

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 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：26462693

研究課題名(和文) 網膜再生にかかわる傷害組織再構築を制御する細胞間相互作用に関する研究

研究課題名(英文) Study on mechanism controlling injury tissue remodeling related to retinal regeneration

研究代表者

福島 美紀子 (Fukushima, Mikiko)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：10284770

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)：網膜再生治療に関わる組織修復過程に誘導される細胞と分子シグナルについて解析した。視神経傷害モデルにおいて傷害組織に誘導されるミクログリアの特性と機能、貪食に関わる分子シグナルを明らかにした。眼疾患サンプルを用いた解析により疾患で異なる生理活性物質の発現と網膜疾患の硝子体液の網膜色素上皮細胞に対する形質転換誘導作用が認められた。組織線維化を制御する分子メカニズムの一つとしてエピジェネティックな制御機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated cellular and molecular mechanisms concerned with tissue damage and fibrosis. 1. Characteristics and functions of microglia induced in injured tissue in the optic nerve crush model, and related molecular signals were clarified. 2. Cytokines and growth factor in aqueous humor samples were increased in patients with uveitic and neovascular glaucoma. In retinal pigment cell culture analysis, vitreous samples in patients with retinal detachment and epimacular membrane induced epithelial-transformation. 3. Epigenetic modification was revealed as one of the molecular mechanisms that controls tissue fibrosis.

研究分野：眼科学

キーワード：眼科学 組織再生

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)糖尿病網膜症、緑内障、加齢黄斑変性は本邦の失明原因の上位にあり、患者数は増加の一途にある。既に重篤な状態に陥り、機能喪失に至った網膜疾患に関する有効な治療法は現時点ではない。難治網膜疾患に対する根本治療として移植再生治療が国内外で注目されている。

(2)神経再生治療において移植細胞が病的組織内で機能を再生するためには生着し適切なニューロンに分化、シナプスを形成することが必要である。傷害された神経組織には再生を抑制する細胞分子シグナルの存在が報告されておりその制御機構の解明が重要である。癒痕化形成にはグリア、炎症細胞、組織の上皮化再生治療の臨床応用に向けた基盤研究として本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

移植再生治療において移植生着、機能発現に影響を与える組織修復、癒痕化の分子メカニズムを解析し、その制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)視神経傷害時網膜内に誘導されるミクログリアの機能・病態解析：成体ラットに視神経挫滅傷害モデルを作成し、発現するミクログリアのサブタイプを免疫組織学的方法で解析した。新生仔ラット脳よりタイプ1、タイプ2ミクログリアを単離し軸索断片の貪食能を *in vitro* で評価した。さらに Lipopolysaccharide (LPS), interferon (IFN)- γ , interleukin (IL) 4 を添加しその影響をみた。*in vitro* において LPS, IL 4 処理下での傷害視神経の軸索の断片化を観察し、ミクログリア貪食能への影響を解析した。

(2)疾患サンプルにおける生理活性物質の探索：白内障、緑内障手術時に前房水、硝子体液を採取しサンプル中の生理活性物質の濃度をマルチプレックスイムノアッセイにより測定した。

(3)硝子体液中の生理活性の探索 培養色素上皮細胞を用いて細胞分化、形質転換への影響を検討した。網膜剥離、黄斑上膜、黄斑円孔の手術時得られた硝子体液をヒト由来網膜色素細胞の培養液に転化し、形質転換に関わる TGF β 細胞内シグナルの発現についてウエスタンブロット法を用いて検討した。創傷治癒アッセイ(wound healing assays) に硝子体サンプル液を添加し網膜色素上皮遊走能への影響をみた。

(4)線維化におけるエピジェネティック制御の解析：TGF β 刺激で誘導される上皮形質転換におけるヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の影響を Gene ontology analysis で探索した。阻害薬添加し TGF β シグナル分子、 α -平滑筋アクチン、および細胞外マトリックスタンパク質の発現をウエスタンブロットで、上清のサイトカイン濃度をマルチプレックスイムノアッセイで測定した。さら

