

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10870

研究課題名(和文) 結膜線維増殖反応における潜在的アレルギー炎症の関与

研究課題名(英文) The involvement of potentially allergic inflammation to fibrosis in conjunctival tissue

研究代表者

寺西 慎一郎 (TERANISHI, Shinichiro)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90649360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：低分子ハプテンによる内因性炎症が結膜線維増殖を誘導する可能性を考え、点眼薬の防腐剤である塩化ベンザルコニウム(BAC)に焦点を絞り、一連の病態における分子機序の解明と線維増殖制御作用を有する薬剤を検討した。テノン嚢線維芽細胞(HTF)のコラーゲン三次元培養を構築し、BAC投与によりゲル収縮が生じることを確認した。ビタミンA誘導体がゲル収縮抑制に有用であること、その作用機序を解析した。角膜上皮細胞およびHTFの共培養を用いて、BACによりHTFが筋線維芽細胞へ形質転換する事を明らかにした。両細胞間の相互作用により、細胞障害や形質転換が修飾され、上清内のタンパク質が関与していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Considering that haptens have the involvement of potentially allergic inflammation to fibrosis in conjunctival tissue, we focused on Benzalkonium chloride (BAC), the most commonly used an eyedrop preservative. We investigated the effects of BAC on the contractility of human Tenon's capsule fibroblasts (HTFs) cultured in a three-dimensional collagen gel. We found that all-trans-retinoic acid inhibited collagen gel contraction mediated by BAC and analyzed the mechanism of this effect. BAC induced myofibroblast transformation in HTFs. In co-culture system, the interaction between human corneal epithelial cells and HTFs, affected the BAC toxicity and the transformation to myofibroblast in HTFs through the effect of proteins in culture serum.

研究分野：医歯薬学

キーワード：結膜線維増殖 アレルギー 特異的治療

1. 研究開始当初の背景

スギ花粉やハウスダストなどのアレルゲンによる重症Ⅰ型アレルギー性結膜炎やコンタクトレンズ、縫合糸など慢性的な機械刺激では、しばしば乳頭形成といった結膜線維増殖を認め、時に角膜障害にまで進展する。また、点眼薬防腐剤も眼表面に炎症を惹起し、結膜線維増殖に関与すると考えられる。このように眼表面において結膜線維増殖が関与する病態は多岐にわたるが、決定的機能障害につながる線維増殖そのものにつながる分子メカニズムは未だ十分に解明されていない。

我々は(予備実験において)点眼液防腐剤などの低分子ハプテンも、肥満細胞浸潤の程度は軽微だが(長期点眼によって)眼表面慢性炎症と結膜線維化を惹起することを見いだした。このことは春季カタル・アトピー性角結膜炎のような重症Ⅰ型アレルギーでなくても、すでに線維増殖の引き金は引かれていることを示唆する。「臨床的炎症」と「線維増殖」は区別して考える視点が重要である。

近年はシクロスポリン点眼・ステロイド局所注射等によって、以前と比較してⅠ型アレルギー自体はコントロールできるようになった。一方、薬剤を使用しても結膜線維化や癒痕形成が増悪する治療困難な症例を経験する。また緑内障手術後、慢性的点眼に伴う防腐剤ハプテンのもたらす炎症によって濾過胞機能が失われたと思われる症例もある。アレルゲンやハプテンによるⅠ型アレルギーのみでなく、それに付随する結膜・結膜下組織の線維増殖反応を制御するかが重要であり、今後ベッドサイドでは「線維増殖を標的とする特異的治療」が求められる時代になる。

結膜線維増殖を考える上で、我々は「自然免疫系」が重要だと考える。自然免疫系は病原微生物などが体内に侵入した際に特異的に活性化されるが、近年病原微生物以外の組織成分によっても活性化されることが注目されている。結膜上皮細胞・結膜線維芽細胞には自然免疫に関与する多くの DAMPs レセプターが発現し、慢性刺激下で生ずるストレス分子 DAMPs に局所的に反応することで病態を修飾する可能性を考えるに至った。

