

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791963

研究課題名（和文）眼内増殖性網膜疾患病態解明に向けた硝子体細胞の機能解析と治療戦略

研究課題名（英文）Strategy of the therapy for proliferative vitreoretinopathy and functional analysis of the hyalocytes

研究代表者

西塚 弘一（Nishitsuka Koichi）

山形大学医学部助教

研究者番号：60422169

研究成果の概要（和文）：眼内増殖性疾患病態における硝子体細胞の役割をしらべるために、我々が以前に樹立したブタ硝子体由来細胞を用いて、病態において上昇する炎症性サイトカインによる反応を検討したところ、サイトカイン刺激によるヒアルロナン産生調節が認められた。また、眼組織の他の細胞と比較するために結膜組織由来細胞系統を樹立した。結膜組織由来細胞も炎症性サイトカインによるヒアルロナン産生調節が認められた。

研究成果の概要（英文）：Inflammatory cytokines increased in intraocular proliferative diseases induced the hyaluronan production regulation on porcine vitreous derived cells which we have established. To compare this cell reaction, we established the conjunctiva-derived cell strains. Inflammatory cytokines also induced the hyaluronan production on these cell strains.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：硝子体細胞、眼内増殖性疾患、ヒアルロナン、増殖糖尿病網膜症、増殖硝子体網膜症

1. 研究開始当初の背景

(1)眼内増殖性疾患は難治性疾患であり、外科的治療が功を奏さず失明に至ることもある。これまでの病態研究の対象は主に網膜であった。

(2)眼内には硝子体細胞と呼ばれる細胞がわずかながらに存在しているが、これまで病態との関連についての研究はほとんどされていなかった。

(3)硝子体細胞を用いた分子生物学的研究を進めるために、研究者らはブタ硝子体組織より不死化遺伝子を用いて細胞株を樹立した。

(4)ブタ硝子体細胞は、病態にて上昇する

種々の炎症性サイトカインによるヒアルロナン産生調節が認められた。ヒアルロナンは細胞外マトリックスのひとつで、細胞の増殖／分化／移動などの生理活性作用をもつといわれており、眼内増殖性疾患におけるサイトカイン・硝子体細胞・ヒアルロナンの関連を調べることで病態の新たな解明となることが期待された。

2. 研究の目的

(1)ブタ硝子体由来細胞株を用いて、眼内増殖性疾患にて上昇する炎症性サイトカイン IL-1 α , IL-1 β , TNF- α による反応性をヒアルロナンを中心に調べる。

(2)ヒト眼組織（硝子体以外）より、ヒアロサイトの初代培養を試みる。また、不死化遺伝子導入による細胞株樹立を目指す。これらは硝子体細胞との比較に用いることが目的である。

3. 研究の方法

(1)細胞：硝子体細胞として、我々が以前に樹立したブタ硝子体由来細胞株

(K. Nishitsuka et al. Exp. Eye Res. 2007)を用いた。

(2)遺伝子発現(mRNA)：サイトカイン刺激による種々のターゲット遺伝子の mRNA レベルでの発現調節を RT-PCR にて検討した。

(3)ヒアルロナン産生：サイトカイン刺激によるヒアルロナン産生量を ELISA にて測定した。

(4)ヒト結膜由来細胞株樹立の試み：倫理委員会承認の上で、臨床検体より得られた結膜組織の初代培養を行い得られた細胞にヒトパピローマウイルス遺伝子 E6E7 を遺伝子導入し、細胞の株化を試みた

4. 研究成果

(1)TNF- α によるブタ硝子体細胞の反応性

眼内増殖性疾患において眼内（硝子体内）で上昇するサイトカインの一つである TNF- α と硝子体細胞・ヒアルロナンの関連を調べるために、TNF- α によるブタ硝子体細胞の反応性を、ヒアルロナン産生、細胞増殖について検討した。ブタ硝子体細胞において、TNF- α 刺激による増殖抑制が認められ、ヒアルロナン合成酵素阻害剤である 4-メチルウンベリフェロン (4-MU) によりさらなる細胞増殖抑制を認めた。TUNEL 染色にて細胞増殖抑制はアポトーシスが主体であることが確認できた。TNF- α 刺激によるヒアルロナン合成酵素 (HAS2) の発現亢進が mRNA レベルで認められ、タンパク質レベルにおけるヒアルロナン産生促進も認められた。TNF- α によるヒアルロナン産生促進は、4-MU にて抑制された。ブタ硝子体細胞において TNF- α によるヒアルロナン産生調節が認められ、眼内増殖性疾患に硝子体細胞・TNF- α ・ヒアルロナンが関与している可能性が示唆された。硝子体細胞において TNF- α によって産生亢進されるヒアルロナンとアポトーシスの関連が病態に関与している可能性がある。