にチューブ形成アッセイを用いて血管新生への影響を解析した。

4. 研究成果

(1)視神経傷害時網膜内に誘導されるミクログリアの機能・病態解析：ラット視神経傷害部位に傷害7~21日後 Iba1 陽性細胞(タイプ1、2ミクログリア)の発現増加がみられた。

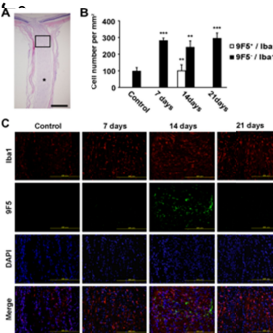


図1 視神経傷害部位におけるミクログリアの発現

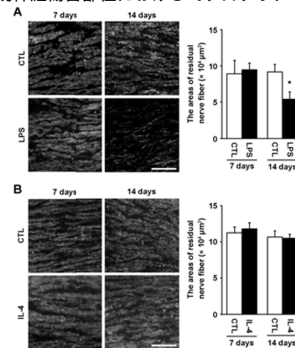


図2 視神経傷害における LPS, IL4 の影響

9F5 陽性細胞(タイプ1ミクログリア)は傷害14日目のみで観察された。LPS投与により軸索の断片化は減少、IL4投与では残存していた。単離したミクログリアで *in vitro* はタイプ1ミクログリアでは LPS, INF γ により貪食能の増強と stat6 シグナルの活性化がみられ IL4 添加で抑制された。タイプ2ミクログリアでは LPS, INF γ による貪食能の亢進に stat6 シグナルの変動はみられなかった。視神経傷害におけるミクログリアの貪食機能を解析し、タイプの異なる2つのミクログリアにおいて性質と細胞内シグナルの違いがあることを明らかにした。

(2)疾患サンプルにおける生理活性物質の探索：前房水中の生理活性物質の濃度を、緑内障、白内障手術症例で測定し、眼内炎症を有するぶどう膜炎症例、血管新生緑内障症例、原発解放隅角緑内障(POAG)症例、白内障症例と比較した。ぶどう膜炎症例では POAG 症例と比較して炎症性サイトカインである interleukin (IL)-6, IL-8, monocyte chemotactic protein (MCP)-1, tumor necrosis factor (TNF)- α , と vascular endothelial growth factor(VEGF) の濃度が高く、白内障症例と比較すると IL-6, MCP-1, VEGF の濃度が高かった。ぶどう膜炎症例間で比較すると白

内障手術の既往眼では IL-6, IL-8, MCP-1, platelet-derived growth factor (PDGF)-AB/BB の濃度、前房内炎症細胞を有する症例では IL-8, TNF- α , PDGF-AB/BB 濃度が高く、感染性ぶどう膜炎では PDGF-AB/BB 濃度が高かった。TGF- β 2 濃度は MCP-1 と TNF- α で負の相関があった。血管新生緑内障症例では IL6, IL8, MCP-1, TNF- α , PDGF-AA が白内障群 POAG 群より高値であった。抗 VEGF 抗体薬 Bevacizumab 投与した血管新生緑内障では VEGF のみが有意に低下した。ブタ虹彩上皮培養上清中の IL 8, MCP-1 濃度は hypoxia で上昇され Bevacizumab 添加でも抑制されなかった。

