

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659765

研究課題名(和文) 眼内薬物治療の飛躍の効果向上の研究：自然免疫の関与について

研究課題名(英文) Innate immunity in ocular pharmacology

研究代表者

坂本 泰二 (Sakamoto, Taiji)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：10235179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：非感染性の眼内炎に焦点を当てて研究を行った。まずトリアムシノロン注射後に強い炎症を起こす病態について、結晶構造物による刺激が炎症を誘発すると考えて、培養R28細胞を用いて、トリアムシノロン顆粒がどのように影響を与えるかを調べた。その結果、結晶状の構造物を眼表面に持続的に接触させると濃度時間依存性に炎症性サイトカインが誘発された。次に細胞破砕物であるhistone H3を網膜色素上皮細胞に添加すると、炎症性サイトカインの産生が誘発された。過剰に添加するとアポトーシスを引き起こした。これらの作用にはいずれも自然免疫系で重要な働きをしているtoll like receptorが関与していた。

研究成果の概要(英文)：First, triamcinolone-associated sterile inflammation was studied. Granular materials including triamcinolone acetate was co-incubated with retinal pigment epithelial cells or R28 retinal cells. As a result, inflammatory cytokines including interleukin-1 beta was significantly upregulated in a time and dose dependent manner. Next, the effect of cell debris was studied. The histone H3 was added to these cells resulting in upregulation of inflammatory cytokines. Moreover, the excessive amount of histones induced apoptosis. Peculiarly, these negative effects were inhibited by vitreous body or hyaluronic acid. These phenomenon was mediated through toll-like receptors. Therefore, innate immunity supposedly plays a certain role in the pathology of retinal diseases.

研究分野：眼科

キーワード：薬物治療 自然免疫 網膜

1. 研究開始当初の背景

眼疾患に対しての自然免疫の関与は極めて大きい。病原微生物感染初期における自然免疫系の作用は良く知られているが、それ以外の作用は眼科領域ではあまり知られていなかった。しかしながら、眼科領域では、原因不明の無菌性眼内炎が知られており、自然免疫系の役割が注目されていた。我々は、眼科疾患の各病態を検索してきたが、トリアムシノロン注射後に起きる無菌性眼内炎や手術後の炎症に関しては自然免疫系の関与を想定している。

細胞死に伴い崩壊組織・細胞から細胞外へ放出される分子 DAMPs に着目して研究する。DAMPs は RAGE や一部の TLR のリガンドとなることで、炎症・組織修復などに関連することが知られ、炎症関連自然免疫に関する最近のトピックスである。昨年までの研究で「細胞死と生体反応」に注目して解析を行っており、眼科領域における DAMPs に関する研究に取り組んできた。具体的には、代表的な DAMPs である HMGB1 (high mobility group box 1) について報告した (Arimura N, Sakamoto T, et al, 2008, Graefes; Arimura N, Sakamoto T, et al, 2009, Lab Invest, Terasaki et al. PlosOne submitted)。それらの結果から、糖尿病網膜症、黄斑変性などの通常の網膜病変でも自然免疫が活発に働いており、その点を明らかにせず薬物治療を行っても、期待効果は得られないと予想されている。そこで、その点を明らかにする。各種網膜硝子体疾患の生体標本(硝子体サンプル等)における DAMPs/PAMPs の解析を行い、背景因子との比較により、病態への寄与の大きい分子を同定する。特に、生物学的製剤などで治療後のサンプルについて注意する。代表的 PAMPs である LPS (Lipopolysaccharide) についての予備実験は終わっており、細胞内シグナルの解析も順調に推移し、その結果を得ることができた。硝子体内薬物投与時に起こり得る眼内炎症への DAMPs/PAMPs の関連について調べることで、薬物有効性及び安全性スクリーニングの新しい系を確立することを目標としている。

2. 研究の目的

本申請は、トリアムシノロン随伴眼内炎、網膜剥離後の無菌性炎症の病態解明を通じて、眼科疾患における自然免疫系の関与を研究することである。

3. 研究の方法

トリアムシノロン硝子体注射の眼内炎は注射あたり数パーセントで発生する無菌性眼内炎である。そこでまずはこの患者の病態

を検討した。鹿児島大学病院外来から、明らかに病原微生物の関与のない無菌性眼内炎を全て抽出し、その中から、トリアムシノロン眼内炎について、患者の背景、眼内の状況についてのデータを検索する。