前述の通り結膜線維増殖の臨床モデルは数多く存在するが、今回は「緑内障濾過手術後の濾過胞消失」に着目する。

塩化ベンザルコニウム(BAC)は眼科領域において最も使用されている防腐剤であるが、薬剤毒性に加えてハプテン作用が強く、角結膜上皮障害だけでなく慢性的な結膜組織の炎症を引き起こし、結膜下組織の癒痕形成による緑内障濾過手術成績不良に関与する(Baudouin, Int J Clin Pharmacol Res, 1996)。実際に、申請者はテノン嚢下線維芽細胞がBACによって活性化され、炎症性サイトカイン IL-6 を分泌発現することを明らかにしている。

さらに申請者らは角結膜上皮細胞が炎症に寄与するサイトカイン・成長因子に反応し、上皮バリアーや創傷治癒機構などの機能を変化させることを明らかにしてきた(Kimura K, Teranishi T et al. IOVS 2008, 2009)。また病原微生物によって結膜下線維芽細胞や角膜実質細胞などの常在細胞が自然免疫の活性化を受け、炎症の起点として作用し角結膜癒痕形成、収縮に関与することを明らかにしてきた(Liu Y, Kimura K et al. IOVS 2008, Exp Eye Res 2006)。また他の研究グループによって、同様の細胞で細胞外基質のリモデリングが癒痕形成・収縮に寄与し、組織障害をもたらすことも明らかにされている(Raghu K, et al. JCI, 2003)。一方、申請者らは自然免疫細胞の浸潤により角結膜線維芽細胞やテノン嚢下線維芽細胞などの常在細胞が活性化され、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)などの蛋白質分解酵素を分泌しコラーゲンを含む細胞外基質のリモデリングを促すことも解明した。

臨床的視点からは、緑内障濾過手術後結膜線維増殖について、特に術後不可欠な点眼薬に含まれる防腐剤を低分子化学物質「ハプテン」として捉え、それを起点に、「アレルギー・自然免疫を共に制御する」視点から研究を行っているグループは、申請者の知る限り無い。

2. 研究の目的

春季カタルにおける巨大乳頭や濾過手術後の濾過胞消失など、眼表面において結膜線維増殖に関与する病態は多岐にわたる。結膜線維増殖反応は重篤合併症の原因病態であるにもかかわらず、その誘発機序について未だ不明な点が多い。近年、スギ花粉・ハウスダスト等のアレルゲンや点眼液防腐剤等の低分子ハプテンは、眼表面にⅠ型アレルギーを誘導する一方で、結膜組織障害を誘導し DAMPs (damage-associated molecular patterns) と呼ばれる内在性ストレス分子を局所放出することが注目されている。結膜上皮細胞・線維芽細胞にはもともと DAMPs レセプターが存在するため、我々は DAMPs で生ずる内因性炎症が線維増殖を誘発する可能性を考えた。本研究の目的は、慢性Ⅰ型アレルギーから線維増殖変化への引き金が引かれる分子機序を明らかにすることである。最終的に、眼表面において結膜線維増殖に関与する全ての病態に共通する新規治療開発を目指す。

3. 研究の方法

眼表面における点眼防腐剤成分による慢性炎症、結膜下癒痕形成への影響を明らかにするため、初年度は防腐剤による「慢性炎症モデル」を作成し、角結膜上皮細胞、角結膜線維芽細胞、テノン嚢下線維芽細胞と共に、炎症細胞における防腐剤による炎症反応および組織癒痕化をもたらす分子機序の解析

を行った。次年度は防腐剤の作用を阻害する分子のスクリーニングと、その作用機序の解明にターゲットを絞って研究を行った。最終年度にはそれまでに明らかにされた慢性炎症の発症機序を制御し、線維性瘢痕形成を抑制する化合物を用いて、動物モデルで緑内障術後の濾過胞形成に対する治療効果を確認した。

4. 研究成果

低分子ハプテンによる内因性炎症が結膜線維増殖を誘導する可能性を考え、点眼薬の防腐剤として最も多用されている塩化ベンザルコニウム (BAC) に焦点を絞り、一連の病態における分子機序の解明ならびに線維増殖制御作用を有する薬剤の検討を行った。