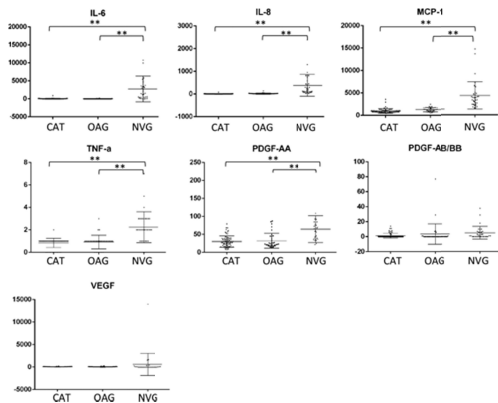


図3 各疾患における前房水生理活性物質濃度の比較

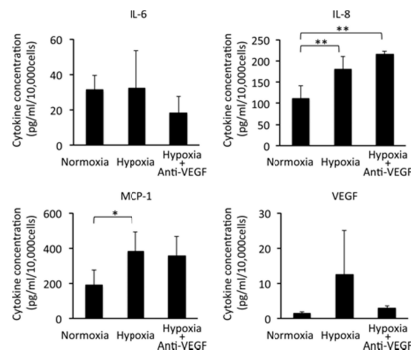


図4 虹彩色素上皮培養上清におけるサイトカイン濃度
疾患により炎症性サイトカインのみならず様々な生理活性物質の発現の違いがあることが判った。生理活性物質の発現に関わる制御機構の更なる探索と他の疾患における眼内液性因子の解析が必要であることが示唆された。

(3) 硝子体液中の生理活性の探索: 培養ヒト網膜色素上皮細胞に網膜疾患の硝子体手術中に得られた硝子体サンプルを添加し TGF- β 細胞内シグナルの発現変化をみたところ、黄斑上膜において p38MAPK の上昇が認められた。擦過刺激を加えると硝子体サンプルの濃度依存性に smad2 リン酸化の上昇を認めた。網膜剥離、黄斑上膜の硝子体液添加により擦過刺激による p38MAPK, NF- κ B の活性化が認められた。網膜色素細胞の3次元培養において網膜剥離由来の硝子体液添加により浸潤形態への転換誘導が認められた。

網膜疾患の硝子体液内には上皮転換誘導に関わる生理活性物質が含まれていることが示唆された。

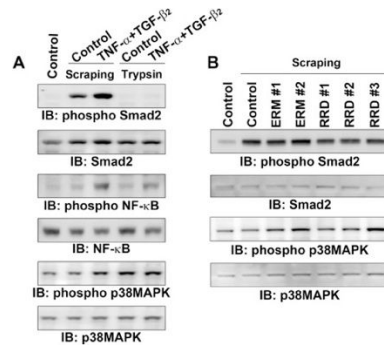


図5 硝子体サンプル添加による TGF- β シグナルの活性化増強効果

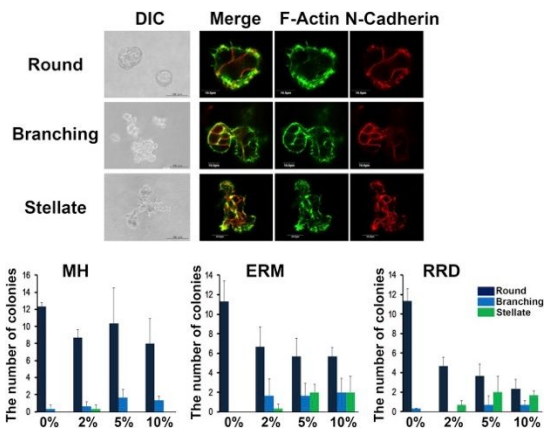


図6 硝子体サンプル添加による網膜色素上皮細胞の3次元培養
(4)線維化におけるエピジェネティック制御の解析: ヒト結膜上皮細胞の TGF- β による線維化形成、上皮形質転換に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害薬、スベロイルアニリドヒドロキサム酸スベロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA)の効果を経験子発現、TGF- β シグナル、 α -平滑筋アクチン、および細胞外マトリック産生、サイトカイン産生、血管新生能について解析し、抑制効果を確認した。た。線維化形成におけるエピジェネティック制御の分子メカニズムを明らかにした。

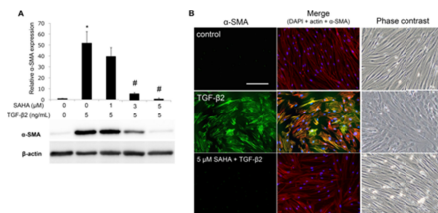


図7 SAHA の SMA 発現抑制効果

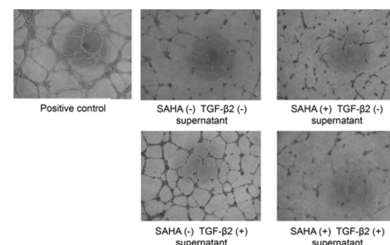


図8 SAHA の血管新生抑制効果

<引用文献>

Haga A, Takahashi E, Inomata Y, Kawahara K, Tanihara H. Differentiated Expression Patterns and Phagocytic Activities of Type 1 and 2 Microglia. Invest Ophthalmol Vis Sci. 57:2814-23, 2016.