接触性炎症のモデル：

図1のように培養網膜細胞、網膜色素上皮細胞について、顆粒の接触のある系、ない系についてサイトカインの産生を検討する。

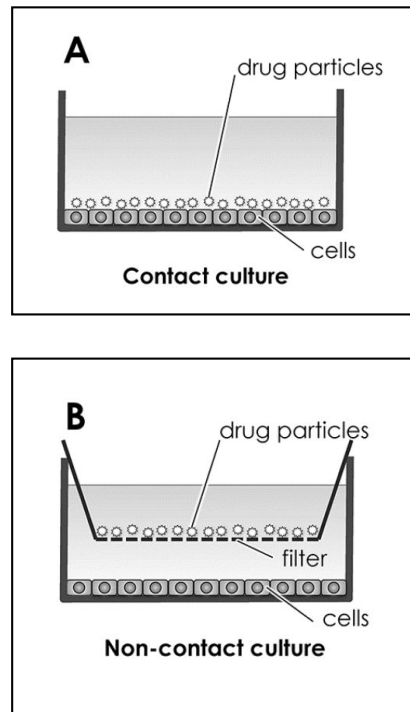


図1 顆粒状物による接触培養系と非接触培養系の図

Damage associated molecular pattern (DAMPs)の研究：

細胞破砕物は自然免疫系を介して、炎症あるいは組織修復に役割を果たしていると考えられる。そこで、まず眼内各種疾患における histone の濃度測定を行う。

次に、histone がどの細胞で発言しているかを免疫染色で確認する。特に網膜下の状態に関しては、電子顕微鏡などを用いて詳しく検索する。

histone が細胞の及ぼす影響について、検索する。その際、toll-like receptor などの関与に注意して検討をする。

Histone による細胞傷害を抑制する因子を探索して、治療への応用について検討する。

4. 研究の結果

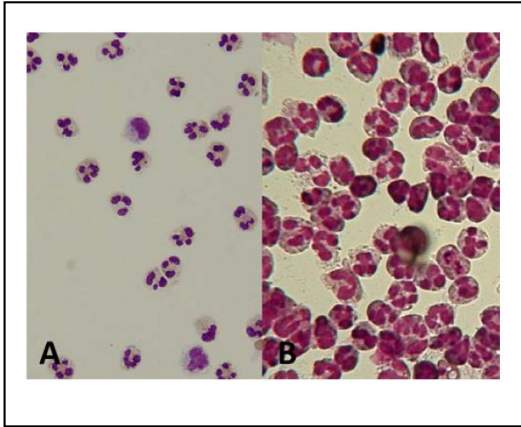


図2 無菌性眼内炎の標本。多くが好中球であるが、細胞破砕物も含まれている。

眼内液を検索すると、ほとんどが好中球であるが、細胞破砕物も多く含まれていた。またIL-6, IL-8が多量に含まれていた(図3)。

Case	IL-12p70 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-6/IL-8
Sterile Endophthalmitis after IVTA							
18	0	4.2	0	447.8	0	47.2	9.5
19	0	0	6.1	>5000	0	>5000	--
20	0	0	0	941.7	0	420.6	2.2
21	0	0	6.4	>5000	0	4904.8	--
Control Samples							
Control 1	0	0	0	6.5	0	6.1	
Control 2	0	0	0	87.3	0	28.5	
Control 3	0	0	0	9.6	0	16.5	
Control 4	0	0	0	4.3	0	10.4	
P Value†	--	0.32	0.13	0.02*	--	0.02*	

IVTA = intravitreal triamcinolone acetate; IL = interleukin; TNF = tumor necrosis factor;
† Mann-Whitney U test

