HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	増殖組織形成を伴う視力予後不良疾患の病理学的検討
Author(s)	董, 陽子
Description	配架番号：2252
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12354号
Issue Date	2016-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12354
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/64708
Type	doctoral thesis
File Information	Yoko_Dong.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

増殖組織形成を伴う視力予後不良疾患の病理学的検討

(Pathological analysis on vision threatening diseases complicated by proliferative tissue formation)

2016 年 6 月

北海道大学

董　陽子

学　位　論　文

増殖組織形成を伴う視力予後不良疾患の病理学的検討

(Pathological analysis on vision threatening diseases complicated by proliferative tissue formation)

2016 年 6 月

北海道大学

董　陽子

目次

発表論文目録および学会発表目録 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ １頁

緒言 ・・ ３頁

略語表 ・・ ５頁

第１章
緒言 ・・ ７頁
実験方法 ・・ ８頁
実験結果 ・・・１０頁
考察 ・・１４頁
結論 ・・１５頁

第２章
緒言 ・・１７頁
実験方法 ・・・１８頁
実験結果 ・・・２１頁
考察 ・・２８頁
結論 ・・３０頁

第３章
緒言 ・・３１頁
実験方法 ・・・３２頁
実験結果 ・・・３５頁
考察 ・・４３頁
結論 ・・４６頁

第４章
緒言 ・・４７頁
実験方法 ・・・４８頁

実験結果 ……５１頁
考察 ……５７頁
結論 ……５８頁

総括 ……５９頁

謝辞 ……６０頁

引用文献 ……６１頁

なお、本文における図、表の一部はすでに International Journal of Ophthalmology、Current Eye Research および International Journal of Molecular Medicine に掲載されており、本論文における使用にあたっては出版社より承諾を得ている。

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Yoko Dong, Zhenyu Dong, Satoru Kase, Ryo Ando, Junichi Fukuhara, Satoshi Kinoshita, Saori Inafuku, Yoshiaki Tagawa, Erdal Tan Ishizuka, Wataru Saito, Miyuki Murata, Atsuhiro Kanda, Kousuke Noda, Susumu Ishida. Phosphorylation of alphaB-crystallin in epiretinal membrane of human proliferative diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol.* 2016. (in press)

2. Yoko Dong, Kousuke Noda, Miyuki Murata, Shiho Yoshida, Wataru Saito, Atsuhiro Kanda, Susumu Ishida. Localization of Acrolein-Lysine Adduct in Fibrovascular Tissues of Proliferative Diabetic Retinopathy. *Curr Eye Res.* 2016. (in press)

3. Yoko Dong, Satoru Kase, Zhenyu Dong, Junichi Fukuhara, Yoshiaki Tagawa, Erdal Tan Ishizuka, Miyuki Murata, Yasuhiro Shinmei, Takeshi Ohguchi, Atsuhiro Kanda, Kousuke Noda, Susumu Ishida. Regulation of vascular endothelial growth factor-C by tumor necrosis factor-α in the conjunctiva and pterygium. *Int J Mol Med.* 2016. (in press)

4. Yoko Dong, Atsuhiro Kanda, Kousuke Noda, Wataru Saito, Susumu Ishida. Pathologic Roles of Receptor-Associated Prorenin System in Idiopathic Epiretinal Membrane. (under review)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Yoko Dong, Kousuke Noda, Wataru Saito, Atsuhiro Kanda, Susumu Ishida. Localization of Acrolein-Lys Adduct in Fibrovascular Tissues of Proliferative Diabetic Retinopathy
World Ophthalmology Congress of the International Council of Ophthalmology. 2014年4月　東京都.

2. **董　陽子**、野田航介、木下哲志、董　震宇、稲福沙織、吉田志帆、齋藤　航、神田敦宏、石田　晋.　糖尿病網膜症におけるアクロレインの発現.　第18回眼科分子生物学研究会、2014年2月、長崎県.

3. **董　陽子**、野田航介、吉田志帆、田川義晃、石塚タンエルダル、稲福沙織、木下哲志、村田美幸、齋藤　航、神田敦宏、石田　晋. Localization of Acrolein-Lys Adduct in Fibrovascular Tissues of Proliferative Diabetic Retinopathy.　第79回インターフェロン・サイトカイン学会、2014年6月、北海道.

緒言

重篤な視力低下を引き起こす眼科疾患は先天性から後天性のものまで幅広く存在するが、中でも後天性に視力低下、ひいては中途失明を引き起こす疾患は我が国における社会問題の一つとなっている。後天性に不可逆的な視力低下につながる疾患の多くにおいては、共通病態の一つとして組織増生があり、実臨床でよく遭遇する疾患しては糖尿病網膜症や特発性黄斑上膜、翼状片などがあげられる。

糖尿病網膜症（図 1）の病態は微小血管閉塞による網膜虚血に起因し、増殖期まで進行すると、虚血に対する代償性変化として線維血管組織が形成され、かつその破綻により硝子体出血を引き起こす。さらに、この網膜上に形成された線維血管組織は失明を引き起こす牽引性網膜剥離の原因ともなる。

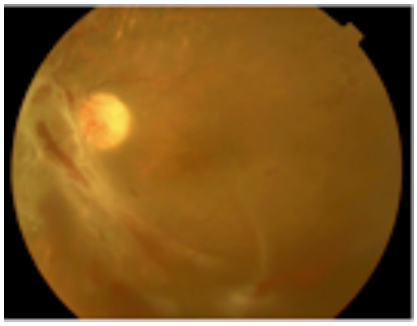


図 1　増殖糖尿病網膜症

網膜の前面に新生血管を伴った線維血管組織増殖の形成がみられる。

特発性黄斑上膜（図 2）は網膜の中心部に存在する黄斑部前面にグリア細胞の増生による新生血管を伴わない線維性膜状組織（黄斑上膜）が形成される疾患であり、その有病率は 50 歳以上で 7.7%ともされている[1,2]。黄斑上膜は網膜組織の形状を変化させるため、視力低下を引き起こす。



図 2　特発性黄斑上膜

黄斑部にセロファン様の膜形成がみられる。

翼状片（図 3）は、血管新生やリンパ管新生に起因した結膜組織が角膜へ異常増殖した結果、角膜混濁や角膜乱視を生じさせ視力低下を引き起こす疾患であり、紫外線が原因とも言われている。

前述のごとく、これらの疾患に共通しているのは増殖組織により視力低下が引き起こされているということである。これらの増殖組織（線維血管組織、黄斑上膜、翼状片）は現在のところ外科的に切除する以外に治療法はなく、外科的に切除したとしてもその視力低下は不可逆的である。唯一、糖尿病網膜症の

病態進展防止目的で下記に示す抗 vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)療法が臨床応用されているが特発性黄斑上膜や翼状片の進展予防に有用な薬物療法は確立されていない。そのため、増殖組織の形成機序を検討し、進展を抑制する薬物療法の開発が求められている。

増殖糖尿病網膜症の線維血管組織の進展に VEGF-A が主要な役割を演じることが明らかとされ[3-6]、種々の抗 VEGF-A 製剤がすでに臨床で用いられているが、反復投与による感染や網膜萎縮などの眼局所の副作用[6-8]、脳梗塞などの血管イベントを含む全身的副作用[6,9-11]などが問題となっている。このため、抗 VEGF-A 製剤に代わる新たな薬剤の開発が望まれるが、この 10 年余にわたり抗 VEGF-A 製剤より優れた薬剤は臨床応用に至っていない。

本学位論文では、申請者が大学院在学中に増殖組織形成を病態基盤とする眼疾患について臨床検体を用いた検討を主軸として、検討した結果についてまとめた。

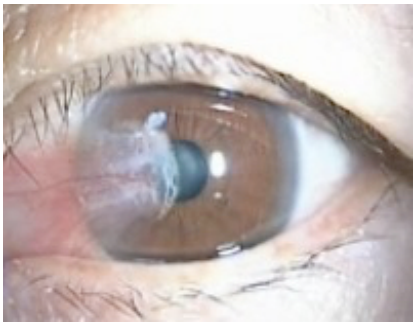


図 3　翼状片

鼻側より血管を伴った結膜組織が角膜内へ侵入している。屋外作業に従事する者に多く見られる。

略語表

αBC	alpha B crystallin
ACE	angiotensin-converting enzyme
AGT	angiotensinogen
α-SMA	alpha-smooth muscle actin
AngⅡ	angiotensin Ⅱ
AT1R	Ang Ⅱ type 1 receptor
AT2R	Ang Ⅱ type 2 receptor
BrdU	5-bromo-2’deoxyuridine
CTGF	connective tissue growth factor
CMA1	chymase 1
DAB	3,3’-diaminobenzidine etrahydrochloride
DAPI	4’,6-diamino-2-phenylindole
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FDP-Lys	Nε-(3-formyl-3,4-dehydropiperidino) lysine adduct
FGF2	fibroblast growth factor 2
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFAP	glial fibrillary acidc protein
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GSH	glutathione
HRMECs	human retinal microvascular endothelial cells
iERM	idiopathic epiretinal membrane
IL-1β	interleukin-1β
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MMPs	matrix metalloproteinases
NGF	nerve growth factor
pαBC	phosphorylated αBC
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction

(P)RR	(pro)renin receptor
qPCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
RAS	renin-angiotensin system
RAPS	receptor-associated prorenin system
REN	prorenin
RT-PCR	reverse transcription PCR
STZ	streptozotocin
TGFB1	transforming growth factor-β1
TNF-α	tumor necrosis factor-α
TNFR1	TNF recpetor1
TNFR2	TNF recpetor2
TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
VEGF	vascular endothelial growth factor

第１章

増殖糖尿病網膜症の病態形成におけるリン酸化 αB crystallin の関与

緒言

糖尿病網膜症は単純、前増殖、増殖期に分類される。最も進行した状態である増殖糖尿病網膜症の病態の主因は、網膜における血管新生とこれを伴った線維血管組織の増殖・進展であり、結果的に牽引性網膜剥離を発症し不可逆的な視力低下が生じる[12,13]。これまで血管新生を介した線維血管組織の増殖・進展に様々な分子が関与していることが示されてきたが、中でも VEGF-A が主要な役割を演じることは先に述べた通りである[3-5]。

脊椎動物において、crystallin はα、β、γのファミリーに分類される。そのうちα crystallin は small heat shock protein に属し、αA とαB の異なるファミリーに分けられる。α crystallin は水晶体の構成タンパクとして発見されたが[14,15]、近年その存在は眼球以外の組織においても局在することが報告されている[16-20]。特に、αB crystallin（αBC)は水晶体構成タンパクのみならず分子シャペロンとしても機能する。酸素誘発性網膜症モデルマウスではαBC が VEGF-A と結合し、分子シャペロンとして VEGF-A の分解を抑制することにより、血管新生を誘導することが明らかとなった[21]。また、αBC は様々なストレスによってリン酸化されることにより、その活性が得られる事が知られている。具体的には Ser59、Ser45、Ser19 の 3 つのセリン残基におけるリン酸化が重要であることが報告されている。Ser59 はりン酸化された p38-mitogen-activated protein kinase（p-p38 MAPK）より、Ser45 は extracellular signal-regulated kinase（ERK）を介してリン酸化されることが知られている。[22,23] 一方、Ser19 に関してはまだ詳細な機序が報告されておらず、これら 3 つのリン酸化部位の中で Ser59 がリン酸化を受けたαBC が最も強い生理活性を示すと報告されている[16,24-26]。

上述のように、低酸素条件下では αBC は VEGF-A の分子シャペロンとして血管新生に働くことが知られており、糖尿病ラットモデルでは非糖尿病ラットに比して Ser59、Ser45、Ser19 がリン酸化された αBC (pαBC)が増加していることが知られている[27]。また、αBC が増殖糖尿病網膜症の線維血管組織における

新生血管形成に関与することが報告されている[28]。しかしながら、pαBC の局在の報告や p-p38 MAPK との関連の報告はない。

本研究では、免疫学的手法を用いて線維血管組織における pαBC の局在やその関連分子の局在を検討した。

実験方法

１．臨床検体

2009 年から 2013 年にかけて、北海道大学病院眼科にて硝子体手術が施行された増殖糖尿病網膜症患者（11 例 11 眼、男性 7 例、女性 4 例、平均年齢 49.1±15.0 歳）において術中に除去された線維血管組織を用いた。増殖糖尿病網膜症網膜症患者の臨床像を表１に示した。対照群として悪性黒色腫により眼球摘出を受けた患者（2 例 2 眼、男性 2 例、平均年齢 63.5±7.8 歳）を用いた。線維血管組織および摘出された眼球は直ちに 4%パラホルムアルデヒドにて固定した。

本研究に使用した臨床検体は全て書面により同意を得た患者より採取しており、臨床検体の扱いは北海道大学病院自主臨床研究審査委員会に承認を受け（IRB #014-0294）、「北海道大学病院における臨床研究の取り扱いに関する指針」に準じた。

No.	Age (years)	Sex	TRD	VH	DME	Type of DM	HbA1c (%)
1	65	female	-	+	-	Ⅱ	12.0
2	20	female	+	-	-	Ⅱ	5.4
3	35	male	-	+	-	Ⅱ	9.2
4	41	male	+	+	-	Ⅱ	5.7
5	59	male	+	-	-	Ⅱ	5.9
6	52	male	+	+	-	Ⅱ	6.8
7	69	female	-	+	+	Ⅱ	7.2
8	60	male	+	+	-	Ⅱ	5.8
9	56	male	+	-	+	Ⅱ	6.1
10	49	female	+	-	+	Ⅱ	6.4
11	34	male	-	+	-	Ⅱ	8.2

表１　増殖糖尿病網膜症患者の臨床像

VH: vitreous hemorrhage, TRD: tractional retinal detachment
DME: diabetic macular edema, DM: diabetes mellitus
HbA1c: hemoglobin A1c

２．免疫組織染色

4%パラホルムアルデヒドにて固定された組織をパラフィンで包埋し、切片を作製した。キシレンおよびエタノールを用いて脱パラフィンを行い、抗原賦活化には 10mM クエン酸バッファー（pH6.0）を用いて電子レンジで行った。次に、切片に 0.1%ウシ血清アルブミン（Wako, Osaka, Japan）含有 PBS を滴下し室温で 30 分間ブロッキングを行った。その後、以下に述べる一次抗体を用いて 4℃で一次抗体反応を行った：rabbit anti-pSer19-αBC（100 倍希釈; Novus Biologicals, Littleton, CO）、rabbit anti-pSer45αBC（100 倍希釈; Stressgen,Ann Arbor, MI)、rabbit anti-pSer59αBC(100 倍希釈; Abcam, Tokyo, Japan）、mouse anti-VEGF（50 倍希釈; Abcam）、 mouse anti-p-p38 MAPK（50 倍希釈; Abcam）、 mouse anti-CD31（100 希釈；Abcam）。その後、PBS で 5 分 3 回洗浄したのちに、Alexa Fluor 488 または 546(400 倍希釈; Life Technologies, Carlsbad, CA）を用いて室温で 30 分間二次抗体反応を行い、核染色は 4’,6-diamino-2-phenylindole (DAPI, 500 倍希釈; Lonza, Basel, Switzerland) を用いた。切片の観察は蛍光顕微鏡 Keyence BZ-9000 series (BIOREVO, Keyence, Osaka, Japan）で行った。蛍光強度の判定は二重盲検法により行われ、各抗体のグループ内で強陽性（++）弱陽性（+）、陰性（-）へ分類した。

３．線維血管組織における血管密度の解析

線維血管組織における血管密度は蛍光顕微鏡 Keyence BZ-9000 series (BIOREVO)を用いて、対物レンズを 40 倍に設定したのち、1mm^2 あたりの CD31 陽性血管数を算出した。

４．統計解析

結果は平均値±標準誤差で示した。また、各群間の比較には Student’s *t*-test を用いて解析し、*p* 値が 0.05 未満を呈した場合に統計学的に有意差があると評価した。

実験結果

１．線維血管組織における各種ｐαBC の局在

各 ｐαBC の線維血管組織における局在について検討した。線維血管組織では Ser59、Ser45、Ser19 の各部位でリン酸化された ｐαBC は、CD31 陽性血管内皮細胞に局在していた（図 4）。

