

学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	坪井 尚子
<p>学位論文題目</p> <p>The Effect of Monocyte Chemoattractant Protein-1/CC Chemokine Ligand 2 on Aqueous Humor Outflow Facility</p> <p>(Monocyte Chemoattractant Protein-1/CC Chemokine Ligand2 が房水流出に与える影響)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>井上 俊洋 川井 基史 井上 みゆき 藤本 智和 笠岡 奈々子 吉田 晃敏 谷原 秀信</p> <p>掲載雑誌</p> <p>Investigative Ophthalmology & Visual Science 2012 年、53 巻 6702 頁～6707 頁</p> <p>研 究 目 的</p> <p>白内障手術は混濁した水晶体を摘出し、透明な人工レンズ(眼内レンズ)を挿入することで、視力改善を目指す術式であるが、その副次効果として術後眼圧が長期的に下降する症例があることが知られている¹⁾。この眼圧下降機序としては、白内障手術によって厚い水晶体が薄い眼内レンズに置換されることで、眼房水の流出路である隅角が機械的に開大し、房水流出抵抗が低下するという解剖学的な要因が大きいと考えられている。そのほか、術後前房内に上昇した炎症性サイトカインの作用で房水流出抵抗が低下するとも考えられているが、その詳しいメカニズムについては未解明であった。</p> <p>最近、我々は白内障以外の眼疾患を有さない健常者を対象とした臨床研究で、白内障術後1年以上経過した眼においても前房水(房水)中の炎症性サイトカイン濃度、特に Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) 濃度が上昇していることを見出し、さらに白内障術後眼圧下降率と、房水中の MCP-1(房水 MCP-1)濃度増加率の間に正の相関があることを明らかにした²⁾。このことから我々は、房水 MCP-1 が白内障術後の長期的な眼圧下降に関与していると推測した。本研究では MCP-1 が、眼圧を規定する組織のひとつである房水流出路に与える影響と、その作用機序について検討した。</p>			

材 料 ・ 方 法

1) MCP-1 が房水流出路に与える影響について(摘出豚眼を用いた ex vivo 実験)

房水は毛様体で産生され、後房から前房へ循環した後、線維柱帯、シュレム管(房水流出路)を通して眼外へ排泄される。摘出直後の豚眼では房水産生は停止しているが、房水流出路の機能は残存している。本実験では特殊な実験系を用いて、摘出豚眼の前房に MCP-1 を含有した灌流液を持続的に流し、MCP-1 刺激による房水流出抵抗の変化(房水流出率)を測定した。

2) MCP-1 レセプター (CCR2) 発現の確認(以下 in vitro 実験)

ブタ線維柱帯細胞とサルシュレム管内皮細胞での CCR2 mRNA 発現を RT-PCR で確認した。

3) MCP-1 による細胞毒性の有無

CCK-8 assay (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)を用いて、ブタ線維柱帯細胞とサルシュレム管内皮細胞とで MCP-1 で刺激後の細胞死の有無を確認した。

4) MCP-1 の線維柱帯細胞における RhoA 活性

ブタ線維柱帯細胞を MCP-1 で刺激し、pull-down assay (Rho Activation Assay Biochem Kit #BK036; Cytoskeleton, Denver, CO)で活性 RhoA を分離した後、ウエスタンブロット法で定量した。

5) MCP-1 の線維柱帯細胞における Matrix Metalloprotease 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) 活性

ブタ線維柱帯細胞を MCP-1 で刺激後、培養上清を濃縮し、Gelatin Zymography で上清中 MMP-2 と MMP-9 活性を調べた。

6) MCP-1 がシュレム管内皮細胞の細胞間接着に与える影響

a) サルシュレム管内皮細胞を二重チャンバー内 (0.4 μ m pore size and 6.5 mm diameter; Transwell, Corning Inc., Corning, NY)に単層培養した。MILLICELLERS® (Millipore, Billerica, MA)を用いて、培養細胞シートの電気抵抗を測定した。電気抵抗は細胞接着の強度を反映する。MCP-1刺激後の電気抵抗変化を測定した。同様の実験をMCP-1受容体阻害剤のCCR2 inhibitorを加えたものでも行った。

b) サルシュレム管内皮細胞をMCP-1で刺激後、細胞接着因子であるZO-1の蛍光免疫性をコントロールと比較した。

統計学的処理

2 群間の比較には、Student's t-test を、複数群間の解析では Dunnett's multiple comparison test を行った。危険率 5%未満を統計学的有意とした。

