

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15636

研究課題名(和文)4次元イメージングを用いた結膜癒着化におけるサイトカインの作用に関する研究

研究課題名(英文) Investigation using 4-dimensional live imaging into the effects of aqueous cytokines on conjunctival scarring

研究代表者

谷原 秀信(Tanihara, Hidenobu)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：60217148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：結膜線維芽細胞由来の培養上清は単核球細胞THP-1の遊走能を亢進し、筋線維芽細胞由来の培養上清では遊走能が低かった。線維芽細胞培養上清のTHP-1細胞遊走はCCR2阻害剤やMCP-1中和抗体により抑制された。さらに、筋線維芽細胞培養上清ではMCP-1濃度が低下していることが分かった。LysM-eGFPマウスを用いた4次元イメージングにより、結膜表面へのMCP-1刺激によりLysM陽性細胞数は増加し、細胞運動速度が上昇した。CCR2阻害剤投与により細胞数および運動速度は低下したことから、MCP-1は結膜局所においてCCR2を介しLysM陽性細胞を集積、活性化させるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The conditioned medium of conjunctival fibroblast cells increased migration of monocyte THP-1 cells. On the other hand, the conditioned medium of myofibroblast cells presented lower chemotactic activity of THP-1 migration in a comparison with medium of fibroblast. These migrations were inhibited by CCR2 inhibitor and MCP-1 neutralizing antibody. Additionally, the concentration of MCP-1 was decreased in conditioned medium of myofibroblast compared with conditioned medium of fibroblast. We performed 4-dimensional live imaging using LysM-eGFP mice, and found that the number of LysM positive cell and the cell velocities were increased by MCP-1 administration to conjunctival surface. The effects of MCP-1 on conjunctiva, such as increased cell number and cell velocities, were suppressed by CCR2 inhibitor. These results indicated that LysM positive cells were accumulated and activated by MCP-1 through CCR2 receptor at conjunctiva.

研究分野：眼科学

キーワード：4次元イメージング MCP-1

1. 研究開始当初の背景

我が国の成人の失明原因第一位は緑内障であり、その治療は眼圧を下降させることを目的として行われる。治療の基本は点眼による薬物治療であるが、十分な眼圧下降が認められない場合や、点眼治療だけでは視野障害の進行が抑制されない場合は手術が必要となる。トラベクトミーは代表的な緑内障手術で、房水を結膜下へ誘導するバイパス路を作成し、濾過胞を作成することで眼圧を下降させる。眼圧下降効果は高く、有効性の高い手術ではあるが、一方で時間経過とともに効果が減弱、消失する症例が存在する。その主な原因は、結膜下の過剰な炎症反応による結膜組織の癒痕化であると考えられる。このような、手術予後不良の原因を探るため我々はこれまでに臨床サンプルの解析、動物モデル、細胞実験等様々な検討を行ってきた結果、房水中に含まれるサイトカイン MCP-1 濃度がトラベクトミーの治療成績に影響することを明らかにし、MCP-1 が結膜下で炎症細胞を誘導することによって過剰な炎症反応と癒痕化を促進させ、手術効果を消失させるモデルを提唱している。しかし、生体結膜組織中での MCP-1 の作用を動的な視点で解析した報告は無い。近年、2 光子顕微鏡を用いた 4 次元イメージング技術により、生きた動物の組織中の細胞動態を解析することが可能となった。我々はこの技術を利用し、マウスの結膜組織の炎症細胞の 4 次元イメージングに成功した。この技術を応用することで、過剰炎症による結膜組織癒痕化の分子機構の解明につながるものと考えられる。

2. 研究の目的

我々が確立した 2 光子顕微鏡を用いた生体結膜組織中の炎症細胞の 4 次元イメージング技術を利用して、MCP-1 を含めた房水中サイトカインの結膜組織の炎症細胞動態への影響を明らかにし、緑内障手術後の結膜組織癒痕化の分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1)2 光子顕微鏡による結膜組織の 4 次元イメージング