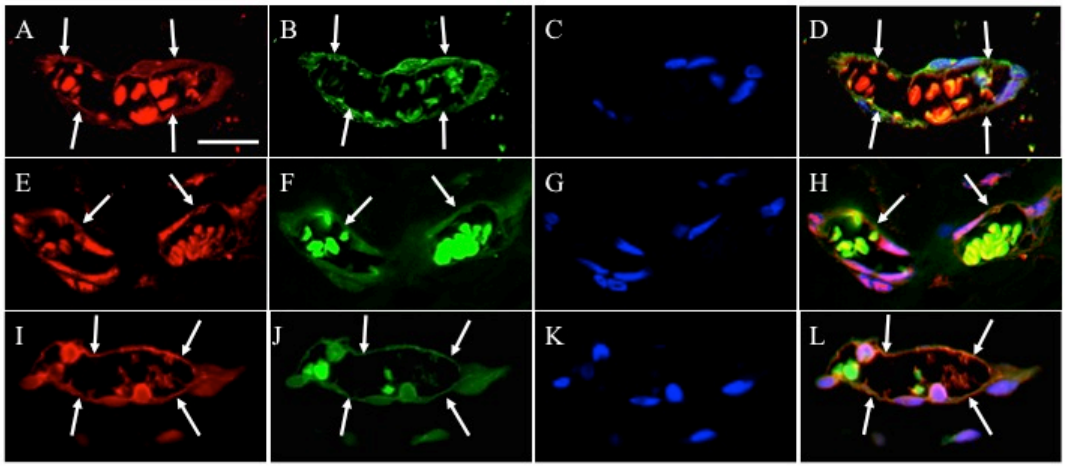


図 4　線維血管組織における ｐαBC と CD31 の局在

A, Ser59 リン酸化 αBC（pSer59-aBC）。E, Ser19 リン酸化αBC（pSer19-aBC）。I, Ser45 リン酸化αBC（pSer45-aBC）。
A, E, I：ｐαBC（赤）。B, F, J：CD31 陽性細胞（緑）。
C, G, K：DAPI（青）。D, H, L：Merge 像。Scale bar：25μm。

また、全 11 例中 8 例において pSer59αBC および pSer45αBC の発現が強く認められた（表 2）。

No.	Immunoreactivity of pSer59-αBC	Immunoreactivity of pSer19-αBC	Immunoreactivity of pSer45-αBC	Intravitreal injections of bevacizumab
1	++	++	++	-
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	++	+	+	+
5	++	++	++	+
6	+	+	++	-
7	++	++	++	-
8	++	++	++	+
9	++	+	++	-
10	++	+	++	-
11	++	+	++	+

表 2　増殖糖尿病網膜症患者の免疫組織染色結果

２．線維血管組織におけるｐαBC と VEGF-A の共局在

線維血管組織において pSer59αBC および pSer45 が強く発現していたが、αBC は VEGF-A の分子シャペロンであるため、その共発現について調べたところ、線維血管組織の血管において pSer59αBC が VEGF-A と最も共発現していることが確認された（図 5）。

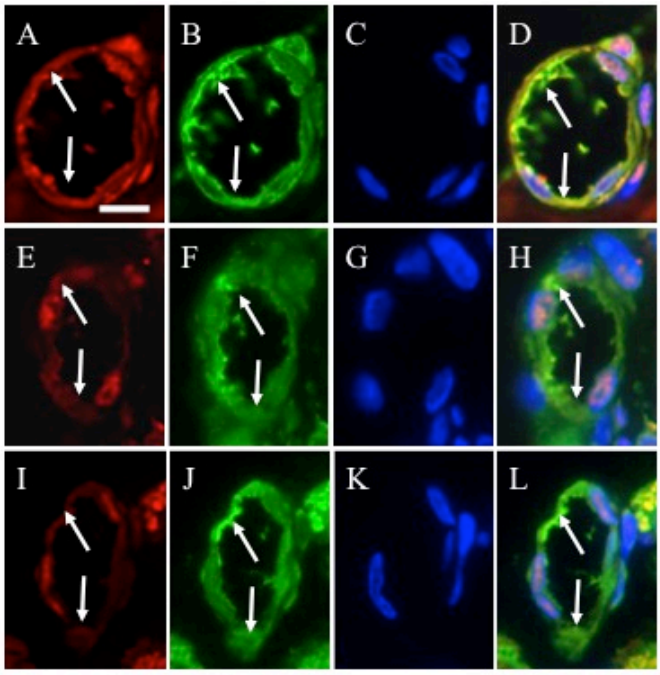


図 5　線維血管組織の血管におけるｐαBC と VEGF-A の局在

A, pSer59αBC, E, pSer19-αBC, I, pSer45-αBC：pαBC（赤）。B, F, J：VEGF-A（緑）。 C, G, K：DAPI（青）D, H, L：Merge 像。Scale bar:10 μm。

３．線維血管組織および正常網膜における pSer59αBC および p-p38MAPK の局在

過去に、αBC は Ser59 でのリン酸化に p-p38 MAPK が関与していると報告されているため、pSer59αBC と p-p 38 MAPK の局在について検討した。併せて、悪性黒色腫による眼球摘出標本における、腫瘍の存在しない部位の正常網膜に着目し、pSer59αBC と p-p38 MAPK の共局在についても比較検討した。その結果、線維血管組織において pSer59αBC は p-p38 MAPK の共局在が確認された(図 6)。pSer59αBC の発現は正常網膜ではみられず、正常網膜における p-p38MAPK の発現は線維血管組織と比較してその発現強度は微弱であった（図 6）。

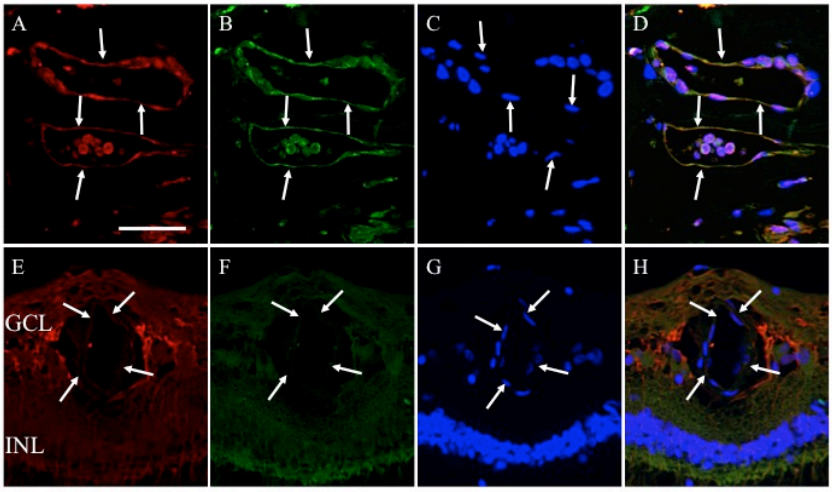


図 6　線維血管組織および正常網膜における pSer59αBC と p-p38MAPK の局在

A,B,C,D：線維血管組織。E,F,G,H：正常網膜。
A,E：pSer59αBC（赤)。B,F：p-p38 MAPK（緑)。C,G:DAPI（青)。
D,H：Merge 像。Scale bar：50μm。

４．線維血管組織における pSer45αBC および pSer19αBC の局在

Ser59 以外のリン酸化部位である pSer45αBC および pSer19αBC の発現の強弱についても検討したところ、pSer45αBC では全 11 例中 8 例において強い発現が認められ（表 2)、一方 3 例では発現強度は微弱であった。また、pSer19αBC に関しては全 11 例中 4 例にのみ強い発現強度がみられたが、残りの 7 例では弱い発現強度しか認められなかった（表 2)。症例 1、5、7 および 8 では全てのリン酸化部位の強い発現がみられたが、症例 2、3 では全てのリン酸化部位で弱い発現しか認められなかった。

また、線維血管組織の血管における pSer45αBC、pSer19αBC の局在は pSer59αBC のそれと比べてより辺縁に局在していた（図 5 E-L）。一方、pSer59αBC の発現と増殖糖尿病網膜症の線維血管組織における血管密度の関係について検討したが、有意差は認められなかった。

最後に、手術前に患者が受けた抗 VEGF-A 製剤の硝子体内注射が αBC のリン酸化に与える影響について検討した。しかしながら、今回の検討では抗 VEGF-A 製剤は Ser59、Ser45、Ser19 のどのリン酸化部位にもその影響は認められなかった（順に、$p = 0.66$、$p = 0.84$、$p = 0.07$）。

考察

過去に αBC の線維血管組織の微小血管における局在についての報告があるが[28]、本検討では線維血管組織における Ser59、Ser45、Ser19 の各種リン酸化部位でリン酸化された αBC の局在を確認した。pSer59αBC が正常網膜には存在せず、線維血管組織においてのみ p-p38MAPK と共局在していたことより、線維血管組織では p-p38 MAPK が αBC の Ser59 でのリン酸化に関与していることが示唆された。

酸素誘発性網膜症モデルマウスでは αBC が VEGF-A と結合し新生血管を誘導することが報告されている[21]。また、糖尿病モデルラットでは非糖尿病ラットに比して pSer59αBC が多く局在することが報告されており[27]、p-p38 MAPK を介して pSer59αBC が VEGF-A の分子シャペロンとして最も重要な役割を果たすと報告されている[21,24]。これらの既報および本検討結果は、ヒトの糖尿病網膜症において p-p38MAPK を介して pSer59αBC が VEGF-A の分子シャペロンとして血管新生に重要な役割を演じていることを示唆している。

今回の検討では、正常網膜の血管組織においては微弱な発現を呈した

pSer59αBC が線維血管組織では強発現しており、また蛍光二重染色で VEGF-A との局在が確認された。同様に、p-p38 MAPK も線維血管組織では発現が多く認められたのに対し、正常結膜ではほとんど確認されず、pSer59αBC の発現量も低い結果となった。これらの結果より、糖尿病網膜症の血管新生では p-p38 MAPK による Ser59αBC のリン酸化が線維血管組織の形成に重要であると考えられた。

近年、αBC が眼球以外の多くの組織で血管新生に関与しているとの報告がなされ[16,29]、また VEGF-A の発現量と血管密度に相関があるとも報告されている[30]。また、動物実験モデルでは pSer59 の発現と血管新生に相関があると報告されている[21]。しかしながら、本検討結果では線維血管組織においては pSer59αBC と血管密度に相関はなかった。この結果については、今回は症例数が限られていたため今後さらなる検討が必要と考えられる。

線維血管組織の血管組織において pSer59αBC のみならず、pSer45αBC にも強い発現が確認された。これに対して、pSer19αBC は微弱な発現しか認められなかった。Ser45 でのリン酸化には ERK が関与しているとされているが、Ser19 におけるリン酸化機序についてはよく知られていない[22]。今回の検討では、pSer45αBC の線維血管組織内の血管組織での発現は、pSer59αBC と比較してより辺縁に局在しており、両者の局在に乖離がみられた。pSer45αBC が糖尿病網膜症の進展に関与するメカニズムに関してはさらなる詳細な検討が必要と考えられる。

現在、未承認ながらも増殖糖尿病網膜症手術前に抗 VEGF-A 製剤の硝子体注射を併用することにより術中・術後の出血を減らし、術後の視力予後を向上させる術前療法が世界的に行われている[6]。今回、術前の抗 VEGF 製剤硝子体注射による pαBC の発現への影響は認められなかった。しかしながら、pSer45αBC に関しては投与群の方がその発現が非投与群に比べて高い傾向にあった（p = 0.07）。この抗 VEGF-A 製剤と pαBC の発現の関係についても、今後さらに症例数を増やし検討を進めていく必要があると考えている。

以上の検討から、増殖糖尿病網膜症の血管新生に伴った線維血管組織の病態進展に、p-p38MAPK によりリン酸化を受けた pSer59αBC が VEGF-A の分子シャペロンとして関与している可能性が示唆された。

結論

１．増殖糖尿病網膜症の線維血管組織では Ser59、Ser45、Ser19 の各部位でリ

ン酸化された αBC は、CD31 陽性血管内皮細胞と共発現していた。
２．線維血管組織では pSer59αBC は CD31 陽性血管内皮細胞で VEGF と共局在していた。
３．線維血管組織では pSer59αBC と p-p38 MAPK が共発現していたが、正常網膜ではその発現がほとんど確認できなかった。
４．本研究の結果から、増殖糖尿病網膜症の病態に p-p38 MAPK を介してリン酸化を受けた pSer59αBC が VEGF-A の分子シャペロンとして関与している可能性が示された。

以上の検討結果を、我々は学術誌 International Journal of Ophthalmology に報告した。

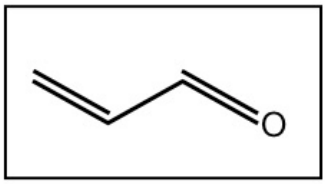
第２章

増殖糖尿病網膜症の病態形成におけるアクロレインの関与

緒言

増殖糖尿病網膜症の病態には、VEGF-Aを初めとした様々なサイトカインや炎症関連分子が関与することが知られているが、その詳細は未だ不明な点も多い。本研究では、増殖糖尿病網膜症における血管新生のメカニズムについてVEGF-A以外の分子に着目して検討をおこなった。

近年、糖尿病網膜症においては脂質過酸化が亢進しており[31]、活性酸素種による酸化ストレスが関与している[32]と報告されている。アクロレインは構造式（CH_2=CHCHO）（図7）で表記される不飽和アルデヒドで、メチル化によりタンパク質のLys, Cys, Hisなどのアミノ酸残基に結合することで複合体を形成し、タンパク変性をもたらす[33,34]。元来、アクロレインは煙草や排気ガスなどの環境汚染物質に含まれ、また油脂の加熱などによって生成されるため、外因性に体内へ取り込まれるものと考えられており、主に肺癌などの呼吸器疾患の領域で検討されてきた[35]。しかしながら、近年不飽和脂肪酸の脂質過酸化[36]やポリアミン代謝[37]を経て内因性にもアクロレインが産生されることが明らかとなり、アルツハイマー病[38]、脳梗塞[39]、心血管疾患[40]や糖尿病[41-43]など幅広い疾患の病態に関与していることが分かってきた。



CH_2=CHCHO

MW: 56.07Da

図７　アクロレインの分子構造式

様々なアクロレイン結合タンパクのうち、Lysと結合することによって生じる生成物はＮε-(3-formyl-3,4-dehydropiperidino) lysine adduct (FDP-Lys)と呼ばれ[34]、FDP-Lysにはglutathione (GSH) などのチオールのカルボニル基に対してアクロレインが結合した生成物も含まれる。抗酸化作用を持つ代表的な酵素であるGSHとアクロレインが結合することにより生体内での還元型GSHが枯渇し、その結果アクロレインは生体内での抗酸化作用を減弱させると言われている[34]。増殖糖尿病網膜症の病態進展には酸化ストレスが主因の一つであることが知られており[44,45]、糖尿病患者血漿中のアクロレインが高値であると報告され

ている[43]。これらのことより、アクロレインもしくはアクロレイン結合タンパクが糖尿病網膜症の病態形成に関与していると推測されるが、増殖糖尿病網膜症におけるアクロレイン結合タンパクに関する報告はない。

本研究の目的は、増殖糖尿病網膜症の病態におけるアクロレインあるいはアクロレイン結合タンパクの関与について検討することである。

実験方法

１．臨床検体

北海道大学病院眼科にて硝子体手術が施行された 2 型糖尿病に起因した増殖糖尿病網膜症患者（11 例 11 眼、男性 5 例、女性 6 例、平均年齢 44.3±3.7 歳）から治療目的に切除された線維血管組織、およびその対照群として黄斑上膜患者（3 例 3 眼、男性 3 例、平均年齢 71.3±3.3 歳）から治療目的に除去された黄斑上膜を用いた。増殖糖尿病網膜症患者の臨床像については表 3 に示した。線維血管組織および黄斑上膜は直ちに 4%パラホルムアルデヒドによって固定した。

本研究に使用した臨床検体は全て書面により同意を得た患者より採取しており、臨床検体の扱いは北海道大学病院自主臨床研究審査委員会に承認を受け（IRB #014-0293）、「北海道大学病院における臨床研究の取り扱いに関する指針」に準じた。

Case	Age(y/o)	Gender	HbA1c (%)	VH	TRD
1	35	Male	7.9	+	-
2	51	Female	6.8	+	-
3	52	Male	6.8	+	-
4	20	Female	5.4	+	-
5	37	Female	9.5	-	+
6	41	Male	5.3	-	+
7	41	Male	5.8	+	-
8	39	Female	9.0	+	-
9	57	Male	7.0	+	-
10	49	Female	6.4	-	+
11	65	Female	5.8	+	-

