

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592613

研究課題名(和文)マクロファージを標的とした新しい眼炎症疾患に対する治療

研究課題名(英文)Macrophage targeted new treatment for ocular inflammation

研究代表者

丸山 和一 (Maruyama, Kazuichi)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：10433244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：C57BL/6, ICRマウスの腹腔内より採取したマクロファージを培養し、低分子化合物にて刺激をしたところ、マクロファージからの炎症性サイトカインの産生が抑制することが出来た。特にマクロファージをリポポリサッカライド(LPS)とIFN- $\gamma$ にて刺激を行った細胞群のTNF- $\alpha$ 産生を劇的に抑制することが出来た。本化合物は局所での投与を目標として研究を開始したため、マウス角膜縫合モデルに対して結膜投与したところ、投与後翌日から角膜の浮腫が出現し、その後眼内炎症がコントロールと比較して悪化したため腹腔内投与に変更した。その結果わずかながらコントロール群と比較してリンパ管新生は抑制された。

研究成果の概要(英文)：The small weight chemical compound could suppress inflamed cytokine from C57/BL6 or ICR mice macrophage that was stimulated with LPS and interferon gamma. Especially, TNF- $\alpha$  secretion from macrophage that was stimulated with LPS and interferon gamma was dramatically suppress by this small weight chemical compound. The purpose of this experiment, we would like to use this small weight chemical compound as local treatment such as eye drop. However, this small weight chemical compound induced inflammation in the eye, especially corneal epithelium. In order to chemical induced local inflammation, we decided to use this small weight chemical compound as systemic administration. As a result, this small weight chemical compound could suppress lymphangiogenesis in corneal suture placement experiment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：アポトーシス マクロファージ リンパ管 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

炎症巣でのリンパ管新生にはマクロファージが深く係る

炎症病態におけるリンパ管新生は、胎生期と同様に血管より分岐すると考えられていた。申請者らは、炎症期リンパ管新生には炎症細胞である M0 が直接寄与するという、独創的な発見をした。リンパ管は胎生期においては、静脈から分化することが報告されていたが、成人期、特に炎症期のリンパ管新生の機構は解明されていなかった。申請者らは、M0 にリンパ管内皮細胞特異的マーカーが発現していること、さらには無リンパ管組織である角膜を用い M0 がリンパ管内皮に直接的に寄与し、リンパ管新生が誘導されることを証明した (Maruyama K, J. Clin Invest 2005)。

マクロファージ機能の人為的制御でリンパ管新生が抑制される

申請者らは、M0 内のチオールレドックス均衡に着目した。酸化型グルタチオンを持つ M0 (酸化型 M0) は、抗炎症作用を発揮し角膜移植における拒絶反応を抑制することが可能であることを証明した (Yamada J. Invest Ophthal Vis Sci 2004)。申請者らは酸化型 M0 を誘導するために低分子化合物 NACOMe2 を用いることでマウス角膜リンパ管新生モデルにおいてリンパ管新生を抑制することに成功した。さらには M0 からの炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  の産生抑制にも成功した (Fukumoto A, Invest Ophthal Vis Sci 2010)。

申請者らは前述した NACOMe2 以外にも種々の体内生理活性物質・中和抗体などを用いリンパ管新生を抑制できることを角膜リンパ管新生モデルで確認している (Cursiefen C, Invest Ophthal Vis Sci 2004, 未発表データを含む)。これらは M0 の炎症応答を抑制することで本作用を示すことも明らかにしている。

リンパ管新生制御の医学的ニーズは高い

リンパ管は体内で大きく分けて2つの機能を持っていることが知られる。一つは細胞・組織から排出された老廃物を集め、静脈系に戻す機能、もう一つは免疫反応を誘導するために必要な抗原提示細胞の局所リンパ節への輸送である。悪性腫瘍はこの輸送経路を使用することで、各リンパ節・多臓器へ移動し生命予後にかかわる転移形質の特性を獲得する。このため、悪性腫瘍の転移予防にリンパ管新生抑制は必須の治療であると考えられる。また、臓器移植後の拒絶反応抑制や炎症の遷延化にも深くかかわる。薬剤としてステロイド剤や免疫抑制剤、悪性腫瘍の所属リンパ節転移・他臓器転移には手術療法・抗がん剤などが使用されているが、種々の副作用