炎症細胞（主に好中球）をラベルした Lysosome M-eGFP マウスを用い、結膜下組織を当施設の 2 光子顕微鏡（オリンパス Fluoview FV1000MPE）を用いて非侵襲的にリアルタイムに観察した。結膜下の炎症細胞の定常状態を観察したのち、観察用のアイカップ内へ MCP-1 および CCR2 阻害剤を含む PBS を入れ結膜表面に MCP-1 および CCR2 阻害剤を暴露させた。MCP-1 暴露後の eGFP 陽性細胞を観察し、細胞数、遊走速度等を解析した。

(2)培養細胞での細胞遊走評価

ヒト由来単球系細胞株の THP-1 細胞を用いて細胞遊走評価を行った。ヒト結膜線維芽細胞（HconF、ScienCell 社）の培養上清およびヒト結膜線維芽細胞を TGF- β 2 刺激により筋織

維芽細胞へ形質転換させた培養上清を回収し、THP-1 細胞へ添加した。THP-1 細胞は、ポアサイズ $5\mu\text{m}$ ポリカーボネート膜付きインサート上に播種し、各培養上清添加後にインサートより遊走する細胞数をカウントした。また、線維芽細胞および筋線維芽細胞培養上清中のサイトカイン濃度をマルチプレック スイムノアッセイ法にて測定した。

4. 研究成果

(1)2 光子顕微鏡による炎症細胞の 4 次元イメージングの結果、定常状態に比べ MCP-1 処置 30-60 分後の結膜組織中の炎症細胞数は増加し、細胞の活動性を示す細胞の移動速度も有意に上昇していた。MCP-1 の受容体である CCR2 の阻害剤の添加により、MCP-1 処置により認められた細胞数の増加、運動速度の亢進は抑制された。

(2)結膜線維芽細胞および結膜筋線維芽細胞の培養上清中サイトカイン濃度を比較した結果、筋線維芽細胞培養上清で PDGF-AA、IL-6 の濃度が有意に高く、MCP-1 濃度が有意に低い結果が得られた。筋線維芽細胞培養上清に対する THP-1 の遊走細胞数は、線維芽細胞培養上清に対して優位に少なかった。線維芽細胞培養上清による THP-1 の遊走細胞数は抗 MCP-1 中和抗体および CCR2 阻害剤で有意に抑制された

本研究により、結膜組織中の細胞より MCP-1 が分泌されていることが明らかとなり、また形質転換によりその分泌能が変化することも明らかとなった。4 次元イメージングにより結膜局所の MCP-1 濃度の上昇が炎症細胞の遊走および活性化を起こすことが明らかとなり、結膜組織の炎症状態において MCP-1 が重要な因子として働くことが明らかとなった。

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 16 件)

Matsumoto M, Inoue T, Kojima S, Nakashima KI, Fukushima A, Tanihara H. Prospective observation of filtration blebs in high-risk eyes with limbal-based conjunctival flap. **Canadian Journal of Ophthalmology**, 2016; 51:431-437. doi: 10.1016/j.jcjo.2016.05.019. 査読あり

Kashiwagi K, Kogure S, Mabuchi F, Chiba T, Yamamoto T, Kuwayama Y, Araie M; Collaborative Bleb-Related Infection Incidence and Treatment Study Group.. Change in visual acuity and associated risk factors after trabeculectomy with adjunctive mitomycin C. 2016; 94(7):e561-e570. doi: 10.1111/aos.13058.

査読あり

Iwasaki K, Takamura Y, Nishida T, Sawada A, Iwao K, Shinmura A, Kunimatsu-Sanuki S, Yamamoto T, Tanihara H, Sugiyama K, Nakazawa T, Inatani M. Comparing Trabeculectomy Outcomes between First and Second Operated Eyes: A Multicenter Study. **PLoS One**, 2016; 11:e0162569. doi: 10.1371/journal.pone.0162569. 査読あり

Futakuchi A, Inoue T, Fujimoto T, Inoue-Mochita M, Kawai M, Tanihara H. The effects of ripasudil (K-115), a Rho kinase inhibitor, on activation of human conjunctival fibroblasts. **Experimental Eye Research**, 2016; 149:107-115. doi: 10.1016/j.exer.2016.07.001. 査読あり

