

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10910

研究課題名(和文)特発性黄斑上膜の発症機序に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Basic research for the pathogenesis of idiopathic epiretinal membranes

研究代表者

池田 恒彦 (Ikeda, Tsunehiko)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：70222891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：特発性黄斑上膜(ERM)の病態を生化学的な面から検討する目的で、セリンプロテアーゼの一つであるトリプターゼおよび抗2型コラーゲン抗体との関連について調べた。特発性黄斑円孔(MH)、増殖糖尿病網膜症(PDR)、ERM、裂孔原性網膜剥離(RD)の硝子体手術時に硝子体および血清を採取し、トリプターゼ活性および抗2型コラーゲン抗体を測定した。その結果トリプターゼ活性は、MHとERMが、抗2型コラーゲン抗体価は、ERMが有意に高値を呈した。ERMでは、硝子体中のトリプターゼ活性上昇が組織の線維化に、血清中の抗2型コラーゲン抗体上昇が網膜硝子体界面の免疫反応に関与して膜形成が生じている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the pathogenesis of idiopathic epiretinal membrane (ERM) from a biochemical perspective, the relationships between ERMs and tryptase activity and anti-type II collagen antibodies were investigated. Vitreous samples for measurement of tryptase activity were obtained from patients who underwent a vitrectomy for idiopathic macular hole (MH), proliferative diabetic retinopathy (PDR), ERM, and rhegmatogenous retinal detachment (RD). Anti-type II collagen antibodies were measured in serum obtained from the patients with ERM, PDR, and RD. Vitreal tryptase activity was significantly higher in MH and ERM than in PDR and RD. The serum levels of anti-type II collagen antibodies were significantly higher in the ERM and PDR than in RD. In the pathogenesis of ERM, increased vitreal tryptase activity may be involved in tissue fibrosis, and elevated serum anti-type II collagen antibodies may lead to an immune response at the vitreoretinal interface, thus resulting in membrane formation.

研究分野：眼科学

キーワード：黄斑上膜 黄斑円孔 セリンプロテアーゼ トリプターゼ キマーゼ 抗2型コラーゲン抗体 ニューステロイド 免疫染色

1. 研究開始当初の背景

ERM は主に中高年者に発症し、変視症、視力低下をきたす。現時点で有効な薬物治療はなく、硝子体手術が唯一の治療手段である。ERM の成因としては、後部硝子体皮質前ポケットの後壁の硝子体ゲルを基盤とし、その部位に細胞増殖や細胞外基質の蓄積が生じるとする説、あるいは後部硝子体剥離によって惹起された内境界膜の破綻によって、感覚網膜中のグリア細胞が遊走増殖する説などが提唱されている。しかし、本疾患においてこのような形態学的な面以外の研究はほとんどなされていないのが実状であった。

2. 研究の目的

われわれは以前に ERM と同じ黄斑部に特異的に発症する MH において、セリンプロテアーゼの一つであるキマーゼの硝子体内の活性が上昇していることを報告した。また、中心窩の網膜には幹細胞様の未分化な細胞が存在し、キマーゼによるアポトーシス作用によって、これらの未分化な細胞が機能不全をおこして、MH が生じるのではないかという仮説を提唱した。一方、PDR を有する患者では血清中の抗 2 型コラーゲン抗体値が上昇しており、PDR の進行によって血液網膜関門が破綻することで、血清中の抗 2 型コラーゲン抗体が硝子体中の 2 型コラーゲンと接触し、一種の免疫反応を生じることが PDR の病態に関与する可能性を提唱した。今回、これらの研究の延長線上で、ERM とセリンプロテアーゼの一つであるトリプターゼおよび抗 2 型コラーゲン抗体との関連について調べた。

3. 研究の方法

大阪医科大学倫理委員会の承認を得たうえで、患者の同意を得て、網膜硝子体疾患の硝子体手術時に硝子体を採取し、トリプターゼ活性を測定した。対象は 54 例 54 眼で、疾患の内訳は MH 14 例 14 眼 (男性 6 例、女性 8 例、平均年齢 66.1 ± 5.3 歳)、PDR 14 例 14 眼 (男性 9 例、女性 5 例、平均年齢 59.0 ± 13.7 歳)、ERM 13 例 13 眼 (男性 4 例、女性 9 例、平均年齢 63.8 ± 8.9 歳)、RD 13 例 13 眼 (男性 10 例、女性 3 例、平均年齢 53.8 ± 7.5 歳)であった (年齢は平均 \pm 標準偏差で表示)。方法は、灌流ポートを設置したうえで、灌流を開始する前に希釈されていない硝子体ゲルを 0.5~1.0ml 硝子体カッターで採取した。硝子体サンプルは直ちに凍結保存した。

トリプターゼ活性の測定は、N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilide を DMSO に溶解し、reaction buffer (0.06M Tris 溶液) を用いて希釈したものを substrate solution とした。reaction buffer に enzyme solution (採取した硝子体) を加え、さらに substrate solution とともに 37 °C で 1 時間反応後、420nm における吸光度を測定した。