が懸念される。

## 2. 研究の目的

申請者は、マクロファージに対し斬新な作用特性を有する新規低分子化合物を使用し、角膜リンパ管新生抑制を本研究期間内の目標とする。

(1) M0 細胞群内リンパ管内皮前駆細胞群の抽出 M0 のどのフェノタイプがリンパ管内皮細胞の特徴をもつかは同定されていない。炎症巣の M0 はリンパ管内皮特異的マーカーを発現するため本マーカーを発現している M0 を抽出することを目標とする。本申請者らは特殊な培養環境下 (培養液; EGM, 培養皿; fibronectin coating dish) にて M0 のリンパ管内皮特異的マーカーが高発現することを発見している。

本予備知見をもとにこれらの細胞群よりリンパ管内皮前駆細胞群を高率に抽出する技術を創出する。

(2) M0 に対する低分子化合物の選択・効果判定

申請者は既に M0 に対し独創的な作用特性を有する新規低分子化合物 (phenyl-pyrazolopyridine-dione 誘導体 GRA12228, GRA1230 など) ならびに骨格構造類似で活性を有しない化合物 (GRA1002) を使用することで、リンパ管新生に関与する炎症反応の抑制・さらにはリンパ管内皮形成に係る M0 細胞自体のアポトーシスを誘導するかどうか判定する。本化合物は分子量 180 ~ 260 ダルトンの低分子化合物であり、抗体であるインフリキシマブなどの生物学的製剤での治療よりも局所作用性、副作用の軽減などが期待される。本低分子化合物はすでに M0 培養環境に添加することで、M0 からの TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカイン産生抑制、さらには活性化 M0 の選択的アポトーシス誘導が可能であることを予備的に確認している。本薬剤を使用し抽出された細胞群に添加し、その効果判定を行う。この中で最も効果のある薬剤を総合的に判断し選択する。選択した薬剤は後述する研究に応用する。

(3) Ex vivo, in vivo における低分子化合物の効果判定

(2) で選択した化合物を用い、マウス角膜にてリンパ管新生への効果判定を行う (Maruyama K, J. Clin Invest 2005, Cursiefen C, Invest Ophthal Vis Sci 2004)。炎症巣では活性化 M0 がリンパ管内皮に形態

変化する。リンパ管誘導された角膜を培養環境下に置換し GRA 化合物を添加し、その効果判定を施行する。

### 3. 研究の方法

(1)M0 をマウス腹腔内より採取・培養し、リンパ管内皮特異的のマーカを発現する亜集団を確立する。

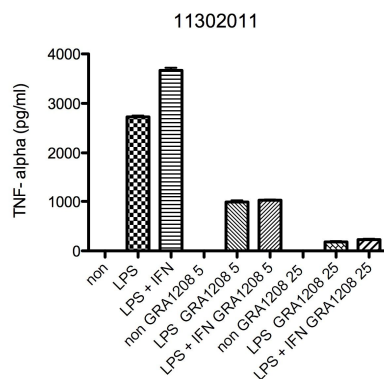
(2)培養環境下にある M0 に炎症刺激を与え、その後種々の新規開発薬剤を添加し、M0 の炎症反応抑制・アポトーシスを誘導できるかどうかを検討する。本実験で最も効果のあった化合物を以降の研究に使用する。

ex vivo, in vivo における M0 に対する化合物の効果を検討する。用いるモデルはマウス角膜縫合モデルを用いる。モデルにおいて化合物の効果を確認するため、組織を採取し、組織像・サイトカイン産生などを施行する。

### 4. 研究成果

C57BL/6, ICR マウスの腹腔内より採取したマクロファージを培養し、低分子化合物にて刺激をしたところ、マクロファージからの炎症性サイトカインの産生が抑制することが出来た。特にマクロファージをリポポリサッカライド (LPS) と IFN- $\gamma$  にて刺激を行った

細胞群の TNF- $\alpha$  産生を劇的に抑制することが出来た(図)



しかし本化合物は局所での投与を目

標として研究を開始したため、マウス角膜縫合モデルに対して結膜投与したところ、投与後翌日から角膜の浮腫が出現し、その後眼内炎症がコントロールと比較して悪化したため腹腔内投与に変更した。その結果わずかであるがコントロール群と比較してリンパ管新生は抑制された。

### 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 23 件)

1. Hagura A, Asai J, Maruyama K, Takenaka H, Kinoshita S, Katoh N. The VEGF-C/VEGFR3 signaling pathway contributes to resolving chronic skin inflammation by activating lymphatic vessel function. *J Dermatol Sci.* 73(2):135-41, 2014 Feb 73(2):1135-41. 査読有
2. Nakamura T, Hamuro J, Takaishi M, Simmons S, Maruyama K, Zaffalon A,

Bentley AJ, Kawasaki S, Nagata-Takaoka M, Fullwood NJ, Itami S, Sano S, Ishii M, Barrandon Y, Kinoshita S. LRIG1 inhibits STAT3-dependent inflammation to maintain corneal homeostasis. *J Clin Invest.* 124(1):385-97, 2014 Jan 2. 査読有

3. Nagata K, Maruyama K, Sugita S, Fukuchi U, Terada Y, Ishizuka A, Nakazawa T, Mochizuki M, Kinoshita S. Age Differences in Sarcoidosis Patients with Posterior Ocular Lesions. *Ocul Immunol Inflamm.* 2013 Dec 19. [Epub ahead of print] 査読有
4. Himori N, Yamamoto K, Maruyama K, Ryu M, Taguchi K, Yamamoto M, Nakazawa T. Critical role of Nrf2 in oxidative stress-induced retinal ganglion cell death. *J Neurochem.* 2013 Dec 127(5):669-80. 査読有
5. Shiga Y, Omodaka K, Kunikata H, Ryu M, Yokoyama Y, Tsuda S, Asano T, Maekawa S, Maruyama K, Nakazawa T. Waveform analysis of ocular blood flow and the early detection of normal tension glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Nov 21 54(12):7699-706. 査読有
6. Maruyama K, Nagata K, Kojima K, Inaba T, Sugita S, Mochizuki M, Kinoshita S. Intraocular Invasion of Adult T-Cell Leukemia Cells without Systemic Symptoms after Cataract Surgery. *Case Report in Ophthalmology.* Nov 16. 4(3):252-6, 2013 査読有
7. Takahashi M, Omodaka K, Maruyama K, Yamaguchi T, Himori N, Shiga Y, Ryu M, Kunikata H, Nakazawa T. Simulated Visual Field Produced from Macular RNFLT Data in Patient with Glaucoma. *Current Eye Research.* 2013 Nov 38(11):1133-41 査読有
8. Sugita S, Ogawa M, Shimizu N, Morio T, Ohguro N, Nakai K, Maruyama K, Nagata K, Takeda A, Usui Y, Sonoda KH, Takeuchi M, Mochizuki M. Use of a Comprehensive Polymerase Chain Reaction System for Diagnosis of Ocular Infectious Diseases. *Ophthalmology.* 2013 Sep 120(9):1761-8 査読有
9. Omodaka K, Kunimatsu S, Ryu M, Shiga Y, Tsuda S, Yokoyama Y, Watanabe R, Takahashi H, Maruyama K, Kunikata H, Nakazawa T. Development of a new strategy of visual field test for macular dysfunction in patients with open angle glaucoma. 2013 Sep *Jpn J Ophthalmol.* 57(5):457-62, 査読有
10. Bock F, Maruyama K, Regenfuss B, Hos

- D, Steven P, Heindl LM, Cursiefen C. Novel anti(lymph)angiogenic treatment strategies for corneal and ocular surface diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2013 May 34:89-112 査読有
11. Katsuta H, Fukushima Y, Maruyama K, Hirashima M, Nishida K, Nishikawa S, Uemura A. EphrinB2-EphB4 Signals Regulate Formation and Maintenance of Funnel-Shaped Valves in Corneal Lymphatic Capillaries. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Jun 12;54(6):4102-8. 査読有
  12. Iwasaki T, Takeda Y, Maruyama K, Yokosaki Y, Tsujino K, Tetsumoto S, Kuhara H, Nakanishi K, Otani Y, Jin Y, Kohmo S, Hirata H, Takahashi R, Suzuki M, Inoue K, Nagatomo I, Goya S, Kijima T, Kumagai T, Tachibana I, Kawase I, Kumanogoh A. Deletion of Tetraspanin CD9 Diminishes Lymphangiogenesis in Vivo and in Vitro. *J Biol Chem.* 2013 Jan 25;288(4):2118-31 査読有
  13. Matsumiya W, Kusuhara S, Hayashibe K, Maruyama K, Kusuhara H, Tagami M, Schuetz JD, Negi A. Forskolin Modifies Retinal Vascular Development in Mrp4-knockout Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Dec 7 53(13):8029-35 査読有
  14. Asai J, Takenaka H, Hirakawa S, Sakabe J, Hagura A, Kishimoto S, Maruyama K, Kajiya K, Kinoshita S, Tokura Y, Katoh N. Topical simvastatin accelerates wound healing in diabetes by enhancing angiogenesis and lymphangiogenesis. *Am J Pathol.* 2012 Dec;181(6):2217-24. 査読有
  15. Kojima K, Maruyama K, Inaba T, Nagata K, Yasuhara T, Yoneda K, Sugita S, Mochizuki M, Kinoshita S. The CD4/CD8 ratio in vitreous fluid is of high diagnostic value in sarcoidosis. *Ophthalmology.* 2012 Nov 119(11):2386-92 査読有
  16. Imai A, Sugita S, Kawazoe Y, Horie S, Yamada Y, Keino H, Maruyama K, Mochizuki M. Immunosuppressive properties of regulatory T cells generated by incubation of peripheral blood mononuclear cells with supernatants of human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Oct 23;53(11):7299-309. 査読有
  17. Inaba T, Nagata K, Maruyama K. Primary intraocular large B cell lymphoma with plasmacytic differentiation. *Int J Hematol.* 2012 Oct 96(4):399-400. 査読有
  18. Maruyama K, Nakazawa T, Cursiefen C, Maruyama Y, Rooijen N, D'Amore P, Kinoshita S. The maintenance of lymphatic vessel in the cornea is dependent on the presence of macrophage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 May 31;53(6):3145-53 査読有
  19. Nagata K, Maruyama K, Uno K, Shinomiya K, Yoneda K, Hamuro J, Sugita S, Yoshimura T, Sonoda KH, Mochizuki M, Kinoshita S. Simultaneous Analysis of Multiple Cytokines in the Vitreous of Patient with Sarcoid Uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Jan 20 53(7):3827-33 査読有
  20. Cho Y, Maruyama K, Sugita S, Mochizuki M, Kinoshita S. Interferon treatment possibly induced endogenous mycotic endophthalmitis. *J Clin Exp Ophthalmol* 2: 193. Doi: 10. 4172/2155-9570. 100193 2011.Dec.02. 査読有
  21. Sekiyama E, Saint-Geniez M, Yoneda K, Hisatomi T, Nakao S, Walshe TE, Maruyama K, Hafezi-Moghadam A, Miller JW, Kinoshita S, D'Amore PA. Heat treatment of retinal pigment epithelium induces production of elastic lamina components and antiangiogenic activity. *FASEB J.* 2012 Feb; 26 (2):567-75. Epub 2-11 Nov 8. 査読有
  22. Cursiefen C, Maruyama K, Bock F, Saban D, Sadrai Z, Lawler J, Dana R, Masli S. Thrombospondin 1 inhibits inflammatory lymphangiogenesis by CD36 ligation on monocytes. *J Exp Med.* 2011 May 9;208(5):1083-92. 査読有
  23. Ryu M, Nakazawa T, Akagi T, Tanaka T, Watanabe R, Yasuda M, Himori N, Maruyama K, Yamashita T, Abe T, Akashi M, Nishida K. Suppression of phagocytic cells in retinal disorders using amphiphilic poly( -glutamic acid) nanoparticles containing dexamethasone. *J Control Release.* 2011 Apr 10;151(1):65-73. 査読有
- [学会発表](計18件)  
海外学会
1. Maruyama K, Maruyama Y, Kato Y, Maruyama Y, Mori K, Ueno M, Ikeda Y, Kinoshita S. Corneal Endothelial Cell Density and Filtration Surgery in Patients with Posner-Schlossman Syndrome. Seattle, USA, 2013.5.5-5.8, ARVO
  2. Yabana T, Omodaka K, Takahashi M, Himori N, Ryu M, Maruyama K, Nakazawa T. Useful Diagnostic Tool for

- Progressive Visual Acuity Decrease in Glaucoma Patients. Seattle, USA, 2013.5.5-5.8 ARVO
3. Maruyama K, Usui Y, Ueda S, Maruyama Y, Goto H, Nakazawa T, The Comparison of Podoplanin Expression Between Choroidal and Conjunctival Melanoma. Seattle, USA, 2013. 2013.5.5-5.8 ARVO
  4. Nagata K, Maruyama K, Yoneda K, Yoshimura T, Sonoda K-H, Kinoshita S. Cytokine Levels In The Vitreous Fluid Of Patients With Ocular Sarcoidosis And Patients With Diabetic Retinopathy. Ft. Lauderdale, U.S.A, 2012. 5.6-5.9 ARVO
  5. Maruyama Y, Maruyama K, Kato Y, Kinoshita S. Suppression Of Corneal Lymphangiogenesis And Rejection Reaction After Corneal Transplantation By Using An Anti-podoplanin Antibody. Ft. Lauderdale, U.S.A, 2012. 5.6-5.9 ARVO
  6. Maruyama K, Maruyama Y, Kato Y, Kerjaschki D, Kinoshita S. Suppression of Corneal Lymphangiogenesis and Rejection Reaction after Corneal Transplantation by Using an Anti-podoplanin antibody. Gordon research conference, Molecular Mechanisms in Lymphatic Function and Disease. Ventura CA 2012. March 4-9 (poster presentation)

#### 国内学会

1. 橋本清香、丸山和一、國方彦志、阿部俊明、中澤徹：Vogt-小柳-原田病と類似したAPMPPEの2例（一般講演）第67回日本臨床眼科学会、東京2013/10/31-11/3
2. 永田健児、丸山和一、米田一仁、畑中宏樹、江石義信、木下茂：眼サルコイドーシスと裂孔原性網膜剥離における網膜生検組織の比較（一般講演）第67回日本臨床眼科学会、東京2013/10/31-11/3
3. 浅野俊文、津田聡、國分太貴、横山悠、面高宗子、渡邊亮、劉孟林、国松志保、高橋秀肇、丸山和一、中澤徹：線維柱帯切除後の濾過胞における経時的結膜血管面積の定量化（学術展示）第67回日本臨床眼科学会、東京2013/10/31-11/3
4. 丸山和一、稲葉亨、清水愛、國方彦志、木下茂、中澤徹：眼内炎症性疾患の硝子体細胞解析について（一般講演）第67回日本臨床眼科学会、東京2013/10/31-11/3
5. 雪田昌克、面高宗子、丸山和一、町田繁樹、中澤徹：ラット視神経切断後早期の

電気生理学・分子生物学的検討（ポスター発表）第24回日本緑内障学会、東京2013/9/21-23

6. 多田麻子、国松志保、丸山和一、高橋秀肇、劉孟林、渡邊亮、檜森紀子、横山悠、津田聡、志賀由己浩、中澤徹：東北大学病院における毛様体光凝固術の術後成績（ポスター発表）第24回日本緑内障学会、東京2013/9/21-23
7. 山本耕太郎、丸山和一、檜森紀子、中澤徹：視神経挫滅モデルにおけるROCK阻害薬K-115の神経保護効果第24回日本緑内障学会、東京2013/9/21-23
8. 國分太貴、津田聡、安田正幸、清水愛、横山悠、渡邊亮、劉孟林、国松志保、丸山和一、中澤徹：Correlation of cytokines in the aqueous humor and functional prognosis of the bleb after trabeculectomy（濾過胞の生存に關与する前房水サイトカインの検討）（English Session）第24回日本緑内障学会、東京2013/9/21-23
9. 丸山和一、丸山悠子、森和彦、劉孟林、国松志保、木下茂、中澤徹：難治性ポスナーシュロスマン症候群における観血的治療症例の特徴第24回日本緑内障学会、東京2013/9/21-23
10. 丸山和一、稲葉亨、國方彦志、望月學、木下茂、中澤徹：ウィルス性ぶどう膜炎における硝子体細胞解析について第47回日本眼炎症学会、大阪2013/7/12-14
11. 檜森紀子、丸山和一、山本耕太郎、田口恵子、劉孟林、山本雅之、中澤徹：マウス視神経挫滅モデルにおけるNrf2活性剤の神経保護効果第13回抗加齢医学学会、横浜2013/6/28-30
12. 安田正幸、劉孟林、田中佑治、檜森紀子、面高宗子、横山悠、雪田昌克、津田聡、丸山和一、山本雅之、中澤徹：エリスロポエチンノックアウトマウスを用いた網膜・視神経の組織学的検討第117回日本眼科学会総会、東京2013/4/4-7

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

丸山和一 (Maruyama, Kazuichi)  
 東北大学・大学病院・講師  
 研究者番号：10433244