対象とする細胞は、緑内障手術における濾過胞の臨床所見並びに病理学的検討から、テノン囊線維芽細胞 (HTF) とした。まず、コラーゲン基材を用いて HTF の三次元培養を構築し、TGF- α と同様に BAC 投与によりゲル収縮が生じることを確認した。ゲル収縮に関して、all-transretinoic acid がその抑制に有用であること、またその作用機序を明らかにした。さらに、retinoic acid 受容体の内、 α 作動薬 が HTF のゲル収縮を著明に抑制し、本作動薬は in vivo における検討でも、濾過手術後の眼圧コントロールを有意に改善することを報告した。

次に、実際の眼表面の組織構成により近づける目的で、角膜上皮細胞 (HCE) および HTF の共培養を行い、BAC の影響を検討した。生体下にて細胞形態が観察でき且つ経時的に撮影可能なシステムを構築し、BAC により HTF が筋線維芽細胞へ形質転換する事を明らかにした。また、HCE および HTF 両細胞間の相互作用に注目して検討を行った。両細胞の相互作用により、細胞障害や形質転換が修飾されていた。相互作用には、上清内のタンパク質が関与していることが判明した。さらに、作用を有するタンパク質を分子量により絞り込むとともに、質量分析による同定準備を行った。

今回の研究で得られた研究結果は、緑内障濾過手術後の濾過胞生存・眼圧改善に関して、術前・術後・経過観察期を通して使用でき、新たな緑内障手術補助剤開発につながると思われる。

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5件)

Hatano M, Kimura K, Nomi N, Teranishi S, Orita T, Fujitsu Y, Sonoda KH: Combination management by C-arm fluoroscopy and extraocular muscle severance for penetrating ocular trauma with a retrobulbar foreign body .

Orbit 35(3): 167-169, 2016. 査読有
DOI:10.3109/01676830.2016.1139596

寺西 慎一郎, 中倉 俊祐, 金森 章泰: 眼底 OCT の診かた 緑内障と診断された乳頭低形成. 臨床眼科 70(5): 648-659, 2016. 査読有

Liu Y, Kimura K, Orita T, Suzuki K, Teranishi S, Mori T, Sonoda KH: Inhibition by a retinoic acid receptor agonist of extracellular matrix remodeling mediated by human Tenon fibroblasts. Mol Vis 21: 1368-1377, 2015. 査読有
PMID: 26788029

Suzuki K, Teranishi S, Sagara T, Yoshino H, Nakayama M, Enoki M, Nuno Y, Hirano S, Wakuta M, Takahashi N, Tokuhisa K, Kondo Y, Shiraiishi R, Ishida Y, Sonoda KH; Yamaguchi Glaucoma Study Group: Safety and Efficacy of Benzalkonium Chloride-optimized Tafluprost in Japanese Glaucoma Patients With Existing Superficial Punctate Keratitis. J Glaucoma 24(6): e145-e150, 2015. 査読有
DOI:10.1097/IJG.0000000000000020

[学会発表](計15件)

寺西 慎一郎: 関西・中四国緑内障道場: 他人の手術から学ぶ緑内障手術~ 譲れない術者のこだわり ~. 第41回日本眼科手術学会学術総会, 京都府(国立京都国際会館), 2018/01/27

永井 智彦, 寺西 慎一郎, 野田 健, 播磨 希, 守田 裕希子, 山田 直之, 鈴木 克佳, 木村 和博: 難治性モーレン角膜潰瘍に対しチューブシャント手術併用強角膜移植を再施行した一例. 第64回山口眼科手術懇話会, 山口県, 2017/10/26

野田 健, 寺西 慎一郎, 永井 智彦, 播磨 希, 徳久 佳代子, 鈴木 克佳, 木村 和博: 谷戸氏 ab interno トラベクトロミーマイクロフックの使用経験. 第63回山口眼科手術懇話会, 山口県(霜仁会館), 2017/07/08

寺西 慎一郎, 徳田 和央, 徳久 佳代子, 白石 理江, 守田 裕希子, 山田 直之, 木村 和博, 徳田 信子, 鈴木 克佳: 点眼防腐剤によるテノン囊線維芽細胞の角膜上皮細胞との共培養時における筋線維芽細胞への転換. 第129回山口県眼科医会春季総会及び集談会, 山口県(翠山荘), 2017/05/28