(2)IL-1 α , IL-1 β によるブタ硝子体細胞の反応性

眼内増殖性疾患において眼内（硝子体内）で上昇するサイトカインの中の IL-1 α , IL-1 β と硝子体細胞・ヒアルロナンの関連を調べるために、IL-1 α , IL-1 β によるブタ硝子体細胞の反応性を、ヒアルロナン産生、細胞増殖について検討した。ブタ硝子体細胞において、IL-1 α , IL-1 β は刺激は細胞増殖に影響を与えなかった。IL-1 α , IL-1 β 刺激により HAS2 の発現亢進が認められた。これらの反応のシグナル伝達を解析すると、TAK を介していることが判明し、病態の解明・新たな治療などに重要と考えられた。

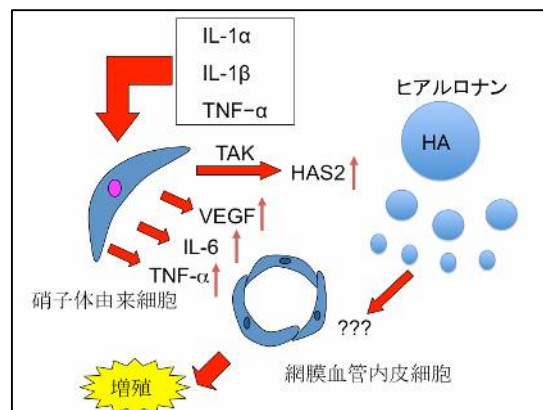
(3)結膜由来細胞系統の樹立

ヒト結膜組織より細胞系統を樹立することができた。結膜由来細胞は TGF- β , PDGF-BB の刺激によりヒアルロナン産生が促進された。

(4)今後の展望

これまでの成果のまとめを図に示した。

図



眼内増殖性疾患病態において上昇するサイトカイン (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α)によって、硝子体細胞においてヒアルロナン産生調節が認められた。ヒアルロナンは、分子量によって生理活性が異なるといわれており、病態におけるヒアルロナンの役割を調べるために、今後は臨床検体（硝子体液）中のヒアルロナン定性・定量の検討が必要である。また、実際の病態には網膜色素上皮、網膜、血管などの組織／細胞が存在するため、それらと硝子体細胞とのネットワーク解明のための研究が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 西 勝弘, 後藤 早紀子, 西塚 弘一, 望月 典子, 武田 祐介, 阿部 さち, 山本