2) 抗 2 型コラーゲン抗体の測定

抗 2 型コラーゲン抗体は ERM 患者の血清 15

例を用い、コントロールには白内障手術症例の血清を 10 例用いた。抗 2 型コラーゲン抗体の測定には human/monkey anti-type II collagen IgG assay kit を用いた。

4. 研究成果

MH, PDR, ERM, RD の硝子体中のトリプターゼ活性はそれぞれ、 0.0146 ± 0.0053 , 0.0018 ± 0.0018 , 0.0166 ± 0.0046 , 0.0117 ± 0.0029 mU/mg protein (平均 \pm 標準偏差) で、MH と ERM が有意に高値を呈した ($p < 0.05$, Fisher PSLD 検定)。抗 2 型コラーゲン抗体価は、ERM が 56.417 ± 35.627 units/ml であったのに対して、コントロールは 30.424 ± 16.128 units/ml で、ERM が有意に高値を呈した ($p = 0.042$, Mann-Whitney test.)。

キマーゼやトリプターゼなどのセリンプロテアーゼの産生細胞は肥満細胞であり、近年、肥満細胞が組織の線維化やリモデリング、血管新生に関与することが報告され注目されている。肥満細胞は眼球では脈絡膜、毛様体、結膜、強膜などに存在することが報告されている。硝子体中のキマーゼやトリプターゼが眼内のどの組織から産生されるのか現時点では不明であるが、脈絡膜や毛様体などのぶどう膜組織がその候補として考えられる。肥満細胞にはトリプターゼ陽性と、トリプターゼ・キマーゼ陽性の 2 種類の細胞が存在する。脈絡膜における肥満細胞の局在としては、眼底後極部にトリプターゼ・キマーゼ陽性の肥満細胞が多いことが知られている。キマーゼとトリプターゼは同じセリンプロテアーゼであることより、組織の線維化や血管新生などの作用をもっているが、キマーゼはアポトーシス作用が優位であり、トリプターゼは組織の線維化をきたす作用が優位とされている。この両者の作用の強弱が、MH や ERM の発症に関与している可能性が考えられる。実際に我々のデータでは MH はキマーゼ活性が高く、トリプターゼはさほど高くなかったが、ERM ではキマーゼ、トリプターゼとも活性が高値であった。

一方、今回の結果では ERM 患者で血清中の抗 2 型コラーゲン抗体が上昇していた。我々は以前に、糖尿病網膜症患者で、抗 2 型コラーゲン抗体値が上昇しており、血液網膜関門が破綻することで、血清中の抗 2 型コラーゲン抗体が硝子体中の 2 型コラーゲンと接触し、免疫反応をきたすことが糖尿病網膜症の病態に関与する可能性を報告した。ERM でも、同様の機序で黄斑部を中心に免疫反応が生じた結果、膜様組織が形成されている可能性がある。事実、ERM の組織学的検討により、リンパ球やマクロファージなどの免疫系の細胞がみられることが報告されている。

既報でも述べたように、2 型コラーゲンが存在する軟骨組織と硝子体は共に無血管組織であることから、2 型コラーゲンは、全身の血液をめぐる免疫細胞の監視 (surveillance) を逃れた隔絶抗原 (sequestered antigen)

としての性質を持っており、免疫学的寛容 (immunological tolerance) の状態にあるとされている。慢性関節リウマチでは何らかの原因でこの免疫学的寛容の状態が失われ、抗 型コラーゲン抗体を含む種々の自己抗体ができ、自己免疫反応によって関節組織の破壊が進むと考えられている。慢性関節リウマチ以外でも、変形性関節症、再発性多発性軟骨炎、メニエル病、等でも、抗 2 型コラーゲン抗体の抗体価が血清中で上昇している。2 型コラーゲンが存在する 3 つの組織、即ち関節、内耳、硝子体には、それぞれ関節液、リンパ液、硝子体液が存在し、これらの体液 (body fluid) はそれぞれ blood-joint-barrier 、 blood-labyrinth-barrier 、 及び blood-retinal(ocular)-barrier によって血液中の免疫細胞から隔絶された状態になっている。糖尿病網膜症では高血糖状態が続くと blood-retinal-barrier が破綻し、血管の透過性が高まって黄斑浮腫を生じることが知られている。慢性関節リウマチやメニエル病でも病変が進行すると共に、関節水腫や内リンパ水腫が起こることが知られており、これらの疾患でもバリアー機構が破綻して血管壁の透過性が高まり、免疫学的寛容が失われている可能性が考えられる。

トリプターゼは組織の線維化を惹起するだけでなく、MMP-2 を介して、基底膜の主成分である 型コラーゲンを分解したり、血管内皮細胞を障害することが報告されている。つまり、ERM の患者では、なんらかの機序で肥満細胞が活性化され、そこから産生されるトリプターゼが、ミュラー細胞の基底膜である内境界膜を破綻させ、感覚網膜中のグリア細胞の遊走を促進するように働いている可能性に加えて、血液網膜関門を形成する血管内皮細胞機能を障害して、抗 2 型コラーゲン抗体の硝子体腔内への拡散を促進し、網膜硝子体界面を足場とした免疫反応を惹起することが、膜形成に関与している可能性が考えられる。事実、ERM のフルオレセイン蛍光眼底造影検査では、黄斑上膜の存在する部位から蛍光色素が漏出し、黄斑浮腫をきたしている症例があることが報告されている。このことは、血液網膜関門を形成する血管内皮細胞が障害されている可能性をしめしている。