表1 眼内のサイトカイン濃度。コントロールに比べてIL-6, IL-8が多量に含まれていた。

培養水晶体上皮細胞に接触培養と非接触培養を行った所、接触培養を行った場合にのみ、炎症性サイトカインが上昇した(図3)。

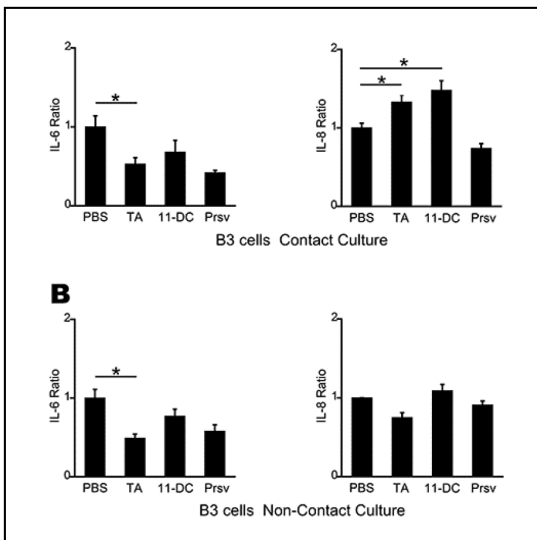


図3 水晶体上皮細胞 B3 に接触培養(上段)と非接触培養(下段)を行った結果。接触培

養のみに炎症性サイトカインが濃度が上昇した。

同じ傾向は培養網膜色素上皮細胞 ARPE-19 細胞でも確認された(図4)。

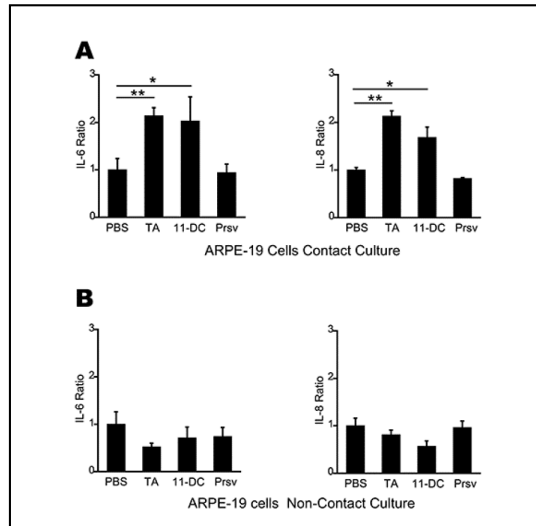


図4 培養網膜色素上皮細胞の接触培養(上段)と非接触培養(下段)における炎症性サイトカインの産生。

以上の結果から、トリアムシノロン注射後の無菌性眼内炎には粒子の接触が関与していると結論した。これは新しい病因である。

DAMP 眼内炎の研究:

各種疾患における DAMP histone の濃度を測定した。裂孔原性網膜剥離において高濃度であったが、IL-6 との相関は見られなかった。

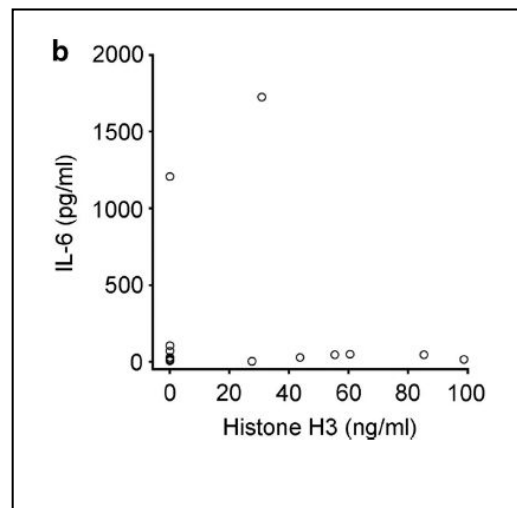


図5 裂孔原性網膜剥離眼の硝子体液中のIL-6とhistone H3の濃度の相関。

次に histone が ARPE19 細胞の炎症性サイトカインの産生に及ぼす影響を調べた。

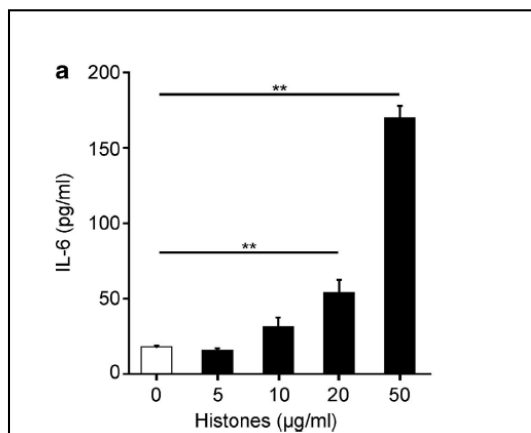


図6 histone が ARPE19 細胞の炎症性サイトカインの産生に及ぼす影響

その結果、濃度依存性に IL-6 や IL-8 の産生を増加させた(図 6)。その作用は抗 toll like receptor 4 に対する抗体で抑制されたことから、この現象には自然免疫系の TLR4 が関与していることが分かった(図 7)。