禎子, 山下 英俊, 手術時期の異なる増殖糖尿病網膜症に対する硝子体手術成績の検討, 臨床眼科, 67 巻, 69-75 (2012) 査読有

- ② 西塚 弘一, 【網膜硝子体疾患診療の進歩 2012】 治療手技の進歩 硝子体手術の進歩 内視鏡を用いた硝子体手術, あたらしい眼科, 29 巻, 204-208 (2012) 査読無
- ③ Nishitsuka K, Kawasaki R, Kanno M, Tanabe Y, Saito K, Honma K, Oizumi T, Daimon M, Kato T, Kayama T, Yamashita H; Funagata Study. Determinants and risk factors for central corneal thickness in Japanese persons: the Funagata Study. *Ophthalmic Epidemiol.* 2011 Oct;18(5):244-9 査読有
- ④ Kashiwagi Y, Nishitsuka K, Yamamoto T, Takamura H, Yamashita H. Hyaluronan production and hyaluronan synthase expression in three human conjunctiva-derived cell strains. *Jpn J Ophthalmol.* 2011 Nov;55(6):660-9 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① Nishitsuka K, Yamashita H: Efficacy of ophthalmic endoscope for vitrectomy in cases with corneal opacity. 108th Annual Meeting of The Korean Ophthalmological Society, 2012 年 11 月 11 日, KINTEX, ソウル (韓国)
- ② 西塚弘一、武田祐介、本間慶、難波広幸、山下英俊：前眼部透視不良所見を伴った眼内炎に対する眼内視鏡下早期硝子体手術 第 66 回日本臨床眼科学会総会, 2012 年 10 月 25-28 日、京都国際会議場、京都
- ③ Nishitsuka K, Yamashita H: Penetrating keratoplasty combined with pars plana vitrectomy assisted with 23-gauge ophthalmic endoscope. 25TH INTERNATIONAL CONGRESS OF GERMAN OPHTHALMIC SURGEONS, 2012 年 6 月 13-15 日、MESSE, ニュルンベルグ (ドイツ)
- ④ Nishitsuka K, Narumi M, Suzuki T, Yamakawa M, Yamashita H: Roles of macrophages and dendritic cells in pathogenesis of vitreoretinal diseases 85st The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual meeting, 2012 年 5 月 6-10 日、Convention center, Fort Lauderdale (アメリカ)
- ⑤ Nishitsuka K, Yamashita H: combined

penetrating keratoplasty and pars plana vitrectomy assisted with 23-gauge ophthalmic endoscope: a case report. The 27th APAO Congress - Joint Meeting of APAO/SOE, 2012 年 4 月 13-16 日、BEXCO, Busan (韓国)

- ⑥ 西塚弘一、成味真理、鈴木俊紀、山川光徳、山下英俊：網膜硝子体疾患病態におけるマクロファージ/樹状細胞の役割 第 116 回日本眼科学会総会, 2012 年 4 月 5-8 日、国際フォーラム、東京
- ⑦ 柏木 佳子、西塚 弘一、山下 英俊, ブタ硝子体細胞における IL-1 刺激によるヒアルロン酸産生制御の検討. 第 116 回日本眼科学会総会, 2012 年 4 月 5-8 日、国際フォーラム、東京
- ⑧ Nishitsuka K, Yamashita H Segmental Scleral Buckling For Rhegmatogenous Retinal Detachment After Cataract Surgery With Multifocal IOL Implantation: A Case Report The 3rd World Congress on Controversies in Ophthalmology, 2012 年 3 月 22-25 日、Swissôtel The Bosphorus, Istanbul (トルコ)
- ⑨ 西塚弘一、山下英俊: 部分的強膜内陥術で治療した多焦点眼内レンズ挿入眼に合併した裂孔原性網膜剥離の 1 例. TEAM2011, 国際フォーラム、東京; 2011 年 12 月
- ⑩ Nishitsuka K, Yamamoto T, Yamashita H: Surgical therapy for submacular hemorrhage associated with rupture of retinal arterial macroaneurysm: a case report. 24TH INTERNATIONAL CONGRESS OF GERMAN OPHTHALMIC SURGEONS, 2011 年 5 月 20 日、MESSE, ニュルンベルグ (ドイツ)
- ⑪ 西塚弘一、柏木佳子、山下英俊：ヒト・ブタ硝子体由来細胞における TNF- α によるヒアルロン酸産生調節と細胞増殖制御. 第 115 回日本眼科学会総会, 2011 年 5 月 12-15 日、東京
- ⑫ Nishitsuka K, Kashiwagi Y, Yamashita H: Effect Of Tumor Necrosis Factor-alpha On Hyaluronan Production And Cell Proliferation By Porcine And Human Vitreous Derived Cell Line. 84st The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual meeting, 2011 年 5 月 1-5 日、convention center, Fort Lauderdale, (アメリカ)

[その他]

山形大学研究者情報 URL:

[http://yudb.kj.yamagata-u.ac.jp/OUTSIDE
?ISTActId=CHKOB0010RIni001&userId=1000
00187&lang_kbn=0](http://yudb.kj.yamagata-u.ac.jp/OUTSIDE?ISTActId=CHKOB0010RIni001&userId=100000187&lang_kbn=0)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西塚 弘一 (NISITSUKA KOICHI)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：60422169