

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16929

研究課題名(和文)末梢血中を循環するfibrocyteの緑内障術後創傷治癒への関与の解明

研究課題名(英文) Involvement of circulating fibrocyte in wound healing after glaucoma filtration surgery

研究代表者

小島 祥 (Kojima, Sachi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：80632661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障濾過手術の術後成績には、手術で作成した濾過経路に生じる創傷治癒過程が強く影響する。本研究ではまず、局所の創傷治癒にfibrocyteを含む末梢循環単核細胞が関わることを示した。さらに、末梢循環単核細胞の局所への浸潤にMCP-1が関与することも示した。我々は既報においてMCP-1は濾過手術の予後不良因子であることを示しているが、今回の研究結果より創部局所における抗線維化抑制が効かない難治緑内障症例には、末梢循環細胞が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障手術の代表である濾過手術の術後成績は、手術で作成した濾過経路をいかに長期間維持できるかに依る。創部の線維化を抑制するために、線維芽細胞増殖抑制作用のあるマイトマイシンCを手術中に創部に塗布することで術後成績は飛躍的に向上したが、それでもなお過剰な線維化を生じる難治緑内障症例は存在する。本研究において我々が見出した、末梢血循環細胞が局所の線維化に関わるという知見は、マイトマイシンの影響を受けない線維化のメカニズムの存在を示唆し、新しい創傷治癒機序の解明の機会となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The postoperative outcome of glaucoma filtration surgery is strongly influenced by the wound healing process that occurs in the surgically created filtration pathway. In this study, we first showed that peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), including fibrocytes, are involved in local wound healing. Furthermore, we indicated that MCP-1, which we have previously shown to be a risk factor in glaucoma filtration surgery, is involved in the migration of PBMCs to surgical site. These results suggested that PBMCs are involved in refractory glaucoma cases in which antifibrosis suppression at the wound site is not effective.

研究分野：緑内障

キーワード：緑内障 緑内障濾過手術 創傷治癒 fibrocyte

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでにトラベクトミーの治療効果や合併症の背景因子の解析を行い、治療成績の向上に貢献すべくトラベクトミー後の創傷治癒過程の解明を課題とし研究に取り組んでいる。トラベクトミーで作成した濾過胞が機能不全となる原因は、濾過胞周囲組織に生じる過剰な線維化である。マイトマイシン C は過剰な線維化を抑制するが、我々は線維芽細胞増殖抑制効果のあるマイトマイシン C を創部に塗布しているにも関わらず、過剰な創傷治癒反応が生じる症例を経験しており、そのメカニズムを明らかにすること重要性を認識した。組織の創傷治癒に関わる細胞として知られている fibrocyte は末梢血中を循環しているため、マイトマイシン C 塗布時にはそこには存在せず、手術により炎症が惹起された創部に後から遊走してくることから、マイトマイシン C の直接的な影響は受けないと考えられる。我々は、房水内の MCP-1 濃度が高い症例ではトラベクトミー術後成績は不良であり、トラベクトミーで作成した房水流出路の閉塞に房水内の MCP-1 濃度が関与しているという知見を見出したが、fibrocyte が MCP-1 の受容体である CCR2 を発現しており、さらに fibrocyte 自身も MCP-1 を産生するという点は興味深く、fibrocyte はマイトマイシン C の影響を受けない創傷治癒過程の解明のターゲットになりうると考えた。

2. 研究の目的

トラベクトミー後の創傷治癒過程における fibrocyte の関与を明確にし、線維化の過程での役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験動物として、全身の細胞に GFP が発現しているグリーンマウス、骨髄単球系細胞 (マクロファージや好中球) が GFP で標識されている LysM-eGFP マウス、C57BL/6 (野生型マウス) の 3 種を使用した。

1) 緑内障濾過手術後の創傷治癒における末梢を循環する単核細胞の関与の証明

グリーンマウスの末梢血を採取し、Ficoll 比重遠心法で GFP がラベルされている fibrocyte を含む末梢単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells: PBMCs) を回収した。結膜切開後に強膜を熱凝固し、30G 針で前房穿刺して 10-0 ナイロン糸で結膜を縫合したモデルを簡易緑内障濾過手術モデルとした。簡易緑内障濾過手術を施行した野生型マウスの尾静脈に PBMCs (5.0×10^5 cells/0.1ml) を静注し、8 週後に眼球摘出して結膜のフラットマウント作成と結膜細胞の単離培養を行なった。結膜フラットマウントと結膜単離細胞の免疫染色を行い、GFP 陽性細胞の存在の有無と、GFP 陽性細胞の線維化を確認するために SMA 発現を確認した。

2) 末梢を循環する単核細胞の創部への移行や線維化への MCP-1 が関与の検証

尾静脈に PBMCs (5.0×10^5 cells/0.1ml) を静注した野生型マウスの結膜下に MCP-1 (1 μ g/ml, 0.05ml) と PBS (0.05ml, コントロール) を注射し、3 日後、2 週間後、4 週間後、8 週間後の時点で眼球摘出し、結膜フラットマウントを作成した。結膜フラットマウントの免疫染色で、GFP 陽性細胞の存在の有無と SMA 発現を確認した。

3) 単核細胞の走化性への MCP-1 が関与と、K-115 の影響の検証

THP-1(ヒト単球細胞系)の走化性と MCP-1 の関与についてポイデンチャンバーを用いて評価した。ポイデンチャンバーの上のウェルに THP-1 を播種(4.0x10⁵ cells/per well)し、下のウェルに MCP-1 (100ng/ml)を入れ、インキュベート2時間後に下のウェルに移行した THP-1 を定量した。また、下方ウェルに K-115 (1μM または 10μM)を入れた状態で同様の検証を行い、MCP-1 の関与と、MCP-1 の作用に対する K-115 の影響について評価した。

4) 生体眼イメージングによる、結膜組織における炎症と MCP-1 の関与の検証

生体眼イメージングは、申請者が確立した2光子顕微鏡による4次元イメージングの方法を用いた(Kojima S, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2016)。具体的には LysM-eGFP マウスにイソフルラン吸入で全身麻酔をかけ、自家製固定器で眼球と頭部を固定し、2光子励起正立顕微鏡(オリンパス Fluoview FV1000MPE)で観察部を連続的に撮影した。眼球固定と乾燥予防目的で撮影眼には PBS で満たしたアイカップを装着するが、そこに MCP-1 (10 μg/ml) 加えることで、MCP-1 負荷モデルとした。K-115 (4mg/ml) 負荷も同様に行なった。撮影直前に TexasRed で標識されたデキストランを静注して血管を赤く描出した。撮影した画像を3次元再構築し時間軸もあわせて4次元画像とし、Imaris image analysis software (Bitplane) で細胞の数と軌跡についての評価を行なった。

4. 研究成果

1) 末梢を循環する単核細胞は、緑内障濾過手術創部に移行し線維化に関与する。

簡易緑内障濾過手術を行なったマウスの創部で GFP 陽性細胞が確認され、創部に fibrocyte を含む PBMCs が移行することが確認できた。さらに移行してきた GFP 陽性細胞は SMA を発現しており、PBMCs の線維化への関与が示唆された。さらに結膜培養細胞においても、GFP 陽性細胞が SMA を発現していることを確認した(図1)。