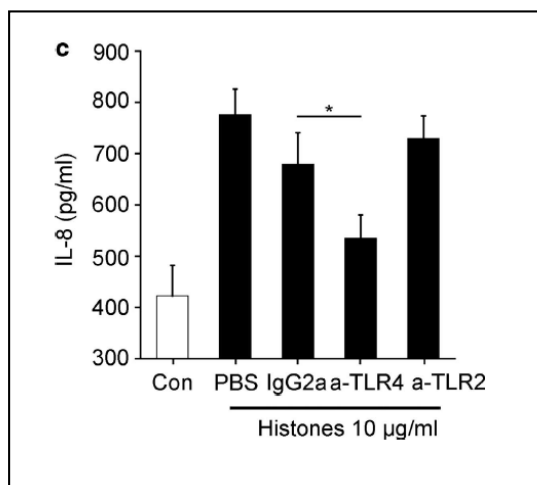


図7 histone が ARPE19 細胞の IL-8 の産生に及ぼす影響を各種抗体でブロックした結果

以上の事から、ヒストンは toll like receptor 4 を通じて炎症を誘導することが分かった。ただし、炎症を誘導するだけでなく、過剰に投与するとどのようなかを検討した。その結果、過剰に投与すると、濃度依存性、時間依存性にアポトーシスを誘導することが分かった(図 8)。つまり、細胞破砕物は単なるペプチドや蛋白ではなく、生体に極めて有害であり、網膜剥離による一時的ダメージではなく、コラテラルダメージをおこすことがわかった。

そこでこの現象を抑制する方法を検討した。Histone は陽性荷電しており、陰性荷電しているもので絡め取って障害性を減ずる方法を考案した(図 8)。

それはヒアルロン酸が最も効果的であることがわかった。

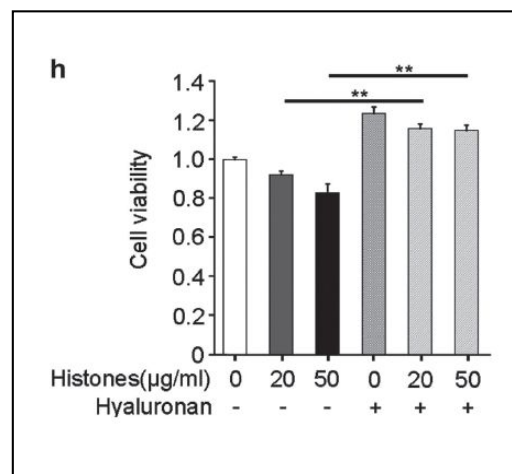


図8 histone haluronan を共培養した時の網膜色素上皮細胞の細胞活性

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 40 件)

Shirasawa M, Sakamoto T, Terasaki H, Yamashita T, Uchino E, Sonoda S. Objective determination of optimal number of spectral-domain optical coherence tomographic images of retina to average. PLoS One. 2014 Oct 22;9(10):e110550. doi:10.1371/journal.pone.0110550. eCollection 2014. PMID: 25337716 [PubMed - in process] 査読有

Terasaki H, Shirasawa M, Otsuka H, Yamashita T, Uchino E, Hisatomi T, Sonoda S, Sakamoto T. Different effects of thrombin on VEGF secretion, proliferation, and permeability in polarized and non-polarized retinal pigment epithelial cells. Curr Eye Res 2014 Oct 13:1-10. 査読有

Yamashita T, Sakamoto T, Kakiuchi N, Tanaka M, Kii Y, Nakao K. Posterior pole asymmetry analyses of retinal thickness of upper and lower sectors and their association with peak retinal

nerve fiber layer thickness in healthy young eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014 Aug 12;55(9):5673-8. doi: 10.1167/iovs.13-13828. PMID: 25118262 査読有

Yamashita T, Sakamoto T, Terasaki H, Tanaka M, Kii Y, Nakao K. Quantification of retinal nerve fiber and retinal artery trajectories using second order polynomial equation and its association with axial length. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014 Jul 29;55(8):5176-82. doi: 10.1167/iovs.14-14105. PMID: 25074777 査読有

Kawano H, Sakamoto T, Ito T, Miyata K, Hashiguchi T, Maruyama I. Hyaluronan protects corneal endothelial cells against extracellular histones after phacoemulsification. *J Cat Ref Surg* 2014 Nov;40(11):1885-93. doi: 10.1016/j.jcrs.2014.07.026. Epub 2014 Oct 23. 査読有

