

## 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 4月25日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791995

研究課題名（和文） 硝子体内投与薬物の眼組織障害の研究と臨床応用

研究課題名（英文） Eye tissue damage and clinical application of intra vitreous injection

研究代表者

山下 高明 (YAMASHITA TAKEHIRO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：70404514

研究成果の概要（和文）：硝子体内薬物投与に起因する炎症が網膜色素上皮に与える影響を調べる為に、炎症性サイトカインの代表である TNF- $\alpha$  について調査・報告した。当教室で培養可能な極性をもった網膜色素上皮細胞のシートに TNF- $\alpha$  を暴露させると、細胞同士のタイトジャンクション（ZO-1）の破壊が認められた。さらに、TNF- $\alpha$  によるさまざまな細胞内シグナル伝達の中で、MAP キナーゼパスウェイが活性化されることにより、タイトジャンクションの破壊、すなわち外側血液網膜関門の破壊が引き起こされることが分かった。

研究成果の概要（英文）：Retinal pigment epithelial (RPE) cells form a blood-ocular barrier, and their polarized property is crucial for maintaining the barrier functions. Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), a major pleiotropic inflammatory cytokine that disrupts the barrier function and eventual angiogenesis, is expressed in the choroidal neovascularizations of age-related macular degeneration eyes. Thus, it most likely plays an important role in the progression of the disease. The purpose of this study was to compare the effects of TNF- $\alpha$  on the barrier function of polarized RPE cells. Non-polarized RPE cells were used as negative controls. Isolated porcine RPE cells were seeded on Transwell™ membranes. The polarization of the RPE cells was determined by their high transepithelial electrical resistance and by their differential secretion of vascular endothelial growth factor (lower layer/upper layer >2.5X). Polarized RPE cells were incubated with 10 ng/ml of TNF- $\alpha$  and the TER was measured. TNF- $\alpha$  significantly decreased the TER of polarized RPE cells by  $17.6 \pm 2.7\%$  ( $P < 0.001$ ) of the control at 24 h and that of non-polarized RPE cells by  $5.4 \pm 6.5\%$  ( $P = 0.401$ ). The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor, SB203580, blocked the effects of TNF- $\alpha$  of decreasing the TER. Cell junction-related molecules, e.g., ZO-1, located between cells in control RPE cells, were disassembled by TNF- $\alpha$ , and this breakdown was suppressed by SB203580 in polarized RPEs. These results indicate that the breakdown of the RPE barrier function was caused exclusively by TNF- $\alpha$  in polarized RPEs, and TNF- $\alpha$  was acting through the p38 MAPK pathways. Investigations of polarized RPE cells should be more suitable for in vitro studies of the pathophysiology of retinchoroidal diseases.

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：眼薬理学、硝子体注射、網膜色素上皮、TNF- $\alpha$ 、薬物反応性

## 1. 研究開始当初の背景

従来、90%以上が水分である硝子体は空間としては認識されていたが、治療の場としては用いられず、治療に関しては無意味な組織と考えられていた。ところが、2000年頃から、網脈絡膜疾患の治療に硝子体内薬物注射が始まると様相は一変し、硝子体は網脈絡膜疾患治療に最も重要な組織であると認識されるようになってきた。また、硝子体手術の補助として、トリアムシノロン、インドシアニングリーンなどの薬物が使用されるようになった。このように、硝子体内薬物治療は臨床が先行しているが、硝子体に投与された薬物の動態・影響は、ほとんどわかっていない。われわれは、インドシアニン色素が濃度依存的に視野障害を起こすことを報告した(Kanda S, Uemura A, Yamashita T, et al. Arch Ophthalmol 2004;122:1447-51)。さらに、インドシアニン色素による視野欠損は網膜神経細胞の特徴的な障害によることを解明し(Yamashita T, Uemura A, Kita H, Sakamoto T. Ophthalmology 2006;113:280-4.)、短期的な障害に加えて、長期的な神経細胞への残留と、視野障害の進行が起こることを見出した(Yamashita T, Uemura A, Kita H, Sakamoto T. Retina 2008;28(9):1228-33)。現在までインドシアニン色素を用いた手術が多施設で数多く行われてきたことを考えると、長期的な網膜障害の問題は今後深刻かつ広範な眼科学的問題になると思われる。また、トリアムシノロン保護剤が網膜、眼圧、視神経に与える影響についても報告した(Yamashita T, Uemura A, Kita H, Sakamoto T. J Glaucoma. 2007 Mar;16(2):220-4.)。しかしながら、硝子体内に投与された遺伝子、インドシアニン色素、トリアムシノロン保護剤、抗 VEGF 薬などが網膜に与える影響については、いまだ十分に解明されておらず、障害が起こった場合の治療法も研究されていない。現在までの予備実験により、硝子体内薬物投与による網膜障害は caspase 系列を介する経路と caspase 系列を介さずに apoptosis inducing factor を介する経路によるアポトーシスが原因であることがわかった(Enaida H, Sakamoto T et al. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.2002;240:209-13)。