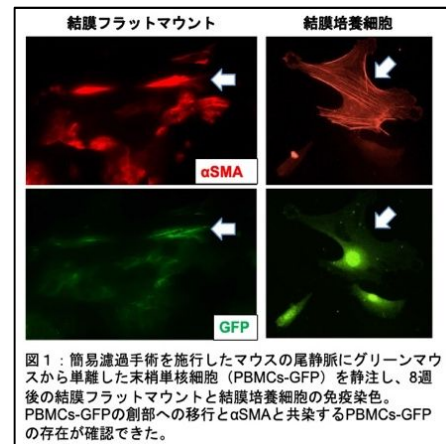
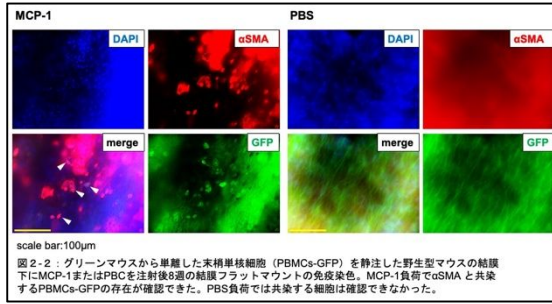
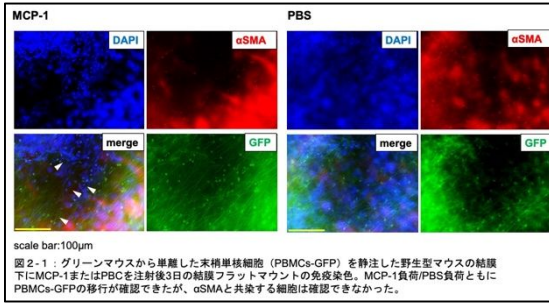


図1: 簡易濾過手術を施行したマウスの尾静脈にグリーンマウスから単離した末梢単核細胞 (PBMCs-GFP) を静注し、8週後の結膜フラットマウントと結膜培養細胞の免疫染色。PBMCs-GFPの創部への移行とαSMAと共染するPBMCs-GFPの存在が確認できた。

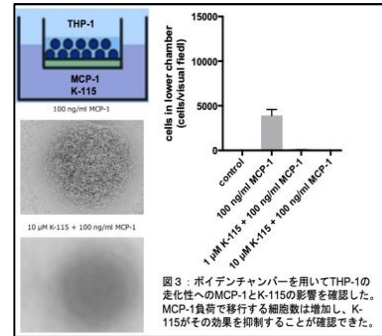
2) 末梢を循環する単核細胞の創部への移行や線維化に MCP-1 が関与する。

3日後の組織では MCP-1 負荷の有無に関わらず、組織への GFP 陽性細胞の移行が確認でき、SMA の発現は確認できなかった(図2-1)。8週後の組織では、MCP-1 負荷した組織で SMA と共染する GFP 陽性細胞が確認できた(図2-2)。この結果より、MCP-1 の PBMCs の移行への関与、さらには PBMCs の線維化進展への関与が示唆された。



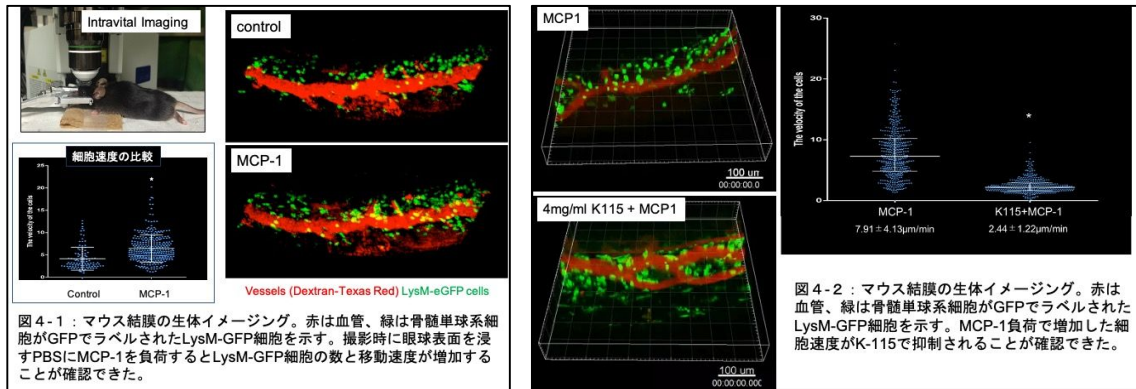
3) 単核細胞の移行に MCP-1 が関与し、その影響を K-115 が抑制する。

MCP-1 単独負荷で、THP-1 の走化性の増加が確認できた。さらに K-115 を同時負荷することで、MCP-1 によって増加した THP-1 の走化性は抑制されることが示された (図3)。



4) 炎症細胞の挙動に MCP-1 が関与し、その影響を K-115 が抑制することを、生体眼イメージングで確認した。

MCP-1 負荷とコントロールを比較した結果、MCP-1 で創部に移行する細胞が増加し、個々の細胞の移動速度も上昇していることが確認できた(図4-1)。さらに K-115 と MCP-1 を同時負荷することで、MCP-1 負荷で上昇した細胞速度が抑制されることが確認できた(図4-2)。



これらの実験より、緑内障濾過手術後の結膜組織の癒着化に fibrocyte を含む末梢循環単核細胞が関与していることが示唆され、末梢循環単核細胞の移行に緑内障濾過手術の予後不良因子と言われている MCP-1 が関わっていることも確認できた。さらに K-115 が、炎症性細胞の移行を抑制することも示され、K-115 の抗線維化効果の可能性も示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tsutsumi-Kuroda Utako, Kojima Sachi, Fukushima Ayako, Nakashima Kei-Ichi, Iwao Keiichiro, Tanihara Hidenobu, Inoue Toshihiro	4. 巻 19
2. 論文標題 Early bleb parameters as long-term prognostic factors for surgical success: a retrospective observational study using three-dimensional anterior-segment optical coherence tomography	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12886-019-1159-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tsutsumi-Kuroda U, Inoue T, Futakuchi A, Shobayashi K, Takahashi E, Kojima S, Inoue-Mochita M, Fujimoto T, Tanihara H.	4. 巻 170
2. 論文標題 Decreased MCP-1/CCR2 axis-mediated chemotactic effect of conjunctival fibroblasts after transdifferentiation into myofibroblasts.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 76-80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exer.2018.02.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Inoue-Mochita M, Inoue T, Kojima S, Futakuchi A, Fujimoto T, Sato-Ohira S, Tsutsumi U, Tanihara H.	4. 巻 293
2. 論文標題 Interleukin-6-mediated trans-signaling inhibits transforming growth factor- signaling in trabecular meshwork cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 10975-10984
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.003298	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Rei Sakata 1, Takeshi Yoshitomi 2 3, Makoto Araie 1 4, for Lower Normal Pressure Glaucoma Study Members in Japan Glaucoma Society	4. 巻 99
2. 論文標題 The occurrence of optic disc haemorrhage in primary open angle glaucoma eyes with lower normal pressure and its relating factors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Ophthalmologica	6. 最初と最後の頁 e28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/aos.14506	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小島祥、船蔵直史、川畑和幸、藤本智和、二口亜希子、谷原秀信、井上俊洋
2. 発表標題 マウス結膜生体イメージングによるK115のMCP-1誘発炎症抑制効果の検証
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島祥
2. 発表標題 結膜下組織における炎症性細胞のイメージング
3. 学会等名 第30回日本緑内障学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島祥
2. 発表標題 緑内障治療におけるレーザー線維柱帯形成術の有効性
3. 学会等名 第30回日本緑内障学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村健一、小島祥、井上俊洋
2. 発表標題 緑内障眼における前房水可溶性VEGF受容体濃度の比較
3. 学会等名 第30回日本緑内障学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田夏実、小島祥、中島圭一、井上俊洋
2. 発表標題 緑内障チューブシャント手術後の強膜パッチの厚みの解析
3. 学会等名 第30回日本緑内障学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島祥
2. 発表標題 Inflammatory cells in glaucoma filtering surgery
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島祥
2. 発表標題 前眼部OCTで考える緑内障手術
3. 学会等名 第31回日本緑内障学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島祥
2. 発表標題 緑内障レーザー治療のトピックス
3. 学会等名 第125回日本眼科眼科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------