

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月8日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20246

研究課題名(和文)トレハロースによる眼内増殖性疾患の新規制御法の開発

研究課題名(英文)New treatment for intraocular proliferative diseases using trehalose

研究代表者

安達 功武 (Adachi, Kbu)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60620862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：最近、当教室ではトレハロースには外表面の上皮細胞に対して保護作用がある反面、線維芽細胞や血管内皮細胞に対しては増殖抑制作用がある事を見いだした。本研究はトレハロースの線維芽細胞増殖抑制作用に注目して、眼内に増殖性変化を起こす増殖性糖尿病網膜症における眼内細胞の増殖作用をトレハロースが抑制するかどうかを明らかにすることを目的とした。巻首疾患患者に対する硝子体切除手術によって採取された硝子体液をARPE-19細胞含有コラーゲンゲルの培養液に添加してコラーゲンゲル収縮を起こさせ、それをトレハロースが阻止するかどうかを検証した。結果はトレハロースには明らかな収縮抑制効果は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：Recently, our lab clarified that trehalose has an inhibitory effect on proliferation of fibroblasts and vascular endothelial cells whereas it has a protective effect on surface epithelial cells. In this study, we tried to investigate whether or not trehalose has an inhibitory effect on growth of fibroblasts by vitreous fluid obtained from various intraocular diseases, including proliferative diabetic retinopathy. I employed cultured ARPE-19 cell in the collagen gel with or without trehalose. There was no statistical deference between gels containing trehalose and gels without trehalose in terms of shrinkage of ARPR-19 collagen gels with vitreous fluid.

研究分野：眼科学

キーワード：トレハロース 眼内増殖性疾患 増殖糖尿病網膜症

1. 研究開始当初の背景

トレハロースはシヨ糖の異性体である二糖類で、湿潤性を保つ性質が古くから知られていた。これはたとえば乾燥気候中で生息する昆虫や植物の体内にトレハロースが豊富に含まれていることから理解できる。さらにトレハロースには極めて安定な化学的性質と生体安全性があるため、食品添加物や化粧品の配合剤としてヒトに用いる化学製品にも広く使用されている物質である。眼科的には眼内投与する抗 VEGF 抗体(ルセンチス®)にも緩衝剤として含有されているほか、ドライアイ治療薬として角膜上皮保護の効果も確認されている。

私が所属する研究室ではこのトレハロースの性質に注目し、これまでに結膜下線維芽細胞増殖抑制¹⁾、上皮細胞保護¹⁾、緑内障濾過胞保持機能¹⁾、血管内皮細胞増殖抑制²⁾、悪性黒色腫細胞増殖抑制³⁾などの大変ユニークな性質をもつことを報告してきた。これらの性質は核内で働く各種転写因子の変動から上皮間葉系移行 (epithelial mesenchymal transition, EMT) や間葉系上皮移行 (mesenchymal epithelial transition, MET) の抑制の可能性があると考えられた。

EMT や MET を促進するサイトカインには TGFβ (transforming growth factorβ) が知られている。眼疾患においては各種網膜硝子体疾患において硝子体中の TGFβ の上昇が知られている。このことは硝子体内が糖尿病網膜症や増殖性硝子体網膜症などの病的状況において EMT や MET を惹起しやすい環境にあり、その結果種々の細胞増殖が起こるとの仮説が成り立つ。

そこで本研究では硝子体手術時に採取されるヒト硝子体サンプルを用いて、その中に含まれる TGFβ をはじめとする硝子体内サイトカインが EMT や MET を促進させて網膜硝子体中に存在する細胞 (とくに網膜色素上皮細胞、グリア細胞や硝子体細胞など) を線維細胞化へと導く可能性、およびその細胞増殖作用をトレハロースが抑制できる可能性を *in vitro* モデルや動物実験にて検証したいと考える。さらに加齢黄斑変性の原因ともなる脈絡膜新生血管の発症についてもトレハロースの血管内皮細胞増殖抑制効果を利用して治療効果を期待できるかどうかを検証したいと考えた。