表 3　増殖糖尿病網膜症患者の臨床像

２．免疫組織化学染色

4%パラホルムアルデヒドにて固定された組織をパラフィンで包埋し、切片を作製した。キシレンおよびエタノールを用いて脱パラフィンを行い、抗原賦活化には10mMクエン酸バッファー(pH6.0)を用いて電子レンジで行った。次に0.3%過酸化水素を用いて内因性ペルオキシダーゼをブロックしたのち、切片に 10%正常ヤギ血清（Life Technologies）含有 PBS を滴下し室温で 30 分間ブロッキングを行った。その後、以下に述べる一次抗体を用いて4℃で一晩一次抗体反応を行った: mouse anti-FDP-Lys (50 倍希釈; NOF CORPORARION, Tokyo, Japan)、rabbit anti-glial fibrillary acidc protein (GFAP、500 倍希釈; DAKO, Glostrup, Denmark)、rabbit anti-CD34 (50 倍希釈; Leica MICROSYSTEMS, Newcastle, UK)。その後、切片を peroxidase-labeled polymer（En Vision; DAKO）を用いて二次抗体反応を行った。陰性コントロールとして、mouse IgG1（2μg/ml; DAKO）を mouse anti-FDP-Lys の代わりに使用した。また、事前に mouse anti-FDP-Lys の特異性を確かめるために抗体吸収試験を行った。FDP-Lys および CD34 の発色に 3,3’-diaminobenzidine tetrahydrochloride（DAB, DAKO）を、また GFAP の発色に 3-amino-9-ethylcarbazole（AEC, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO）または DAB（DAKO)を用い、対比染色として hematoxylin を用いた。組織における局在の同定および FDP-Lys の染色強度については、二重盲検法で Keyence BZ-9000 series（BIOREVO）を用いて以下の様に 3 段階に分類した；-（細胞外基質と同等）、+（中等度）、++（強度）。

３．形態計測解析

線維血管組織における血管新生の程度を測るため、既報に準じて 1mm^2 あたりの CD34 陽性血管数を計測し、血管密度を計測した[46]。その上で、線維血管組織を FDP-Lys の染色強度に準じて二群に分け、FDP-Lys の染色強度と血管密度との関係を調べた。

４．蛍光免疫染色

線維血管組織における細胞内の FDP-Lys の局在を調べるため、免疫組織染色を施行した。免疫組織化学染色の時と同様にブロッキングを行った後、下記一次抗体を用いて4℃で一晩反応を行った;mouse anti-FDP-Lys, rabbit anti-GFAP, rabbit anti-CD34 および、rabbit anti-alpha smooth muscle actin（α-SMA, 100

倍希釈；Abcam, Cambridge, MA）。その後、Alexa Fluor 488 および 546 (Life Technologies)にて二次抗体反応を施行し、核染色は DAPI （500 倍希釈; Lonza）で行った後に、蛍光顕微鏡 Keyence BZ-9000 series (Keyence) を用いて観察した。

５．細胞培養、生細胞率および細胞増殖測定

Human retinal microvascular endothelial cells (HRMECs)を Cell Systems Corporation (Kirkland, WA)より購入した。細胞は Collagen Ⅰコート 96well plate に 6×10^3cells/well ずつ撒種し、培地には CS-C complete medium (Cell Systems Corporation) を用いた。生細胞率測定は RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI) を用いて、アクロレイン刺激 24 時間後 (10-200μM) に測定した。細胞増殖に関する検討では、アクロレインで HRMECs を 24 時間刺激した後、細胞内に取り込まれた 5-bromo-2’deoxyuridine (BrdU)を BrdU cell proliferation enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キット (Roche, Mannheim, Germany)を用いて計測した。

６．Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Heme oxygenase-1 (*HO-1*)の mRNA 発現は qPCR を用いて解析した。HRMECs は CS-C complete medium 下にて Collagen Ⅰコート 96well plate に 2×10^5cells/well ずつ撒種した。細胞を無血清培地に交換し、その 16 時間後にアクロレイン刺激を行った。刺激 6 時間に TRIzol Reagent (Life Technologies) を用いて RNA を回収し、GoScript reverse transcriptase (Promega)を用いて逆転写を行い、cDNA を作成した。遺伝子発現解析には下記に示したプライマー、SYBR Green および GoTaq qPCR Master Mix (Promega)を用い、反応条件を 95℃2 分、続いて 95℃15 秒、60℃60 秒を 40 サイクルとし、StepOne Plus Real-Time PCR System (Life Technologies)のプログラムで自動測定した。*HO-1* のプライマーには 5′ - GCC AGC AAC AAA GTG CAA G -3′ (forward) and 5′ - GAG TGT AAG GAC CCA TCG GA -3′ (reverse) (GenBank number NM_002133); 105 bp を用い、内因性コントロールとして 5′ -CGA GCA CAG AGC CTC GCC TT-3′ (forward) and 5′ -AGC GCG GCG ATA TCA TCA TCC-3′ (reverse) (NM_001101); 83 bp の *ACTB* を用いた。全てのデーターは内因性コントロールである *ACTB* を各サンプル中の遺伝子の相対発現量をΔΔCT 法で算出した。

7．統計解析

結果は全て平均値±標準誤差で示した。各群間の比較検討には生細胞率および細胞増殖測定には one-way analysis of variance (ANOVA)で行い、事後比較は Dunnett’s test を用いた。形態学的な検討については Student’s *t*-test を用いて解析した。*p* 値が 0.05 を下回った場合に統計学的に有意差があるとした。

結果

１．線維血管組織におけるアクロレインの局在

11 例の増殖糖尿病網膜症患者より治療目的で切除された線維血管組織において、アクロレイン結合タンパクである FDP-Lys の局在を免疫組織化学染色によって検討した。全ての線維血管組織において、CD34 陽性の血管組織が認められたが（100%、表 4）、その一方で GFAP 陽性である網膜グリア細胞は 11 例中 5 例でのみ認められた（45.5%、表 4）。

Case	GFAP	FDP-Lys Adduct		CD34	Vascular Density (vessels/mm²)
		Glial cell	Endothelial cell		
1	-	-	++	+	234.30
2	-	-	++	+	520.85
3	+	+	+	+	366.85
4	-	-	-	+	131.04
5	-	-	+	+	99.88
6	-	-	-	+	22.67
7	+	++	++	+	492.68
8	+	++	-	+	161.33
9	+	++	-	+	59.03
10	+	-	+	+	393.49
11	-	-	++	+	605.92
Positive Ratio	45.5%	80.0%	63.6%	100.0%	

表 4　線維血管組織における FDP-Lys の局在と血管密度

また、11 例中 7 例の検体で CD34 陽性血管に一致して FDP-Lys が局在していた（63%、図 8 および表 4）。

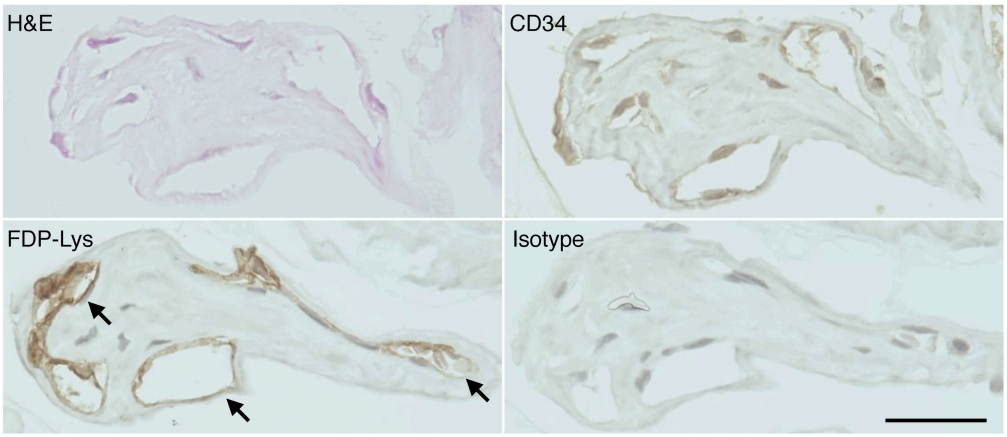


図 8　線維血管組織における FDP-Lys の局在

線維血管組織における FDP-Lys と CD34 の局在。左上：H&E 染色、右上：CD34、左下：FDP-Lys、右下：Isotype control。Scale bar：30μm。

一方、網膜グリア細胞を有する 5 例の線維血管組織のうち、4 例において FDP-Lys の局在がみられた（80.0%、図 9、表 4）。

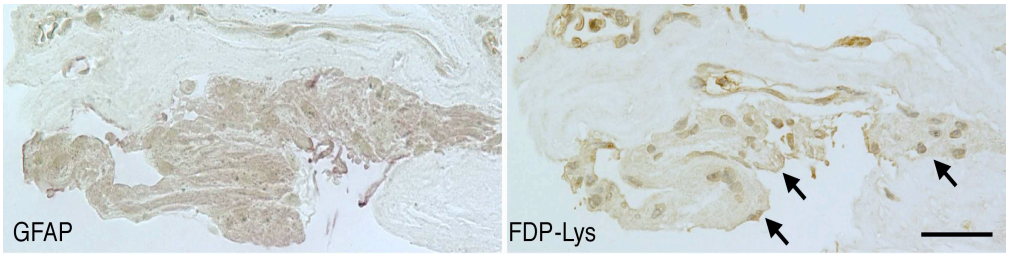


図 9　線維血管組織における FDP-Lys の局在

線維血管組織における FDP-Lys と GFAP の局在。左：GFAP、右：FDP-Lys。Scale bar：30μm。矢印は FDP-Lys 陽性グリア細胞を示す。

しかしながら、黄斑上膜では FDP-Lys の局在は確認できなかった（図 10）。

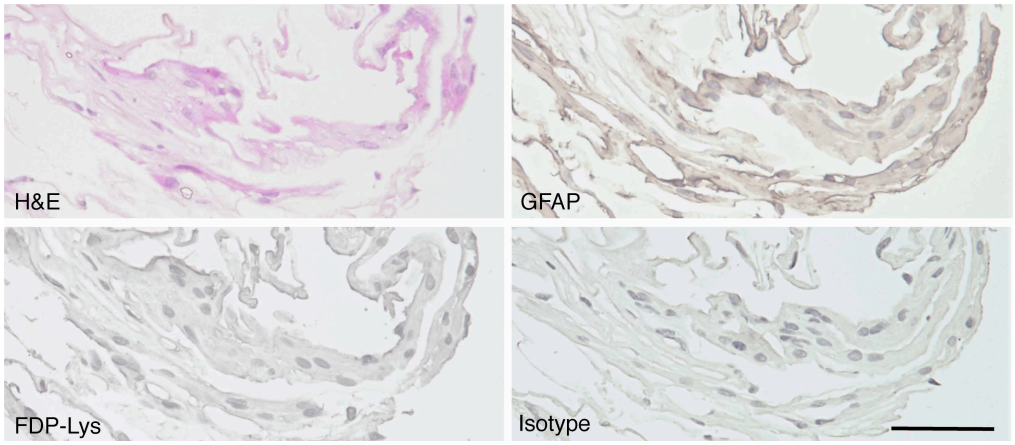


図 10　線維血管組織および黄斑上膜における FDP-Lys の局在

黄斑上膜における FDP-Lys と GFAP の局在。左上：H&E 染色、右上：GFAP、左下：FDP-Lys、右下：Isotype control。Scale bar：30μm。

次に、細胞内での FDP-Lys の細胞内局在を検討するために蛍光二重染色をおこなったところ、FDP-Lys は GFAP 陽性グリア細胞の細胞質のみならず核にも局在が認められた（図 11）。

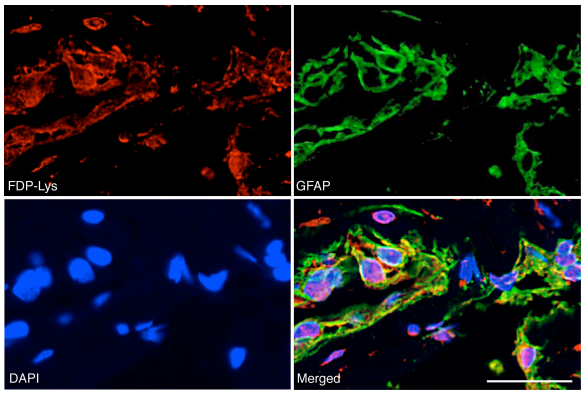


図 11　線維血管組織のグリア細胞における FDP-Lys の局在

線維血管組織における FDP-Lys（赤）と GFAP（緑）の局在。細胞核（青）。Scale bar：30μm。

さらに、FDP-Lys は CD34 陽性の血管内皮細胞（図 12）およびα-SMA 陽性の周皮細胞にも局在しており（図 13）、本結果から FDP-Lys は血管構造において血管内皮細胞と周皮細胞の両者に存在することが明らかとなった。

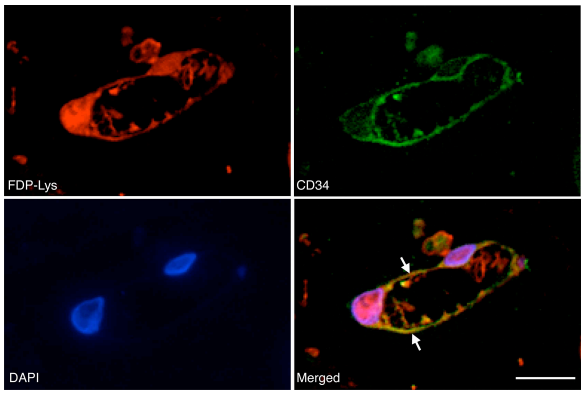


図 12　線維血管組織の血管内皮細胞における FDP-Lys の局在

線維血管組織における FDP-Lys（赤）と CD34（緑）の局在。細胞核（青）。
Scale bar：30μm。

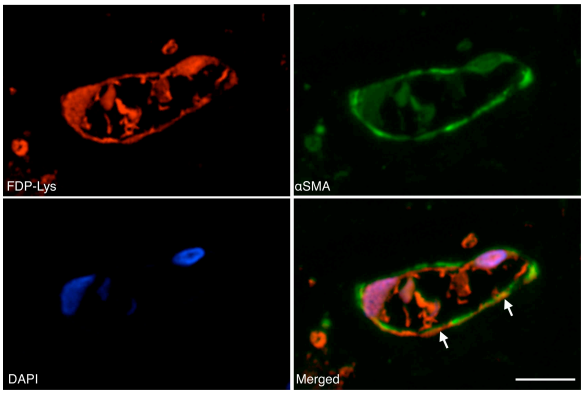


図 13　線維血管組織の血管内皮細胞における FDP-Lys の局在

線維血管組織における FDP-Lys（赤）とα-SMA（緑）の局在。細胞核（青）。
Scale bar：30μm。

２．細胞増殖における FDP-Lys の関与

線維血管組織形成における FDP-Lys の関与を調べるため、FDP-Lys の局在と血管密度の関係を検討した（表 4）。その結果、FDP-Lys 陽性の血管が存在した線維血管組織は局在しないそれと比較して、血管密度が有意に高かった（93.52±31.90 vessels/mm^2 vs 387.71±66.04 vessels/mm^2, $p < 0.05$, 図 14）。

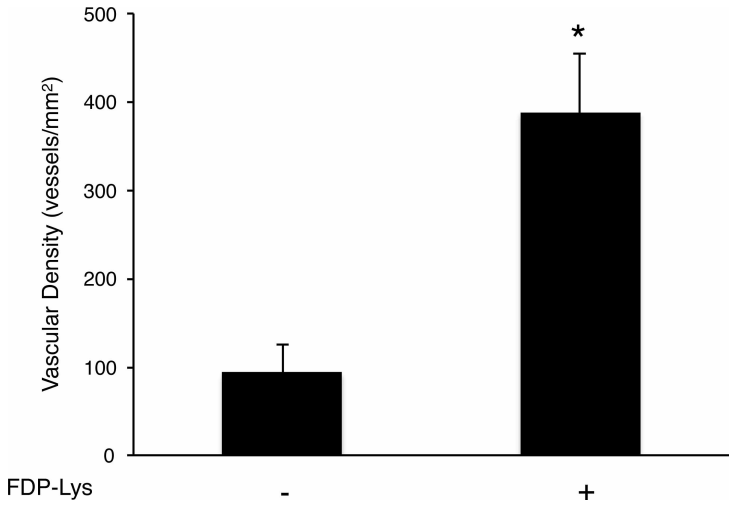


図 14　線維血管組織の FDP-Lys の発現の有無と血管密度の関係

FDP-Lys 陽性の血管を有する線維血管組織は有しない組織と比較して有意に血管密度が高値であった。n = 4 to 7 *, $p < 0.05$。

本結果は、アクロレインまたはアクロレイン結合タンパク、もしくはその両者が線維血管組織における血管新生に寄与していることを示唆していた。

次に、アクロレインが血管内皮細胞に及ぼす影響を検討するため、アクロレイン刺激後における HRMECs の生細胞率および細胞増殖能を検討した。アクロレイン刺激 24 時間後では、高濃度刺激群では生細胞率は低下したが（100μM, 64.1±3.8%, $p < 0.01$; 200μM, 29.4±0.8%, $p < 0.001$, 図 15)、その一方で低濃度刺激群（50μM）では生細胞率の増加が認められた（114.7±3.1%, $p < 0.05$, 図 15)。

