

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16899

研究課題名(和文) 緑内障術後創傷治癒過程におけるMCP-1/CCR2の役割の解明

研究課題名(英文) Analysis of the role of MCP-1/CCR2 in the wound healing process after glaucoma surgery

研究代表者

小島 祥 (Kojima, Sachi)

熊本大学・病院・講師

研究者番号：80632661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障濾過手術のリスクファクターであるMCP-1負荷で結膜下組織中の炎症細胞(LysM陽性細胞)が活発化することを生体イメージングで確認した。その細胞の活性化をROCK阻害薬が抑制した。MCP-1負荷で遊走活性をもつ細胞の系譜解析にシングルセルRNAシーケンスを行い、controlとMCP-1負荷で細胞集団に差異がないこと、手術モデルではマクロファージや線維芽細胞が優位であること、LysM陽性細胞はマクロファージ優位であることが明らかとなった。以上より、結膜創部におけるマクロファージの関与、またMCP-1がマクロファージの活性化に関与し、それがROCK阻害薬で抑制される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障は日本において中途失明の第一位となっている進行性の視神経症であり、現在のところ眼圧下降のみが唯一エビデンスのある治療法である。薬物療法やレーザー治療で十分な効果が得られない場合は手術療法を行う。緑内障濾過手術は眼圧下降効果に優れた手術であるが、術創に働く創傷治癒に術後成績に大きく関わる。房水内MCP-1は緑内障濾過手術のリスクファクターである。本研究成果による、濾過手術後の創傷治癒過程におけるMCP-1の役割や、その抑制過程を明らかにすることは、緑内障濾過手術後の創傷治癒機序解明の一助となり、最終的には緑内障による失明を減らすことに寄与することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Intravital imaging confirmed that MCP-1 loading, a risk factor for glaucoma filtration surgery, activates inflammatory cells (LysM-positive cells) in the subconjunctival tissue. A ROCK inhibitor inhibited the activation of these cells. Single-cell RNA sequencing was performed to analyze the lineage of cells with migratory activity following MCP-1 loading, revealing that there was no difference in the cell population between the control and MCP-1 loading, and that macrophages and fibroblasts were predominant in the surgical model. Furthermore, macrophages were predominant among LysM-positive cells observed by intravital imaging. These results suggest that macrophages may be involved in conjunctival wounds, and that MCP-1 may be involved in macrophage activation, which may be inhibited by a ROCK inhibitor.

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 MCP-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

緑内障は日本において中途失明の第一位となっている進行性の視神経症であり、現在のところ眼圧下降のみが唯一エビデンスのある治療法である。まずは薬物治療やレーザー治療で眼圧下降を試みるが、効果不十分な場合は手術加療を行う。緑内障濾過手術は房水を前房から結膜下に直接流す流出路を作成する手術であり、眼圧下降効果に優れている。しかし創部に働く過剰な創傷治癒の影響により組織の線維化が進展し、手術で作成した濾過胞が機能不全となる症例が一定の割合で存在する。我々の研究グループはこれまでに房水内 monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 が緑内障濾過手術の代表であるトラベキュlectミーのリスクファクターであることを明らかにした (Inoue, et al. Clin Exp Ophthalmol. 2014)。さらに、房水内 MCP-1 がトラベキュlectミー術後の房水流出路の閉塞に影響していることを見出した (Kojima, et al. JAMA Ophthalmol. 2015)。MCP-1 は、単球やリンパ球の遊走活性で知られるケモカインの一つであるが、その受容体である CCR2 を介して線維芽細胞の分化や細胞増殖にも関わることが報告されている (Dobaczewski M, et al. Front Biosci (Schol Ed). 2009)。これらの背景より、眼組織における創傷治癒機序における MCP-1/CCR2 の関与のメカニズムの解明は緑内障手術成績向上に寄与する研究であると考えた。

2. 研究の目的

緑内障濾過手術後の創傷治癒過程における MCP-1 の分子レベルでの役割を明らかにし、線維化抑制に繋がる新しい理解を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

1) 生体イメージングによる MCP-1 の細胞遊走への影響の検証

我々が確立した 2 光子顕微鏡による 4 次元イメージングの方法を用いて生体イメージングをおこなった (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。

2) マウス眼表面における炎症・創傷に関わる細胞集団の特定

免疫染色による LysM-eGFP 陽性細胞の特定

生体眼イメージングで使用した LysM-eGFP マウスの結膜/結膜下細胞を単離培養し、単球系のマーカーである F4/80 と CD11b の免疫染色を行なった。