参考文献

1. Takeuchi K, Nakazawa M, Ebina Y, Sato K, Metoki T, Miyagawa Y. Inhibitory effects of trehalose on fibroblast proliferation and implications for ocular surgery. *Exp Eye Res.* 91(5): 567-577, 2010.
2. Takeuchi K, Nakazawa M, Ebina Y. Effects of trehalose on VEGF-stimulated angiogenesis and myofibroblast proliferation. Implication for glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52(9): 6987-6993, 2011.
3. Kudo T, Takeuchi K, Ebina Y, Nakazawa M. Inhibitory effects of trehalose on malignant melanoma cell growth: implications for a novel topical anti-cancer agent on the ocular surface. *ISRN Ophthalmology* 2012 (2012), Article ID 968493, 9 pages, doi:10.5402/2012/968493.

2. 研究の目的

当教室ではこれまでトレハロースには線維芽細胞、血管内皮細胞および悪性黒色腫細胞などの間葉系由来細胞の増殖抑制作用がありながら上皮細胞保護作用をもつという二面性の性質があることを報告してきた。これはトレハロースが上皮間葉系移行 (EMT) および間葉系上皮移行 (MET) を抑制するという特異な性質によるものであると考えている。このトレハロースの性質はさらに網膜硝子体疾患の治療にも応用できる可能性がある。そこで本研究では網膜硝子体疾患において硝子体中の線維増殖や網膜下新生血管発生をトレハロースが抑制できるかどうかを、ヒト硝子体サンプルを利用した *in vitro* 培養細胞系により、その一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト硝子体サンプルの採取

弘前大学医学部附属病院眼科にて日常業務として行っている硝子体切除手術の際に、弘前大学大学院医学研究科倫理委員会の承認と、患者の承諾のもとに切除する硝子体の一部サンプルとして採取する。手術中に採取した硝子体サンプルは直ちに専用容器に注入したのち遮光のうえ氷冷し、手術後-80度にて実験に使用するまでの間保存する。

(2) ヒト網膜色素上皮細胞含有2型コラーゲンの硝子体サンプルによる収縮

ヒト網膜色素上皮細胞として ARPE-19 細胞を使用する。ヒト2型コラーゲンを水に溶解し、ARPE-19細胞を含有するコラーゲンゲルシートを24穴培養プレート内に作成する。前ページの図に示すとおり、このシート上に1.にて採取したヒト硝子体サンプルのみを入れた群と硝子体サンプルにトレハロースを添加した群とに分けて、両群を同一条件で培養する(37)。コラーゲンゲルの収縮の度合いは写真撮影(図1)と画像解析ソフトにて定量的に計測する。ゲルの収縮後の面積と術前の臨床像、重症度のスコアとを比較する。臨床像の重症度が収縮能に関与するのかどうかを検討する。予備実験結果を図1に示す。

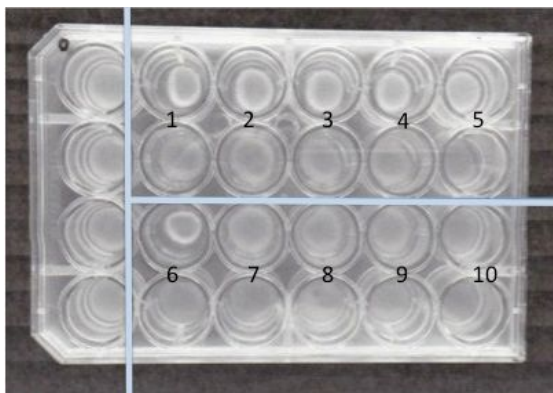


図1：培養ヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE-19) 含有コラーゲンゲルの糖尿病患者硝子体液による特異的収縮とトレハロースによる収縮抑制(予備実験結果)。試料1~6上下には増殖糖尿病網膜症患者の硝子体液、7~10上下には黄斑円孔患者の硝子体液を添加して ARPE-19 細胞含有コラーゲンゲルの収縮をみた予備実験結果。各試料上段は硝子体液のみ、下段には硝子体液とトレハロースを添加した。1~6上段はゲルの収縮が起こり、それをトレハロース(下段)が抑制していることが確認された。黄斑円孔硝子体には収縮能はみられなかった。