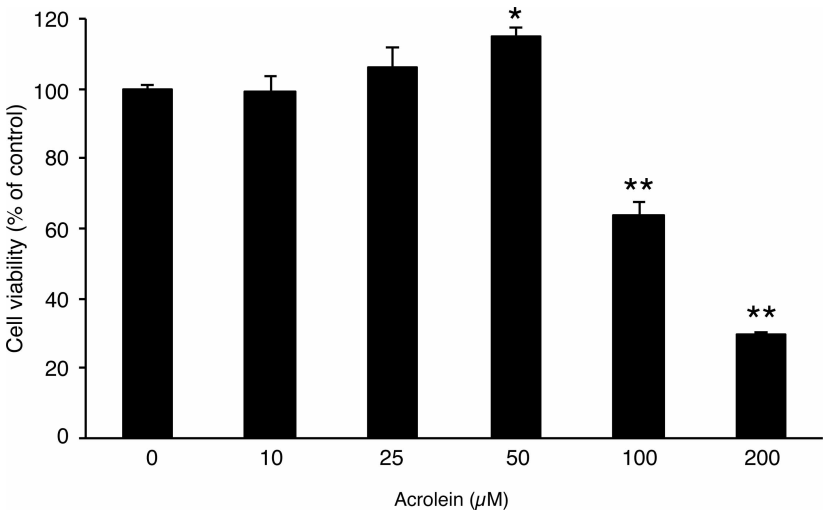


図 15　アクロレイン刺激による HRMECs の生細胞率測定

高濃度のアクロレイン刺激（100 および 200μM）では生細胞率は低下下したが、低濃度刺激（50μM）では生細胞率は増加した(n = 4)。
*, $p < 0.05$ **, $p < 0.01$。

また、アクロレイン低濃度刺激(50μM)24時間後ではBrdU incorporation rateの増加が認められた（117±8, $p < 0.01$, 図16)。本検討結果は、低濃度のアクロレインは血管内皮細胞の増殖を誘導することを示していた。

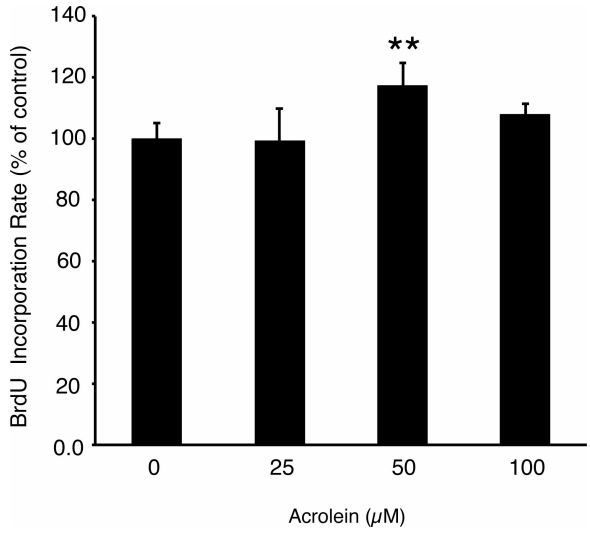


図16　アクロレイン刺激によるHRMECsの細胞増殖能測定

低濃度のアクロレイン刺激（50μM）ではHRMECsの細胞増殖能は増加した（n = 4)。**, $p < 0.01$。

さらに、この低濃度アクロレイン刺激(50μM)は *HO-1* の遺伝子発現を増加させることも明らかとなった（n = 3, $p < 0.01$, 図 17)。

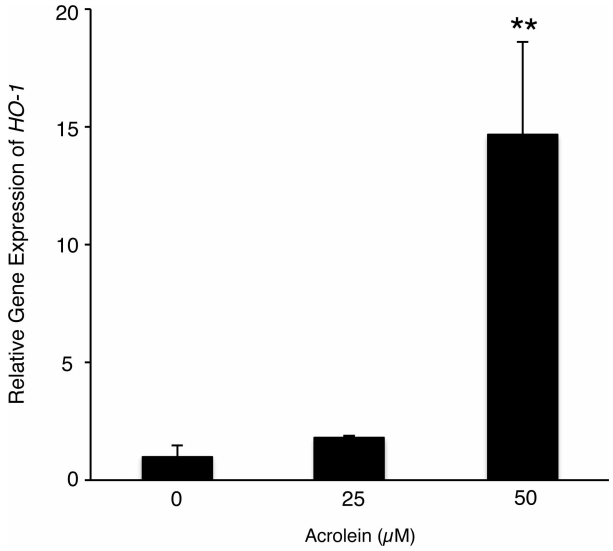


図 17　アクロレイン刺激による HRMECs での *HO-1* の発現変化

低濃度のアクロレイン刺激（50μM）では HRMECs から *HO-1* の遺伝子遺伝子発現レベルの増加が確認された(n = 3)。**, $p < 0.01$。

考察

本研究により、１）FDP-Lys が増殖糖尿病網膜症患者から採取された線維血管組織に局在し、２）その中でも網膜グリア細胞、血管内皮細胞および血管周皮細胞に存在し、３）FDP-Lys の発現を強く認めた線維血管組織はその血管密度が高いことが明らかとなった。さらに、培養網膜血管内皮細胞を低濃度のアクロレインで刺激すると、生細胞率、細胞増殖能および *HO-1* の遺伝子発現が増加することが明らかとなった。上記より、アクロレイン結合タンパクは増殖糖尿病網膜症の病態進展に血管新生を介して関与していることが示唆された。

糖尿病患者は血漿中のアクロレインが高値であるのに加え[43]、2 型糖尿病患者の尿中の FDP-Lys 濃度は非糖尿病患者に比べて高値であると報告されている[41]。また、糖尿病腎症の組織ではアクロレイン結合タンパクが確認されており、そ

のシグナル強度は組織学的な病期と相関するとされている[42]。また、過去の報告では、streptozotocin (STZ)誘発糖尿病ラットモデルでは網膜の内境界膜から内顆粒層にかけて FDP-Lys の免疫活性が増加しており、このことは糖尿病網膜ではミュラー細胞（網膜グリア細胞）で FDP-Lys の蓄積もしくは産生が行われていることを示唆している[47]。しかしながら、これまで糖尿病患者の眼組織におけるアクロレインもしくはアクロレイン結合タンパクの局在に関する報告はなかった。本研究において、我々は初めて増殖糖尿病網膜症患者の眼組織で網膜グリア細胞のみならず、血管内皮細胞および血管周皮細胞にもアクロレイン結合タンパクが存在することを確認した。過去には、内因性に産生されたアクロレインは血管収縮の調節を担っているとの報告があり[48]、線維血管組織の血管内皮細胞および周皮細胞でアクロレイン結合タンパクが存在したことから、網膜血管内皮細胞でもアクロレインもしくはアクロレイン結合タンパクが産生される可能性が示される。一方で、糖尿病患者の血漿中の FDP-Lys が高値であることから[43]、血中の FDP-Lys が血管内皮細胞に蓄積している可能性もある。この FDP-Lys の由来、つまり血管内皮細胞、周皮細胞や網膜グリア細胞が産生するのか、もしくは蓄積されているのかという点についてはさらなる研究が必要である。

今回の検討では、FDP-Lys は血管内皮細胞、周皮細胞および網膜グリア細胞の細胞質のみならず核にも存在していた。アクロレインは不飽和アルデヒドであり、不安定な分子であるため様々なタンパクと結合し[49]、近年の報告ではアクロレインは核内へ移行する分子群、例えば NF-kappa B1[50] や glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)[51] にも結合することが知られている。このことは、アクロレインが転写因子に結合し核内へ移行することによりその形質を変化させ、糖尿病網膜症の進展に関与していることも推測された。

また、本検討では、FDP-Lys が局在していた血管内皮細胞を有する線維血管組織の血管密度が高値であった。これに加えて、培養網膜血管内皮細胞を用いたアクロレイン刺激実験において、高濃度のアクロレイン刺激では細胞毒性が認められたが、低濃度刺激下では逆に生細胞率および細胞増殖能の増加が認められ、これに加えて *HO-1* の遺伝子発現の増加も確認された。HO-1 は元来ストレスを誘因に増加する、抗酸化作用を有するタンパクとして知られていたが、近年は血管新生を誘導するとの報告がある[52]。過去の報告では、ウシの大動脈および

ヒトの気管支内皮細胞でアクロレイン刺激により *HO-1* の遺伝子発現が増加するとされ[53,54]、近年では Wu ら[53]が低濃度のアクロレイン刺激は *HO-1* の遺伝子発現を誘導すると報告している。アクロレインにより *HO-1* の遺伝子発現が増加して血管新生に関与するという報告は他にも存在し[55,56]、本検討の結果であるアクロレインの低濃度刺激が血管新生を惹起しているという結果に矛盾しないが、糖尿病網膜症の進展機序における HO-1 の役割についてはさらなる検討が必要と考えている。

以上の結果より、増殖糖尿病網膜症網膜症の線維血管組織にアクロレイン結合タンパクが存在し、血管内皮細胞の増殖を介してその病態形成に関与していることが示唆された。

結論

１．FDP-Lys は増殖糖尿病網膜症患者の線維血管組織に存在していた。

２．線維血管組織の中では、網膜グリア細胞、血管内皮細胞および血管周皮細胞に局在していた。

３．FDP-Lys の発現を強く認めた線維血管組織はその血管密度が高値であった。

４．培養網膜血管内皮細胞を低濃度アクロレイン刺激で刺激すると、生細胞率、細胞増殖および *HO-1* の遺伝子発現が増加した。

５．本研究の結果から、アクロレイン結合タンパクが細胞増殖や血管新生を介して増殖糖尿病網膜症の病態に関与している可能性が示された。

以上の検討結果を、我々は学術誌 Current Eye Research に報告した。

第 3 章

特発性黄斑上膜の病態形成における受容体結合プロレニン系の関与

緒言

特発性黄斑上膜は単眼性複視、歪視などにより視力低下を生じさせ、その有病率は 50 歳以上で 7.7%にものぼるとされている[1,2]。特発性黄斑上膜の病態形成には諸説あるが、その多くが不完全な後部硝子体剥離による後部硝子体膜の網膜側への遺残に、遊走・増殖した網膜グリア細胞（Müller 細胞)による修飾が加わることが一因とされている[57-60]。さらに、特発性黄斑上膜の病態形成には様々な線維化に働くサイトカインが関与していると報告されているが[61]、その詳細なメカニズムは知られていない。

レニン・アンジオテンシン系（renin-angiotensin system: RAS）は、循環 RAS（circulatory RAS）として血圧や体液を調整する循環ホルモンシステムとして働くが、一方で網膜を含む臓器局所では細胞の分化・増殖など組織修復などの役割を担い、組織 RAS（tissue RAS）としても作用している[62]。また、従来の RAS の経路とは独立して、prorenin が(pro)renin 受容体[(P)RR]に結合し、renin と同等の生理活性を獲得することで、組織 RAS の活性化を惹起することが明らかとなっており、この両者の経路は合わせて receptor-associated prorenin system（受容体結合プロレニン系；RAPS）（図 18）と呼ばれ、網膜での炎症や血管新生に深く関与していることが報告されてきた[63,64]。これまでに我々は、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体液中では可溶性(P)RR タンパク質濃度が増加していることを報告している[65,66]。また、Maruichi らによれば angiotensin Ⅱ（Ang Ⅱ）変換酵素である chymase および angiotensin-converting enzyme（ACE）が黄斑上膜や黄斑円孔、増殖糖尿病網膜症の硝子体中で活性化されていたと報告している[67]。これらの報告から、特発性黄斑上膜の病態形成に RAS が寄与している可能性が考えられる。

本研究の目的は、RAS および RAPS がどのように特発性黄斑上膜の病態形成に関与しているのか、そのメカニズムについて検討することである。

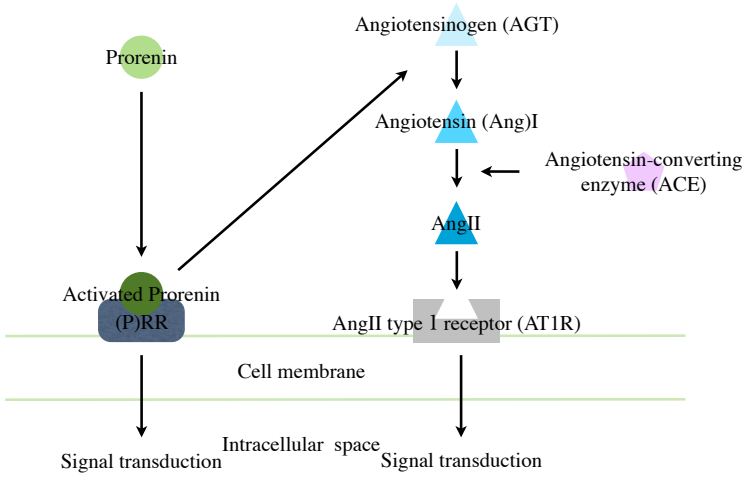


図 18　受容体結合プロレニン系
(receptor-associated prorenin systems: RAPS)

実験方法

１．臨床検体

北海道大学病院眼科にて硝子体手術が施行された特発性黄斑上膜患者（10 例 10 眼）から治療目的に切除された黄斑上膜組織、そのうち 6 例を免疫化学染色に、残りの 4 例を遺伝子発現解析に用いた。黄斑上膜組織は直ちに 4%パラホルムアルデヒドにて固定した。

本研究に使用した臨床検体は全て書面により同意を得た患者より採取しており、臨床検体の扱いは北海道大学病院自主臨床研究審査委員会に承認を受け（IRB #015-0226）、「北海道大学病院における臨床研究の取り扱いに関する指針」に準じた。なお、正常ヒト網膜および胎盤の cDNA は Dr. Anand Swaroop（National Eye Institute, Bethesda, MD）より供与された。

２．細胞と試薬

培養ヒト Müller 細胞（MIO-M1）は Dr. G. Astrid Limb（UCL Institute of Ophthalmology, London, United Kingdom）より供与された [68]。細胞は 10%ウシ胎児血清（Life Technologies）を添加した Dulbecco’s modified Eagle’s

medium で、37℃、5%CO_2 濃度で培養した。GeneDesign 社 (Osaka, Japan) へ既報[65]に準じてヒト(pro)renin 受容体阻害剤(PRRB)として prorenin と(pro)renin 受容体の結合を阻害するデコイドペプチド NH_2-RIFLKRMPSI-COOH の合成・精製を依頼した。MIO-M1 細胞は無血清培地に置換後、1μM PRRB もしくは、10μM の AngⅡ type 1 receptor (AT1R) blocker losartan (Sigma-Aldrich)で 1 時間前に前処置を施行した。その後 10nM の prorenin または 1uM の AngⅡを添加し、投与 24 時間後に細胞を回収し遺伝子発現解析を行った。

