

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09933

研究課題名（和文）ぶどう膜炎に対するエストロゲン受容体シグナルの抗炎症作用機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of anti-inflammatory mechanism of estrogen receptor signal for uveitis

研究代表者

隈上 武志（KUMAGAMI, Takeshi）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・客員研究員

研究者番号：70294329

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：ブタ脈絡膜血管内皮細胞と色素上皮細胞はおおむね再現性を持って培養できるようになった。周皮細胞の培養は、安定した結果を未だ得られていない。マウス肉腫180腫瘍細胞との培地前調整に問題があるのではないかと考え、培地を変更したり、ウシ血清の添加調整法を変えて培養を試みたが、未だ安定した結果を得られてない。ウシとブタとの違い、網膜血管と脈絡膜血管の違いによって、周皮細胞の採取方法および培養方法を調整し直す必要があることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回我々が参考にした細胞採取法および培養法はウシ網膜の血管内皮細胞と周皮細胞に対するものであった。本研究において、日本では比較的入手し易いブタを使用した。ぶどう膜炎に対する研究であったため、ぶどう膜炎の主座であると考えられている脈絡膜血管の内皮細胞および周皮細胞を得ることが必要であった。ウシとブタとの種の違い、網膜血管と脈絡膜血管の違いによって、細胞の採取法および培養法を変えないといけないことが分かり、今後の研究を始める上で参考になるだろう。

研究成果の概要（英文）：Porcine choroidal vascular endothelial cells and pigment epithelial cells can be cultured generally reproducibly. Culture of pericytes has not yet yielded consistent results. We thought that there might be a problem with the preconditioning of the culture medium with the mouse sarcoma 180 tumor cells, so we tried to change the culture medium and change the addition and adjustment method of bovine serum, but We still could not obtain stable results. It was found that the method of collecting and culturing pericytes needed to be readjusted due to differences between bovine and porcine, and between retinal and choroidal vessels.

研究分野：眼科学

キーワード：ぶどう膜炎 エストロゲン 抗炎症作用

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ベ-レット病や急性前部ぶどう膜炎などのぶどう膜炎では疫学的に発症の男女差が報告されている (Mishima, et al. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1979; 77: 225-79) (Ilknur, et al. *Am J Ophthalmol.* 2004; 138: 373-380)。エストロゲンは、性ホルモン的一种であるが、その働きは多岐に渡っており、特にぶどう膜炎における役割についてはあまり明らかにされていない。エストロゲンにはその受容体であるエストロゲンレセプターを介して作用する経路があり、エストロゲンレセプターが、眼組織にも存在する事が報告されている。1998年に Kobayashi らは、ウサギとラットの網膜に、エストロゲンレセプターの mRNA が存在する事を、免疫染色と、in situ hybridization 法にて証明した (Kobayashi, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998; 39: 2105-10)。また1999年には、Ogueta らが、人の網膜に、エストロゲンレセプターが存在する事を証明した (Ogueta, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40: 1906-11)。Miyamoto らの報告によるとラットぶどう膜炎モデルにおいてエストロゲン投与により細胞浸潤が有意に抑制され、E-selectin と IL6 の発現も有意に低下した (Miyamoto N, et al. *J Immunol.* 1999; 163: 374-9)。また Simoncini らはエストロゲンが受容体を介して直接 PI3-kinase 作用を持つという画期的な報告をした (Simoncini, et al. *Nature.* 2000; 407: 538-541)。さらに最近、エストラジオールは、初代ヒトマクロファージ中の let-7a との miR-125B の協調調節を介して NF- $\kappa$ B 活性化を抑制することを見出した (Murphy, et al. *J Immunol.* 2010; 184: 5029-5037)。加えて、Xing らは、エストロゲンは I $\kappa$ B のレベルを高め、エストロゲン受容体を介して炎症性遺伝子のプロモーターに結合し P65 をブロックすることにより NF- $\kappa$ B シグナル伝達を調節することを報告した (Xing, et al. *PLoS ONE.* 2012; 7: e36890)。これら二報の研究により、エストロゲンによる NF- $\kappa$ B シグナル伝達の阻害が、エストロゲンが顕著なプロ炎症性メディエーターの放出を減弱する作用の核心であることが示唆された (Nadkarni, et al. *Curr Opin Pharmacol.* 2013; 13: 576-581)。