シングルセル RNA シークエンス解析による細胞集団の特定

実験動物として C57BL/6 (野生型マウス) を使用し、定常状態 (コントロール)、創傷モデルとして濾過手術を施行したマウス、房水負荷モデルとして濾過手術のリスクファクターである MCP-1 (Kojima S, et al. JAMA Ophthalmol. 2015) を点眼したマウスを準備した。これらの

マウスの眼球から単離した結膜/結膜下組織細胞をシングルセル化し、クロミウムシステム(10x genomics)でライブラリーを作製し、RNA シークエンスをおこなった。シークエンスで得られたUMAP 解析にてクラスター分離を行い、バイオインプロットにて遺伝子発現を評価した。

3) 房水内に存在する生理活性物質が線維芽細胞に与える影響の細胞生物学的検証

ヒト線維芽細胞を、緑内障濾過手術のリスクファクターである血管新生緑内障の房水内で上昇している VEGF(121, 165)で 24 時間刺激し、上清中の生理活性物質 (MCP-1, VEGF, TGF- β , IL-6, IL-8, IL-1, MMP1, TIMP1, Fibronectin, SMA) の発現量を qPCR で測定した。

4. 研究成果

1) マウス結膜/結膜下組織の炎症細胞の挙動に MCP-1 が影響する。

マウス眼球に MCP-1 を負荷した状態で、結膜/結膜下組織中の LysM 陽性細胞の挙動を 2 光子顕微鏡による生体イメージングで観察した結果、定常状態と比較して MCP-1 負荷状態では LysM 陽性細胞の動く速度が上昇することが確認できた (図 1)。

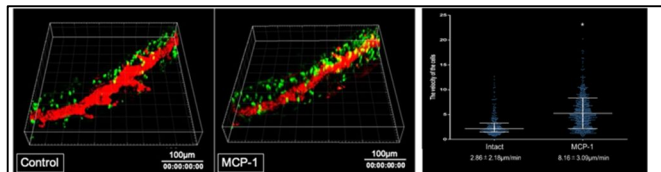


図1：マウス結膜/結膜下組織の生体イメージング
定常状態とMCP-1負荷で炎症性細胞 (LysM陽性細胞：緑) の動きを4次元的に観察した。MCP-1負荷で細胞数が増え、動きが速くなることが確認できた。

2) MCP-1 負荷による炎症細胞の活動を K-115 が抑制する。

マウス眼球を MCP-1 と同時に ROCK 阻害薬である K115 を負荷することで、LysM 陽性細胞の活動性が抑制されることが生体イメージングで確認できた。以前の研究計画で確認した in vitro における K115 の単球系細胞 (THP-1) の走化性の抑制効果と合わせて、MCP-1 負荷による炎症細胞の活動性を K115 が抑制することが示唆される (図 2、図 3)。

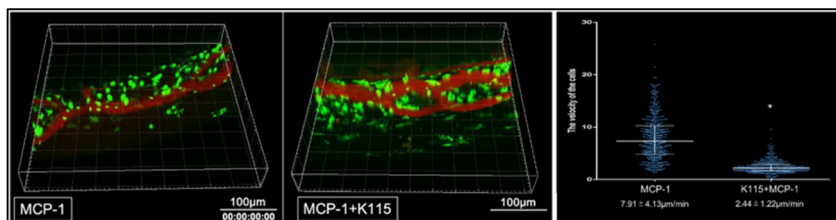


図2：マウス結膜/結膜下組織の生体イメージング
MCP-1負荷で挙動が活発となった炎症性細胞 (LysM陽性細胞：緑) の動きが K115負荷により抑制されることが確認できた。

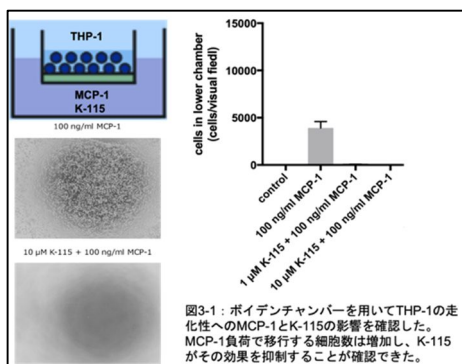


図3-1：ボイデンチャンパーを用いてTHP-1の走化性へのMCP-1とK-115の影響を確認した。MCP-1負荷で移行する細胞数は増加し、K-115がその効果を抑制することが確認できた。

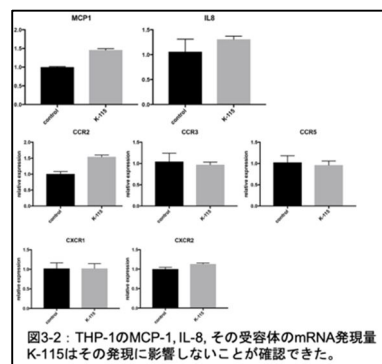


図3-2：THP-1のMCP-1, IL-8, その受容体のmRNA発現量 K-115はその発現に影響しないことが確認できた。

3) 生体眼イメージングで挙動をみた LysM 陽性細胞はマクロファージ優位な細胞である。

免疫染色で GFP と単球系のマーカー（F4/80 及び CD11b）の共染が確認された（図4）。また LysM 陽性マウスの結膜/結膜下組織をシングルセル RNA シークエンス解析した結果、LysM 陽性細胞はマクロファージ優位な細胞集団であることが明らかとなった（図5）。これらの結果から生体イメージングで観察した LysM-eGFP 陽性細胞がマクロファージ優位な細胞であることが示唆される。

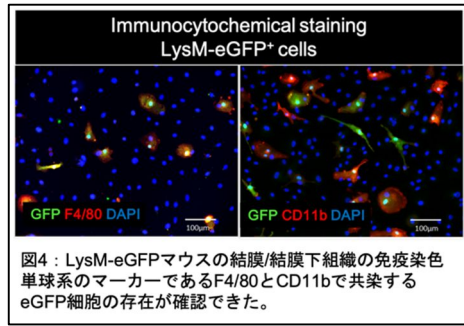


図4：LysM-eGFPマウスの結膜/結膜下組織の免疫染色。単球系のマーカーであるF4/80とCD11bで共染するeGFP細胞の存在が確認できた。

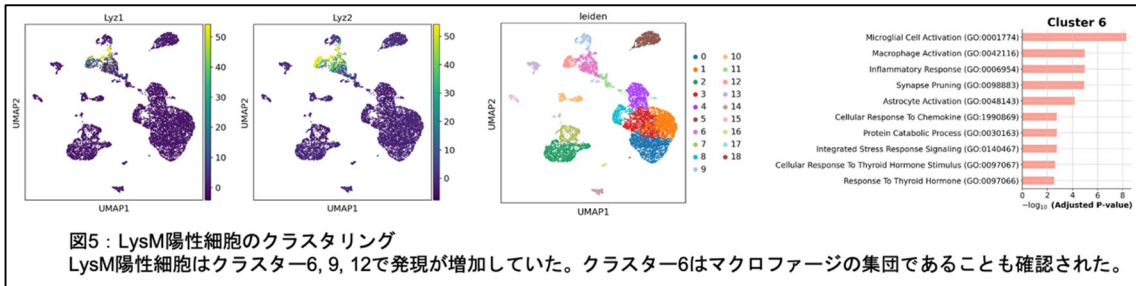


図5：LysM陽性細胞のクラスタリング。LysM陽性細胞はクラスター6, 9, 12で発現が増加していた。クラスター6はマクロファージの集団であることも確認された。

4) ヒト線維芽細胞は VEGF 刺激により MCP-1 を産生する。

培養ヒト線維芽細胞を VEGF (125, 165) で 24 時間刺激し、その上清中の生理活性物質の発現量を qPCR で測定した結果、MCP-1, TGF- β 1, IL-1 β , IL-8, MMP の濃度依存的な増加が確認された（図6）。VEGF は緑内障濾過手術のリスクファクターである血管新生緑内障の房水内で著明に上昇しており、血管新生緑内障の術後創傷治癒における MCP-1 の関与が示唆される。