３．RNA 抽出、Transcription-PCR (RT-PCR) および q PCR

細胞から SuperPrep Cell Lysis (TOYOBO, Tokyo, Japan) を用いて RNA を回収し、RT Kit for qPCR (TOYOBO) で RNA の逆転写を施行した。同様に、組織においては TRIzol (Life Technologies) を用いて RNA を回収し、GoScrip Reverse Transcriptase (Promega)を使用し、RNA の逆転写を施行した。次に述べるプライマー、*(pro)renin receptor* (*(P)RR;* forward 5'-AGG CAG TGT CAT TTC GTA CC-3' reverse 5'-GCC TTC CCT ACC ATA TAC ACT C-3')、 *prorenin* (*REN;* forward 5'-GTG TCT GTG GGG TCA TCC ACC TTG-3', reverse 5'-GGA TTC CTG AAA TAC ATA GTC CGT-3')、 *angiotensinogen(AGT;* forward 5'-CTG CAA GGA TCT TAT GAC CTG C-3', reverse 5'-TAC ACA GCA AAC AGG AAT GGG C-3')、 *ACE* (forward 5'-CCG AAA TAC GTG GAA CTC ATC AA-3', reverse 5'-CAC GAG TCC CCT GCA TCT ACA-3')、 AT1R (forward 5'-AGG GCA GTA AAG TTT TCG TG-3', reverse 5'-CGG GCA TTG TTT TGG CAG TG-3')、 AT2R (forward 5'-GGC CTG TTT GTC CTC ATT GC-3' reverse 5'-CAC GGG TTA TCC TGT TCT TC-3')、 *fibroblast growth factor* 2 (*FGF2;* forward 5'-ACG GCG TCC GGG AGA A-3', reverse 5'-ACA CTC CCT TGA TGG ACA CAA CT-3')、 *glial cell line-drived neurotrophic factor (GDNF;* forward 5'-CCA ACC CAG AGA ATT CCAGA-3', reverse 5'-AGC CGC TGC AGT ACC TAA AA-3')、 *nerve growth factor (NGF;* forward 5'-ATA CAG GCG GAA CCA CAC TC-3', reverse 5'-TGC TCC TGT GAG TCC TGT TG-3')、 *transforming growth factor-β1* (*TGFB1;* forward 5'-GCC CTG GAC ACC AAC TATT G-3', reverse 5'-CGT GTC CAG GCT CCA AAT G-3')、 *TGFB2* (forward 5'-AGA GTG CCT GAA CAA CGG ATT-3', reverse 5'-CCA TTC GCC TTC TGC TCT T-3')、 *connective tissue growth factor* (*CTGF;* forward 5'-TTG GCA GGC TGA TTT CTA GG-3', reverse 5'-GGT GCA AAC ATG TAA CTT TTG G-3')、 *chymase 1* (*CMA1;* forward 5'-AAC ACT TCT ACT CTT CAC CACGA-3', reverse

5'-GGC TTC AAC ACA CCT GTT CTT-3')、 *18S ribosomal RNA* (*18SrRNA*; forward 5'-GAA TCG AAC CCT GAT CCC CGT C-3', reverse 5'-CGG CGA CGA CCC ATT CGA AC-3')と、GoTaq qPCR Master mix (Promega)を用いStepOne plus Systems (Life Technologies)を使用しreal-time PCRを行った。反応条件は95℃ 2分、95℃ 15秒、60秒 60秒を1サイクルとし、40サイクル施行した。Threshold cycle (C_T) 値はStepOnePlus Real-Time PCR Systemにより自動的に測定され、内因性コントロール *18S ribosomal RNA* を用いて各サンプル中の遺伝子の相対的発現量をΔΔCT法で算出した。

４．免疫組織染色

4%パラホルムアルデヒドにて固定された組織をパラフィンで包埋し、切片を作製した。キシレンおよびエタノールを用いて脱パラフィンを行い、抗原賦活化には 10mM クエン酸バッファー(pH6.0)を用いて電子レンジで行った。次に切片に5%正常ヤギ血清 (Life Technologies) と 0.05% Triton X-100 含有 PBS で室温 1 時間かけてブロッキングを行った。その後、以下に述べる一次抗体を用いて 4℃で一晩一次抗体反応を行った：rabbit anti-(P)RR (Sigma-Aldrich)、mouse anti-prorenin (Abcam) 、 rabbit anti-AT1R and goat anti-angiotensinogen (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、 mouse anti-FGF2 (Millipore, Temecula, CA)、goat anti-GDNF、goat anti-NGF、mouse anti-TGF-β1 and mouse anti-α-SMA (R&D systems, Minneapolis, MN)、 mouse anti-GFAP (Leica)。その後、AlexaFluor 488 and 546 (Life Technologies)にて二次抗体反応を行い、核染色にはDAPI (Lonza) を用いた。切片は蛍光顕微鏡 Keyence BZ-9000 series (BIOREVO) で観察した。

５．統計解析

結果は全て平均値±標準誤差で示した。各群間の比較検討は Student's *t*-test を用いて解析した。*p* 値が 0.05 を下回った場合に統計学的に有意差があるとした。

結果

１．特発性黄斑上膜組織および培養ヒト Müller 細胞における RAS コンポーネントの発現解析

特発性黄斑上膜における RAPS の組織学的な解析のために、まず初めに RAPS コンポーネント[*(P)RR*, *REN* (*prorenin*), *AGT*, *ACE*, *AT1R* and *AT2R*] および *CMA1* の遺伝子発現解析を特発性黄斑上膜組織および培養ヒト Müller 細胞　MIO-M1 で行った。その結果、特発性黄斑上膜組織および MIO-M1 細胞では RAPS コンポーネントの遺伝子発現が認められた。一方、*CMA1* の発現はヒト網膜および胎盤ではその発現が認められたが、今回の検討では特発性黄斑上膜組織での発現は確認できなかった（図 19）。

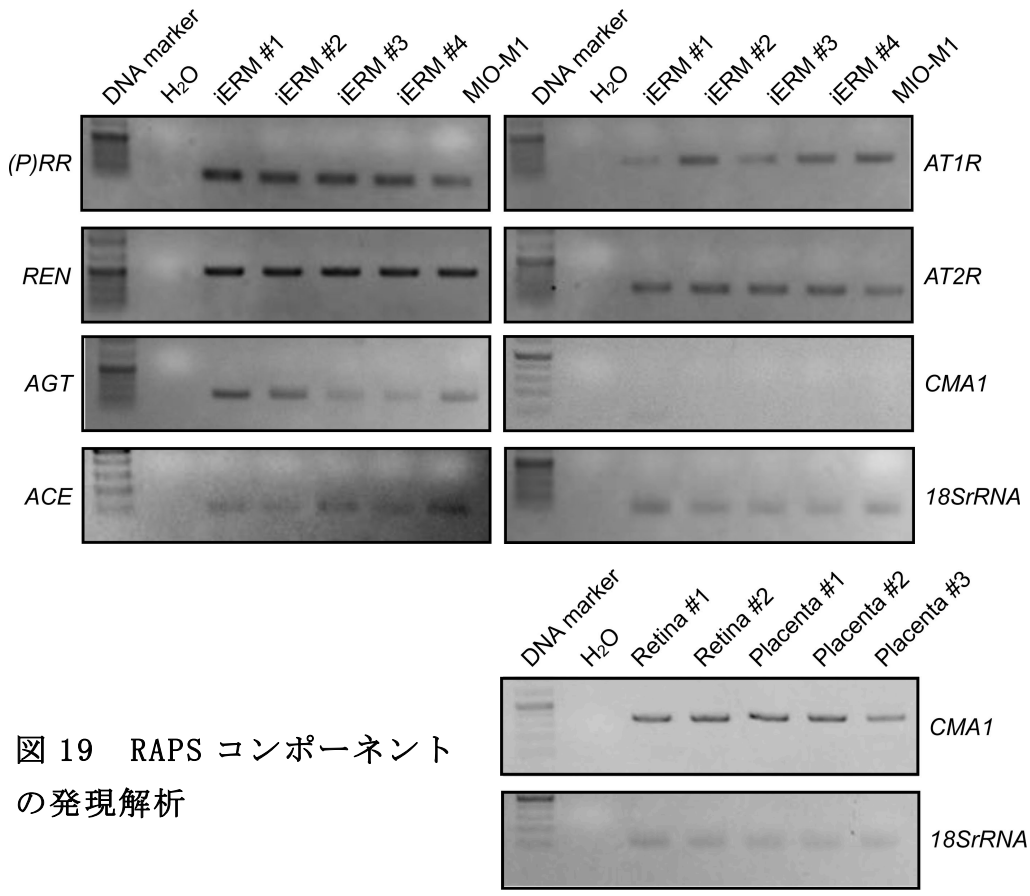


図 19　RAPS コンポーネントの発現解析

特発性黄斑上膜組織、培養ヒト Müller 細胞、ヒト網膜および胎盤における遺伝子解析。iERM：特発性黄斑上膜。

２．特発性黄斑上膜組織における prorenin および(P)RR タンパクの局在

次に、(P)RR の特発性黄斑上膜組織における局在を蛍光二重染色法により解析を行った。既報によると、Müller 細胞および myofibroblasts が特発性黄斑上膜を構成している主な細胞とされ、それぞれ GFAP および α-SMA を発現していると報告されている[61,69,70]。本検討では、(P)RR は GFAP（図 20A-C）および α-SMA（図 20D-F）との共局在が確認された。さらに、特発性黄斑上膜組織の中の Müller 細胞では prorenin と(P)RR の共局在が認められた。

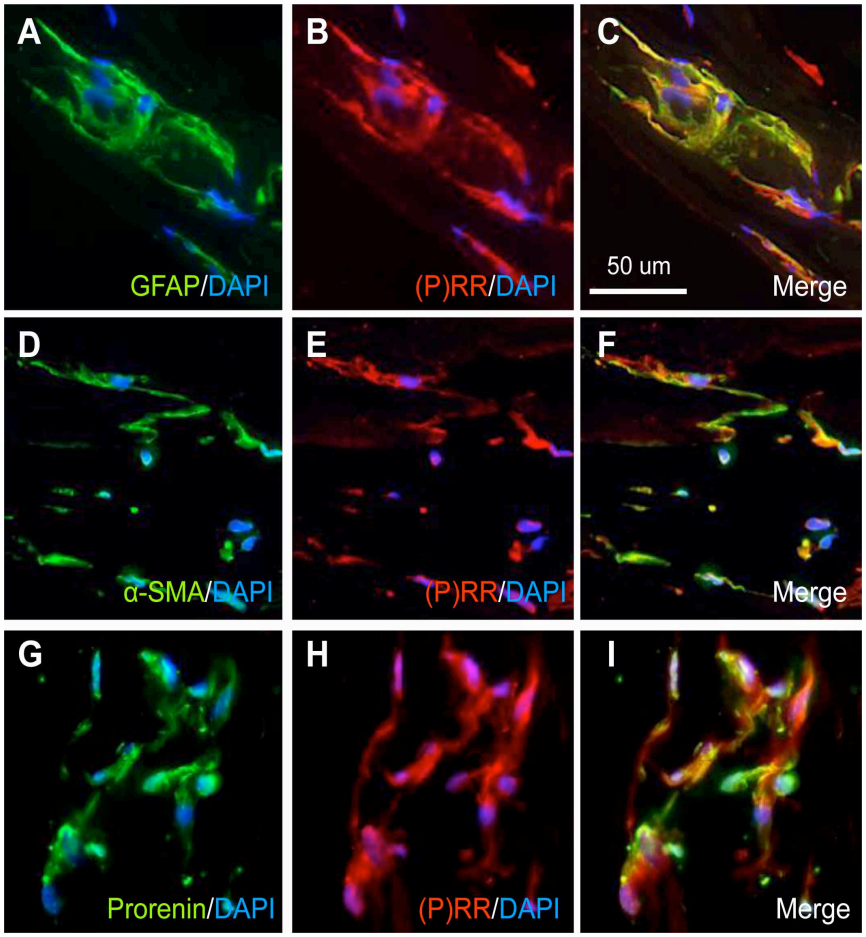


図 20　特発性黄斑上膜組織における(P)RR の局在

A-C：(P)RR と GFAP、D-F：(P)RR と α-SMA、G-I：(P)RR と prorenin。線維血管組織では(P)RR は GFAP、α-SMA および prorenin と共局在していた。Scale bar：50μm。

３．特発性黄斑上膜組織における AGT および AT1R 受容体タンパクの局在

さらに、特発性黄斑上膜組織における AT1R の局在を確認すべく、先ほどと同様に GFAP およびα-SMA で蛍光二重染色を施行した。その結果、Müller 細胞および myofibroblasts に AT1R が共局在しているのが確認された。これに加えて AGT と AT1R が特発性黄斑上膜組織中の Müller 細胞で共局在しているのが認められた（図 21）。

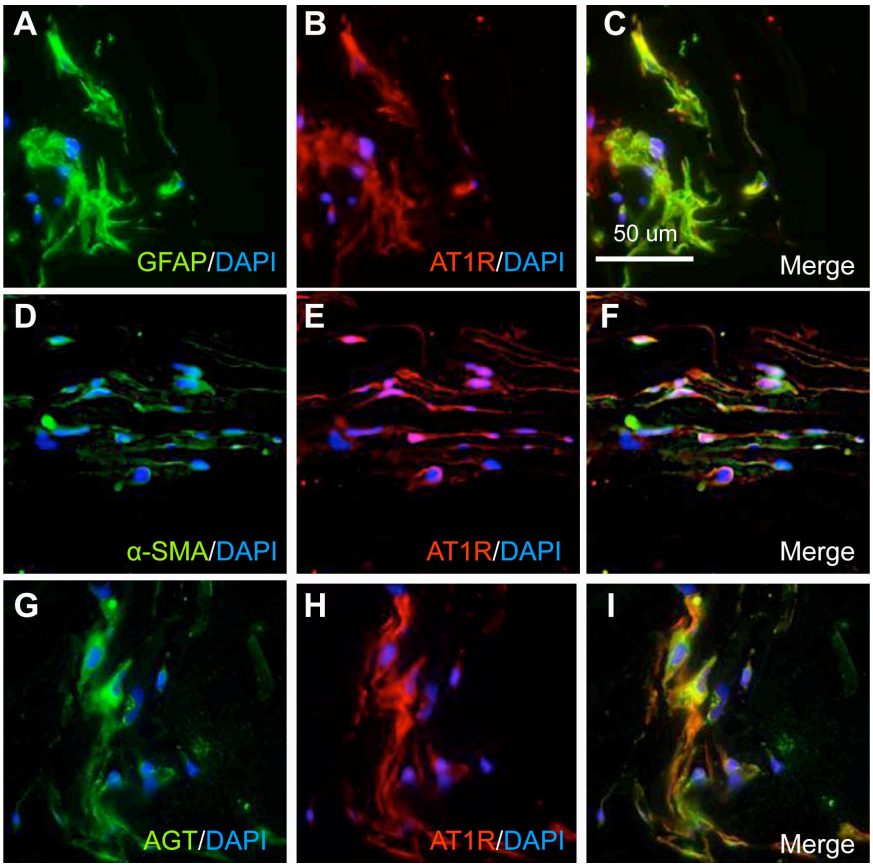


図 21　特発性黄斑上膜組織における AT1R の局在

A-C：AT1R と GFAP、D-F：AT1R とα-SMA、G-I：AT1R と ATG。線維血管組織では AT1R は GFAP、α-SMA および ATG と共局在していた。Scale bar：50μm。

４．Prorenin および AngⅡ刺激による線維化関連サイトカインの発現解析

Prorenin-(P)RR および AngⅡ-AT1R の伝達経路は *in vivo* でも *in vitro* の実験でも多彩な遺伝子発現を誘導し、様々な眼疾患に関与していると報告されている[62-65]。特発性黄斑上膜の構成細胞としては Müller 細胞、網膜色素上皮細胞、fibroblast や myofibroblast などが知られているが[71-73]、中でも Müller 細胞は主たる構成細胞として知られており、様々なサイトカインや栄養因子が特発性黄斑上膜の進展に関与しているとされている[58,61,68,70,73-76]。また、AngⅡがラット心臓線維芽細胞にてコラーゲン合成に関与することは知られているが[77]、Müller 細胞における AngⅡの役割については余り知られていない。

そこで、培養ヒト Müller 細胞　MIO-M1 を用いて prorenin および AngⅡ刺激を行い、線維化を誘導するサイトカインの遺伝子解析を real-time qPCR で検討した。Prorenin 刺激によりコントロール群と比較して、*FGF2*（fold change = 1.49, $p<0.05$）および *GDNF*　（fold change = 1.81, $p < 0.01$）は有意な遺伝子発現レベルの上昇を認め、その阻害剤である PRRB を前投与したところその発現レベルは有意に抑制された（*FGF2,* fold change = 0.99, $p < 0.05$; *GDNF,* fold change = 1.31, $p < 0.05$）（図 22A、B）。

