

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670735

研究課題名(和文) 緑内障術後結膜下組織における炎症細胞の4次元イメージング

研究課題名(英文) 4-dimension live imaging of inflammatory cells in conjunctiva after glaucoma surgery

研究代表者

谷原 秀信(Tanihara, Hidenobu)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：60217148

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)：2光子励起顕微鏡を用いて、生体マウス眼球で非侵襲的にリアルタイムに結膜下組織を可視化し、炎症反応の観察を行った。LysM-eGFP遺伝子改変マウスを用いることで、蛍光標識された炎症細胞(主に好中球)を追跡・撮像が可能であった。10-0ナイロン縫合を行った結膜侵襲モデルでは、縫合処置後3時間から徐々に時間依存的に炎症細胞数の増加がみられ、また、細胞の移動速度は術後3時間の時点でピークとなり、その影響は72時間まで維持された。これらの新しいライブイメージング技術は、緑内障手術における眼炎症環境や創傷治癒機転の理解につながる成果である。

研究成果の概要(英文)：We visualized intravital inflammatory cell dynamics in mice conjunctiva in vivo by using two-photon microscopy, and evaluated immuno-reaction after conjunctival invasive interventions. Using LysM-eGFP transgenic mouse, eGFP-labeled inflammatory cells (mainly neutrophil) were tracked and imaged. In conjunctival injury model by 10-0 nylon suturing, eGFP-positive cells were significantly and time-dependently increased compared to non-injured control. Also, the migration velocities of inflammatory cells were rapidly increased by 3 hours after invasion, and sustained until 72 hours. This novel in-vivo live imaging technique may be a useful tool to elucidate the inflammatory/wound healing mechanism in conjunctiva after glaucoma surgery..

研究分野：眼科学

キーワード：眼細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国の成人の失明原因第一位である緑内障の治療は眼圧を下降させることを目的として行われる。トラベキュlectミーは房水を結膜下に誘導するバイパス路を作成し濾過胞を作製することで眼圧を下降させる代表的な緑内障術式であるが、時間経過とともに効果が減弱、消失する症例が存在し、重篤で不可逆的な視機能障害に帰結する要因の一つとなっている。トラベキュlectミーが失敗に至る主な原因は結膜下の過剰な炎症反応と癒着によるバイパス路の閉塞である。

(2) 申請者らはこの問題を解決すべく、豊富な臨床症例を対象にそのリスク因子同定を進めるとともに (Awai-Kasaoka et al. J Cataract Refract Surg 2012; Takihara et al. Arch Ophthalmol 2011; Takihara et al. Am J Ophthalmol 2009) 基礎研究によって房水流出路調節機構の知見を得た (Kameda et al. IOVS 2012; Fujimoto et al. IOVS 2012)。これらの成果をもとに房水内のサイトカインに着目するに至り、房水 MCP-1 濃度が緑内障症例で高くトラベキュlectミー成績に影響することを見出した (Inoue et al. J Cataract Refract Surg 2012; Kawai et al. IOVS 2012)。また、動物モデルの組織切片観察によって MCP-1 が結膜下に炎症細胞の遊走を促す作用があることを確認し、さらに MCP-1 が生理的な房水流出路にも影響を与えることを明らかにした (Tsuboi et al. IOVS 2012)。申請者らはこれらの結果から、房水内 MCP-1 が結膜下で炎症細胞を誘導することによって過剰な炎症反応と癒着を促し、手術効果を消失させるというモデルを提唱している。しかしながら、生体結膜組織における炎症細胞の動的な応答については、未だ報告がなされていない。

2. 研究の目的

2 光子励起顕微鏡を用いた生体結膜組織を経時的に撮影する 4 次元イメージング技術確立する。実験動物モデルにおいて、緑内障手術が惹起する結膜下炎症反応と癒着形成の動態を生体のままで捉え、動的に炎症反応/創傷治癒機転を理解し、その分子メカニズムを解明する。