なぜ ERM 患者で肥満細胞からのトリプターゼの産生が増加するか、あるいはなぜ抗 2 型コラーゲン抗体が血中で増加するのかは、今後の検討課題であるが、少なくともこの 2 つの生理活性物質が、ERM の成因に関与している可能性が示唆される。今まで生化学的な研究データがほとんどなかった疾患だけに、病態解明の一つの糸口となるものと考えられる。

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 8 件)

1. 森下清太, 河本良輔, 福本雅格, 鈴木浩之, 佐藤孝樹, 小林崇俊, 喜田照代, 池田恒彦. 黄斑上膜を伴う中心性漿液性脈絡網膜症の 2 例 . 眼臨紀, 査読有, 2017;10(11): 905-9.
2. 池田恒彦: 硝子体手術のワンポイントアドバイス 173 特発性黄斑上膜の発症機序 (研究編). あたらしい眼科, 査読無, 2017;34(10):1425.
3. 池田恒彦: 硝子体手術のワンポイントアドバイス 154 癒着が強固な黄斑上膜の OCT 所見 (初級編). あたらしい眼科, 査読無, 2016;33(3):405.
4. Ueki M, Morishita S, Kohmoto R, Fukumoto M, Suzuki H, Sato T, Kobayashi T, Kida T, Oku H, Ikeda T, Shibayama Y. Comparison of histopathological findings between idiopathic and secondary epiretinal membranes. Int Ophthalmol. 2016 Oct;36(5):713-8. doi: 10.1007/s10792-016-0194-7.
5. 池田恒彦: 黄斑上膜の成因 . あたらしい眼科, 査読有, 2015;32(11):1515-21.
6. 池田恒彦: 硝子体手術のワンポイントアドバイス 146 糖尿病網膜症と自己免疫 (研究編). あたらしい眼科, 査読無, 2015; 32(7):993.
7. Ikeda T, Nakamura K, Oku H, Morishita S, Fukumoto M, Suzuki H, Kida T, Horie T, Sugiyama T, Takai S. The role of tryptase and anti-type collagen antibodies in the pathogenesis of idiopathic epiretinal membranes. Clin Ophthalmol 2015;9:1181-6. doi: 10.2147/OPHT.S82015.
8. Nakaizumi A, Fukumoto M, Kida T, Suzuki H, Morishita S, Satou T, Oku H, Ikeda T, Nakamura K. Measurement of serum and vitreous concentrations of anti-type collagen antibody in diabetic retinopathy. Clinical Ophthalmology 2015;9:543-7. doi: 10.2147/OPHT.S75422.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 佐藤孝樹, 福本雅格, 喜田照代, 堀江妙子, 奥 英弘, 池田恒彦, 高井真司, 金徳男, 中村公俊. Bursa premacularis におけるセリンプロテアーゼの発現 . 第 122 回日本眼科学会総会, 2018.
2. 佐藤孝樹, 福本雅格, 河本良輔, 小林崇俊, 喜田照代, 堀江妙子, 奥 英弘, 池田恒彦, 高井真司, 金 徳男, 中村公俊. 網膜硝子体疾患における硝子体と血清中トリプターゼ活性の比較 . 第 121 回日本眼科学会総会, 2017.
3. 森下清太, 福本雅格, 佐藤孝樹, 喜田照代, 佐藤文平, 池田恒彦. 黄斑上膜術後に生じた黄斑浮腫の 4 例 . 第 56 回日本網膜硝子体学会 総会 , The 2nd Taiwan-Japan

Vitreoretinal Joint Meeting, 2017.

4. 森下清太, 河本良輔, 福本雅格, 鈴木浩之, 佐藤孝樹, 小林崇俊, 喜田照代, 池田恒彦. 若年者の黄斑上膜を伴う中心性漿液性脈絡網膜症の2例. 第55回日本網膜硝子体学会総会, 2016.

5. 福本雅格, 奥田吉隆, 喜田照代, 森下清太, 鈴木浩之, 池田恒彦. 特発性黄斑上膜に対する術前後での網膜血管移動量の検討. 第69回日本臨床眼科学会, 2015.

6. 池田恒彦, 森下清太, 福本雅格, 鈴木浩之, 喜田照代, 奥英弘, 中村公俊, 高井真司. 特発性黄斑上膜の病態におけるトリプターゼと2型コラーゲン抗体の関与. 第119回日本眼科学会総会, 2015.

6. 研究組織

(1)研究代表者

池田 恒彦 (Ikeda Tsunehiko)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70222891

(2)研究分担者

奥 英弘 (Oku Hidehiro)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 90177163

(3)連携研究者

高井 真司 (Takai Shinji)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80288703

(4)研究協力者

森下 清太 (Morishita Seita)
堀江 妙子 (Horie Taeko)