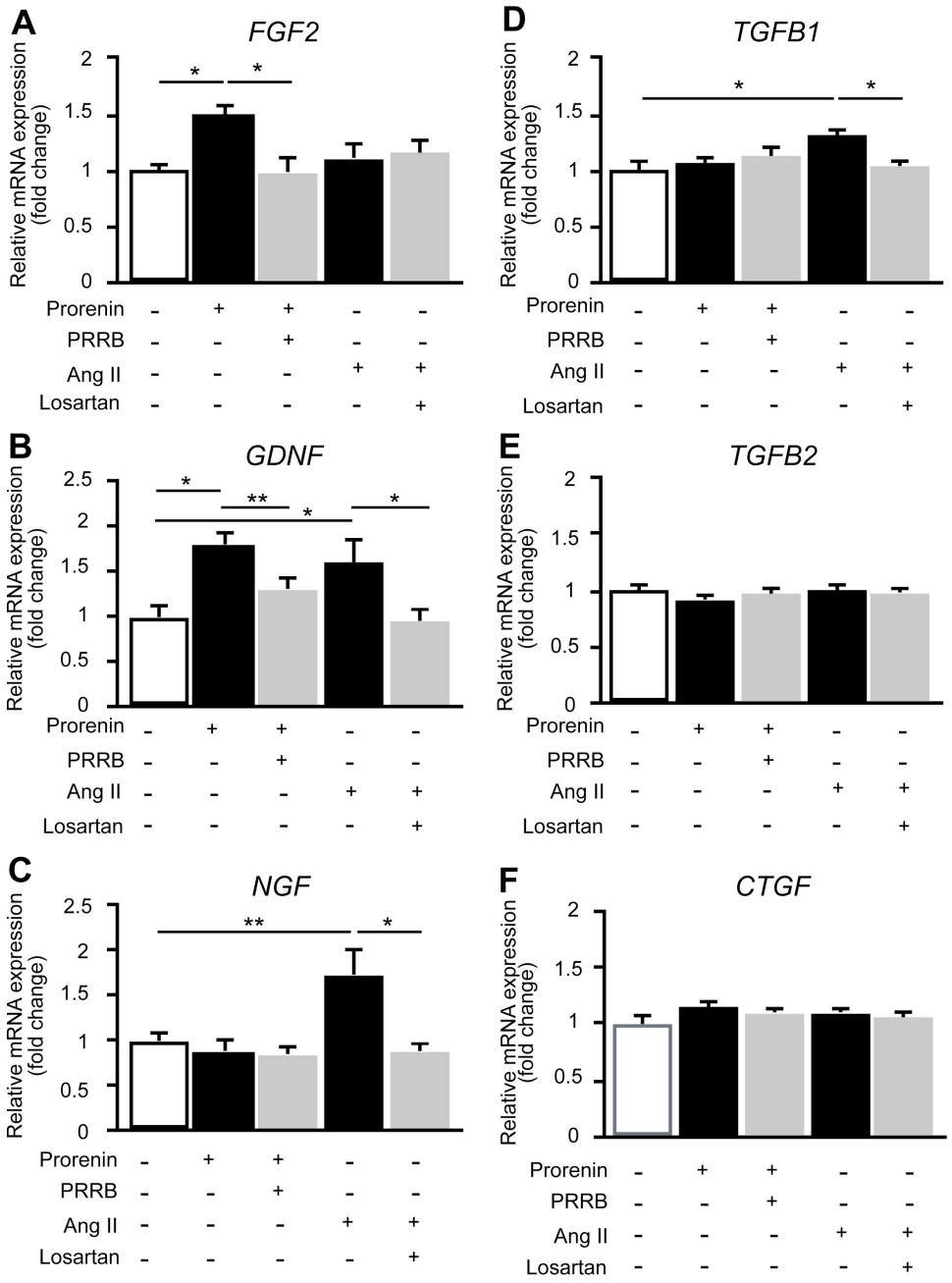


図22　培養ヒトMüller細胞における線維化関連サイトカイン発現解析

培養ヒトMüller細胞（MIO-M1）にproreninもしくはAngⅡで刺激し、刺激24時間後に各サイトカインの遺伝子発現をqPCRで解析した。n＝8 per group *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$。

上昇した *GDNF* の発現レベルは AT1R 阻害剤である losartan の前投与によりその発現は有意に抑制され（図 23A)、この結果より *GDNF* の発現レベルの上昇は(P)RR によりその発現が誘導されたのではなく、RAS の経路を介してその発現が上昇していたことが分かった。

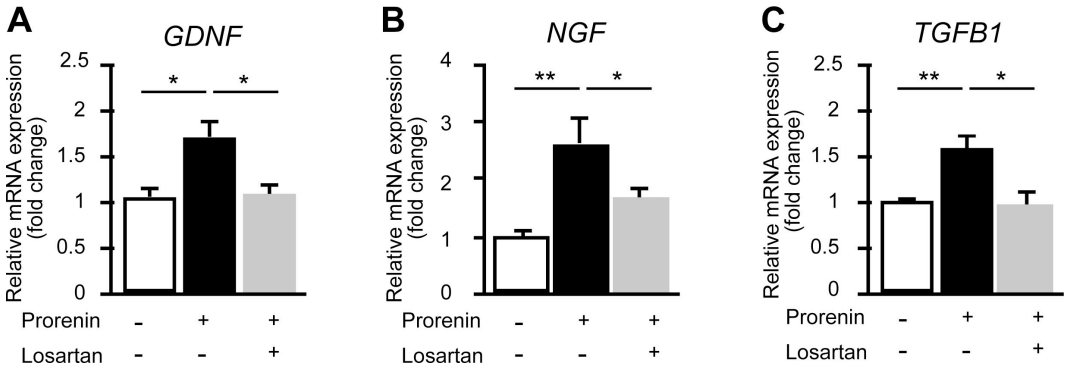


図 23　培養ヒト Müller 細胞における線維化関連サイトカイン発現解析

培養ヒト Müller 細胞（MIO-M1）に prorenin で刺激し、各サイトカインの遺伝子発現を qPCR で解析した。n=8 per group *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$。

一方、培養ヒト Müller 細胞を AngⅡ刺激で施行したところ、コントロールと比較して *GDNF*（fold change = 1.61, $p < 0.05$)、*NGF*（fold change = 1.74, $p < 0.01$）および *TGFB1*（fold change = 1.31, $p < 0.05$）の遺伝子発現レベルの有意な上昇が認められた。さらにこれらの遺伝子は losartan の前投与によりその発現は有意に抑制された（*GDNF*, fold change = 0.96, $p < 0.05$; *NGF*, fold change = 0.89, $p < 0.05$; *TGFB1*, fold change = 1.04, $p < 0.05$）（図 22B,C,D）。*NGF* および *TGFB1* については、さらに AngⅡ刺激 48 時間後の遺伝子発現レベルの解析も行ったが、同様に losartan の前投与により遺伝子発現は抑制された(図 23B,C)。この結果より、prorenin は(P)RR に結合することによってその組織 RAS としての生理活性を獲得し、AT1R を介して *NGF* および *TGFB1* の遺伝子発現レベルの上昇が認められたと考えられた。

対照的に、*TGFB2* および TGF-β のシグナル伝達の下流のメディエーターとして線維化に関与するとされる *CTGF* の遺伝子発現は prorenin や AngⅡ刺激では誘

導されなかった（図 22E,F)。

５．特発性黄斑上膜における prorenin または AngⅡ刺激により誘導されるサイトカインと(P)RR および AT1R の局在

上記 *in vitro* における遺伝子発現解析の結果を基に特発性黄斑上膜組織における FGF2、GDNF、NGF および TGF-β1 と(P)RR および AT1R の発現および局在について蛍光二重染色法を用いて検討した。その結果、FGF2 は(P)RR と共局在しており（図 24A-C）、GNDF、NGF および TGF-β1 は AT1R と共局在していた（図 24D-L）。

以上より、(P)RR と AT1R の両者の経路により活性化した RAPS は、Müller 細胞において線維化を誘導するサイトカインの産生を誘導させ、特発性黄斑上膜の病態形成に関与していることが示唆された。

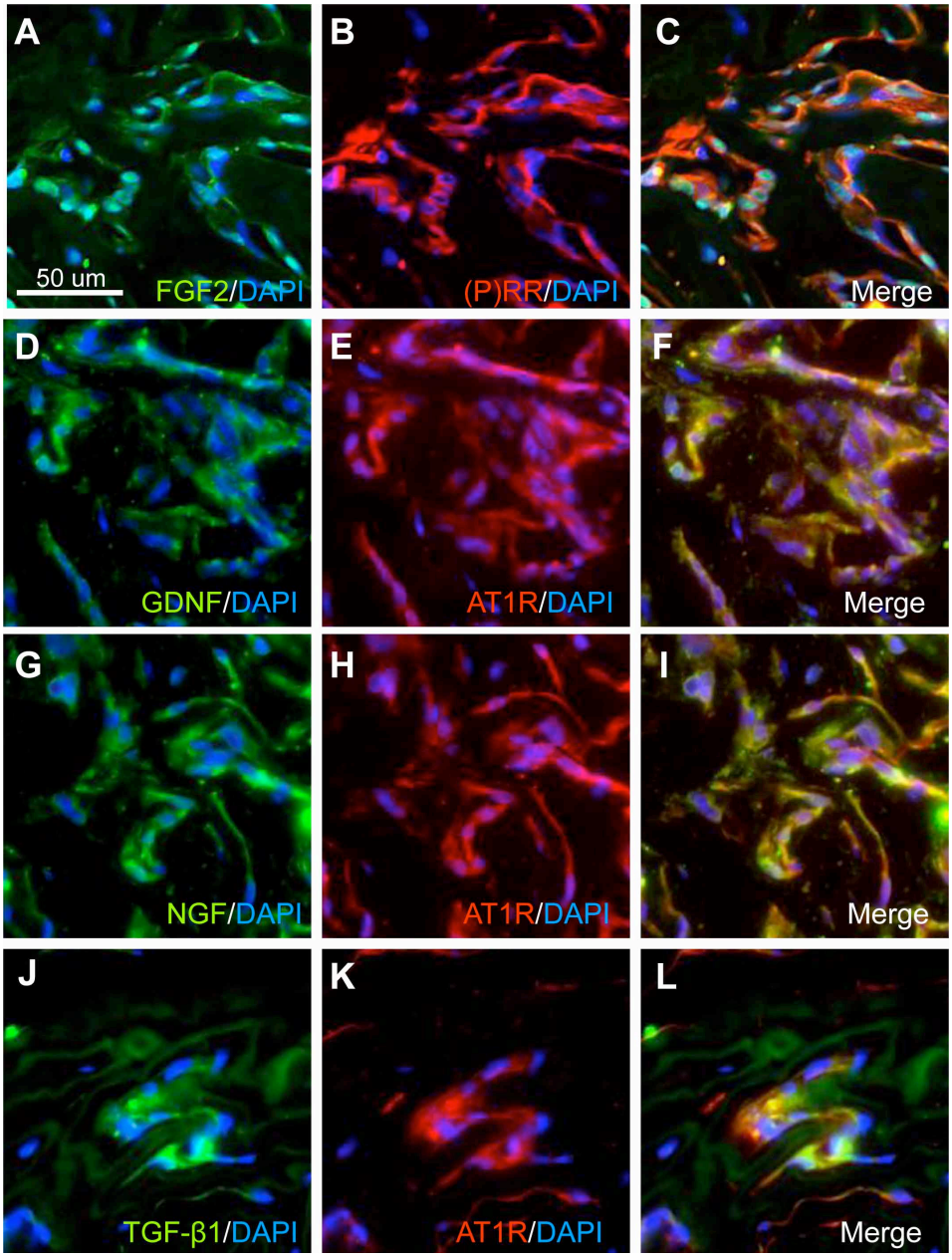


図 24　特発性黄斑上膜組織における prorenin または AngⅡ刺激により誘導されるサイトカインと(P)RR および AT1R の局在

（A-C）FGF2（緑）、(P)RR（赤）、DAPI（青）による二重染色。（D-F）GDNF（緑）、AT1R（赤）、DAPI（青）による二重染色。（J-L）TGF-β1（緑）、AT1R（赤）、DAPI（青）による二重染色。Scale bar：50μm。

考察

本研究により、RAPS コンポーネントが特発性黄斑上膜組織および培養 Müller 細胞に発現していることが明らかとなった（図 19）。また、(P)RR と prorenin および AGT と AT1R が特発性黄斑上膜組織上で共局在していた（図 20,21）。さらに、prorenin 刺激により Müller 細胞から(P)RR 活性を介して *FGF2* の遺伝子発現が増加し、また AngⅡ刺激により Müller 細胞から AT1R の活性化を介して *GDNF*、*NGF*、*TGFB1* の遺伝子発現が増加することが示された（図 22,23）。最後に、蛍光免疫組織染色法により、上記の線維化に関連する分子が特発性黄斑上膜組織に発現し、かつ(P)RR もしくは AT1R と共局在していることを確認した(図 24）。以上の結果から、RAPS が特発性黄斑上膜の線維化に関与していると考えられる。

既報によると、様々なサイトカインや栄養因子が特発性黄斑上膜患者から採取された黄斑上膜組織や硝子体から検出され、それらの分子により Müller 細胞が形質転換を起こし特発性黄斑上膜の病態進展に関与しているとされている[58,61,70,74,75]。具体的には、FGF2 は神経栄養因子ファミリーに属し、Müller 細胞の生存および成長に関与している[74,78]。GDNF は TGF-β関連神経栄養因子に属し、Müller 細胞からの FGF2 の産生を増加させる方向に働く[78]。また、NGF および TGF-β1 は Müller 細胞を myofibroblast へ誘導させることが知られている[70,75]。今回の検討結果より、これらの特発性黄斑上膜の線維化を介して病態進展へ働く分子が、RAPS により制御されていることが示唆された（図 25）。

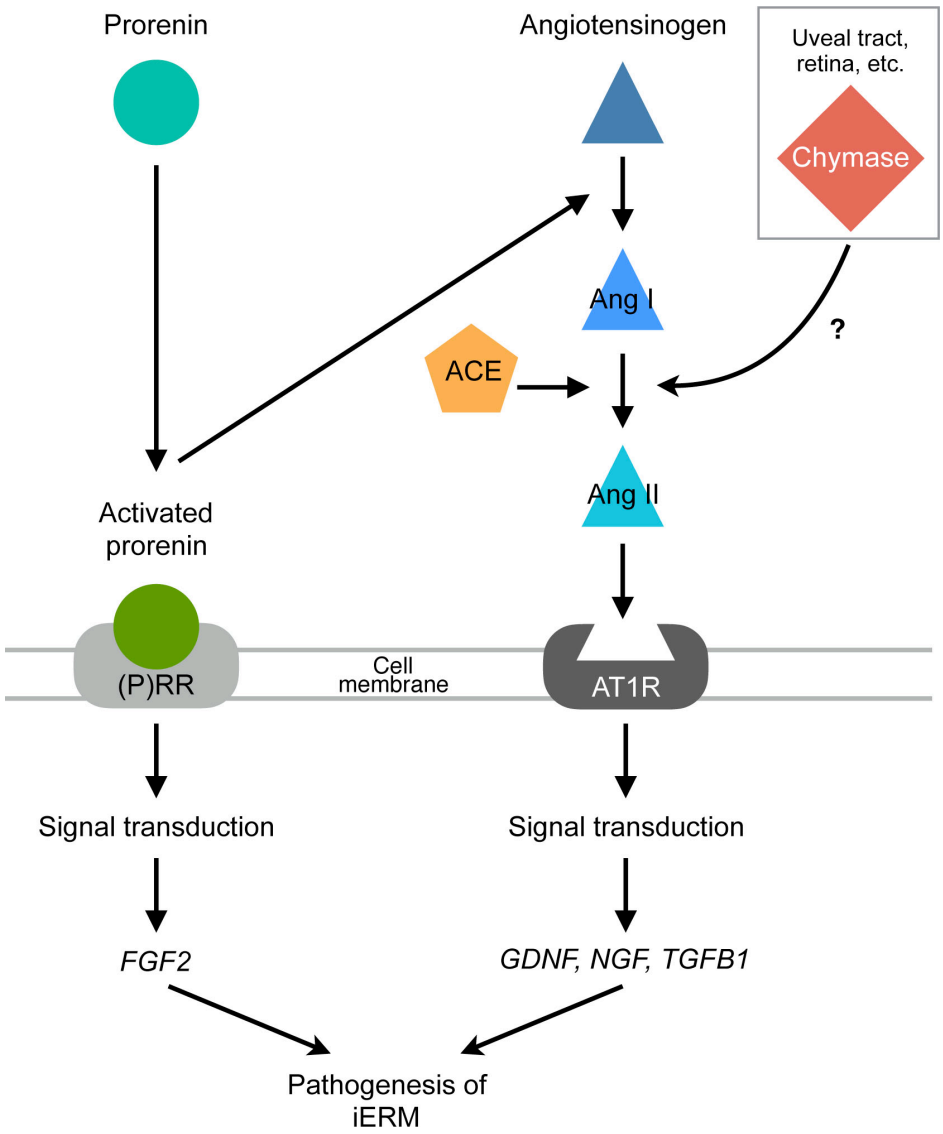


図 25　(P)RR および AT1R が特発性黄斑上膜の病態進展に関与するメカニズムの模式図

これまでに、動物モデルやヒトの臨床検体を用いた検討で特発性黄斑上膜以外の眼疾患に RAPS が関与していると報告がなされている[62-66,79]。なかでも増殖糖尿病網膜症患者より摘出された線維血管組織において RAPS のコンポーネントの発現が確認され、(P)RR と AT1R の両者の経路から VEGF-A を介して血管新生が誘導されていることが報告されている[62,65,66]。特発性黄斑上膜の進展に新生血管の発生は伴わないが、一方で増殖糖尿病網膜症における線維血管組織は血管新