成 績

1) MCP-1 が房水流出路に与える影響について(摘出豚眼を用いた ex vivo 実験)

MCP-1 は経時的に摘出豚眼の房水流出率を増加させた。

2) MCP-1 レセプター (CCR2) 発現の確認(以下 in vitro 実験)

ブタ線維柱帯細胞、サルシュレム管内皮細胞ともに CCR2 mRNA の発現が確認できた。

3) MCP-1 による細胞毒性の有無

MCP-1 刺激によってブタ線維柱帯細胞、サルシュレム管内皮細胞ともに細胞死をおこさなかった。

4) MCP-1 のブタ線維柱帯細胞における RhoA 活性

MCP-1 刺激とコントロールの間で RhoA 活性に有意差はみられなかった。

5) MCP-1 のブタ線維柱帯細胞における MMP-2、MMP-9 活性

MCP-1 刺激とコントロールの間で MMP-2、MMP-9 活性に有意差はみられなかった。

6) MCP-1 がシュレム管内皮細胞の細胞間接着に与える影響

a) MCP-1 はシュレム管内皮細胞シートの電気抵抗を低下させた。その作用は MCP-1 受容体阻害剤で阻害された。

b) MCP-1 は細胞接着因子である ZO-1 の局在を細胞膜から細胞質内へと変化させ、細胞間接着を減弱させた。

考 案

本研究では MCP-1 が摘出豚眼の房水流出率を増加させることが明らかとなり、その作用機序はシュレム管内皮細胞接着の減弱であると考えられた。

房水流出抵抗が低下し、房水流出率が増加すると眼圧は下降するが、房水流出抵抗の低下はシュレム管内皮細胞の細胞間接着減弱のほか、線維柱帯のアクチン減少や細胞外マトリックス減少でも生じる³⁾。そのため、本研究ではさらに、単離培養したブタ線維柱帯細胞とサルシュレム管内皮細胞を用

いて、これらについて検討した。その結果、MCP-1 刺激によってブタ線維柱帯細胞におけるアクチンの免疫染色性と、その活性シグナルである RhoA 活性に変化は認められなかった。また、同じくブタ線維柱帯細胞を用いた実験では、細胞外マトリックスを減少させる MMP-2, 9 活性についても MCP-1 刺激による活性増加を認めなかった。

過去の報告では、白内障術後の眼圧下降機序については隅角の形態学的変化のほかに、IL-1 や IL-8 などの炎症性サイトカインの関与が推測されている。本研究は、術後眼圧下降に関わる因子として房水 MCP-1 に着目した初めての報告である。その結果、MCP-1 による眼圧下降がシュレム管内皮細胞間接着の減弱に起因していることが明らかとなり、MCP-1 は白内障術後の長期的な眼圧下降の一要因であることが示唆された。MCP-1 刺激によるシュレム管内皮細胞間接着の変化に関わる上流シグナルの解明については今後の研究課題としたい。










結 論

1. MCP-1 は摘出豚眼の房水流出率を増加させた。
2. MCP-1 刺激により、サルシュレム管内皮細胞の細胞間接着が減弱した。
3. MCP-1 は白内障術後の長期的眼圧下降の一要因であると推測された。

引 用 文 献

1. Irak-Dersu I, Nilson C, Zabriskie N, Durcan J, Spencer HJ, Crandall A. Intraocular pressure change after temporal clear corneal phacoemulsification in normal eyes. *Acta Ophthalmol*. 2010;88:131–134.
2. Kawai M, Inoue T, Inatani M, Tsuboi N, Shobayashi K, Matsukawa A, Yoshida A, Tanihara H. Elevated Levels of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in the Aqueous Humor after Phacoemulsification. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. in press
3. Ye W, Gong H, Sit A, Johnson M, Freddo TF. Interendothelial junctions in normal human Schlemm's canal respond to changes in pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38: 2460–2468.