## 2. 研究の目的

近年、眼疾患に対する薬物投与方法として、硝子体内注入が増えてきている。点眼にくらべ高濃度で目的組織に薬剤を暴露させることができるが、一方でさまざまな副作用が報告されている。本研究では硝子体内に臨床あるいは実験で注入される物質(インドシアニン色素、トリアムシノロン保護剤、抗 Vascular Endothelial Growth

Factor(VEGF)薬、遺伝子)により、網膜・視神経に及ぼす影響を視機能・硝子体内各種ケミカルメディエーター、眼科所見により検討し、さらに網膜保護物質により副作用を抑制できないか調査する。また、硝子体内投与に最適な薬物濃度を実験、臨床の両面から決定する。

## 3. 研究の方法

ラットの硝子体中にインドシアニン色素、トリアムシノロン、抗菌薬、抗 VEGF 抗体など臨床問題となっている薬物を注入し、組織切片を作成し、網膜に与える影響について調べる。具体的にはアポトーシス型障害と非アポトーシス型障害のいずれが優位かについて、Clarke の分類での 1 型から 3 型について調べる。組織学的検索、生化学的検索を行うが、最初の検索対象は、caspase 群、Bcl-2 ファミリー群、p53 蛋白群、BH3-only 蛋白群、を考えている。周辺因子として proMMP2, proMMP9 についても調べる予定である。以上の研究で、どのタイプの細胞障害が優位であるかのおおよその目途を立てた後、細胞内シグナルをより詳細に研究するため、in vitro の研究を行う。我々は培養細胞システムをすでに構築しており、(網膜色素上皮細胞、網膜神経節細胞など)、それぞれの障害パターンを誘導する際、キーとなる細胞内シグナルを同定する。あわせて、光障害・低酸素障害との比較を行い、特徴を調べる。ラットの眼球では硝子体注入システム構築が不十分(眼球が小さいため評価が困難または、臨床上的眼科的所見の取得が困難)な場合は、鹿児島大学のフロンティアサイエンス研究推進センターで開発されているトランスジェニックミニブタを用いる。構築したシステムを用いて、硝子体内投与薬物によって生じる網膜障害の治療ターゲットを絞り込む。その結果を用いて、抑制実験を行う。ターゲット分子により薬物送達方法は異なるが、siRNA、L-NAME などの薬剤、抗体などを用いる予定である。最初は in vitro の系を用いて次に、in vivo の実験系へ進む。

## 4. 研究成果

ラットの眼内に TNF  $\alpha$ 、トロンピンを注入し、網膜、脈絡膜アポトーシス型障害と非アポトーシス型障害のいずれが優位かについて、Clarke の分類での 1 型から 3 型について調べた。マウスを麻酔後、トロピカミド点眼液で散瞳し、片眼に TNF  $\alpha$  (500ng/眼)を 30G 針で網膜下注射を行った。もう片眼にはコントロールとして PBS の注射を行った。トロンピンは、1・10U/眼の濃度で網膜下注射を行った。TNF 注射群では、網膜・網膜色素上皮・脈絡膜の菲薄化を認めた。Tunel 染色の結果では、TUNEL 陽性細胞を多く認め、アポ

トーン型細胞障害を生じていることが示唆された。網膜色素上皮が菲薄化し不連続となっており、TNF $\alpha$ によって網膜色素上皮のバリア機能障害を示唆する所見と思われた。トロンビンにおいても網膜・網膜色素上皮・脈絡膜の菲薄化を認めた。TUNEL染色の結果からは、濃度依存的にアポトーシスを生じていた。低濃度では色素上皮の増殖性変化を認め、トロンビンが細胞増殖にも影響している可能性が示唆された。過去の報告では、TNF $\alpha$ がアポトーシス誘発の他、網膜色素上皮のバリア機能を低下させることが報告されている。今回の実験では、TNF $\alpha$  (500ng/眼)では、網膜・脈絡膜障害を強く認め、アポトーシス型の細胞障害が有意であった。トロンビンは、血液凝固系の重要な酵素であるが、その他にも細胞に様々な影響(増殖・遊走反応など)を与えることが報告されている。今回の濃度では、そのような影響よりは、アポトーシス型の細胞障害が有意であった。硝子体内薬物投与に起因する炎症が網膜色素上皮に与える影響を調べる為に、炎症性サイトカインの代表であるTNF- $\alpha$ について調査・報告した。当教室で培養可能な極性をもった網膜色素上皮細胞のシートにTNF- $\alpha$ を暴露させると、細胞同士のタイトジャンクション(ZO-1)の破壊が認められた。さらに、TNF- $\alpha$ によるさまざまな細胞内シグナル伝達の中で、MAPキナーゼパスウェイが活性化されることにより、タイトジャンクションの破壊、すなわち外側血液網膜関門の破壊が引き起こされることが分かった。硝子体内薬物投与を行う、加齢黄斑変性やブドウ膜炎は疾患自体も炎症性サイトカインが関与しており、これらの疾患の理解にも今回の研究は有用であった。TNF- $\alpha$ が網膜色素上皮細胞シートに与える影響を初めて明らかにした研究である。臨床研究として、網膜、脈絡膜の評価方法として光干渉断層計(OCT)を用いて再現性の研究を行った。OCTによる網膜、脈絡膜の再現性は高く、組織障害の評価に有用であった。

