

## 学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	川井 基史
<p>学位論文題目</p> <p>Elevated Levels of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in the Aqueous Humor after Phacoemulsification.</p> <p>(超音波水晶体摘出後、前房水中 monocyte chemoattractant protein-1 濃度は上昇する)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>井上俊洋、稲谷大、坪井尚子、正林耕平、松川昭博、吉田晃敏、谷原秀信</p> <p>Investigative Ophthalmology &amp; Visual Science. 2012, In press.</p> <p>研 究 目 的</p> <p>超音波水晶体摘出術(白内障手術)後早期では、血液房水柵破綻により前房水(房水)中の炎症細胞数が増加し、炎症性サイトカインや増殖因子の濃度が上昇するが、時間経過とともに血液房水柵は修復され、術後の炎症は終息へ向かう。しかしながら、緑内障患者を対象とした最近の研究では、白内障術後長期間経過しているにもかかわらず、房水中には手術未施行眼に比べ高濃度の monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) が存在し<sup>(1)</sup>、さらに、白内障手術既往眼に対する緑内障濾過手術成績は、白内障手術未施行眼に対するものに比べ不良であることが報告されている<sup>(2)</sup>。房水中の MCP-1 は白内障術後長期間経過した時点においても高濃度を維持しており、このためその後に行われる緑内障濾過手術に悪影響を及ぼすと考えられている。しかしながら、この仮説は薬物投与中の緑内障患者を対象とした臨床研究から導かれており、白内障手術と房水中 MCP-1 濃度上昇の因果関係を明らかにするためには、緑内障治療の影響を排除した研究を行う必要がある。</p> <p>そこで本研究では、臨床研究と基礎実験により、白内障術後における長期的な房水中 MCP-1 濃度上昇のメカニズムについて検討した。</p> <p>材 料 ・ 方 法</p> <p>1. 臨床研究</p> <p>白内障以外に眼疾患を有さない健常者 21 例 21 眼(男 6 例、女 15 例、年齢 77.5 ± 7.4 歳)を対象とした。白内障手術開始時(術前)と、術後1年以上経過した時点の計 2 回、各症例から房水 100 - 150</p>			

$\mu$ l を採取した(房水サンプル)。房水サンプル中の炎症性サイトカイン、増殖因子濃度を multiplex immunoassay 法を用いて網羅的に解析した。測定可能であった 5 因子(MCP-1, IL-8, TNF- $\alpha$ , PDGF-AA, VEGF)について術前後の値を比較した(paired t-test)。

## 2. 基礎研究

1) 動物実験: 日本白色家兎 42 羽(メス、体重 2.0 - 2.4 kg、週令 12 -14)を使用した。30 羽に対して超音波白内障手術装置を用いて水晶体摘出を施行し、そのうち 6 羽に対しては眼内レンズ挿入術も併施した。12 羽は手術未施行のコントロールとした。実験には右眼のみを使用した。水晶体を摘出後、30 日、90 日の時点でウサギを屠殺し(各時点 12 羽)、各サンプル(房水、血清、前眼部組織)を採取した。

a) 房水と血清サンプル中の MCP-1 濃度を ELISA 法で測定し、コントロール群、術後 30 日群、90 日群の値を比較した(Dunnett's test)。

b) 眼球摘出後、前眼部組織を角膜、虹彩、毛様体、水晶体嚢に分離し、各組織における MCP-1 mRNA 発現を RT-PCR 法で解析し、各組織でのコントロール群、術後 30 日群、術後 90 日群の RT-PCR バンドを比較した(Steel's test)。

c) 前眼部組織における  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) と MCP-1 発現を免疫染色で検討した。

2) 細胞実験: ヒト水晶体上皮細胞(ScienCell 社より購入)を培養し、recombinant human (rh) TGF- $\beta$ 2 (5 ng/ml) で刺激した。刺激後、0, 4, 6, 12, 24, 48 時間で上清 MCP-1 濃度を ELISA 法で測定し、各時点での値をコントロールと比較した(unpaired t-test)。