寺西 慎一郎, 徳田 和央, 徳久 佳代子, 白石 理江, 守田 裕希子, 徳田 信子, 山田 直之, 鈴木 克佳, 木村 和博: 点眼防腐剤によるテノン囊線維芽細胞の角膜上皮細胞との共培養時における上皮間葉転換. 第121回日本眼科学会

総会，東京都（東京国際フォーラム），2017/04/06
芳川 里奈，寺西 慎一郎，山田 直之，緒方 惟彦，白石 理江，徳久 佳代子，折田 朋子，木村 和博，鈴木 克佳：バルベルト緑内障インプラントの両眼入れ替えを行った角膜移植眼の一例．第 62 回山口眼科手術懇話会，山口県（霜仁会館），2016/10/08
寺西 慎一郎：緑内障と最新の治療．第 16 回目の健康講座 in 下関，山口県（海峡メッセ下関），2016/09/27
芳川 里奈，寺西 慎一郎，山田 直之，緒方 惟彦，白石 理江，徳久 佳代子，折田 朋子，木村 和博，鈴木 克佳：バルベルト緑内障インプラント全房挿入型から硝子体腔挿入型へ両眼入れ替えを行った角膜移植眼の一例．第 27 回日本緑内障学会，神奈川県（パシフィコ横浜），2016/09/18
寺西 慎一郎，木村 和博，岩本 菜奈子，村田 敏彦，白石 理江，徳久 佳代子，折田 朋子，鈴木 克佳：バルベルト緑内障インプラント前房用チューブを用いた硝子体腔内チューブ挿入法の経験．第 54 回六大学合同眼科研究会，福岡県（九州大学），2016/09/03
太田 真実，寺西 慎一郎，鈴木 克佳，白石 理江，岩本 菜奈子，能美 なな実，徳久 佳代子，園田 康平：プロスタグランジン関連薬使用中の緑内障患者における上眼瞼溝深化の定量評価．第 69 回日本臨床眼科学会，愛知県（名古屋国際会議場），2015/10/24
緒方 惟彦，小林 由佳，小林 正明，内 翔平，波多野 誠，庄田 裕美，原田 大輔，寺西 慎一郎，鈴木 克佳，柳井 亮二，木村 和博，園田 康平：ぶどう膜炎続発緑内障に対する治療方法の検討．第 69 回日本臨床眼科学会，愛知県（名古屋国際会議場），2015/10/22
Morita Y, Morishige N, Yamada N, Iwamoto N, Ohta M, Teranishi S, Suzuki K, Sonoda KH: Outcome of Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty (DSAEK) in Patients with or without a history of trabeculectomy. The 8th Joint Meeting of JAPAN-CHINA-KOREA Ophthalmologists, 福岡県（ヒルトン福岡シーホーク），2015/10/17
太田 真実，寺西 慎一郎，白石 理江，徳久 佳代子，折田 朋子，鈴木 克佳，園田 康平：バルベルト緑内障インプラント手術における前房内挿入型チューブの硝子体腔内留置法の経験．第 60 回山口眼科手術懇話会，山口県（山口大学病院），2016/10/03
寺西 慎一郎，鈴木 克佳，白石 理江，森 拓也，青木 一将，木村 和博，園田 康平：全トランス型レチノイン酸受

容体作動薬 R667 のラット濾過手術後眼圧下降維持効果．第 26 回日本緑内障学会，愛知県（ウインクあいち），2015/09/12
太田 真実，寺西 慎一郎，内 翔平，白石 理江，徳久 佳代子，鈴木 克佳，園田 康平：山口大における Ex-PRESS 術後成績の検討．第 59 回山口眼科手術懇話会，山口県（霜仁会館），2015/07/02

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺西 慎一郎 (TERANISHI, Shinichiro)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：9 0 6 4 9 3 6 0

(2) 研究分担者

守田 裕希子 (MORITA, Yukiko)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：3 0 7 2 5 6 6 9

森重 直行 (MORISHIGE, Naoyuki)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：4 0 3 4 6 5 6 5

柳井 亮二 (YANAI, Ryoji)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：1 0 3 4 6 5 5 4

木村 和博 (KIMURA, Kazuhiro)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：6 0 3 3 5 2 5 5

鈴木 克佳 (SUZUKI, Katsuyoshi)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授(特命)
研究者番号：90325217

園田 康平 (SONODA, Kohei)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：10294943

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし