

令和元年6月13日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11303

研究課題名(和文) 緑内障濾過手術におけるリンパ管流の解析と制御

研究課題名(英文) Lymphatic vessels in glaucoma filtration surgery

研究代表者

松田 彰 (Matsuda, Akira)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00312348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロアレイ法を用いて、マウス濾過胞モデルの濾過胞部位の網羅的遺伝子発現解析を施行した。Gene Ontology解析で術後3日目、7日目に共通してTリンパ球および好中球の遊走に関連する遺伝子発現経路の活性化が、術後7日目にコラーゲンの産生・分解経路の活性化が観察された。個々の遺伝子では、S100a8・S100a9といったアラミン分子、サイトカインIl1b, プロテアーゼSerpinb2, 増殖型ケラチンKrt16など創傷治癒時に結膜上皮で産生される遺伝子群の発現増加が著明であった。また、ムチン遺伝子Muc5ac, およびゴブレット細胞のマーカーGp2の発現量が有意に低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として、マウス濾過手術モデルを樹立し、網羅的遺伝子発現解析を施行した。その結果、マクロファージ等の炎症細胞の濾過胞への浸潤が濾過胞の術後癒着化に関連していることが判明し、今後マクロファージの組織内への浸潤、活性化の抑制といった方法で濾過手術の治療成績を改善するための臨床応用に向けた基礎的なデータを得ることができた。また、結膜上皮の恒常性維持が濾過手術の成績に関連している可能性があり、臨床的に興味深い結果を得ることができたと考えられる。マウス濾過手術モデルは汎用性の高い実験モデルであり、今後濾過手術の基礎研究に広く使われることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We carried out genome-wide gene expression analysis of bleb tissue obtained from mouse glaucoma filtration surgery using microarray. Gene ontology analysis revealed the activation of the gene pathways relate to T lymphocyte and neutrophil migration, collagen production and degradation. As for individual genes, we found upregulation of alamin genes (s100a8/s100a9), interleukin 1b, serpin b2, keratin 16, all of which are related to the wound healing process in the conjunctival epithelium. Furthermore, we found downregulation of Muc5ac, GP2, which related to the homeostatic responses of the conjunctival epithelium.

研究分野：眼科学

キーワード：緑内障 濾過手術 マウスモデル 遺伝子発現 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

緑内障は我が国において40歳以上の約5%が罹患し、常に中途失明原因の上位を占めている疾患である。進行した緑内障性視神経障害を呈し、薬剤による眼圧下降が不十分な緑内障患者に対しては、房水を眼外に導出する線維柱帯切除術等の濾過手術が施行される(日本眼科学会、緑内障診療ガイドライン)。濾過手術は、優れた眼圧下降作用を持つ一方、濾過部位の癒着化による眼圧上昇が長期的には30-40%の症例で見られることや、逆に3-12%程度の症例で眼圧の過剰な低下による視機能障害や濾過胞の感染を生ずることが知られており、手術方法の改良が望まれている。濾過手術後の房水は、主に結膜下のリンパ管あるいは静脈から排出されている。サルを使用した濾過手術の研究から、濾過手術後には一度障害されたリンパ管が再生し、結膜下に誘導された房水は毛細リンパ管(initial lymphatics)から吸収され、術後の眼圧はリンパ管の再生が良好である個体の方が低いと報告されている(Yu D et al. Prog Retin Eye Res. 28:303-28)。本研究では濾過手術におけるリンパ管流の経時的変化に対し、リンパ管増殖因子と術後炎症が与える影響を明らかにすること、またリンパ管増殖因子と術後炎症の制御によりリンパ管流を増大させ、濾過手術の術後成績を向上させることを最終目標とする。手術後侵襲とリンパ管機能に関しては、マウス尾部リンパ管創傷治癒(リンパ浮腫)モデルを用いた研究が報告されており、CD4陽性リンパ球(特にTh2リンパ球)ならびにTh2サイトカインがリンパ管の創傷治癒並びに再生を阻害し、リンパ管周囲の組織線維化を促進することが報告されている。またリンパ管流と房水の動態に関して、リンパ管増殖因子であるVGEF-Cシグナルが、マウスにおいてシュレム管経由の房水流出を増加させることが報告された(Aspelund A et al. J Clin Invest. 124:3975-86)。我々は、これまでにヒト慢性アトピー性角結膜炎の病態にリンパ管新生が関連していること(Matsuda A et al. J Allergy Clin Immunol. 126:1310-12)、また、重症アトピー性皮膚炎に伴う緑内障において、濾過手術の成績が不良であること(Takakuwa K et al. J Glaucoma in press)を報告し、濾過手術後の結膜リンパ管流と術後炎症に焦点をあてた研究を着想した。

2. 研究の目的

代表的な緑内障手術である濾過手術における長期的な成功率は60-70%とされており、炎症を伴う緑内障においては癒着化にともなう眼圧再上昇がおこりやすい。リンパ管流は濾過手術後の房水吸収によって濾過手術の成功に貢献している一方で、リンパ球やマクロファージ等の炎症性細胞の流入によって濾過胞の線維化を引き起こしている可能性がある。本研究では、マウス濾過手術モデルを用い、濾過手術後のリンパ管流の動態を解析するとともに、リンパ管増殖因子を濾過胞で操作することにより、術後炎症とリンパ管流が濾過手術の結果に及ぼす役割を明らかにするとともに、その過程に介入することで、濾過手術の成績向上に寄与するための基礎データを得ることを目標に研究を進める。

3. 研究の方法

リンパ管を可視化できるマウスを用いて、濾過手術後のリンパ管からの房水吸収と眼圧の関係を明らかにするとともに、リンパ管流を増大させて眼圧下降につながる可能性のある治療的介入を試みた。

(1)濾過手術によるリンパ管の変化：濾過手術によって結膜リンパ管が障害され、その後再生される経時的変化をリンパ管マーカー(Prox1)のレポーターマウスを用いて観察する。また同時に炎症細胞(リンパ球、マクロファージ)の浸潤について、免疫組織染色で観察する。

(2)濾過手術後の結膜リンパ管流と術後眼圧の関係：マウス濾過手術モデルにおいて、濾過胞のリンパ管再生・新生を実験的に抑制(リンパ管増殖因子の中和抗体投与)あるいは促進(リンパ管増殖因子の強制発現)し、濾過胞の形状や眼圧に与える影響を評価する。

(3)術後の炎症細胞浸潤がリンパ管流に与える影響：マクロファージを除去したマウス(クロドロン酸投与)を用いて濾過手術を施行し、リンパ球およびマクロファージが濾過手術後のリンパ管流に与える影響を明らかにする。

(4)毛細リンパ管からの房水吸収の解析：濾過手術後にフルオレセインを前房内に注入し、毛細リンパ管からの房水吸収をin vivoイメージングにて観察する。

(5)マウス濾過手術モデルの濾過胞組織を術後経時的に採取し、マイクロアレイ解析を施行することによって、術後炎症反応や組織癒着化の病態を網羅的遺伝子解析で検討した。

(6)網羅的遺伝子解析の結果から術後組織線維化反応に大きな役割を果たしていると考えられる細胞外マトリックス・ペリオスチンの遺伝子欠損マウスとコンジェニックな野生型マウスを用いて、マウス濾過手術モデルを作成し、ペリオスチン発現が濾過胞の組織癒着化に果たす役割を検証した。

4. 研究成果

(1)マウス濾過手術モデルを用いたリンパ管の変化の経時的観察：濾過手術によって結膜リンパ管が障害され、その後再生される経時的変化をリンパ管マーカー(Prox1)のレポーターマウスを用いて観察した。また同時に炎症細胞(リンパ球、マクロファージ)の浸潤について、免疫組織染色で観察した。その結果、濾過手術施行1時間後には炎症細胞の浸潤が観察され、術後3-7日目にかけて炎症細胞の浸潤が増加した。一方で、濾過胞におけるリンパ管マーカーの発現は術後24時間以内に消失、術後7日の時点でも回復しないことが明らかになった。

(2) 濾過手術後の結膜リンパ管流と術後眼圧の関係：マウス濾過手術モデルにおいて、濾過胞のリンパ管を実験的に促進（リンパ管増殖因子の強制発現）し、濾過胞の形状や眼圧に与える影響を評価した。具体的には、濾過手術におけるリンパ管の役割を明らかにするため、Prox1-Cre-Tomato マウスに濾過手術を施行し、マウス VEGF-C を含んだペレットを留置し、濾過胞の維持状態、リンパ管の再生および新生と術後眼圧を対照群と比較検討した。その結果、濾過胞部位の肥大が観察されたものの、期待された濾過効果の増大には繋がらないことが判明した。すなわち、VEGF-C 投与はリンパ管のみならず、新生血管を濾過胞に誘導し、濾過胞の維持には貢献しない事が明らかになった。

(3) 術後の炎症細胞浸潤がリンパ管流に与える影響：マクロファージを除去したマウス(クロドロン酸投与)を用いて濾過手術を施行し、マクロファージが濾過手術後のリンパ管流に与える影響を検討した。その結果、マクロファージ除去マウスでは術後3日目の時点で、濾過胞組織における組織線維化マーカーである alpha-Smooth muscle actin 遺伝子の発現が有意に低下していること、IL-6, IL-1 といった炎症性サイトカインの発現も有意に低下していることが判明した。

(4) 毛細リンパ管からの房水吸収の解析：濾過手術後にフルオレセインを前房内に注入し、毛細リンパ管からの房水吸収を in vivo イメージングにて観察した。Prox1-Cre-Tomato 濾過手術モデルを用いて、前房内へフルオレセインを投与して、リンパ管内への房水移行の可視化を試みたが、フルオレセインの蛍光強度と比較して、リンパ管の蛍光強度が弱く In vivo 観察には適さないモデルであることが判明した。

(5) 上記1-4の結果を踏まえ、マウス濾過手術モデルの解析をリンパ管のみから、遺伝子発現プロファイル全体に解析対象を広げた。その結果、マウス濾過胞モデルにおいて濾過胞部位で有意に発現が上昇したプローブを術後3日目で789個、術後7日目で871個検出した。Gene Ontology 解析で術後3日目、7日目に共通してTリンパ球および好中球の遊走に関連する遺伝子発現経路の活性化が、術後7日目にコラーゲンの産生・分解経路の活性化が観察された。個々の遺伝子では、S100a8・S100a9 といったアラミン分子、サイトカイン Il1b, プロテアーゼ Serpinb2, 増殖型ケラチン Krt16 など創傷治癒時に結膜上皮で産生される遺伝子群の発現増加が著明であった。また、術後7日目においてムチン遺伝子 Muc5ac, およびゴブレット細胞のマーカーGp2 の発現量が有意に低下していた。これらの結果は日本眼科学会総会および Annual meeting of Associations for Vision Research and Ophthalmology の年次総会で発表した。学会発表におけるディスカッションから内容を吟味して、論文を執筆し、現在学術雑誌に投稿中である。また、遺伝子発現プロファイルで特に興味深い結果を示したいくつかの遺伝子に関して、遺伝子改変マウスを入手し、濾過手術モデルを作成、その機能解析も施行した。その結果、マクロファージの中でも組織修復・癒着を促進する M2 マクロファージの活性化が観察された。同時に濾過胞における M2 マクロファージのマーカー(Arg1, CD164)発現を免疫組織染色により解析し、濾過手術後の濾過胞では有意に M2 マクロファージが浸潤していることを発見した。濾過手術の結果にマクロファージが重要な役割を果たしている可能性が考えられたため、前述のクロドロンネトリポゾームを使用したマクロファージ除去モデルマウスを作成し、濾過手術に与える役割を検証した。すなわち、マクロファージ除去マウスモデルに濾過手術を施行し、対照野生型マウスとの間で、濾過胞の維持状態、リンパ管の分布（ホールマウント LYVE-1 免疫染色）と術後眼圧経過、術後組織における組織癒着マーカー発現を比較したところ、マクロファージ除去マウスでは濾過胞の癒着化が有意に抑制されることが判明し、それらの結果は、2019年度の日本眼科学会総会ならびに Annual meeting of Associations for Vision Research and Ophthalmology の年次総会で発表した。現在学会発表および学術雑誌への投稿を準備中である。

(6) 網羅的遺伝子解析の結果から術後組織線維化反応に大きな役割を果たしていると考えられる細胞外マトリックス・ペリオスチンの遺伝子欠損マウスとコンジェニックな野生型マウスを用いて、マウス濾過手術モデルを作成し、比較検討したところ、術後7日目の時点でペリオスチン発現が濾過胞部位で有意に亢進していること、また、濾過胞におけるペリオスチン遺伝子発現を認める野生型マウスにおいてペリオスチン欠損マウスと比較して、濾過胞組織における組織線維化マーカーである alpha-Smooth muscle actin 遺伝子の発現が有意に低下していることを発見した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

1. [Matsuda A](#), [Asada Y](#), Suita N, [Iwamoto S](#), Hirakata T, Yokoi N, Ohkawa Y, Okada Y, Yokomizo T, Ebihara N. Transcriptome profiling of refractory atopic keratoconjunctivitis by RNA sequencing. *J Allergy Clin Immunol*. 2019 Apr;143(4):1610-1614.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2018.11.007.
2. [Asada Y](#), Okano M, Ishida W, [Iwamoto S](#), Fukuda K, Hirakata T, Tada N, Fukushima A, Ebihara N, Kudo A, [Matsuda A](#). Periostin deletion suppresses late-phase response in mouse experimental allergic conjunctivitis. *Allergol Int*. 2019 Apr;68(2):233-239. doi:

[学会発表](計9件)

1. Akira Matsuda, Yosuke Asada, Satoshi Iwamoto, Jobu Sugita. Alteration of lymphatic vessels after filtration surgery in mouse. Annual meeting for the Association of Research in Vision and Ophthalmology. May 1. 2016 Seattle USA
2. Toshimitsu Kasuga, Yosuke Asada, Satoshi Iwamoto, Akira Matsuda. The effect of tenascin-C for conjunctival fibrosis after filtration surgery in mouse. Annual meeting for association of vision and ophthalmology May 7. 2017 Baltimore USA
3. 松田 彰 アトピー性疾患の組織線維化 第121回日本眼科学会総会(招待講演)2017年04月09日
4. 松田 彰、浅田洋輔、岩本 怜 マウス濾過手術後の遺伝子発現の変化 第122回日本眼科学会総会 2018年4月
5. Akira Matsuda, Yosuke Asada, Satoshi Iwamoto. The alteration of gene expression profiles after filtration surgery in mouse. Annual meeting of association for research in vision and ophthalmology. 29 Apr 2018 Hawaii USA
6. 足立啓介, 平形寿彬, 浅田洋輔, 岩本 怜, 工藤 明、松田 彰. 濾過手術マウスモデルの濾過胞におけるペリオスチンの役割 日本眼科学会総会 2019年4月、東京
7. 尾上美樹 足立啓介 平形寿彬、浅田洋輔 岩本 怜 松田 彰. マウス濾過手術モデルにおけるマクロファージ枯渇化の影響 日本眼科学会総会 2019年4月、東京
8. Keisuke Adachi, Toshiaki Hirakata, Yosuke Asada, Satoshi Iwamoto, Akira Kudo, Akira Matsuda. The role of periostin in the conjunctival bleb after filtration surgery in mice. Annual meeting of association for research in vision and ophthalmology. 2019 May 1 Vancouver, Canada
9. Miki Onoue, Yosuke Asada, Satoshi Iwamoto, Toshiaki Hirakata, Keisuke Adachi, Akira Matsuda. The influence of macrophage depletion in mouse model of filtration surgery. Annual meeting of association for research in vision and ophthalmology. 2019 May 1 Vancouver, Canada

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：岩本 怜

ローマ字氏名：(IWAMOTO, satoshi)

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 10568207

研究分担者氏名：浅田 洋輔

ローマ字氏名：(ASADA, yosuke)

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 70596626