しかし実際にエストロゲンを治療に応用するには女性化などの副作用が予測されるため、エストロゲンの抗炎症作用のメカニズムを解明し抗炎症作用に必要なシグナルだけを利用することが重要である。

### 2. 研究の目的

本研究における目的はエストロゲンのシグナル伝達システムを解明し、その中で抗炎症作用をもつ部分のみを利用しようとする点である。現在ぶどう膜炎の治療としては副腎皮質ステロイドの投与が主流であるが、それ以外の治療法選択の幅はあまりない。抗 TNF $\alpha$  抗体の全身投与が最近可能となったが適応が限られており、病態の分子メカニズム解明によるさらなる適応拡大が必要な状況である。これまでの報告からエストロゲンは生体内で生理的に強力な抗炎症作用を現わしていると考えられるため、その作用を利用できれば新たな治療ストラテジーとなると確信している。

また in situ hybridization 法を用いる事で、眼内のどの部分でレセプターが発現しているのかを確認する事が可能となる。ただし、エストロゲンレセプターあるいは関連レセプターの発現は、多くない事が予想されるので、in situ hybridization において最も良い設定を探し出すのは容易でないと思われる。また、in situ hybridization 法において、視覚による発色の比較は、時に困難な場合がある。そこで、我々の研究では、蛍光抗体を用いて、レーザー顕微鏡にて観察し、その発現強度を、数値的に比較検討しようとするものである。発現強度の比較的低い遺伝子の発現を in situ hybridization にて観察、確認するのは容易でないが、エストロゲンレセプターの眼組織中の役割を解明するためには非常に重要である。蛍光抗体の発現が、より明確に、観察、比較できる研究手法も同時に開発したい。

### 3. 研究の方法

細胞レベルで、エストロゲンレセプターの発現、機序を解明し、次に、動物レベルで、エストロゲンがモデル動物のぶどう膜炎を抑制できるか検討する。

#### (1)細胞レベルでの検討

ブタ脈絡膜血管内皮細胞、周皮細胞、色素上皮細胞を King GL の方法 (King GL, et al. *J Clin Invest.* 1985; 75: 1028-36) によりそれぞれ培養する。

Northern blot 解析、Real time quantitative PCR による遺伝子発現、LPS (リポ多糖、グラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分、エンドトキシンであり、ヒトや動物など他の生物の細胞に作用すると多彩な生物活性を発現する) の binding analysis、免疫沈降や Western blot による蛋白発現などの解析により各細胞における TLR4 受容体発現を検討する。

LPS が各細胞に及ぼす作用を検討する。培養上清に LPS を加え細胞の透過性亢進に及ぼす影響を boyden-chamber 法による電気抵抗およびアルブミン透過率等を測定し検討する。

E-selectin, ICAM-1 など細胞浸潤に関係する接着分子の発現量に対する LPS の影響を Real time quantitative PCR, Northern blot 解析や Western blot 解析により検討する。エストロ

ゲンと同時に負荷して同様に検討する。

これら一連の LPS、エストロゲンの作用がどのような細胞内シグナル伝達を介しているのかを検討する。IKKs や JNK、p38 などのストレス感受性シグナル、NF- $\kappa$ B や AP1 などの転写因子の活性化を検討し、その結果に基づき阻害実験を行い接着分子やサイトカインの発現が修飾されるかを検討する。

ブタ大動脈より血管内皮細胞と平滑筋細胞を培養し上記実験を行い微小血管細胞との比較検討を行う。これによりぶどう膜炎が眼局所に起こりやすい機序が解明される可能性がある。

#### (2)動物レベルでの検討

細胞レベルでの検討結果に基づき、LPS やエストロゲンの作用を動物モデルで確認したうえで、エストロゲンシグナルが実験的ぶどう膜炎を抑制できるか検討する。

エストロゲンシグナルで重要とわかったシグナル分子の dominant negative を導入するための adenovirus を大量培養、精製する。

上記 adenovirus とコントロールとなる lacZ 遺伝子を導入する adenovirus をラット硝子体に注入し時間経過を追って眼球を採取し組織学的検討を行う。各種細胞の局在を vWF(内皮細胞)、3G5 alphaSMA(smooth muscle cell actin)(周皮細胞)、サイトケラチン(色素上皮細胞)などの marker に対し免疫染色を行い、confocal microscope により検討する。(限上)