(3) 増殖性眼内疾患の硝子体液中のサイトカインと抗酸化力の測定

増殖性眼内疾患における炎症反応と酸化ストレスはトレハロースの効果に影響する可能性がある。増殖性眼内疾患の代表として増殖性糖尿病網膜症と裂孔原性網膜剥離に着目し、手術時に得られた硝子体サンプル中

の炎症性サイトカインと酸化ストレスの指標としての抗酸化力を測定した。対照疾患として黄斑円孔と網膜上膜の患者硝子体サンプルを用いた。

4. 研究成果

(1) ヒト網膜色素上皮細胞含有2型コラーゲンの硝子体サンプルによる収縮

予備実験においてヒト ARPE-19 細胞含有2型コラーゲンゲルは培養とともに収縮傾向を示し、その培養後面積は添加トレハロースの濃度を0%、2.5%、5.0%、10.0%と濃度依存性に収縮が抑制されることが示された。

研究期間中に硝子体切除手術の対象となった患者で硝子体採取に同意を得られた患者は増殖糖尿病網膜症22例22眼、対照とした網膜上膜または黄斑円孔は8例8眼だった。これらの手術眼の硝子体サンプルを用いて、コラーゲンゲルの5%トレハロース添加による収縮抑制効果の実験を行った。結果を以下に平均値 ± 標準偏差にて羅列する。統計学的検定には Student t-test を用いた。単位は mm^2 。

ゲルのみ： 134.000 ± 19.278 (n = 9)

トレハロース無添加群

糖尿病群： 70.176 ± 26.313 (n = 22)

対照群： 103.321 ± 26.874 (n = 8)

両者の間には有意差を認めた (P = 0.006)。

トレハロース添加群

糖尿病群： 77.690 ± 23.216 (n = 22)

対照群： 88.486 ± 21.601 (n = 8)

糖尿病群においてはトレハロース無添加群と添加群との間に有意差を認めた (P = 0.014)。

対照群においてはトレハロース無添加群と添加群との間には有意差を認めなかった (P = 0.079)。

以上の結果から、増殖糖尿病網膜症の硝子体には2型コラーゲンゲルを収縮させる作用があり、その作用は網膜上膜や黄斑円孔の硝子体より有意に強いことが明らかとなった。さらに、5%トレハロース添加によってコラーゲンゲル収縮は有意に抑制されることが明らかとなった。将来的に、増殖糖尿病網膜症に対する硝子体手術時の眼内灌流液や何らかの硝子体内薬物療法としてトレハロースの応用が考慮されてもよい可能性が見いだされた。

(2) 増殖性眼内疾患の硝子体液中のサイト

カインと抗酸化力の測定

各種眼疾患に対する硝子体切除手術に際して硝子体サンプルを採取し、硝子体試料中の炎症性サイトカインと抗酸化力（BAP）を測定した。

炎症性サイトカインのうち、網膜剥離と増殖糖尿病網膜症において、黄斑円孔を対照とした場合に有意に上昇していたサイトカインはIL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1, IP-10の5種類だった（具体的なデータに関してはすでに後述の発表論文3に詳細に記載されている）。このうち、網膜剥離と糖尿病網膜症との間で有意差なく高値であったのが、MCP-1, MIP-1, IP-10の3者であり、網膜剥離で糖尿病網膜症と黄斑円孔とのほぼ中間の値だったのが、IL-6とIL-8だった。また網膜剥離硝子体中のサイトカイン値は網膜剥離の範囲と持続時間に比例して高くなることが判明し、臨床的な重症度が高くなれば炎症反応を惹起させることが明らかとなった。