P < 0.05 を統計学的有意とした。

## 成 績

### 1. 臨床研究

術後房水中 MCP-1、IL-8、TNF- $\alpha$  濃度は有意に上昇していた(MCP-1, IL-8; P < 0.0001, TNF- $\alpha$ ; P = 0.002)。MCP-1 と IL-8 は 21 例全例で上昇していた。術前と術後において房水中 MCP-1 濃度は他のどの因子よりも高い値を示した。

### 2. 基礎研究

#### 1) 動物実験:

a) ウサギ房水中 MCP-1 濃度は術後上昇し、術後 30 日群ではコントロール群と比較して有意に高い値であった(P = 0.018)。また、眼内レンズ挿入術併用の有無は術後房水中 MCP-1 濃度の上昇に影響を与えなかった。コントロール群と術後 30 日群の血清 MCP-1 濃度に差はなく、術後、全身性の MCP-1 上昇はなかった。

b) ウサギ前眼部組織の MCP-1 mRNA 発現量は、角膜、虹彩、毛様体ではコントロール群と比較して術後 30 日群で増加し、術後 90 日群では減少に転じたが、水晶体嚢では逆に術後 90 日群でさらに増加した。水晶体嚢における MCP-1 mRNA 発現パターンは他の組織と異なっていた。

c) 免疫組織学的検討では、術後 30 日群の水晶体嚢内には  $\alpha$ -SMA と MCP-1 陽性細胞が増殖していたが、残存水晶体組織で覆われた単層の水晶体上皮細胞は MCP-1 陰性であった。

2) 細胞実験: rhTGF- $\beta$ 2 刺激群では上清 MCP-1 濃度が、刺激後 12、24、48 時間でコントロール群と比較して有意に高かった ( $P < 0.05$ )。

## 考 案

本研究により初めて、白内障手術によって房水中 MCP-1 濃度が長期的に上昇することが明らかとなり、緑内障を対象とした既報<sup>(1)</sup>の結果と一致していた。

ウサギを用いた動物実験でも水晶体摘出後に房水中 MCP-1 濃度は上昇していた。また、ウサギ前眼部組織のうち、水晶体嚢のみで術後経過とともに MCP-1 mRNA 発現量が増加した。従って、水晶体摘出後の長期的な房水中への MCP-1 産生は、水晶体嚢内に存在する細胞に由来すると考えられた。

免疫組織学的解析では、水晶体嚢内の重層化した水晶体上皮細胞のなかに MCP-1 陽性細胞を観察できたが、残存水晶体に覆われ房水と接触していない単層の水晶体上皮細胞は MCP-1 陰性であった。このことから、水晶体摘出術後の房水中 MCP-1 濃度上昇のメカニズムとして、房水で刺激された水晶体上皮細胞が MCP-1 を産生すると推測した。

房水中には免疫抑制物質である TGF- $\beta$ 2 が豊富にあり<sup>(2)</sup>、前房は免疫反応、炎症反応が抑制された状態にある。また、TGF- $\beta$ 2 は免疫抑制物質としての働きのみならず、上皮間葉系移行にも関与し、白内障術後に水晶体嚢内に残存した水晶体上皮細胞を筋線維芽細胞へと形質転換させることで、後発白内障発症にも関与している。我々は TGF- $\beta$ 2 は後発白内障発症に関与しながらも、再増殖した水晶体上皮細胞を刺激して MCP-1 を産生させると推測し、更なる細胞実験を行った。その結果、TGF- $\beta$ 2 刺激で水晶体上皮細胞培養上清の MCP-1 濃度が上昇することが確認できた。

我々が行った臨床研究と基礎研究の結果、白内障手術後、水晶体嚢内に再増殖した水晶体上皮細胞を由来とした房水への MCP-1 産生が長期的に起こることが初めて明らかとなった。