ラットに LPS で endotoxin-induced uveitis を誘発し前房内の浸潤細胞、前房内蛋白濃度を測定することにより治療効果を評価する。

エストロゲンシグナルで重要とわかったシグナル分子の過剰発現トランスジェニックマウスを作成し、LPS で endotoxin-induced uveitis を誘発し同様に検討し確認する。(限上、北岡)

蛍光抗体を用いて in situ hybridization を行い、レーザー顕微鏡にて観察する。発現強度を数値化出来るか検討する。

## 4. 研究成果

現在、細胞レベルでの検討を推進中であるが、新型コロナウイルス感染症の流行で行動制限を余儀なくされ、進行が遅れた。これまでは、ブタ脈絡膜血管内皮細胞、周皮細胞、色素上皮細胞をそれぞれ培養している途中であった。内皮細胞と色素上皮細胞の培養は、おおむね再現性を持って培養できるようになった。周皮細胞の培養が再現性に乏しく原因を検索した。マウス肉腫 180 腫瘍細胞との培地前調整に問題があるのではないかと考え、Coon's modified Ham's F-12M tissue culture medium や Dulbecco's modified Eagle's medium、Medium 199 等へのウシ血清の添加調整法を変えて培養を試みているところであるが、未だ安定した結果を得られてない。ウシとブタとの違い、網膜血管と脈絡膜血管の違いによって、周皮細胞の採取方法および培養方法を調整し直す必要があることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamada K, Oishi A, Kusano M, Kinoshita H, Tsuiki E, Kitaoka T	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Effect of inverted internal limiting membrane flap technique on small-medium size macular holes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 731
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-04739-x	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 Yuki Hirata, Akio Oishi, Yuki Maekawa, Eiko Tsuiki, Akira Machida, Junko Kurihara, Takashi Kitaoka	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Recurrence of neovascular age-related macular degeneration after cessation of treat and extend regime	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 14768
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-19062-2	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 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 河野良太、隈上武志、北岡 隆、田畑和宏、岡野真士
2. 発表標題 診断・治療に苦慮した多発虹彩結節を伴った外傷性閉塞隅角緑内障の1例
3. 学会等名 第91回九州眼科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上隆哉、伊藤理佐、田代紘子、久保田 伸、岸川泰宏、隈上武志、北岡 隆
2. 発表標題 アームドTM緑内障バルブ移植後に複視をきたした1例
3. 学会等名 第44回日本眼科手術学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前川有紀、佐藤健人、松本牧子、築城英子、隈上武志、北岡 隆
2. 発表標題 血管新生緑内障における硝子体切除による予後への影響
3. 学会等名 第124回日本眼科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤健人、隈上武志、岡 朱莉、築城英子、北岡 隆
2. 発表標題 線維柱帯切除後に脈絡膜剥離と漿液性網膜剥離を来した1例
3. 学会等名 第90回九州眼科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河野良太、ヤッセルヘルミーモハメド、前川有紀、米田愛、木下博文、山田義久、築城英子、藤川垂月茶、隈上武志、北岡隆
2. 発表標題 黄斑前膜において内境界膜剥離の有無が術後網膜に及ぼす影響の検討
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 Kono Ryota, Yasser Helmy Mohamed, Yuki Maekawa, Ai Yoneda, Hirofumi Kinoshita, Yoshihisa Yamada, Eiko Tsuiki, Azusa Fujikawa, Takeshi Kumagami, Takashi Kitaoka
2. 発表標題 Effect and risk of internal limiting membrane peeling for idiopathic epiretinal membrane.
3. 学会等名 ARV02019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤健人、前川有紀、隈上武志、北岡隆
2. 発表標題 当院で3年間に行ったバルベルト緑内障手術の長期データ報告
3. 学会等名 第89回九州眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木下博文、築城英子、隈上武志、北岡隆
2. 発表標題 初回裂孔原性網膜剥離手術時における硝子体皮質処理の有無による治療成績の検討
3. 学会等名 第58回日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2019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
研究分担者	築城 英子  (TSUIKI Eiko)  (30363493)	長崎大学・病院(医学系)・講師   (17301)	
研究分担者	木下 博文  (KINOSHITA Hirofumi)  (50530466)	長崎大学・病院(医学系)・助教   (17301)	削除:2020年5月14日
研究分担者	松本 牧子  (MATSUMOTO Maki ko)  (70437903)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教   (17301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	北岡 隆  (KITAOKA Takashi)  (80234235)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授     (17301)	

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