## 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4件)

- ①Ki-I Y, Yamashita T, Uemura A, Sakamoto T. Long-term intraocular pressure changes after combined phacoemulsification, intraocular lens implantation, and vitrectomy. Jpn J Ophthalmol. 2013 Jan;57(1):57-62. DOI: 10.1007/s10384-012-0207-7. 査読有
- ②Shirasawa M, Sonoda S, Terasaki H, Arimura N, Otsuka H, Yamashita T, Uchino

E, Hisatomi T, Ishibashi T, Sakamoto T. Exp Eye Res. DOI:2013;27;110C:59-69  
10.1016/j.exer.2013.02.012 査読有

③Terasaki H, Shirasawa M, Yamashita T, Yamashita T, Yamakiri K, Sonoda S, Sakamoto T. Comparison of foveal microstructure imaging with different spectral domain optical coherence tomography machines. Ophthalmology. 2012 Nov;119(11):2319-27. DOI: 10.1016/j.ophtha.2012.07.012. 査読有

④Yamashita T, Yamashita T, Shirasawa M, Arimura N, Terasaki H, Sakamoto T. Repeatability and reproducibility of subfoveal choroidal thickness in normal eyes of Japanese using different SD-OCT devices. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Mar 1;53(3):1102-7 査読有

[学会発表] (計29件)

①Takehiro Yamashita, Ryo Asaoka, Minoru Tanaka, Yuya Kii, Kumiko Nakao, Taiji Sakamoto, Relationship between retinal nerve fibre layer thickness and retinal artery position. , UK and Eire Glaucoma Society Meeting, 6 December 2012 (英国).

②庭田有里、山下高明、田中実、喜井裕哉、坂本泰二 抗血管内皮増殖因子薬による新生血管緑内障の治療中に眼球瘻に陥った2例 第28回九州緑内障カンファレンス 2012年5月25日~27日 福岡

③Takehiro Yamashita, Minoru Tanaka, Yuya Kii, Kumiko Nakao, Taiji Sakamoto. , Sex-related Differences In Axial Length, Anterior Chamber Depth And Lens Thickness In Japanese Young Healthy Eyes., ARVO 2012, 8 May 2012 (アメリカ合衆国).

④Takehiro Yamashita, Yuya Kii, Minoru Tanaka, Kumiko Nakao, Taiji Sakamoto. , Subfoveal choroidal thickness in relation to sex and axial length in healthy Japanese young participants., APAO/SOE Busan2012, 13~16 April 2012 (韓国).

⑤Yuya Kii, Takehiro Yamashita, Ryo Asaoka, Minoru Tanaka, Kumiko Nakao, Taiji Sakamoto : 「The influence of the conus on the retinal nerve fibre layer thickness in Japanese normal eyes」 20th International Visual Field and Imaging Symposium (Trinity College The University of Melbourne・Melbourne) 23 January 2012. (オ

ーストラリア)

⑥Takehiro Yamashita, Ryo Asaoka, Yuya Kii, Minoru Tanaka, Kumiko Nakao, Taiji Sakamoto : 「The variability of the peak retinal nerve fibre layer position in Japanese normal eyes」 20th International Visual Field and Imaging Symposium (Trinity College The University of Melbourne・Melbourne) , 25 January 2012. (オーストラリア)

⑦Minoru Tanaka, Takehiro Yamashita, Ryo Asaoka, Yuya Kii, Kumiko Nakao, Taiji Sakamoto : 「The relationship between the peak retinal nerve fibre layer position and the papillo-macular position in Japanese normal eyes」 20th International Visual Field and Imaging Symposium (Trinity College The University of Melbourne・Melbourne) 23th January 2012. (オーストラリア)

⑧Takehiro Yamashita, Toshifumi Yamashita, Minoru Tanaka, Yuya Kii, Kumiko Nakao, Taiji Sakamoto : 「The subfoveal choroidal thickness in Japanese young normal eyes」 The 4th joint meeting of Korea-China-Japan Ophthalmologists (Seoul, Korea) 04 November 2011 (韓国)

⑨Takehiro Yamashita, Yuya Kii, Akinori Uemura, Taiji Sakamoto : 「 Long-term Intraocular Pressure After 20 Gauge Pars Plana Vitrectomy 」 ARVO2011 (Fort Lauderdale・U.S.A) 01 May, 2011 (アメリカ)

他 20 件

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山下高明 (YAMASHITA TAKEHIRO)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・  
助教  
研究者番号 : 70404514