

平成 22 年 5 月 7 日現在

研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2007 ～ 2009
課題番号：	19791298
研究課題名(和文)	ミュラー細胞におけるコラーゲン産生と特発性黄斑円孔の病態に関する基礎研究
研究課題名(英文)	Collagen production by Muller cell and pathophysiology of idiopathic macular hole formation
研究代表者	
	佐藤 孝樹 (Satou Takaki)
	大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：	20388284

研究成果の概要(和文)：キマーゼの培養家兔網膜ミュラー細胞のコラーゲン産生に対する影響につき検討した。培養液にエストロゲンのみ、キマーゼのみ、エストロゲンとキマーゼの双方を添加した場合において、V型コラーゲンの産生が最も多く、次いでI型コラーゲンの産生が認められた。培養液にエストロゲンやキマーゼを添加しなかった場合と比較して多くのコラーゲンを産生する傾向がみられたが、有意な差は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：I examined the influence of estrogen and chymase on collagen production by cultured retinal Muller cells of laboratory rabbits. V type collagen is produced much more than any other type of collagen by the cells when using culture solution including estrogen, chymase and both of them respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,800,000	540,000	3,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：ミュラー細胞、コラーゲン、エストロゲン、キマーゼ

1. 研究開始当初の背景

一般にヒト硝子体中に占めるコラーゲンのタイプは大半が2型である。しかし、特発性黄斑円孔に対する硝子体手術時に硝子体の性状が正常の場合と異なっている印象があり、その生化学的特徴を解明することは特発性黄斑円孔の発症メカニズムを解明する上

でも有意なことであると考えられる。また生物物理的な現象から、特発性黄斑円孔の発症には硝子体皮質の黄斑部網膜への牽引が関与していると考えられているが、その裏付けとなる分子生物学的なレベルにおけるその発症機序は、依然として不十分である。これまでに特発性黄斑円孔の病態に深く関わ

っていると考えられる蛋白質にはキマーゼが考えられているが、特発性黄斑円孔の硝子体中にはキマーゼ活性が高く、一方、キマーゼは幹細胞因子の前駆体を活性型に転換させる作用をもつことが報告されている。幹細胞因子は一般的に、幹細胞および自ら幹細胞因子の産生源になっている肥満細胞の増殖に影響を与えることが知られている。また、網膜の幹細胞としてはミュラー細胞が有力視されており、肥満細胞の分泌する幹細胞因子が黄斑部のミュラー細胞の分化に影響を及ぼしている可能性も考えられている。しかし現在のところ、特発性黄斑円孔の発症機序を明快に説明できる十分な知見は得られていない。

2. 研究の目的

(1) 特発性黄斑円孔の病態の解明には、まずその病態を有する患者の硝子体コラーゲンの型を検討する必要がある。また、感覚網膜の主要なグリア細胞であるミュラー細胞は、基底側に内境界膜を有し、先端側は視細胞の内外節の間に微細絨毛を出しており、網膜の全長にわたってその構造を保つ支持細胞として重要な役割を担っている。しかし、近年になってミュラー細胞は種々の生理的機能を有することが明らかになってきており、その一つに硝子体の主要成分である細胞外基質であるコラーゲンの産生源となっている可能性がある。そのため、ミュラー細胞がコラーゲンを産生しているかについての検討も同時に必要と考えられる。

(2) 一般的にコラーゲタンパクの検索には、免疫組織化学染色を施行したり、³H-proline の細胞内への取り込みによりコラーゲンを測定したりする方法が行われている。しかしこれらの方法は定性的なものであったり、アイソトープを用いた煩雑な方法であったりするため、定量的かつ簡便な測定

法の開発が望まれている。そこで本研究では、その目的のためにコラーゲンをマイクロプレート上で酵素免疫法により定量する方法をまず確立し、同法を用いることにより培養ミュラー細胞が産生するコラーゲンおよび硝子体手術で得られた硝子体ゲルに含まれるコラーゲンなど、一度に多くの検体を簡便に処理できる点が、本研究の特色及び独創的な点であると考えられる。

(3) 本研究では、まず安楽死させた成熟家兎より摘出した眼球から得られたミュラー細胞を培養し何代か継代を繰り返す。その後同細胞をマイクロプレート上に固相化し、酵素免疫法によりコラーゲン産生の有無について調べ、同時に産生されたコラーゲンの型別の構成比についても検討を加えた。また種々の硝子体手術時に得られた硝子体ゲルを凍結保存し、硝子体中に占めるコラーゲンの性状についても、解凍した硝子体ゲルをマイクロプレート上にコーティングし、酵素免疫法により同様の検討を行う。さらに特発性黄斑円孔の発症に関与しているとされている女性ホルモンのエストロゲンや蛋白分解酵素であるキマーゼを添加した培養液で培養したミュラー細胞においてコラーゲン産生に変化を生じるか否かについて調べる。われわれはすでに特発性黄斑円孔患者の硝子体中には女性ホルモンのエストロゲンであるエストラジオール濃度が高いことをすでに報告している。キマーゼ同様、エストロゲンにはコラーゲナーゼ活性をあげてコラーゲンを分解する作用のあることが報告されている。また、培養ヒトミュラー細胞には、レニン・アンギオテンシン系諸因子のうちレニン、アンギオテンシノーゲン、アンギオテンシン変換酵素、アンギオテンシンタイプ1受容体の mRNA の発現がみられた。またわれわれはサイトカインによる網膜ミュラー細胞

への刺激により、同細胞がインターロイキン-6を産生することを発見した。特発性黄斑円孔の発症に関与していると考えられる上記諸因子の相互関係をみることにより、その病態の解明に寄与できれば、同疾患における手術手技に依らない新たな内科的治療法の開発につながる可能性があり、臨床的に大変意義深いものになると考えられる。

3. 研究の方法

培養ミューラー細胞のコラーゲン産生の検討
成熟家兎を安楽死させ、眼球摘出後に半切片感覚網膜を剥離除去する。その後、0.1% トリプシン+0.2% ヒアルロニダーゼ+4% チキンシーラム液で45分インキュベートする。20%FBS+DMEM+Ham 培養液を適量添加した上でホモジネートし、ミューラー細胞を培養する。以下、継代を繰り返し、コンフルエントになった同細胞をマイクロプレート上に移し替え、一昼夜静置した同細胞を5%ホルマリン・リン酸緩衝液で固相化する。コラーゲン定量のための酵素免疫法では、一次抗体として抗ヒトコラーゲンウサギ抗体を固相化された細胞に反応させ、二次抗体にはアルカリホスファターゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体を使用する。発色基質としてパラニトロフェニルリン酸を使用し、反応後に生じた発色物質をマイクロプレート吸光度計で測定し、コラーゲンの定量を行い、使用する抗体および発色基質の至適な濃度、反応時間を吸光度計から得られた数値より検討し、各タイプの精製ヒトコラーゲンをマイクロプレート上にコーティングし、酵素免疫法を施行しコラーゲン量と吸光度値との関係を調べる（検量線の作製）。

細胞固相化酵素免疫法によりミューラー細胞が産生するコラーゲンの定量を、そのタイプ別に蛋白レベルで行い、さらにコラーゲンの遺伝子レベルでの発現をみるために、PE

Biosystems のプロトコールに従い、RT-PCRを行い各コラーゲンタイプ別に mRNA の発現を調べる。

病型の違いによる硝子体コラーゲンタイプの検討するために種々の網膜硝子体疾患の硝子体手術中に得られた硝子体ゲルを、クライオチューブに一旦凍結保存する。解凍した硝子体ゲルをマイクロプレートのウェルにコーティングし、同様の方法でコラーゲンの定量を行う。

使用する硝子体サンプルは単純糖尿病網膜症で糖尿病黄浮腫軽減のための硝子体切除をおこなったものを対照例とし、特発性黄斑円孔症例におけるものと比較検討する。

4. 研究成果

エストロゲン、キマーゼの培養家兎網膜ミューラー細胞のコラーゲン産生に対する影響について、次に示す方法で検討を行った。培養液にエストロゲン、キマーゼをそれぞれ添加した場合、またエストロゲンとキマーゼを添加した場合においてミューラー細胞のコラーゲン産生に対する影響について調べた。培養液にエストロゲンのみ、キマーゼのみ、エストロゲンとキマーゼの双方を添加した場合において、V型コラーゲンの産生が最も多く、次いでI型コラーゲンの産生が認められた。培養液にエストロゲンやキマーゼを添加しなかった場合と比較して多くのコラーゲンを産生する傾向がみられたが、有意な差は認められなかった。

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2件)

1.

佐藤孝樹、石崎英介、南 政宏、植木麻理、池田恒彦、森野以知朗
周辺部網膜血管腫に対し PDT を施行した von Hippel 病の 1 例
眼科、査読あり
51 巻 : 2009 1169-1173.

2.

Takaki Sato, Hidehiro Oku, Kazuhiro Tsuruma, Kozo Katsumura, Masamitsu Shimazawa, Hideaki Hara, Tetsuya Sugiyama, and Tsunehiko Ikeda
Effect of Hypoxia on Susceptibility of RGC-5 Cell to Nitric Oxide
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 査読有り
51: 2010 2575-2586.

[学会発表] (計1件)

1.

佐藤孝樹 中泉敦子 福本雅格 石崎英介
南 政宏 植木麻理 池田恒彦
レーザーSpeckルによる網脈絡膜循環測定を施行した中心性漿液性脈絡網膜症の 1 例
第 26 回日本眼循環学会 名古屋
2009. 12. 5

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○ 出願状況 (0件)

○ 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 孝樹 (Satou Takaki)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 20388284