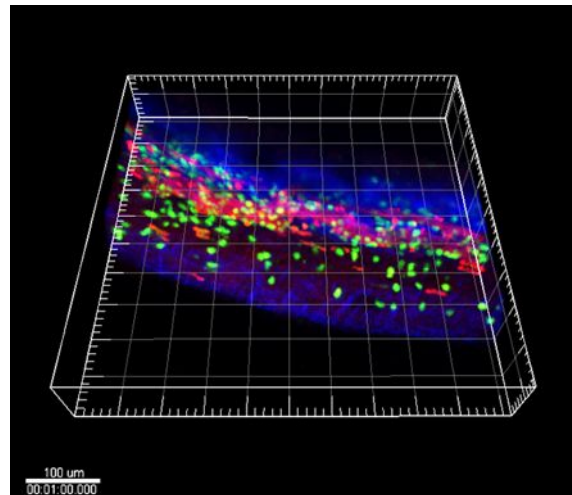
3. 研究の方法

(1) 従来行われてきた摘出した組織を固定、薄切して顕微鏡で観察するという手法 (2 次元イメージング) では、炎症細胞の浸潤を間接的あるいは静的に捉えることは可能であっても、その細胞の起源などの情報は極めて乏しかった。そこで、本研究では、生体組織でライブイメージングを撮像できる 2 光子励起顕微鏡を用いて、生体結膜組織内の細胞を 3 次元的に捉え、かつ時間経過を追う観察方法 (4 次元イメージング) を応用できるか確認し、炎症細胞の経時変化を調査する。

(2) 炎症細胞 (主に好中球) をラベルした Lysosome M-eGFP マウスを用い、結膜下組織を当施設の 2 光子励起顕微鏡を用いて非侵襲的にリアルタイムに観察する。結膜下の炎症細胞の定常状態を観察した後、緑内障術後癒着モデルを作製して、0.5 時間後、3 時間後、6 時間後、1 日後、3 日後の創傷部位の 4 次元イメージングを行い、蛍光ラベルされた細胞の数、遊走スピード、遊走経路などを比較検討する。

4. 研究成果

(1) 2 光子励起顕微鏡 (オリンパス Fluoview FV1000MPE) を用いてマウス眼球に侵襲を加えることなくリアルタイムに結膜下組織を観察するシステムを確立した。インフルレン吸入によって全身麻酔した後に、マウス眼球をスライドガラス上に固定し撮像することで、結膜下の炎症細胞の定常状態および活性化状態の観察が可能であった。対象炎症細胞は eGFP で標識 (主に好中球)、血管はテキサスレッドでラベルした 150kDa デキストラン (Sigma) を静脈内に撮影前に注射することで可視化、強膜の線維は Second Harmonic Generation によって青色で検出可能で、各構成組織・細胞を区別して描出することが可能であった。



(2) 10-0 ナイロン糸をマウス結膜に縫合した結膜侵襲モデルを作製して、無縫合のコントロールと比較検討した。縫合処置後 3 時間の時点で、既に有意な炎症細胞の増加が認められ、その後も時間の経過とともに処置後 3 日目まで細胞数の増加を認めた。一方、炎症細胞の移動速度は、縫合処置後 30 分後には有意な上昇を呈し、その後、3 日目まで移動速度の上昇は維持されたままであった。

本研究を通じて、我々は初めて 2 光子励起顕微鏡を使用することで生体結膜における炎症反応を可視化することに成功した。これらの技術や知見を応用することで、眼組織における炎症環境や創傷治癒機転の更なる理解を深めるとともに、術後炎症修飾ひいてはト

ラベクレクトミーをはじめとする緑内障手術治療の成績改善に寄与する研究成果である。

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 20 件)

Kojima S, Inoue T, Nakashima K, Fukushima A, Tanihara H. Prospective investigation of filtering blebs using three-dimensional anterior-segment optical coherence tomography. *JAMA Ophthalmology*, 113:148-56, 2015. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2014.4489. 査読有.

Kojima S, Inoue T, Kawaji T, Tanihara H. Filtration bleb revision guided by three-dimensional anterior segment optical coherence tomography. *Journal of Glaucoma* 312-315, 2014. doi: 10.1097/IJG.0b013e3182741ee6. 査読有.

Kojima S, Inatani M, Shobayashi K, Haga, A, Inoue T, Tanihara H. Risk factors for hyphema after trabeculectomy with mitomycin C. *Journal of Glaucoma* 23:307-311, 2014. doi: 10.1097/IJG.0b013e3182741c85. 査読有.

Takahara Y, Inatani M, Ogata-Iwao M, Kawai M, Inoue T, Iwao K, Tanihara H. Trabeculectomy for open-angle glaucoma in phakic eyes vs in pseudophakic eyes after phacoemulsification: a prospective clinical cohort study. *JAMA Ophthalmology* 132:69-76, 2014. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2013.5605. 査読有.

Inoue T, Kawaji T, Tanihara H. Monocyte chemotactic protein-1 level in the aqueous humor as a prognostic factor for the outcome of trabeculectomy. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 42:334-341, 2014. doi: 10.1111/ceo.12204. 査読有.

Takahashi E, Inoue T, Fujimoto T, Kojima S, Tanihara H. Epithelial mesenchymal transition-like phenomenon in trabecular meshwork cells. *Experimental Eye Research* 118:72-79, 2014. doi: 10.1016/j.exer.2013.11.014. 査読有.

Kojima S, Inoue T, Kawaji T, Tanihara H. Tear fluid signs associated with filtration blebs, as demonstrated by three-dimensional anterior segment

optical coherence tomography. *Clinical Ophthalmology* 8:767-772, 2014. doi: 10.2147/OPHTH.S59778. 査読有.

Kuroda U, Inoue T, Awai-Kasaoka N, Shobayashi K, Kojima S, Tanihara H. Fornix-based versus limbal-based conjunctival flaps in trabeculectomy with mitomycin C in high-risk patients. *Clinical Ophthalmology* 8: 949-954, 2014. doi: 10.2147/OPHTH.S61342. 査読有.

Kawaji T, Inoue T, Hara R, Eiki D, Ando Y, Tanihara H. Long-term outcomes and complications of trabeculectomy for secondary glaucoma in patients with familial amyloidotic polyneuropathy. *PLoS One* 9:e96324, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0096324. 査読有.

Kawaji T, Inoue T, Matsumura R, Kuroda U, Nakashima K, Tanihara H. Trabeculectomy Bleb Assessment via Three-dimensional Anterior Segment Optical Coherence Tomography. *JSM Ophthalmology* 2: 1020, 2014. 査読有.

Iwao K, Inatani M, Seto T, Takihara Y, Ogata-Iwao M, Okinami S, Tanihara H. Long-term outcomes and prognostic factors for trabeculectomy with mitomycin C in eyes with uveitic glaucoma: a retrospective cohort study. *Journal of Glaucoma* 23: 88-94, 2014. doi: 10.1097/IJG.0b013e3182685167. 査読有.

Goto A, Inatani M, Inoue T, Awai-Kasaoka N, Takihara Y, Ito Y, Fukushima M, Tanihara H. Frequency and risk factors for neovascular glaucoma after vitrectomy in eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Journal of Glaucoma*, 22:572-576, 2013. doi: 10.1097/IJG.0b013e31824d514a. 査読有.

Kameda T, Inoue T, Inatani M, Tanihara H; Japanese Phaco-Goniosynechialysis Multicenter Study Group. Long-term efficacy of goniosynechialysis combined with phacoemulsification for primary angle closure. *Graefe 's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 251:825-830, 2013. doi: 10.1007/s00417-012-2091-8. 査読有.

Tanihara H, Inoue T, Yamamoto T, Kuwayama Y, Abe H, Araie M: K-115 Clinical Study Group. Phase 1 Clinical Trials of a Selective Rho Kinase Inhibitor, K-115.

JAMA Ophthalmology, 131: 1288-1295, 2013. doi: 10.1001/jamaophthol.2013.323. 査読有.

Ogata-Iwao M, Inatani M, Takihara Y, Inoue T, Iwao K, Tanihara H. A prospective comparison between trabeculectomy with mitomycin C and phacotrabeculectomy with mitomycin C. Acta Ophthalmologica, 91:e500-5001, 2013. doi: 10.1111/aos.12133. 査読有.

Awai-Kasaoka N, Inoue T, Kameda T, Fujimoto T, Inoue-Mochita M, Tanihara H. Oxidative stress response signaling pathways in trabecular meshwork cells and their effects on cell viability. Molecular Vision, 19:1332-1340, 2013. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3692401/>. 査読有.

Haga A, Inatani M, Shobayashi K, Kojima S, Inoue T, Tanihara H. Risk factors for choroidal detachment after trabeculectomy with mitomycin C. Clinical Ophthalmology, 7:1417-1421, 2013. doi: 10.2147/OPHT.S46375. 査読有.

Tanihara H, Inoue T, Yamamoto T, Kuwayama Y, Abe H, Araie M for the K-115 Clinical Study Group. Phase 2 randomized clinical study of a Rho kinase inhibitor, K-115, in primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. American Journal of Ophthalmology, 156:731-736, 2013. doi: 10.1016/j.ajo.2013.05.016. 査読有.

Awai-Kasaoka N, Inoue T, Inatani M, Takihara Y, Ogata-Iwao M, Tanihara H. Study on prognostic factor in trabeculectomy with mitomycin C having history of previous glaucoma surgery. Japanese Journal of Ophthalmology, 57:514-519, 2013. doi: 10.1007/s10384-013-0257-5. 査読有.

Inoue T, Kawaji T, Tanihara H. Elevated levels of multiple biomarkers of Alzheimer's disease in the aqueous humor of eyes with open-angle glaucoma. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 54:5353-5358, 2013. doi: 10.1167/iovs.13-12245. 査読有.

[学会発表](計 32 件)

World Ophthalmology Congress (April 2-6, 2014, Tokyo, Japan). Yamamoto T, Tanihara H, Kuwayama Y, Abe H, Inoue T, Araie M for the K-115 Clinical Study Group. Phase 3 randomized clinical study of a Rho

kinase inhibitor, K-115, in primary open-angle glaucoma and ocular hypertension.

World Ophthalmology Congress (April 2-6, 2014, Tokyo, Japan). Tanihara H, Yamamoto T, Kuwayama Y, Abe H, Inoue T, Araie M for the K-115 Clinical Study Group. Phase 3 randomized clinical study of a Rho kinase inhibitor, K-115, in combination with timolol or latanoprost in primary open-angle glaucoma and ocular hypertension.

World Ophthalmology Congress (April 2-6, 2014, Tokyo, Japan). Cho H, Inoue T, Fukushima A, Kojima S, Kee C, Tanihara H. Effects of laser suture lysis on filtration openings: a prospective study by three-dimensional anterior segment optical coherent tomography.

World Ophthalmology Congress (April 2-6, 2014, Tokyo, Japan). Tsutsumi T, Kawaji T, Eiki D, Ideta R, Tanihara H. The incidence of rhegmatogenous retinal detachment in Kumamoto, Japan.

The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 4-8, 2014, Orlando, Florida, USA). Inoue T, Kojima S, Fukushima A, Nakashima K, Tanihara H. Prospective investigation of filtering bleb by three-dimensional anterior-segment optical coherence tomography.

The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 4-8, 2014, Orlando, Florida, USA). Inoue-Mochita M, Inoue T, Fujimoto T, Awai-Kasaoka N, Tanihara H. Effects of p38 inhibitor on TGF- β 2 signal in trabecular meshwork cells.

The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 4-8, 2014, Orlando, Florida, USA). Fujimoto T, Inoue T, Inoue-Mochita M, Tanihara H. Live cell imaging of F-actin in dexamethasone treated trabecular meshwork cells.

The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 4-8, 2014, Orlando, Florida, USA). Ohira S, Inoue T, Tanihara H. Investigation of Multiple Proinflammatory Cytokines in the Aqueous Humor in Eyes with Neovascular Glaucoma.

European Glaucoma Society 2014 (June 7-11, 2014, Nice, France). Inoue T, Kojima S, Fukushima A, Nakashima K, Tanihara H. Prospective investigation of filtering bleb by three-dimensional anterior-segment optical coherence tomography.

European Glaucoma Society 2014 (June 7-11, 2014, Nice, France). Shobayashi K, Inoue T, Kawai M, Tanihara H. Postoperative changes in the aqueous monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) level after trabeculectomy vs. Ex-PRESS shunt.

European Glaucoma Society 2014 (June 7-11, 2014, Nice, France). Kojima S, Inoue T, Tanihara H. Immune cell dynamics around the subconjunctival tissue after injury by four dimensional in vivo imaging.

European Glaucoma Society 2014 (June 7-11, 2014, Nice, France). Fujimoto T, Inoue T, Inoue-Mochita M, Tanihara H. Live cell imaging of F-actin in dexamethasone treated trabecular meshwork cells.

American Academy of Ophthalmology 2014 (October 18 - 21, Chicago, USA). Kawaji T, Fukushima M, Tanihara H. Sutureless intrascleral fixation of posterior chamber intraocular lens: simpler technique and 1-year follow-up.

第 118 回日本眼科学会総会 (平成 26 年 4 月 2 日～6 日. 東京国際フォーラム. 東京). 井上みゆき、井上 俊洋、藤本智和、笠岡奈々子、谷原 秀信: 線維柱帯細胞内 TGF- β 2 シグナルに対する ROCK 阻害剤および p38 阻害剤の影響.

第 118 回日本眼科学会総会 (平成 26 年 4 月 2 日～6 日. 東京国際フォーラム. 東京). 大平さおり、井上 俊洋、谷原 秀信: ぶどう膜炎緑内障において背景因子が房水サイトカイン濃度に与える影響の検討.

第 68 回日本臨床眼科学会 (平成 26 年 11 月 13 日～16 日. ポートピアホテル/神戸国際展示場. 神戸). 谷原秀信, 井上俊洋, 山本哲也, 桑山泰明, 阿部春樹, 菅波秀規, 新家真, K-115 Clinical Study Group: Rho キナーゼ阻害薬リパスジル(K-115)の単独・併用療法での眼圧下降効果.

第 68 回日本臨床眼科学会 (平成 26 年 11 月 13 日～16 日. ポートピアホテル/神戸国際展示場. 神戸). 小島祥, 井上俊洋, 中島圭

一, 福島亜矢子, 谷原秀信: 3D AS-OCT を用いたトラベクレクトミー術後濾過胞の経時的变化の前向き解析.

第 68 回日本臨床眼科学会 (平成 26 年 11 月 13 日～16 日. ポートピアホテル/神戸国際展示場. 神戸). 中島圭一, 井上俊洋, 谷原秀信: 3次元前眼部 OCT による oozing を伴う濾過胞内部構造の検討.

The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 5-9, 2013, Seattle, Washington, USA). Inoue T, Tanihara H. Investigation of Multiple Proinflammatory Cytokines in the Aqueous Humor in Eyes with Secondary Glaucoma.

The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 5-9, 2013, Seattle, Washington, USA). Kojima S, Inoue T, Nakashima K, Fukushima A, Tanihara H. Short-term prospective investigation of filtering bleb by three dimensional anterior-segment optical coherence tomography.

21 The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 5-9, 2013, Seattle, Washington, USA). Inoue-Mochita M, Inoue T, Fujimoto T, Awai-Kasaoka N, Tanihara H. Identification of TGF- β 2-induced proinflammatory cytokines secreted from cultured trabecular meshwork cells.

22 The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 5-9, 2013, Seattle, Washington, USA). Nakashima K, Inoue T, Fukushima A, Hirakawa S, Kawaji T, Tanihara H. Evaluation of filtering blebs with transconjunctival oozing by anterior segment optical coherence tomography.

23 The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 5-9, 2013, Seattle, Washington, USA). Takahashi E, Inomata Y, Kawaji T, Ito Y, Tanihara H. Epithelial Mesenchymal Transition and Human Vitreous Samples in 2D and 3D culture of ARPE-19 cells.

24 The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 5-9, 2013, Seattle, Washington, USA). Kawaji T, Inoue T, Matsumura R, Kuroda Y, Nakashima K, Tanihara H. Trabeculectomy bleb assessment via

three-dimensional anterior segment optical coherence tomography.

25 World Glaucoma Congress 2013 (July 17-20, 2013, Vancouver, Canada). Inoue T, Tanihara H. Investigation of Multiple Proinflammatory Cytokines in the Aqueous Humor in Eyes with Secondary Glaucoma.

26 World Glaucoma Congress 2013 (July 17-20, 2013, Vancouver, Canada). Kojima S, Inoue T, Nakashima K, Fukushima A, Tanihara H. Short-term prospective investigation of filtering bleb by three dimensional anterior-segment optical coherence tomography.

27 World Glaucoma Congress 2013 (July 17-20, 2013, Vancouver, Canada). Fujimoto T, Inoue T, Inoue-Mochita M, Kasaoka N, Shobayashi K, Tanihara H. Visualization of actin filament using time-lapse fluorescent microscopy in trabecular meshwork cells.

28 World Glaucoma Congress 2013 (July 17-20, 2013, Vancouver, Canada). Hirakawa S, Kojima S, Inoue T, Tanihara H. A short-term efficacy and safety of brimonidine 0.1% as fourth-line therapy in open-angle glaucoma subjects.

29 第 117 回日本眼科学会総会 (平成 25 年 4 月 4 日～7 日. 東京国際フォーラム. 東京). 笠岡奈々子, 井上俊洋, 亀田隆範, 藤本智和, 井上みゆき, 谷原秀信: 線維柱帯細胞において ROCK 阻害薬が酸化ストレスに与える影響.

30 第 67 回日本臨床眼科学会 (平成 25 年 10 月 31 日～11 月 3 日. パシフィコ横浜. 神奈川). 笠岡奈々子, 井上俊洋, 稲谷大, 谷原秀信: トラベキュlectミー術後のラタノプロスト点眼薬による眼圧下降効果の検討.

31 第 67 回日本臨床眼科学会 (平成 25 年 10 月 31 日～11 月 3 日. パシフィコ横浜. 神奈川). 平川沙織, 井上俊洋, 小島祥, 笠岡奈々子, 正林耕平, 大平さおり, 高橋枝里, 谷原秀信: 開放隅角緑内障における緑内障点眼 4 剤目としてのプリモニジン点眼液の効果.

32 第 67 回日本臨床眼科学会 (平成 25 年 10 月 31 日～11 月 3 日. パシフィコ横浜. 神奈川). 福島亜矢子, 井上俊洋, 坪井尚子, 岩尾美奈子, 平川沙織, 小島祥, 笠岡奈々子, 正林耕平, 大平さおり, 高橋枝里, 稲谷大, 谷原秀信: 開放隅角緑内障における緑内障点眼薬配合剤への切り替え効果の前向き検討.

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学大学院生命科学研究部眼科学分野
研究業績

[http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/ganka/
kyousitu/gyouseki.html](http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/ganka/kyousitu/gyouseki.html)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

谷原 秀信 (TANIHARA HIDENOBU)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号 : 60217148