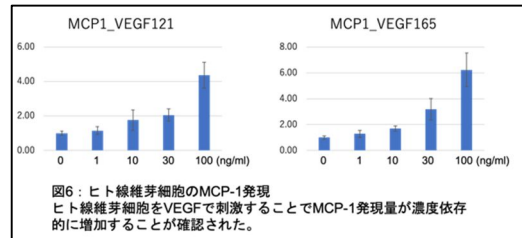


図6：ヒト線維芽細胞のMCP-1発現。ヒト線維芽細胞をVEGFで刺激することでMCP-1発現量が濃度依存的に増加することが確認された。

以上の結果より、結膜/結膜下組織における炎症・創傷においてマクロファージが関与している可能性、また緑内障濾過手術のリスクファクターである MCP-1 がマクロファージの活性化に関与し、それが ROCK 阻害薬で抑制される可能性が示唆された。この知見は緑内障濾過手術後の創傷治癒機序解明の一助となり、緑内障治療成績向上に寄与することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Iraha Satoshi, Takihara Yuji, Urahashi Yui, Watanabe Takahiro, Nakamura Kenichi, Urahashi Mai, Watanabe-Kitamura Fumika, Nakashima Kei-Ichi, Takahashi Eri, Kojima Sachi, Tanihara Hidenobu, Inoue Toshihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Factors associated with the surgical outcomes of Baerveldt glaucoma implant for open-angle glaucoma, an age-related eye disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-04570-4	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 Iwasaki Kentaro, Kojima Sachi, Wajima Ryotaro, Okazaki Tomoyuki, Yokoyama Yu, Inoue Toshihiro, Higashide Tomomi, Miki Atsuya, Nakazawa Toru, Inatani Masaru	4. 巻 5
2. 論文標題 Comparing Surgical Outcomes in Neovascular Glaucoma between Tube and Trabeculectomy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ophthalmology Glaucoma	6. 最初と最後の頁 672 ~ 680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ogla.2022.05.003	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 Nakamura Kenichi, Kojima Sachi, Inoue-Mochita Miyuki, Tanihara Hidenobu, Inoue Toshihiro	4. 巻 223
2. 論文標題 Elevated soluble vascular endothelial growth factor receptor levels in aqueous humor from patients with different types of glaucoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 109204 ~ 109204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2022.109204	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murata Natsumi, Takahashi Eri, Saruwatari Junji, Kojima Sachi, Inoue Toshihiro	4. 巻 261
2. 論文標題 Outcomes and risk factors for ab interno trabeculotomy with a Kahook Dual Blade	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 503 ~ 511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-022-05799-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Manako Kiyofumi, Takahashi Eri, Saruwatari Junji, Matsumura Tomoyo, Kojima Sachi, Inoue Toshihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Risk factors for Baerveldt glaucoma drainage implantation for uveitic glaucoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-29244-1	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 Rei Sakata, Takeshi Yoshitomi, Makoto Araie, 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 2021年
3. 雑誌名 Acta Ophthalmologica	6. 最初と最後の頁 e28-e35
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakata Rei, Araie Makoto, Yoshitomi Takeshi; for lower normal pressure glaucoma study members in Japan Glaucoma Society.	4. 巻 38
2. 論文標題 Factors associated with visual field or structure progression occurring first in a prospective study on patients with untreated open-angle glaucoma with normal intraocular pressure	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Eye	6. 最初と最後の頁 737 ~ 744
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41433-023-02766-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Irie Anna, Nakashima Kei-Ichi, Inoue Toshihiro, Kojima Sachi, Takihara Yuji, Takahashi Eri	4. 巻 33
2. 論文標題 Trabeculotomy Using the Kahook Dual Blade for Exfoliation Glaucoma and Primary Open Angle Glaucoma: Comparison of Outcomes According to Incision Range	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Glaucoma	6. 最初と最後の頁 270 ~ 276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IJG.0000000000002323	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小島祥
2. 発表標題 前眼部OCTによる緑内障術後評価
3. 学会等名 第126回日本眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村健一、小島祥、瀧原祐史、井上俊洋
2. 発表標題 血管新生緑内障に対するバルベルト緑内障インプラント手術成績への線維柱帯切除術既往の影響
3. 学会等名 第33回日本緑内障学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小島摂、小島祥、佐藤一徳、浦橋舞衣、瀧原祐史、中島圭一、高橋枝里、井上俊洋
2. 発表標題 同一薬剤カテゴリーにおけるプリモニジン酒石酸塩・プリンゾラミド配合懸濁性点眼液切り替え成績
3. 学会等名 第38回九州緑内障カンファレンス
4. 発表年 2022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回日本眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 幸野理久、小島祥、佐藤一徳、浦橋舞衣、瀧原祐史、中島圭一、高橋枝里、井上俊洋
2. 発表標題 同一薬剤カテゴリーにおけるプリモニジン酒石酸塩・プリンゾラミド配合懸濁性点眼液切り替え成績
3. 学会等名 第37回九州緑内障カンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤一徳、小島祥、小田原敦子、瀧原祐史、中島圭一、渡邊隆弘、浦橋舞衣、小島撰、高橋枝里、井上俊洋
2. 発表標題 当院におけるパターン स्क्यानレーザー線維柱帯形成術の治療成績
3. 学会等名 第31回緑内障学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島祥
2. 発表標題 隅角検査を極める
3. 学会等名 第34回緑内障学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 諸岡研人、小島祥、井上俊洋
2. 発表標題 毛様溝挿入した緑内障インプラントのチューブ内に硝子体嵌頓をきたした落屑緑内障
3. 学会等名 第39回九州緑内障カンファレンス
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小島祥
2. 発表標題 濾過手術アップデート
3. 学会等名 第128回日本眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Sachi Kojima, Kenichi Nakamura, Yuji Takihara, Toshihiro Inoue
2. 発表標題 Treatment outcomes of Baerveldt glaucoma implantation in patients with neovascular glaucoma with versus without a history of trabeculectomy
3. 学会等名 10th World Glaucoma Congress（国際学会）
4. 発表年 2023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