次に各種眼疾患硝子体中の抗酸化力の測定結果であるが、抗酸化力（Biological antioxidant potential, BAP）は以下の通りとなった。

黄斑円孔： 2258.83 ± 450.79

網膜上膜： 2169.23 ± 594.01

網膜剥離： 1860.50 ± 470.59

糖尿病網膜症： 1647.76 ± 460.53

であり、網膜剥離と糖尿病網膜症であり、呂謝は黄斑円孔に比べて統計学的に有意の差があった（網膜剥離と黄斑円孔, $P = 0.012$ ；糖尿病網膜症と黄斑円孔, $P < 0.001$ ）。詳細については下記文献の2と4に詳細に記載されている。

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 4 件)

1. Suzuki Y, Adachi K, Takahashi S, Maeno A, Nakazawa M.

Oxidative stress in the vitreous fluid with rhegmatogenous retinal detachment. J Clin Exp Ophthalmol 6: 682-686, 2017.

Doi:10.4172/2155-9570.1000682 査読あり

2. Maeno A, Suzuki Y, Adachi K, Takahashi S, Yokoi Y, Nakazawa M.

Characterization of biological antioxidant potential in the vitreous fluid from patients with rhegmatogenous retinal detachment. Acta Ophthalmol 94 (6), e515-516, 2016, doi: 10.1111/aos.13002. 査読あり

3. Takahashi S, Adachi K, Suzuki Y, Maeno A, Nakazawa M.

Profiles of inflammatory cytokines in the vitreous fluid from patients with rhegmatogenous retinal detachment and their correlations with clinical features. BioMed Res Int 2016, article ID 4256183, 9 pages, 2016. doi:10.1155/2016/4256183 査読あり

4. Adachi K, Takahashi S, Yamauchi K, Mounai N, Tanabu R, Nakazawa M.

Optical coherence tomography of retinal degeneration in Royal College of Surgeons rats and its correlation with morphology and electroretinography. PLOS ONE 11(9): e0162835, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0162835. 査読あり

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 鈴木幸彦、安達功武、工藤孝志、鈴木香、目時友美、中澤 満

術前網膜光凝固の有無による糖尿病網膜症の硝子体サイトカインと術後炎症. 第122回日本眼科学会総会、2018年4月19-22日、大阪国際会議場

2. 工藤孝志、鈴木幸彦、目時友美、安達功武、毛内奈津姫、中澤 満

内境界膜剥離操作が神経節細胞層に及ぼす影響. 第122回日本眼科学会総会、2018年4月19-22日、大阪国際会議場

3. 安達功武、鈴木幸彦、丹藤利夫、江目孝幸、工藤朝香、鈴木香、目時友美、中澤 満

外傷性低眼圧黄斑症 6 例の検討. 第 56 回日本網膜硝子体学会、2017 年 12 月 1-3 日、東京国際フォーラム

4. 鈴木幸彦、安達功武、工藤孝志、鈴木香、目時友美、中澤 満

糖尿病網膜症に対する汎網膜光凝固術既往の有無による硝子体サイトカイン濃度の差. 第 121 回日本眼科学会、2017 年 4 月 6-9 日、東京国際フォーラム

5. 安達功武、鈴木幸彦、丹藤利夫、工藤孝志、鈴木香、目時友美、中澤 満

増殖糖尿病網膜症に対する硝子体手術後に両眼の網膜動脈分枝閉塞症を発症した 1 例. 第 71 回日本臨床眼科学会、2016 年 10 月 12-15 日、東京国際フォーラム

6. 田名部玲子、鈴木幸彦、高橋 静、毛内奈津姫、山内宏大、安達功武、工藤孝志、吹田淑子、中澤 満、櫻庭知己

慢性眼 GVHD による重症ドライアイの角膜穿孔に対する治療経験例. 第 70 回日本臨床眼科学会、2015 年 11 月 3-6 日、京都国際会議場

〔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
<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~ophthal/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達功武 (Adachi, Kobu)
弘前大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60620862

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし ()