

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462664

研究課題名(和文) 房水流出路の4次元イメージングと緑内障病態における動的変化に関する研究

研究課題名(英文) A study relating to 4-dimensional imaging of aqueous outflow route and its dynamics in glaucoma pathology

研究代表者

井上 俊洋 (Inoue, Toshihiro)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00317025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新しいイメージング技術を用いて房水流出路組織における眼圧調節に関わる分子メカニズムを解明することを目的とした。2光子顕微鏡を用いた角膜輪部付近の撮影によって、前房とシュレム管と思われる部位を確認することが出来た。また強膜のコラーゲン線維も観察可能であった。条件検討を行ったが、画像のシグナル/ノイズ比の改善は困難だった。細胞実験ではデキサメサゾン刺激によって線維柱帯細胞におけるアクチン細胞骨格が変わることをライブイメージングで確認することができ、その細胞が細胞遊走能に乏しいことを初めて証明した。またデキサメサゾンは線維柱帯細胞の貪食を低下させるが、ROCK阻害剤では貪食が増加することがわかった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the molecular mechanisms relating to the regulation of intraocular pressure in aqueous outflow tissue using novel imaging techniques. Observation of tissue around corneal limbus by two-photon microscopy depicted area which was supposed to be anterior chamber and Schlemm's canal. Collagen fibers in sclera were also imaged successfully. Despite of the consideration of imaging conditions, it was difficult to improve the signal/noise ratio of the images. In in vitro experiments, we could perceive the changes in actin cytoskeleton in trabecular meshwork cells after dexamethasone treatment, and firstly found decreased migration activity of the treated cells. Moreover, it was clarified that dexamethasone decreased phagocytic activity of trabecular meshwork cells, while ROCK inhibitor increased the activity.

研究分野：眼科学分野

キーワード：線維柱帯 緑内障 眼圧 房水 イメージング

1. 研究開始当初の背景

緑内障は我が国において有病率が高く、他の先進国と同様に失明原因の上位を占めるため、その病態解明と治療成績改善は社会的急務である。エビデンスに基づいた唯一確実な緑内障治療法は眼圧を下降することである。緑内障では房水流出抵抗上昇が眼圧上昇に寄与している。近年、ROCK 阻害薬などのアクチン細胞骨格制御薬が房水流出抵抗を減弱させることによって眼圧を下降させ、緑内障の治療薬となりうる事が明らかとなり、房水流出主経路である線維柱帯およびシュレム管の収縮・弛緩を伴うダイナミックな房水流出制御が注目されていたが、その動的変化を vivo で捉えた研究はそれまでになかった。

2. 研究の目的

2 光子顕微鏡という新しいツールを用いた in vivo イメージングの経験を房水流出組織の観察に応用し房水流出組織の 4 次元イメージングを行うとともに、in vitro イメージングの手法を併用し、眼圧調節機構に関わる分子メカニズムを解明すること。

3. 研究の方法

(1) 2 光子顕微鏡撮影の、組織毒性が弱く深達度が高いという特性を生かし、さらに SHG によるコラーゲン線維の可視化を組み合わせる 4 次元イメージングを行った。ラットの摘出眼の前房にマイクロニードルを刺入し、緑色の蛍光色素を定圧で灌流した。角膜および結膜上皮は Hoechst によって核染色をおこなった。これを 2 光子顕微鏡にセットし角膜輪部付近の撮影を行った。

(2) 線維柱帯細胞の機能を視覚化するために GFP でラベルしたアクチンを導入し、タイムラプス顕微鏡を用いてライブイメージングを行い、デキサメサゾン刺激に伴うアクチン細胞骨格の変化を観察した。

(3) 線維柱帯細胞の培地を一晩無血清とし、その後各種薬剤とともに蛍光マイクロビーズを培地に加え、1-2 時間培養した。その後 wash out して細胞外のビーズを抗体標識し、蛍光顕微鏡で写真撮影し、1 細胞あたりの取り込数をオートカウンターにてカウントした。刺激薬剤は、デキサメサゾン、ROCK 阻害薬で

4. 研究成果

(1) 2 光子顕微鏡を用いて角膜輪部付近の撮影を行ったところ、緑色に染まる前房とシュレム管と思われる部位を確認することが出来た。また強膜のコラーゲン線維も観察可能であった。しかしながら蛍光のみを映し出すモニターの断面図からシュレム管と思われる部位を同定することは困難で、得られた画像も詳細な解析が可能なレベルには至っていなかった。蛍光試薬濃度、励起光の強さ、対物レンズの種類等の調節によってノイズ/

シグナル比のより低い条件を検討したが、改善にいたらなかった。

(2) デキサメサゾン刺激によって線維柱帯細胞におけるアクチン細胞骨格の構造が変わり、クロスリンクアクチンネットワーク (CLAN) を形成することが確認された。これまで固定した細胞の CLAN を観察した報告はあったが、ライブイメージングによる CLAN 形成の確認は我々が初めてであった。ライブイメージングによって CLAN は刻々と形態を変え、形成と消失を繰り返す例もあることが分かった。また、デキサメサゾン刺激によって CLAN が形成されることと、細胞遊走が低下することは報告されていたが、この 2 つの現象を直接結びつけるデータは得られていなかった。我々はライブイメージングを用いることで、CLAN を形成した細胞が細胞遊走能に乏しいことを初めて証明した。さらに、Rho-kinase inhibitor (Y-27632) によるアクチンの脱重合化現象も、同様の方法でライブイメージングが可能であった。

(3) プタ線維柱帯細胞を用いた実験では 100nM デキサメサゾン刺激によってコントロールと比較して貪食が低下する傾向にあった。一方で、2.5、10、25 μ M の Y-27632 で処理したところ、25mM の濃度で貪食が有意に増加した。一方で、MCP-1、TGF- β 2 でも刺激を行なったが、有意な変化はみとめられなかった。ヒト線維柱帯細胞由来の TM-3 を用いた同様の実験では、100nM デキサメサゾンによって貪食が低下する傾向があり、10 および 25 μ M の Y27632 で有意に貪食が増加した。以上のことから、デキサメサゾンは線維柱帯細胞の貪食を低下させ、ROCK 阻害薬は逆にこれを向上させることが示唆された。

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 22 件)

1) Futakuchi A, Inoue T, Fujimoto T, Kuroda U, Inoue-Mochita M, Takahashi E, Ohira S, Tanihara H. Molecular mechanisms underlying the filtration bleb-maintaining effects of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). **Investigative Ophthalmology & Visual Sciences**, 2017;58(4):2421-2429. doi: 10.1167/iovs.16-21403. 査読あり

2) Matsumoto M, Inoue T, Kojima S, Nakashima KI, Fukushima A, Tanihara H. Prospective observation of filtration blebs in high-risk eyes with limbal-based conjunctival flap. **Canadian Journal of Ophthalmology**, 2016; 51:431-437. doi: 10.1016/j.cjco.2016.05.019. 査読あり

3) Tsutsumi T, Iwao K, Hayashi H, Kirihara T, Kawaji T, Inoue T, Hino S, Nakao M, Tanihara H. Potential Neuroprotective Effects of an LSD1 Inhibitor in Retinal Ganglion Cells via p38 MAPK Activity. **Investigative Ophthalmology**

- & **Visual Sciences**, 2016; 57:6461-6473. doi: 10.1167/iovs.16-19494. 査読あり
- 4) Fujimoto T, Inoue T, Maki K, Inoue-Mochita M, Tanihara H. Vascular Endothelial Growth Factor-A Increases the Aqueous Humor Outflow Facility. **PLoS One**, 2016; 11:e0161332. doi: 10.1371/journal.pone.0161332. 査読あり
- 5) Futakuchi A, Inoue T, Fujimoto T, Inoue-Mochita M, Kawai M, Tanihara H. The effects of ripasudil (K-115), a Rho kinase inhibitor, on activation of human conjunctival fibroblasts. **Experimental Eye Research**, 2016; 149:107-115. doi: 10.1016/j.exer.2016.07.001. 査読あり
- 6) Nishizawa A, Inoue T, Ohira S, Takahashi E, Saruwatari J, Iwao K, Tanihara H. The Influence of Phacoemulsification on Surgical Outcomes of Trabeculectomy with Mitomycin-C for Uveitic Glaucoma. **PLoS One**, 2016; 11:e0151947. doi: 10.1371/journal.pone.0151947. 査読あり
- 7) Kojima S, Inoue T, Kikuta J, Furuya M, Koga A, Fujimoto T, Ueta M, Kinoshita S, Ishii M, Tanihara H. Visualization of Intravitreal Immune Cell Dynamics After Conjunctival Surgery Using Multiphoton Microscopy. **Investigative Ophthalmology & Visual Sciences**, 2016; 57:1207-1212. doi: 10.1167/iovs.15-18507. 査読あり
- 8) Fujimoto T, Inoue T, Inoue-Mochita M, Tanihara H. Live cell imaging of actin dynamics in dexamethasone-treated porcine trabecular meshwork cells. **Experimental Eye Research**, 2016; 145:393-400. doi: 10.1016/j.exer.2016.02.007. 査読あり
- 9) Kaneko Y, Ohta M, Inoue T, Mizuno K, Isobe T, Tanabe S, Tanihara H. Effects of K-115 (Ripasudil), a novel ROCK inhibitor, on trabecular meshwork and Schlemm's canal endothelial cells. **Scientific Reports**, 2016; 6:19640. doi: 10.1038/srep19640. 査読あり
- 10) Ohira S, Inoue T, Iwao K, Takahashi E, Tanihara H. Factors Influencing Aqueous Proinflammatory Cytokines and Growth Factors in Uveitic Glaucoma. **PLoS One**, 2016; 11:e0147080. doi: 10.1371/journal.pone.0147080. 査読あり
- 11) Shobayashi K, Inoue T, Kawai M, Iwao K, Ohira S, Kojima S, Kuroda U, Nakashima K, Tanihara H. Postoperative Changes in Aqueous Monocyte Chemotactic Protein-1 Levels and Bleb Morphology after Trabeculectomy vs. Ex-PRESS Shunt Surgery. **PLoS One**, 2015; 10:e0139751. doi: 10.1371/journal.pone.0139751. 査読あり
- 12) Tanihara H, Inoue T, Yamamoto T, Kuwayama Y, Abe H, Fukushima A, Suganami H, Araie M; K-115 Clinical Study Group.. One-year clinical evaluation of 0.4% ripasudil (K-115) in patients with open-angle glaucoma and ocular hypertension. **Acta Ophthalmologica**, 2016; 94:e26-34. doi: 10.1111/aos.12829. 査読あり
- 13) Takihara Y, Inatani M, Eto K, Inoue T, Kreymerman A, Miyake S, Ueno S, Nagaya M, Nakanishi A, Iwao K, Takamura Y, Sakamoto H, Satoh K, Kondo M, Sakamoto T, Goldberg JL, Nabekura J, Tanihara H. In vivo imaging of axonal transport of mitochondria in the diseased and aged mammalian CNS. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, 2015; 112:10515-10520. doi: 10.1073/pnas.1509879112. 査読あり
- 14) Cho HK, Kojima S, Inoue T, Fukushima A, Kee C, Tanihara H. Effect of laser suture lysis on filtration openings: a prospective three-dimensional anterior segment optical coherence tomography study. **Eye**, 2015; 29:1220-1225. doi: 10.1038/eye.2015.129. 査読あり
- 15) Ohira S, Inoue T, Shobayashi K, Iwao K, Fukushima M, Tanihara H. Simultaneous increase in multiple proinflammatory cytokines in the aqueous humor in neovascular glaucoma with and without intravitreal bevacizumab injection. **Investigative Ophthalmology & Visual Sciences**, 2015; 56:3541-3548. doi: 10.1167/iovs.14-15918. 査読あり
- 16) Tanihara H, Inoue T, Yamamoto T, Kuwayama Y, Abe H, Suganami H, Araie M; K-115 Clinical Study Group.. Additive Intraocular Pressure-Lowering Effects of the Rho Kinase Inhibitor Ripasudil (K-115) Combined with Timolol or Latanoprost: A Report of 2 Randomized Clinical Trials. **JAMA Ophthalmology**, 2015; 133:755-761. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2015.0525. 査読あり
- 17) Inoue-Mochita M, Inoue T, Fujimoto T, Kameda T, Awai-Kasaoka N, Ohtsu N, Kimoto K, Tanihara H. p38 MAP kinase inhibitor suppresses transforming growth factor- β -induced type 1 collagen production in trabecular meshwork cells. **PLoS One**, 2015; 10:e0120774. doi: 10.1371/journal.pone.0120774. 査読あり
- 18) Nakashima K, Inoue T, Fukushima A, Hirakawa S, Kojima S, Tanihara H. Evaluation of filtering blebs exhibiting transconjunctival oozing using anterior segment optical coherence tomography. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, 2015; 253:439-445. doi: 10.1007/s00417-014-2872-3. 査読あり
- 19) Tanihara H, Inoue T, Yamamoto T, Kuwayama Y, Abe H, Suganami H, Araie M; K-115 Clinical Study Group.. Intra-ocular pressure-lowering effects of a Rho kinase inhibitor, ripasudil (K-115), over 24 hours in primary open-angle glaucoma and ocular hypertension: a randomized, open-label, crossover study. **Acta Ophthalmologica**, 2015; 93:e254-260. doi: 10.1111/aos.12599. 査読あり
- 20) Kojima S, Inoue T, Nakashima K, Fukushima

A, Tanihara H. Filtering blebs using 3-dimensional anterior-segment optical coherence tomography: a prospective investigation. **JAMA Ophthalmology**, 2015; 133:148-156. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2014.4489. 査読あり

21) 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**, 2014; 9:e96324. doi: 10.1371/journal.pone.0096324. 査読あり

22) 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**, 2014; 8:767-772. doi: 10.2147/OPHTH.S59778. 査読あり

[学会発表](計 25 件)

1)12th European Glaucoma Society (EGS) Congress (June 19-22, 2016, Prague, Czech Republic). Inoue T., Inoue-Mochita, M, Fujimoto T, Tanihara H. Effects of interleukin (IL)-6 signaling activity on fibrogenic activity of human trabecular meshwork cells.

2) The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 1-5, 2016, Seattle, Washington, USA) Inoue T., Inoue-Mochita, M, Fujimoto T, Tanihara H. Effects of interleukin (IL)-6 signaling activity on fibrogenic activity of human trabecular meshwork cells.

3) The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 1-5, 2016, Seattle, Washington, USA) Fujimoto T, Inoue T., Kei Maki, Inoue-Mochita M, Kojima S, Tanihara H. Vascular endothelial growth factor-A increases aqueous humor outflow facility.

4) The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 1-5, 2016, Seattle, Washington, USA) Kojima S, Inoue T., Fujioto T, Tanihara H. Four-dimensional imaging revealed influences of monocyte chemoattractant protein-1 on immune cell dynamics in the subconjunctival tissue.

5) The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 1-5, 2016, Seattle, Washington, USA) Futakuchi A, Inoue T., Fujimoto T, Inoue-Mochita M, Tanihara H. Effects of ripasudil (K-115), a Rho kinase inhibitor, on the activation of human conjunctival fibroblasts.

6) 31st Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress (APAO) (March 24-27, 2016, Taipei, Taiwan) Inoue T., Ohira S, Kawaji T, Tanihara H. Proinflammatory cytokine levels in the aqueous humor of secondary glaucoma patients with

familial amyloidotic polyneuropathy.

7) 31st Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress (APAO) (March 24-27, 2016, Taipei, Taiwan) Kojima S, Inoue T., Ohira S, Iwao K, Tanihara H. Elevated levels of interleukin-6 in the aqueous humor in primary open-angle glaucoma patients required repeat trabeculectomy.

8) XXXIII Congress of the European Society of Cataract & Refractive Surgeons (ESCRS) (Septembr 5-9, 2015, Barcelona, Spain). Nishizawa A, Takahashi E, Ohira S, Iwao K, Inoue T., Tanihara H. The effect of phacoemulsification on failure of trabeculectomy in uveitic glaucoma patients.

9) XXXIII Congress of the European Society of Cataract & Refractive Surgeons (ESCRS) (Septembr 5-9, 2015, Barcelona, Spain). Iwao K, Nishizawa A, Inoue T., Tanihara H. Impact of phacoemulsification on postoperative IOP after MMC trabeculectomy for uveitic glaucoma.

10) The 6th World Glaucoma Congress (June 6-9, 2015, Hong Kong, China). Inoue T. Imaging for glaucoma Diagnosis and Monitoring: New Idea from Asia, Impact of anterior segment OCT on bleb evaluation.

11) The 6th World Glaucoma Congress (June 6-9, 2015, Hong Kong, China). Inoue T. Rho kinase inhibitors as a new glaucoma medication: The role of actomyosin system in regulating aqueous outflow.

12) The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 3-7, 2015, Denver, Colorado, USA). Futakuchi A, Inoue T., Fujimoto T, Kuroda U, Inoue-Mochita M, Takahashi E, Shobayashi K, Ohira S, Tanihara H. Histone deacetylase inhibitor attenuates TGF- β 2 induced human conjunctival fibroblast activation.

13) The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 3-7, 2015, Denver, Colorado, USA). Fujimoto T, Inoue T., Maki K, Inoue-Mochita M, Kojima S, Tanihara H. The effect of VEGF-A on trabecular meshwork and Schlemm's cannal endothelial cells permeability.

14) The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 3-7, 2015, Denver, Colorado, USA). Matsubara K, Takahashi E, Haga A, Tanihara H. TGF- β -activated kinase 1 is essential for tumor necrosis factor- α -induced epithelial mesenchymal transition in ARPE-19 cells.

15) The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (May 3-7, 2015, Denver, Colorado, USA). Takahashi E, Haga A, Tanihara H. Merlin regulated hyaluronan endocytosis and epithelial mesenchymal transition in ARPE-19 cells.

16) XXI International Society for Eye Research

(ISER) Biennial Meeting (July 20-24, 2014, San Francisco, USA). Inoue T. Effect of Inflammatory Cytokines on Aqueous Outflow.

17) 11th European Glaucoma Society (EGS) Congress (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.

18) 11th European Glaucoma Society (EGS) Congress (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.

19) 11th European Glaucoma Society (EGS) Congress (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.

20) 11th European Glaucoma Society (EGS) Congress (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.

21) 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.

22) 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.

23) 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.

24) 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.

25) 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.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔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/gyouuseki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 俊洋 (INOUE, Toshihiro)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00317025

(2) 研究分担者

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