Sonoda S, Sakamoto T, Yamashita T, Shirasawa M, Uchino E, Terasaki H, Tomita M. Choroidal structure in normal eyes and after photodynamic therapy determined by binarization of optical coherence tomographic images. *Invest Ophthalmol Vis Sci* Jun 3;55(6):3893-9. doi: 10.1167/iovs.14-14447. PMID: 24894395 査読有

Hisatomi T, Notomi S, Tachibana T, Sassa Y, Ikeda Y, Nakamura T, Ueno A, Enaida H, Murata T, Sakamoto T, Ishibashi T. Ultrastructural changes of the vitreoretinal interface during long-term follow-up after the removal of the internal limiting membrane. *Am J Ophthalmol* 2014 Sep;158(3):550-556.e1. doi: 10.1016/j.ajo.2014.05.022. Epub 2014 May 27. PMID: 24878309 [PubMed - in process] 査読有

Hisatomi T, Notomi S, Tachibana T, Oishi S, Asato R, Yamashita T, Murakami Yi, Ikeda Y, Enaida H, Sakamoto T, Ishibashi T. Brilliant Blue G Double Staining Enhances Successful ILM Peeling with minimal adverse effect by low cellular permeability into live cells. *Retina* (in press). 査読有

Sonoda S, Sakamoto T, Yamashita T, Otsuka H, Shirasawa M, Kakiuchi N, Uchino E, Terasaki H, Kawano H. Effect of intravitreal triamcinolone acetonide or bevacizumab on choroidal thickness in eyes with diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014 Jun 6;55(6):3979-85. doi: 10.1167/iovs.14-14188. 査読有

Kida T, Kozai S, Takahashi H, Isaka M, Tokushige H, Sakamoto T.

Pharmacokinetics and Efficacy of Topically Applied Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in Retinochoroidal Tissues in Rabbits. *PLoS One.* 2014 May 5;9(5):e96481. doi: 10.1371/journal.pone.0096481. eCollection 2014. 査読有

Otsuji F, Nakano T, Sakamoto T, Uemura A. Long-term observation of the vitreomacular relationship in normal fellow eyes of patients with unilateral idiopathic macular holes. *Ophthalmologica* (in press) 査読有

Takenouchi K, Shrestha B, Yamakuchi M, Yoshinaga N, Arimura N, Kawaguchi H, Nagasato T, Feil R, Kawahara K, Sakamoto T, Maruyama I, Hashiguchi T. Upregulation of non- β cell-derived vascular endothelial growth factor A increases small cluster of insulin-producing cells in the pancreas. *Exp Clin Endocrinol & Diabetes* 2014 May;122(5):308-15. doi: 10.1055/s-0034-1371811. Epub 2014 May 16. 査読有

Kamisanuki T, Katori N, Kasai K, Hayashi K, Kokubo K, Ota Y, Sakamoto T. Adhesiotomy with grafting of fat and perifascial areolar tissue for adhesions of extraocular muscles after trauma or surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2014 May;52(5):829-36. 査読有

Kawano H, Ito T, Yamada S, Hashiguchi T, Maruyama I, Hisatomi T, Nakamura M, Sakamoto T. Toxic effects of extracellular histones and their neutralization by vitreous in retinal detachment. *Lab Invest.* 2014 May;94(5):569-85. doi: 10.1038/labinvest.2014.46. Epub 2014 Mar 10. 査読有

Yamashita T, Kii Y, Tanaka M, Yoshinaga W, Yamashita T, Nakao K, Sakamoto T. Relationship between supernormal sectors of retinal nerve fibre layer and axial length in normal eyes. *Acta Ophthalmol.* 2014 Mar 21. doi: 10.1111/aos.12382. 査読有

Sonoda S, Sakamoto T, Shirasawa M, Yamashita T, Uchino E, Terasaki H. Blood Components and OCT Reflectivity Evaluated in Animal Model. *Curr Eye Res.* 2014 Oct 13:1-7. 査読有

Yamashita T, Sakamoto T, Yamashita T, Sonoda S, Yamakiri K, Otsuka H, Hisatomi T, Imaki H, Ishibashi T, Dugel PU. Individualized, spectral domain-optical coherence tomography-guided facedown posturing after macular hole surgery: Minimizing Treatment

Burden and Maximizing Outcome. *Retina*. 2014 Jul;34(7):1367-1375. 査読有

Yamashita T, Tanaka M, Kii Y, Nakao K, Sakamoto T. Association between retinal thickness of 64 sectors in posterior pole determined by optical coherence tomography and axial length and body height. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Nov 13;54(12):7478-82. doi: 10.1167/iovs.13-12586. 査読有