## 結 論



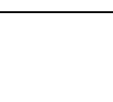
1. 白内障手術によって、房水中 MCP-1、IL-8、TNF- $\alpha$  濃度は長期的に上昇した。
2. これらの炎症性サイトカインのうち MCP-1 濃度が最も高かった。
3. ウサギでも水晶体摘出後に房水 MCP-1 濃度は上昇した。

4. 術後長期的な房水 MCP-1 産生は水晶体上皮細胞由来であると考えられた。

#### 引用文献

1. Simultaneous increases in multiple proinflammatory cytokines in the aqueous humor in pseudophakic glaucomatous eyes. Inoue T, Kawaji T, Inatani M, Kameda T, Yoshimura N, Tanihara H. *J Cataract Refract Surg.* 2012 Aug;38(8):1389-97.
2. Trabeculectomy with mitomycin for open-angle glaucoma in phakic vs pseudophakic eyes after phacoemulsification. Takihara Y, Inatani M, Seto T, Iwao K, Iwao M, Inoue T, Kasaoka N, Murakami A, Futa R, Tanihara H. *Arch Ophthalmol.* 2011 Feb;129(2):152-7.
3. Inatani M, Tanihara H, Katsuta H, Honjo M, Kido N, Honda Y. Transforming growth factor-beta 2 levels in aqueous humor of glaucomatous eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2001;239:109-113.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	川 井 基 史
<p>審査委員長 廣 川 博 之 </p> <p>審査委員 高 井 章 </p> <p>審査委員 柏 柳 誠 </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Elevated levels of monocyte chemoattractant protein-1 in the aqueous humor after phacoemulsification</p> <p>(和訳)</p> <p>超音波水晶体摘出後、前房水中 monocyte chemoattractant protein-1 濃度は上昇する</p>			
<p>白内障の代表的な手術方法である超音波水晶体摘出術の術後早期では、血液房水柵破綻により前房水中の炎症性サイトカインや増殖因子の濃度が上昇する。緑内障患者では白内障術後長期間にわたり、前房水中に monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) が存在し、この MCP-1 が白内障手術既往眼における緑内障濾過手術の術後成績に悪影響を与えていると考えられている。しかし、これまで白内障以外に疾患を有さない眼での白内障術後前房水中 MCP-1 濃度や長期的な MCP-1 濃度上昇のメカニズムは不明であった。</p> <p>学位論文提出者は、白内障以外に眼疾患を有さない健常者の白内障手術前後の前房水中炎症性サイトカインと増殖因子濃度を測定し、特に MCP-1 濃度が極めて高く、さらに長期的に上昇することを初めて明らかにした。</p>			

また、提出された学位論文は日本白色家兎眼に同様の水晶体摘出術を行い、術後前房水中の MCP-1 濃度の上昇を確認した。さらに、水晶体摘出術を行った家兎眼の角膜、虹彩、毛様体、水晶体囊各々における MCP-1 mRNA 発現を RT-PCR 法で解析し、水晶体囊でのみ、術後経過とともに MCP-1 mRNA 発現量が増加したことから MCP-1 産生は水晶体囊内に存在する細胞であることを示した。免疫組織学的検討により、前房水中にさらされている水晶体上皮細胞が MCP-1 を産生し、培養したヒト水晶体上皮細胞への recombinant human TGF- $\beta$ 2 刺激で、培養液上清の MCP-1 濃度が高くなることから、水晶体摘出術後、前房水中に存在する TGF- $\beta$ 2 が水晶体上皮細胞を刺激し、MCP-1 を産生することを示した。以上の研究結果は、白内障術後の緑内障治療に関連する新知見であり、緑内障患者の手術成績向上に繋がる重要な論文であるといえる。

論文内容と関連領域についての各審査委員による諮問に対しても適切な解答が得られ、提出者はこの領域において十分な知識を有することが示された。

以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値するものと判定した。