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	坪井 尚子									
<table border="0"> <tr> <td>審査委員長</td> <td>高井 章</td> <td></td> </tr> <tr> <td>審査委員</td> <td>船越 洋</td> <td></td> </tr> <tr> <td>審査委員</td> <td>廣川 博之</td> <td></td> </tr> </table>				審査委員長	高井 章		審査委員	船越 洋		審査委員	廣川 博之	
審査委員長	高井 章											
審査委員	船越 洋											
審査委員	廣川 博之											
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>The effect of monocyte chemoattractant protein-1 / CC chemokine ligand 2 on aqueous humor outflow facility</p> <p>「Monocyte chemoattractant protein-1 / CC chemokine ligand 2 が房水流出に与える影響」</p> <p><i>Investigative Ophthalmology & Visual Science</i> 53: 6702-6707 (2012)に掲載済</p>												
<p>【背景・目的】 白内障手術(水晶体を摘出後、人工レンズ挿入)のあと眼圧が長期にわたって下降する症例のあることが知られている。最近、論文提出者らは、白内障以外の眼疾患を有さない患者で、白内障手術のあと1年以上経過した眼において前房水中に炎症性サイトカインの一種 monocyte chemoattractant protein-1 [MCP-1; 別名 CC chemokine ligand 2 (CCL2)]の濃度が上昇していること、さらに MCP-1 濃度と眼圧下降率との間に有意な正の相関があることを明らかにした。本論文では、房水 MCP-1 が白内障手術後の長期的下降の要因になっているという仮説を検証する目的で、MCP-1 の房水流出路に与える影響と、その作用機序について検討した。</p> <p>【方法】</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 摘出豚眼における前房灌流実験により、MCP-1 の房水流出抵抗に及ぼす影響を調べた。 ● プタ線維中帯細胞とサル Schlemm 管内皮細胞において RT-PCR、ウエスタンブロット、酵素活性の測定をおこなった。 ● サル Schlemm 管内皮細胞の二重チャンバ内で単層培養し、培養細胞シートの電気抵抗を測定した。また、細胞接着因子 ZO-1 の分布を蛍光免疫法で観察した。 												

【主な結果】

1. 摘出豚眼における前房灌流実験により、MCP-1 が房水流出率を有意に増加させることを確認した。
2. ブタ線維中帯細胞とサル Schlemm 管内皮細胞において RT-PCR により CCR2 mRNA 発現を確認した。
3. ブタ線維中帯細胞とサル Schlemm 管内皮細胞において MCP-1 が細胞毒性を示さないことを CCK-8 assay により確認した。
4. ブタ線維中帯細胞において MCP-1 が RhoA 活性、MMP-2 および MMP-9 に有意な変化を起こさないことを確認した。
5. サル Schlemm 管内皮培養細胞シートにおいて、MCP-1 が電気抵抗を低下させることを確認した。また、同様の標本における蛍光免疫法による実験において、MCP-1 が細胞接着因子 ZO-1 の細胞膜から細胞内への移行を起こし細胞間接着を弱めることを示唆する像を観察した。

【評価】

本論文は、動物モデルにおける *ex vivo* 実験および細胞生理学的実験により、MCP-1 が CCR2 の刺激を介して Schlemm 管内皮細胞の細胞間接着を減少させることにより、房水流出抵抗を減弱させるというメカニズムを明確にしたものである。臨床的に観察された、白内障手術後の房水内 MCP-1 上昇と長期的眼圧下降とに因果関係があることを初めて実験的に証明したことは高く評価される。

論文提出者は、3名の審査員による個別の口頭試問において、本論文の内容とその重要性について明確に説明し、また、関連領域についての試問でも適切な回答を与えた。それにより、当人がこの領域において十分な知識と経験を有することを確認できた。

以上より、本審査委員会は、本論文が学位授与に値するものと判定した。