Nishizawa A, Inoue T, Ohira S, Takahashi E, Saruwatari J, Iwao K, Tanihara H. The Influence of Phacoemulsification on Surgical Outcomes of Trabeculectomy with Mitomycin-C for Uveitic Glaucoma. **PLoS One**, 2016; 11:e0151947. doi: 10.1371/journal.pone.0151947. 査読あり

Kojima S, Inoue T, Kikuta J, Furuya M, Koga A, Fujimoto T, Ueta M, Kinoshita S, Ishii M, Tanihara H. Visualization of Intravital Immune Cell Dynamics After Conjunctival Surgery Using Multiphoton Microscopy. **Investigative Ophthalmology & Visual Sciences**, 2016; 57:1207-1212. doi: 10.1167/iovs.15-18507. 査読あり

Fujimoto T, Inoue T, Inoue-Mochita M, Tanihara H. Live cell imaging of actin dynamics in dexamethasone-treated porcine trabecular meshwork cells. **Experimental Eye Research**, 2016; 145:393-400. doi: 10.1016/j.exer.2016.02.007. 査読あり

Kaneko Y, Ohta M, Inoue T, Mizuno K, Isobe T, Tanabe S, Tanihara H. Effects of K-115 (Ripasudil), a novel ROCK inhibitor, on trabecular meshwork and Schlemm's canal endothelial cells. **Scientific Reports**, 2016; 6:19640. doi: 10.1038/srep19640. 査読あり

Ohira S, Inoue T, Iwao K, Takahashi E, Tanihara H. Factors Influencing Aqueous Proinflammatory Cytokines and Growth Factors in Uveitic Glaucoma. **PLoS One**, 2016 ;11:e0147080. doi: 10.1371/journal.pone.0147080. 査読あり

Matsumura R, Inoue T, Tanihara H. Bleb-like Finding Caused by Idiopathic Scleral Thinning in an Eye With Absolute Glaucoma. **Journal of Glaucoma**, 2016 ;25:e288-e290. doi: 10.1097/IJG.0000000000000341. 査読あり

Shobayashi K, Inoue T, Kawai M, Iwao K, Ohira S, Kojima S, Kuroda U, Nakashima K, Tanihara H. Postoperative Changes in Aqueous Monocyte Chemotactic Protein-1 Levels and Bleb Morphology after Trabeculectomy vs. Ex-PRESS Shunt Surgery. **PLoS One**, 2015; 10:e0139751. doi: 10.1371/journal.pone.0139751. 査読あり

Tanihara H, Inoue T, Yamamoto T, Kuwayama Y, Abe H, Fukushima A, Suganami H, Araie M; K-115 Clinical Study Group.. One-year clinical evaluation of 0.4% ripasudil (K-115) in patients with open-angle glaucoma and ocular hypertension. **Acta Ophthalmologica**, 2016; 94:e26-34. doi: 10.1111/aos.12829. 査読あり

Takahara Y, Inatani M, Eto K, Inoue T, Kreymerman A, Miyake S, Ueno S, Nagaya 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. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, 2015; 112:10515-10520. doi: 10.1073/pnas.1509879112. 査読あり

Cho HK, Kojima S, Inoue T, Fukushima A, Kee C, Tanihara H. Effect of laser suture lysis on filtration openings: a prospective three-dimensional anterior segment optical coherence tomography study. **Eye**, 2015; 29:1220-1225. doi: 10.1038/eye.2015.129. 査読あり

Ohira S, Inoue T, Shobayashi K, Iwao K, Fukushima M, Tanihara H. Simultaneous increase in multiple proinflammatory cytokines in the aqueous humor in neovascular glaucoma with and without intravitreal bevacizumab injection. **Investigative Ophthalmology & Visual Sciences**, 2015; 56:3541-3548. doi: 10.1167/iovs.14-15918. 査読あり

Tanihara H, Inoue T, Yamamoto T, Kuwayama Y, Abe H, Suganami H, Araie M; K-115 Clinical Study Group.. Additive Intraocular Pressure-Lowering Effects of

the Rho Kinase Inhibitor Ripasudil (K-115) Combined With Timolol or Latanoprost: A Report of 2 Randomized Clinical Trials. **JAMA Ophthalmology**, 2015; 133:755-761. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2015.0525. 査読あり

〔学会発表〕(計 13 件)

12th European Glaucoma Society (EGS) Congress (June 19-22, 2016, Prague, Czech Republic). Inoue T, Inoue-Mochita, M, Fujimoto T, Tanihara H. Effects of interleukin (IL)-6 signaling activity on fibrogenic activity of human trabecular meshwork cells.

The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 1-5, 2016, Seattle, Washington, USA) Tanihara H, Inoue T, Yamamoto T, Kuwayama Y, Abe H, Fukushima A, Suganami H, Araie M. Specific clinical features of intraocular pressure-lowering effect in ripasudil (K-115): insights from 52-week phase 3 study.

The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 1-5, 2016, Seattle, Washington, USA) Inoue T, Inoue-Mochita, M, Fujimoto T, Tanihara H. Effects of interleukin (IL)-6 signaling activity on fibrogenic activity of human trabecular meshwork cells.

The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 1-5, 2016, Seattle, Washington, USA) Fujimoto T, Inoue T, Kei Maki, Inoue-Mochita M, Kojima S, Tanihara H. Vascular endothelial growth factor-A increases aqueous humor outflow facility.

The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 1-5, 2016, Seattle, Washington, USA) Kojima S, Inoue T, Fujimoto T, Tanihara H. Four-dimensional imaging revealed influences of monocyte chemoattractant protein-1 on immune cell dynamics in the subconjunctival tissue.

The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 1-5, 2016, Seattle, Washington, USA) Futakuchi A, Inoue T, Fujimoto T, Inoue-Mochita M, Tanihara H. Effects of ripasudil (K-115), a Rho kinase inhibitor, on the activation of human conjunctival fibroblasts.

31st Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress (APAO) (March 24-27, 2016, Taipei, Taiwan) Inoue T, Ohira S, Kawaji T, Tanihara H. Proinflammatory cytokine levels in the aqueous humor of secondary glaucoma patients with familial amyloidotic polyneuropathy.

31st Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress (APAO) (March 24-27, 2016, Taipei, Taiwan) Kojima S, Inoue T, Ohira S, Iwao K, Tanihara H. Elevated levels of interleukin-6 in the aqueous humor in primary open-angle glaucoma patients required repeat trabeculectomy.

XXXIII Congress of the European Society of Cataract & Refractive Surgeons (ESCRS) (Septembr 5-9, 2015, Barcelona, Spain). Nishizawa A, Takahashi E, Ohira S, Iwao K, Inoue T, Tanihara H. The effect of phacoemulsification on failure of trabeculectomy in uveitic glaucoma patients.

XXXIII Congress of the European Society of Cataract & Refractive Surgeons (ESCRS) (Septembr 5-9, 2015, Barcelona, Spain). Takahashi E, Nishizawa A, Inoue T, Kawabata K, Tanihara H. Two cases with scleral fixation of intraocular lens after trabeculectomy.

XXXIII Congress of the European Society of Cataract & Refractive Surgeons (ESCRS) (Septembr 5-9, 2015, Barcelona, Spain). Iwao K, Nishizawa A, Inoue T, Tanihara H. Impact of phacoemulsification on postoperative IOP after MMC trabeculectomy for uveitic glaucoma.

The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 3-7, 2015, Denver, Colorado, USA). Futakuchi A, Inoue T, Fujimoto T, Kuroda U, Inoue-Mochita M, Takahashi E, Shobayashi K, Ohira S, Tanihara H. Histone deacetylase inhibitor attenuates TGF- β 2 induced human conjunctival fibroblast activation.

The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 3-7, 2015, Denver, Colorado, USA). Fujimoto T, Inoue T, Maki K, Inoue-Mochita M, Kojima S, Tanihara H. The effect of VEGF-A on trabecular meshwork

and Schlemm's canal endothelial cells permeability.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学大学院生命科学研究部眼科学分野
研究業績

[http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/ganka/
kyousitu/gyouseki.html](http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/ganka/kyousitu/gyouseki.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷原 秀信 (TANIHARA, Hidenobu)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：60217148