生を伴った線維化により進展する。今回の検討結果において特発性黄斑上膜にRAPS が関与していたことは、増殖糖尿病網膜症の進展を考えていく上でも、新たな病態形成が関与している可能性を示唆するものと考える。実際に、心臓疾患や腎疾患においてはRAPSを介した線維化がその病態に強く関与していると報告されており[80,81]、他の眼疾患へのRAPSの関与については、さらなる検討が必要であると考えている。

Chymaseは肥満細胞から産生され、AngⅠをAngⅡへ変換するserine proteaseである。このため、硝子体中にはchymaseとACEという二つのAngⅠを変換する経路が存在しており、実際に特発性黄斑上膜や増殖糖尿病網膜症でその両者が機能しているとされる[67]。増殖糖尿病網膜症の線維血管組織では*ACE*の遺伝子発現が報告されており[65]、増殖糖尿病網膜症の硝子体中でもACE酵素活性が高いことが知られている[67]。一方で、特発性黄斑上膜患者の硝子体中にはACE活性が低いとされていたが[67]、今回の検討では全ての特発性黄斑上膜組織で*ACE*の遺伝子発現が確認された（図 19）。しかしながら、本検討では特発性黄斑上膜組織からは*CAM1*の遺伝子発現を確認することができなかった（図19）。哺乳類の眼内ではぶどう膜で*CAM1*の遺伝子発現が報告されており[82]、今回の検討においては正常ヒト網膜ではその発現が確認できた（図 19）。このことより、増殖糖尿病網膜症における ACE とは異なり、おそらく特発性黄斑上膜においては眼内の他組織（ぶどう膜、網膜など）で産生されたchymaseが硝子体内に移行し、AngⅡの変換に関与しているものと考えられる（図25）。

今回はRAPSの視点から特発性黄斑上膜の病態進展について検討したが、増殖糖尿病網膜症に比べて特発性黄斑上膜などの黄斑部疾患では AngⅡの発現はきわめて低値であったと報告されており、非糖尿病性の黄斑部疾患の硝子体中におけるRASの活性はあまり強くはないのではないかと考えられている[83]。また、実際にこれらの疾患の硝子体中の可溶性(P)RR[65]およびrenin活性[66]を測定したところ、増殖糖尿病網膜症より低かったと報告されている。これらの報告および本研究結果から、増殖糖尿病網膜症と比較して特発性黄斑上膜ではRAPS活性は低いが、低度で慢性的な活性化が線維化を誘導して特発性黄斑上膜の病態形成や進展に関与している可能性が考えられる。本研究はRAPSが特発性黄斑上膜のような非血管新生性線維組織の形成に関与していること、さらに特発性黄斑上膜の新たな病態機序を提示したこと、そしてその病態の進行を予防できる薬物療法の可能性を示した。

結論

１．RAPSコンポーネントが特発性黄斑上膜組織および培養ヒトMüller細胞に発現していた。

２．特発性黄斑上膜組織ではprorenin が(P)RR と、AGT が AT1R と共局在していた。

３．Prorenin 刺激により Müller 細胞から(P)RR 活性化を介して *FGF2* の遺伝子発現が増加し、またAngⅡ刺激により Müller 細胞から AT1R を介して *GDNF*、*NGF*、*TGFB1* の遺伝子発現が増加した。

４．免疫組織染色により、上述の線維化関連分子が特発性黄斑上膜組織においてタンパクレベルで発現していることを確認し、さらにそれらは(P)RR もしくはAT1R と共局在していた。

５．本研究の結果から、RAPS が特発性黄斑上膜の線維化を介した病態進展に関与していることを示した。

以上の検討結果は現在学術誌に投稿中である。

第４章

翼状片の病態形成における VEGF-C の関与

緒言

翼状片は角膜へ結膜上皮が異所性に増殖したものであり、増殖した翼状片は角膜に不可逆的な混濁を生じさせ視力低下をきたすが、現在のところ有効な薬物療法はない。組織学的には翼状片は血管組織が豊富な増殖性組織として認識されている[84]。過去の報告によると、結膜上皮細胞に比べて翼状片上皮細胞の増殖能は高く[85,86]、また VEGF-A[84]、FGF2[87]、erythropoietin 受容体[88]が高発現しており、血管新生を介して病態が進展することが示されてきた。近年、翼状片組織には血管組織のみならずリンパ管組織も存在することが明らかになり、結膜上皮に比べて翼状片上皮ではリンパ管密度が有意に高いと報告されている[89,90]。また、Lin らは翼状片の再発にリンパ管密度が有意に相関していると報告している[91]。これらに加えて、培養結膜上皮細胞から発現される VEGF-C と VEGF 受容体3型の経路に起因したリンパ管形成が、翼状片の進展に関与すると報告された[90]。しかしながら、どのようなメカニズムを経て結膜上皮細胞からの VEGF-C の分泌が誘導されるかは知られていない。

既報によると、培養翼状片線維芽細胞に tumor necrosis factor-α(TNF-α)や interleukin-1β(IL-1β)刺激を与えると、matrix metalloproteinases(MMPs)の発現が上昇するとされ、翼状片の進展および不完全な切除による再発には眼表面で生じる慢性炎症が関与していることが知られている[92]。また、悪性リウマチ患者の滑液中の TNF-α や IL-1β といった炎症性サイトカインと VEGF-C の発現量が相関しており、その結果により生じるリンパ管形成が滑膜の炎症および過形成を惹起し、悪性リウマチの病態進展に関与している[93]。加えて、TNF-α を介した VEGF-C の上昇が慢性進行性腎疾患[94]、膀胱癌[95]、メラノーマや乳癌のリンパ管転移[96,97]の原因の一つと報告されている。これらの報告より、翼状片においても TNF-α などの炎症性サイトカインが翼状片上皮細胞における VEGF-C の発現上昇に影響を及ぼし、その結果リンパ管新生を介し翼状片の病態に関与していると推測される。

今回の研究の目的は、結膜や翼状片における VEGF-C の発現制御機構を明らか

にすることである。

実験方法

１．細胞と試薬

培養ヒト結膜上皮細胞（Clone 1-5c-4）は European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK)より購入した。細胞は 10%ウシ胎児血清（Life Technologies）を添加した medium 199 (Sigma-Aldrich)で 37℃、5%CO_2 濃度で培養した。

培養ヒト結膜上皮細胞は無血清培地へ置換後、recombinant human TNF-α (0, 4, 20ng/ml; R&D Systems)または recombinant human IL-1β (0, 0.2, 2.0, 20 ng/ml; Thermo Scientific Biomarkers, Hennigsdorf, Germany)で刺激し、刺激 24 時間もしくは 48 時間後に細胞を回収し遺伝子発現を解析した。コントロール群には phosphate-buffered saline (PBS)を投与した。

Recombinant human TNF-α の中和抗体試験には 200ng/ml の rabbit anti-TNF-α neutralizing antibody (D1B4; Cell Signaling TECHNOLOGY, Danvers, MA)で前処置した後に recombinant human TNF-α 20ng/ml (R&D Systems)で刺激し、48 時間後に細胞を回収し遺伝子発現解析を行った。中和抗体のコントロールには normal rabbit IgG (R&D Systems)を使用した。

２．RNA 抽出、qPCR および RT-PCR

細胞から TRIzol(Life Technologies)を用いて RNA を回収し、GoScrip Reverse Transcriptase (Promega)を使用し、RNA の逆転写を施行した。*VEGFC* TaqMan probe は Life Technologies より購入し、内因性コントロールには *GAPDH*；forward 5′-CCT GGC CAA GGT CAT CCA TG-3’, reverse 5′-GGA AGG CCA TGC CAG TGA GC-3’を使用した。GoTaq qPCR Master mix (Promega)および THUNDERBIRD Proge qPCR Mix (TOYOBO) を使用し、StepOne plus Systems (Life Technologies)を使用し real-time PCR を行った。反応条件は 95℃ 2 分、95℃ 15 秒、60 秒 60 秒を 1 サイクルとし、40 サイクル施行した。Threshold cycle (C_T) 値は StepOnePlus Real-Time PCR System により自動的に測定され、内因性コントロール *GAPDH* を用いて各サンプル中の遺伝子の相対的発現量をΔΔCq 法で算出した[98]。

RT-PCR は、プライマー（*tumor necrosis factor receptor superfamily, member*

1A（*TNFRSF1A*）；forward 5′ - CTG CCA GGA GA AAC AGA ACA C -3′ , reverse 5′ - CTC AAT CTG GGG TAG GCA CAA- 3′ ）と GoTaq DNA polymerase (Promega) を使用し、95℃　30 秒、60℃　30 秒、72℃　15 秒を 1 サイクルとし、35 サイクル施行した。その後に 2% agarose gel を用い電気泳動を行い、SYBR safe (Invitrogen, Carlsbad, CA)で染色し、RAS-4000 (FUJIFILM, Tokyo, Japan)で遺伝子発現を検出した。

３．ELISA 法

培養ヒト結膜上皮細胞より培地へ分泌された VEGF-C の濃度は細胞培養上清を回収後、4℃、1000g、15 分間遠心した後、その上清を VEGF-C ELISA kit (R&D Systems) を用いて測定した。

４．臨床検体

翼状片患者（10 例 10 眼、平均年齢：73.6±5.6 歳）の手術時に切除された翼状片組織、および緑内障患者（3 例 3 眼、平均年齢：62.3±4.2 歳）の手術中に採取された正常結膜を用いた。摘出された組織は直ちに 4%パラホルムアルデヒドにて固定した。

本研究に使用した臨床検体は全て書面により同意を得た患者より採取しており、臨床検体の扱いは北海道大学病院自主臨床研究審査委員会に承認を受け（IRB #014-0295）、「北海道大学病院における臨床研究の取り扱いに関する指針」に準じた。

５．蛍光免疫染色

4%パラホルムアルデヒドにて固定された組織をパラフィンで包埋し、切片を作成した。キシレンおよびエタノールを用いて脱パラフィンを行い、抗原賦活化には 10mM クエン酸バッファー(pH6.0)を用いて電子レンジを用いて行った。次に切片に 0.1%ウシ血清アルブミン (Wako) を含む PBS を滴下し、室温で 30 分間ブロッキングを行った。その後、以下に述べる一次抗体を用いて 4℃で一晩一次抗体反応を行った：rabbit polyclonal anti-TNF receptor 1 (TNFR1) (100 倍希釈; Abcam) 、goat polyclonal anti-VEGF-C (10 倍希釈; R&D Systems)。その後、Alexa Fluor 488 および 546 (Life Technologies)にて二次抗体反応を行った後、核染色は DAPI (500 倍希釈; Lonza) を用いた。最後に、蛍光顕微鏡

Keyence BZ-9000 series (BIOREVO) で観察した。

６．免疫組織化学染色

免疫組織染色と同様に、抗原賦活化を行った後に 0.3%過酸化水素を用いて内因性ペルオキシダーゼをブロックした。その後、切片に 10%正常ヤギ血清 (Life Technologies) 含有 PBS を滴下し、室温で 30 分間ブロッキングを行った。その後、以下に述べる一次抗体を用いて 4℃で一次抗体反応を行った：rabbit polyclonal anti-TNFR1 antibody (100 倍希釈; Abcam)。anti-TNFR1 antibody のコントロールには PBS を使用した。発色には DAB (DAKO) を、対比染色には hematoxylin を用いた。最後に、Keyence BZ-9000 series (BIOREVO) を用いて観察した。

６．統計解析

結果は全て平均値±標準誤差で示した。各群間の比較検討は Student’s *t*-test を用いて解析した。*p* 値が 0.05 未満を呈した場合に統計学的に有意差があると評価した。

結果

１．培養ヒト結膜上皮細胞における TNF-α刺激後の VEGF-C 発現変化

翼状片の進展に関与する代表的な炎症性サイトカインである TNF-αおよび IL-1βで培養ヒト結膜上皮細胞を刺激し、24 時間後の *VEGFC* の遺伝子発現変化について検討した。その結果、TNF-α（20ng/ml)で刺激を行ったところ、*VEGFC* の遺伝子発現が有意に増加した（fold change = 1.60±0.35, n = 6, $p < 0.01$）（図 26）。

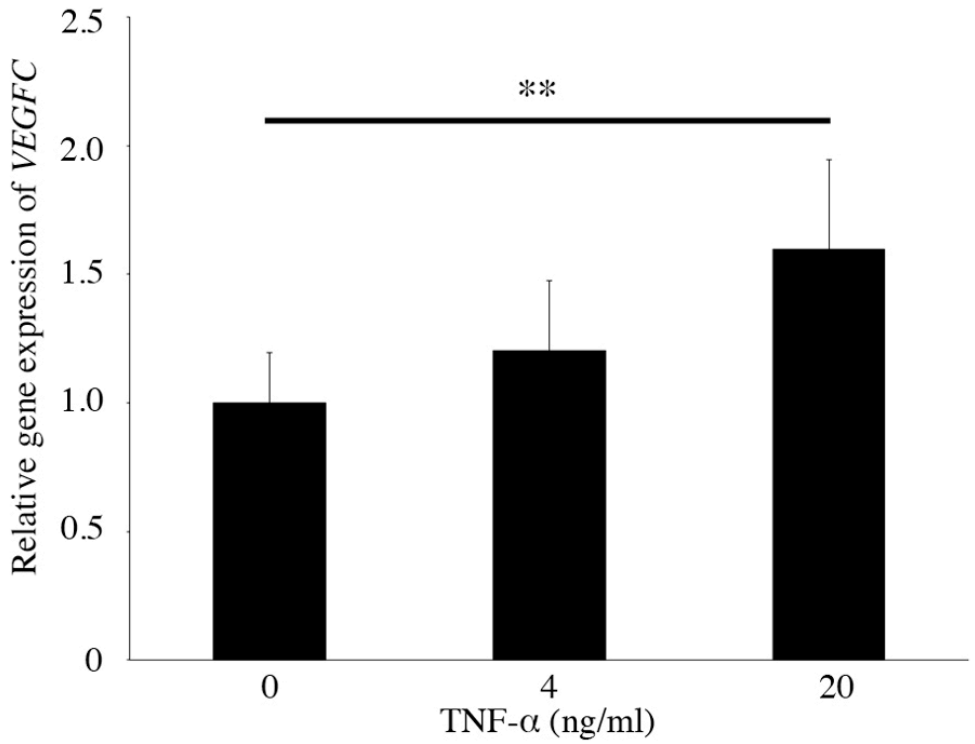


図 26　培養ヒト結膜上皮細胞における *VEGFC* 発現解析

培養ヒト結膜上皮細胞を TNF-αで刺激し、その 24 時間後の *VEGFC* の遺伝子発現を qPCR 法で解析した。n = 6 per group **, $p < 0.01$。

また、IL-1β 刺激では 0.2ng/ml で刺激した時に *VEGFC* の遺伝子発現レベルの上昇（fold change = 1.23±0.17, n = 6, $p < 0.05$）が認められた（図 27）。

