Safety evaluation of novel drug delivery device, the conjunctival ring、ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting、2014/5/4-8、Orange Country Convention Center (Orland, USA)
 11. 大口剛司、野田航介、木下哲志、神田敦宏、安枝真一、福島 努、石田 晋。ヒト結膜リングのオキュラサーフェスにおける安全性の検討、第 118 回日本眼科学会総会、2014/4/2-6、東京国際フォーラム（東京都千代田区）
 12. 木下哲志、野田航介、田川義晃、石塚タンエルダ、稲福沙織、董 陽子、厚見育代、小畑晴香、松永 透、大口剛司、神田敦宏、石田 晋。ステロイド含有結膜リングの安全性評価、第 118 回日本眼科学会総会、2014/4/2-6、東京国際フォーラム（東京都千代田区）
 13. 田川義晃、大口剛司、山本哲平、水内一臣、田川義継、北市伸義、石田 晋。ドライアイ患者の自覚症状と角膜知覚および痛覚についての検討、第 118 回日本眼科学会総会、2014/4/2-6、東京国際フォーラム（東京都千代田区）
 14. 鈴木佳代、大口剛司、山本哲平、水内一臣、田川義継、石田 晋。角膜穿孔をきたしたアカントアメーバ角膜炎の 1 例。第 160 回 北海道眼科集談会。2013/8/24。北海道大学（札幌市）
 15. 田川小百合、田川義晃、大口剛司、新明康弘、清水啓史、宇野友絵、石嶋 漢、南場研一、陳 進輝、石田 晋。線維柱帯切除術後に持続性低眼圧に陥った乾癬に合併したぶどう膜炎の 1 例。第 160 回 北海道眼科集談会。2013/8/24。北海道大学（札幌市）
 16. Nitta T, Chin S, Shinmei Y, Ohguchi T, Yamamoto M, Namba K, Ishida S. The effects of a modified 360-degree trabeculotomy for uveitic glaucoma with peripheral anterior synechiae. The 5th World Glaucoma Congress. 2013/7/17-20. Vancouver Convention(Vancouver, Canada)
 17. 大口剛司、新明康弘、新田卓也、山本麻梨亜、南場研一、大野重昭、陳 進輝、石田 晋。周辺虹彩前癒着を伴うぶどう膜炎に続発した緑内障に対する suture-trabeculotomy の成績。第 117 回 日本眼科学会。2013/4/4-7。東京国際フォーラム（東京都千代田区）
 18. 大口剛司、水内一臣、西坂紀実利、竹本裕子、田川義継、石田 晋。ドライアイに対するレバミピド点眼薬の効果。角膜カンファランス 2013。2013/2/14-16。白浜町立体育館（和歌山県）
 19. 新明康弘、新田卓也、大口剛司、宇野友絵、石嶋 漢、陳 進輝、石田 晋。360 度トラベクロトミー変法（S-LOT 変法）と水晶体超音波乳化吸引術の同時手術の成績。第 36 回 日本眼科手術学会。2013/1/25-27。福岡国際会議場(福岡市)
 20. 大口剛司、小島隆司、永田妙子、難波志帆、野田航介、川北哲也、村戸ドール、島崎 潤、坪田一男、石田 晋。SOD-1 ノックアウトマウスに伴うドライアイにおける 2% レバミピド点眼薬の有効性。第 116 回 日本眼科学会。2012/4/5-8。東京国際フォーラム（東京都千代田区）
 21. 佐藤 出、大口剛司、仲 昌彦、新田卓也、新明康弘、陳 進輝、石田 晋。遮断薬・炭酸脱水酵素阻害薬からコソプトへの切り替え効果。第 116 回 日本眼科学会。2012/4/5-8。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
 大口 剛司 (OHGUCHI TAKESHI)
 北海道大学・北海道大学病院・助教
 研究者番号：70579599
 - (2) 研究分担者
 なし