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. Invest Ophthalmol Vis Sci. 56:3541-8, 2016.

Takahashi E, Fukushima A, Haga A, Inomata Y, Ito Y, Fukushima M, Tanihara H. Effects of mechanical stress and vitreous samples in retinal pigment epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 470(3):569-74, 2016.

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). Invest Ophthalmol Vis Sci. 58:2421-2429, 2017.

doi: 10.1167/iovs.16-21403.

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 9件)

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). Invest Ophthalmol Vis Sci. 58:2421-2429, 2017. 査読有 . doi: 10.1167/iovs.16-21403.

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. Invest Ophthalmol Vis Sci. 57:6461-6473, 2016. 査読有 . doi: 10.1167/iovs.16-19494.

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. Exp Eye Res. 149:107-15, 2016. 査読有 .

doi: 10.1016/j.exer.2016.07.001.

Haga A, Takahashi E, Inomata Y, Kawahara K, Tanihara H. Differentiated Expression Patterns and Phagocytic Activities of Type 1 and 2 Microglia. Invest Ophthalmol Vis Sci. 57:2814-23, 2016. 査読有 . doi: 10.1167/iovs.15-18509.

Kojima S, Inoue T, Kikuta J, Furuya M, Koga A, Fujimoto T, Ueta M, Kinoshita S, Ishii M, Tanihara H. Visualization of Intravital Immune Cell Dynamics After Conjunctival Surgery Using Multiphoton Microscopy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 57:1207-12, 2016. 査読有 . doi: 10.1167/iovs.15-18507.

Takahashi E, Fukushima A, Haga A, Inomata Y, Ito Y, Fukushima M, Tanihara H. Effects of mechanical stress and vitreous samples in retinal pigment epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 470(3):569-74, 2016. 査読有 . doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.104.

Ohira S, Inoue T, Iwao K, Takahashi E, Tanihara H. Factors Influencing Aqueous Proinflammatory Cytokines and Growth Factors in Uveitic Glaucoma. PLoS One. 11: e0147080, 2016. 査読有 . doi: 10.1371/journal.pone.0147080.

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. Invest Ophthalmol Vis Sci. 56:3541-8, 2016. 査読有 . doi: 10.1167/iovs.14-15918.

Takahashi E, Haga A, Tanihara H. Merlin Regulates Epithelial-to-Mesenchymal Transition of ARPE-19 Cells via TAK1-p38MAPK-Mediated Activation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 56(4):2449-58, 2015. 査読有 . doi: 10.1167/iovs.14-16300.

[学会発表](計 4件)

Ohira S, Inoue T, Tanihara H. Investigation of multiple proinflammatory cytokines in the aqueous humor in eyes with neovascular glaucoma. ARVO annual meeting 2014. 2014年5月4日～5月8日オーランド(米国)

Futakuchi A, Inoue T, et al.. Histone diacetylase inhibitor attenuates TGF- β 2 induced human conjunctival fibroblast activation. ARVO annual meeting 2015. 2015年5月3日～5月7日デンバー(米国)

Takahashi E, Haga A, Tanihara H. Merlin regulates hyaluronan endocytosis and epithelial mesenchymal transition in ARPE-19 cell. ARVO annual meeting 2015. 2015年5月3日～5月7日デ
ンバー（米国）

Haga A, Takahashi E, Inomata Y, Tanihata H. The subtype of microglia in rat after optic nerve crush injury. ARVO annual meeting 2015. 2015年5月3日～5月7日デ
ンバー（米国）

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 美紀子 (FUKUSHIMA, Mikiko)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：10284770

(2) 研究分担者

伊藤 康裕 (ITO, Yasuhiro)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70380996

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

高橋 枝里 (TAKAHASHI, Eri)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：60622602