Matsuo Y, Sakamoto T, Yamashita T, Tomita M, Shirasawa M, Terasaki H. Comparisons of choroidal thickness of normal eyes obtained by two different spectral-domain OCT and one swept-source OCT instruments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013 Nov 19;54(12):7630-6. doi: 10.1167/iovs.13-13135. 査読有

Sonoda S, Sakamoto T, Otsuka H, Yoshinaga N, Yamashita T, Ki-I Y, Okubo A, Yamashita T, Arimura N. Responsiveness of Eyes with Polypoidal Choroidal Vasculopathy with Choroidal Hyperpermeability to Intravitreal Ranibizumab. *BMC Ophthalmol*. 2013 Aug 20;13:43. doi: 10.1186/1471-2415-13-43. 査読有

㉑ Sonoda S, Sakamoto T, Shirasawa M, Yamashita T, Otsuka H, Terasaki H. Correlation between reflectivity of subretinal fluid in OCT images and concentration of intravitreal VEGF in eyes with diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Aug 9;54(8):5367-74. doi: 10.1167/iovs.13-12382. 査読有

㉒ Yamashita T, Kii Y, Tanaka M, Sakamoto T. Relationship between position of peak retinal nerve fiber layer thickness and retinal arteries on sectoral retinal nerve fiber layer thickness. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Aug 13;54(8):5481-8. doi: 10.1167/iovs.12-11008. 査読有

㉓ Sonoda S, Sakamoto T, Yamashita T, Shirasawa M, Otsuka T, Sonoda Y. Retinal Morphological Changes and Concentrations of Cytokines in Eyes with Diabetic Macular Edema. *Retina*. 2014 Apr;34(4):741-8. doi: 10.1097/IAE.0b013e3182a48917. 査読有

㉔ Terasaki H, Kase S, Shirasawa M, Otsuka H, Hisatomi T, Sonoda S, Ishida S, Ishibashi T, Sakamoto T. TNF- α decreases VEGF secretion in highly polarized RPE cells but increases it in non-polarized RPE cells related to crosstalk between JNK and NF- κ B pathways. *PLoS One*. 2013 Jul 29;8(7):e69994. doi: 10.1371/journal.pone.0069994. Print 2013. 査読有

㉕ Otsuka H, Kawano H, Sonoda S, Nakamura M,

Sakamoto T. Particle-induced endophthalmitis: Possible mechanisms of sterile endophthalmitis after intravitreal triamcinolone. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Mar 11;54(3):1758-66. doi: 10.1167/iovs.12-11247. 査読有

㉖ Notomi S, Hisatomi T, Murakami Y, Terasaki H, Sonoda S, Asato R, Takeda A, Ikeda Y, Enaida H, Sakamoto T, Ishibashi T. Dynamic increase in extracellular ATP accelerates photoreceptor cell apoptosis via ligation of P2RX7 in subretinal hemorrhage. *PLoS One* 2013;8(1):e53338. doi: 10.1371/journal.pone.0053338. Epub 2013 Jan 8. 査読有

㉗ Okubo A, Unoki K, Yoshikawa H, Ishibashi T, Sameshima M, Sakamoto T. Hyperreflective dots surrounding the central retinal artery and vein in optic disc melanocytoma revealed by spectral domain optical coherence tomography. *Jpn J Ophthalmol*. 2013 Jan;57(1):108-12. doi: 10.1007/s10384-012-0207-7. 査読有

㉘ Yamashita T, Yamashita T, Kawano H, Sonoda Y, Yamakiri K, Sakamoto T. Early Imaging of Macular Hole Closure: A Diagnostic Technique and Its Quality for Gas-Filled Eyes with Spectral Domain Optical Coherence Tomography. *Ophthalmologica* 2013;229(1):43-9. doi: 10.1159/000343061. 査読有

〔学会発表〕(計 40 件)

〔図書〕(計 3 件)

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1 件)

名称：眼球組織への生理活性薬剤導入のための組成物および装置

発明者：坂本泰二、園田祥三

権利者：鹿児島大学

番号：特許登録番号整理番号：05P002 特第4992071号

出願年月日：

取得年月日：平成 24 年 5 月 18 日

国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

坂本 泰二 (SAKAMOTO Taiji)

鹿児島大学歯学部総合研究科教授

研究者番号：10235179