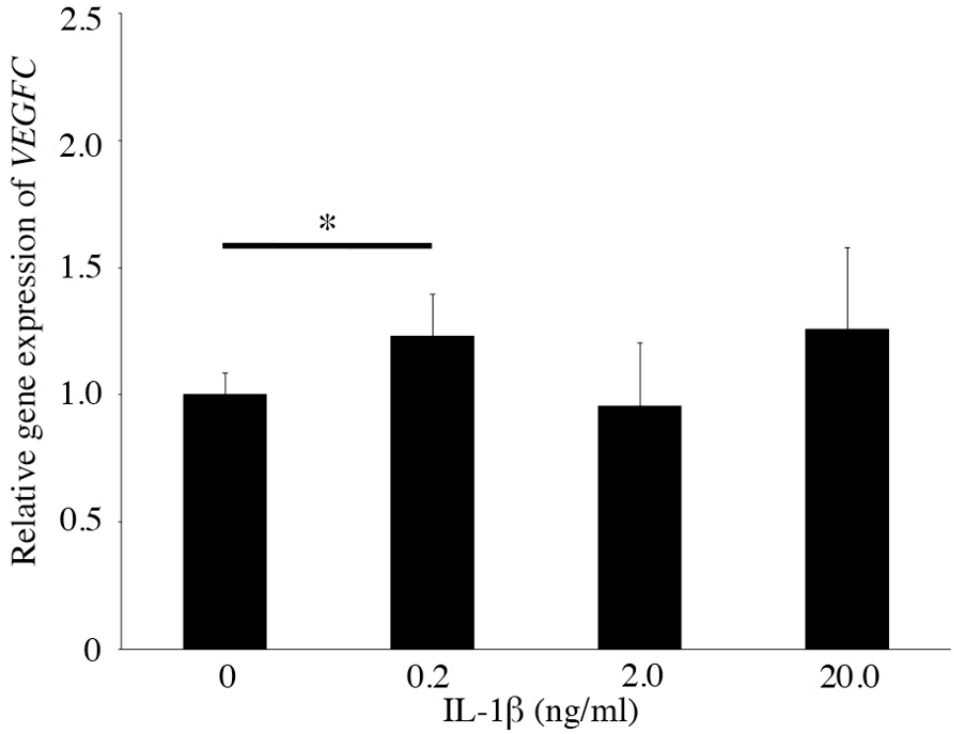


図 27　培養ヒト結膜上皮細胞における *VEGFC* 発現解析

培養ヒト結膜上皮細胞を IL-1β で刺激し、その 24 時間後の *VEGFC* の遺伝子発現を qPCR 法で解析した。n = 6 per group *, $p < 0.05$。

次に、培養ヒト結膜上皮細胞に対する TNF-α および IL-1β 刺激後の培養上清中 VEGF-C タンパク濃度について検討した。その結果、20ng/ml の TNF-α 刺激 48 時間後に VEGF-C タンパクの分泌が有意に増加していた（195.92±33.41pg/mg, n = 6, $p < 0.05$）（図 28）。一方、IL-1β 刺激では VEGF-C タンパク濃度に変化はなかった（data not shown)。

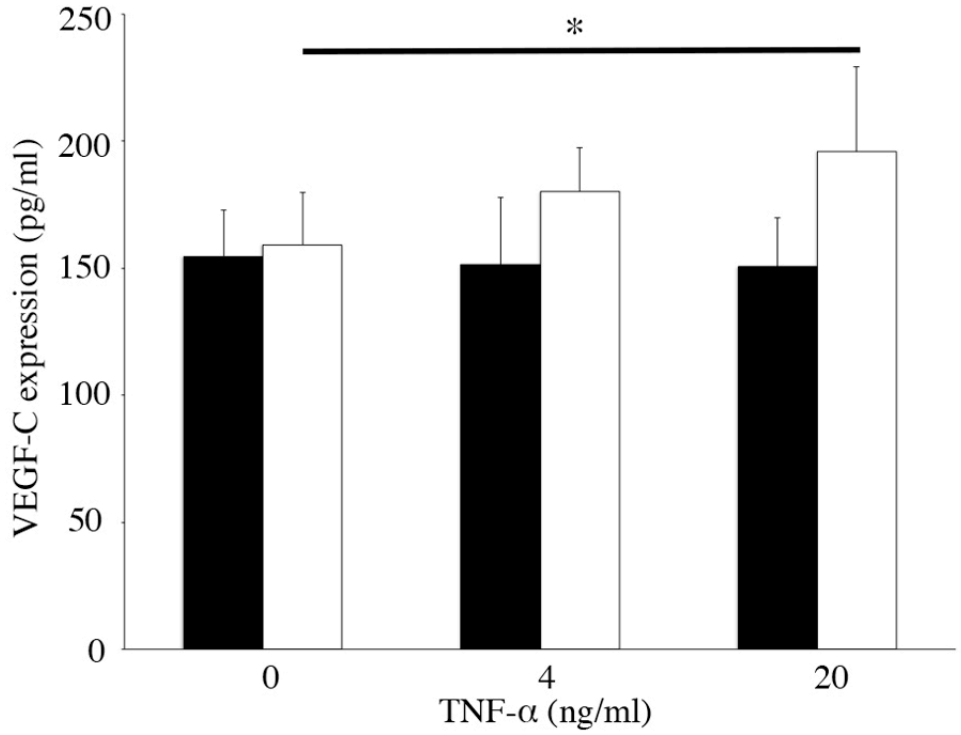


図 28　培養ヒト結膜上皮細胞における TNF-α 刺激による VEGF-C タンパク発現変化

培養ヒト結膜上皮細胞を TNF-α で刺激し、その 24 時間および 48 時間後の VEGF-C のタンパク発現を ELISA 法で解析した。n = 6 per group
*, $p < 0.05$。黒：24 時間、白：48 時間

２．培養ヒト結膜上皮細胞における抗 TNF-α中和抗体の抑制効果に対する VEGF-C 発現変化

以上の結果から、我々は TNF-α がより VEGF-C の発現誘導に重要な役割を果たしていると考え、次に TNF-α 中和抗体を前投与した後の TNF-α 刺激後の培養ヒト結膜上皮細胞から分泌された VEGF-C タンパク発現変化を確認した。結果、TNF-α 刺激により上昇した VEGF-C の分泌は、抗 TNF-α 中和抗体投与により有意にその分泌は抑制されたが（140.44±1.92 to 119.33±4.41pg/ml, n = 3, $p < 0.05$）、コントロールとして用いた normal rabbit IgG（200ng/ml）では分泌は抑制されなかった（図 29）。

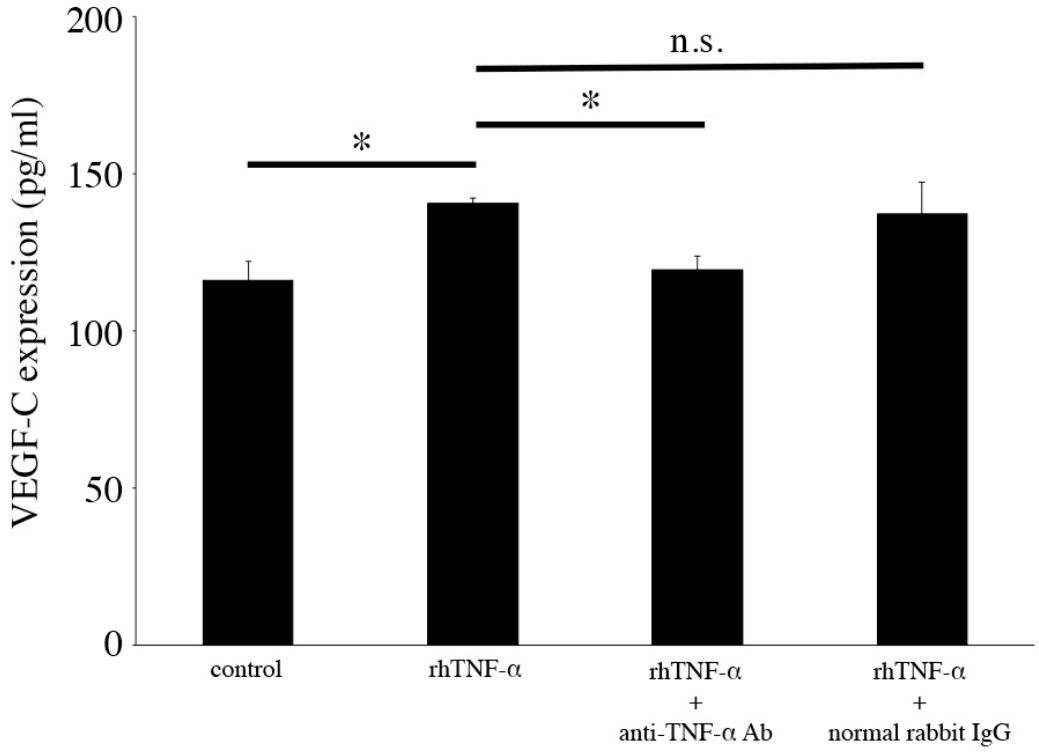


図 29　培養ヒト結膜上皮細胞における抗 TNF-α中和抗体の VEGF-C タンパク発現抑制効果

培養ヒト結膜上皮細胞を TNF-α で刺激し、その 48 時間後の VEGF-C のタンパク発現を ELISA 法で解析した。抗 TNF-α 中和抗体の前処置群では VEGF-C のタンパク発現が有意に抑制された。

n = 3 per group　*, $p < 0.05$。n.s.: not significant

３．培養ヒト結膜上皮細胞および翼状片組織における TNFR1 の発現

TNF-αは TNF1 型受容体（TNFR1）および TNF2 型受容体（TNFR2）を介して細胞内へシグナルを伝達する。TNFR1 はほぼ全ての哺乳類の細胞に発現しているのに対して、TNFR2 は主に免疫細胞でのみ発現している。このことからリンパ系細胞以外の様々な細胞においては TNFR1 が TNF-αのシグナル伝達の鍵を握っているとされている[99-101]。そこで、培養ヒト結膜上皮細胞における *TNFR1*（遺伝子名：*TNFRSF1A*）発現を確認した。その結果、*TNFRSF1A* は培養ヒト結膜上皮細胞でその遺伝子発現がみられた（図 30）。

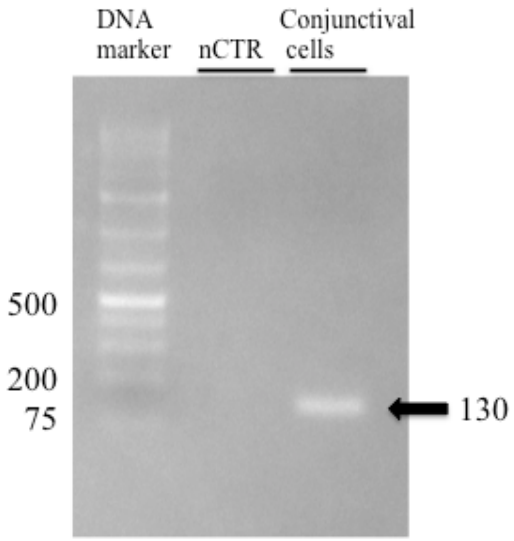


図 30　培養ヒト結膜上皮細胞における TNFR1 の遺伝子発現

培養ヒト結膜上皮細胞において *TNFR1* の遺伝子発現を認めた。陰性コントロール（negative control: nCTR）として H_20 を用いた。

また、TNFR1 は免疫組織染色でも培養ヒト結膜上皮細胞にその局在が認められ（図 31）。

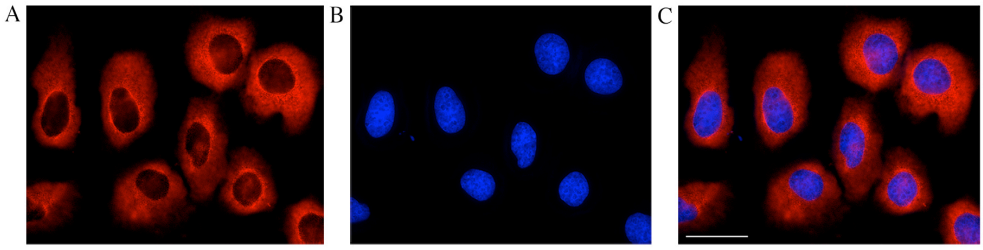


図 31　培養ヒト結膜上皮細胞における TNFR1 のタンパク発現

A: TNFR1, B: DAPI, C: Merge 像。Scale bar：10μm。

次に、ヒト翼状片組織の上皮細胞および正常結膜組織の上皮細胞における TNFR1 タンパク発現を免疫組織染色で確認したところ、両者の細胞膜でその発現がみられたが（図 32B、E）、翼状片組織の方がより多く発現していた（図 32B）。

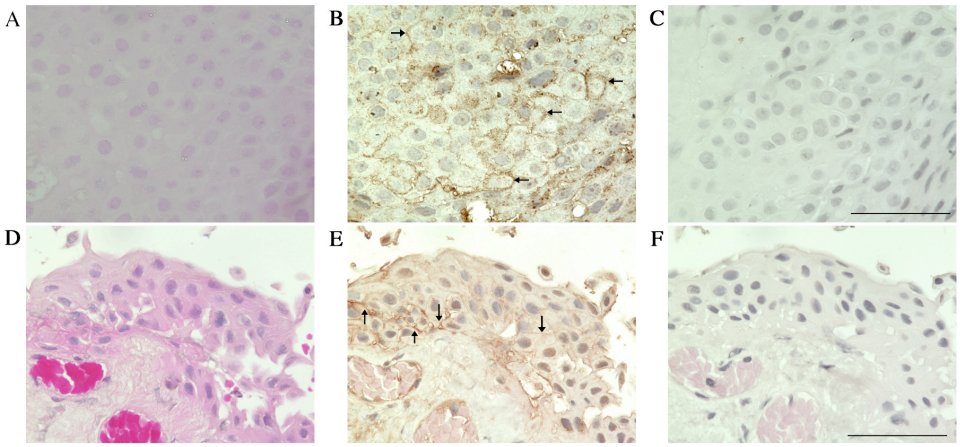


図 32　翼状片組織の上皮細胞および正常結膜組織の上皮細胞における TNFR1 のタンパク発現

A-C：翼状片組織の上皮細胞。D-F：正常結膜組織の上皮細胞。A,D: H&E 染色、B,E：TNFR1、C,E：PBS control。Scale bar：50μm。

さらに、翼状片組織の上皮細胞においては、TNFR1 は VEGF-C 陽性細胞に発現していた（図 33）

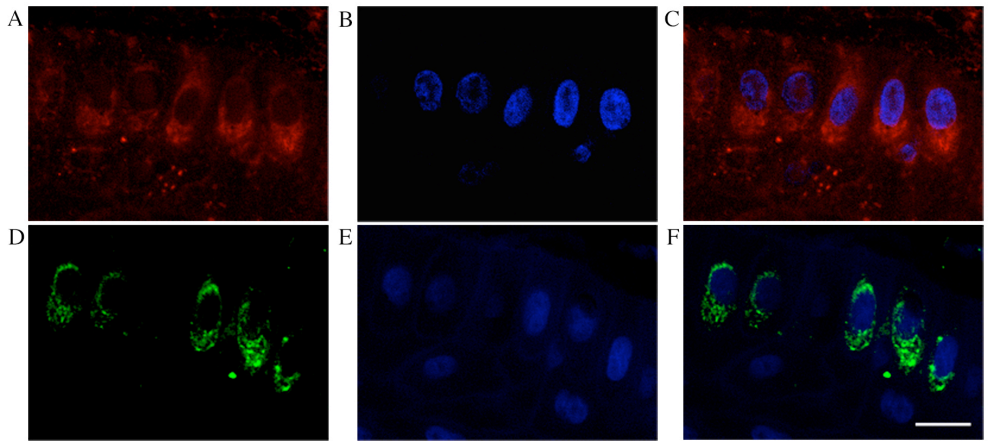


図 33　翼状片組織の上皮細胞における VEGF-C および TNFR1 のタンパク発現

A-C：翼状片組織の上皮細胞。D-F：正常結膜組織の上皮細胞。A：VEGF-C（赤）、B,E：DAPI（青）、D：TNFR1（緑）、C,E：merge 像。 Scale bar：10μm。

考察

本研究では、培養ヒト結膜上皮細胞は TNF-α 刺激により VEGF-C の遺伝子発現およびタンパク分泌が亢進することが明らかとなった。これまでの報告によると、TNF-α は翼状片線維芽細胞からの MMPs の発現を上昇させることで、翼状片の病態に関与しているとされている[92]。さらに近年、結膜上皮細胞より分泌された VEGF-C がリンパ管形成を促進させることにより翼状片の進展に関与していると報告され[90]、また免疫組織染色では翼状片組織では TNF-α 発現が亢進していることが示されている[102]。TNF-α 刺激に起因した VEGF-C の上昇が翼状片の進展に寄与しているという本検討結果は、これらの報告と矛盾しない。

TNFR1 は様々な細胞に発現していると報告されている[99,101,103]。今回の検討では、培養ヒト結膜上皮細胞において TNFR1 は遺伝子レベルでもタンパクレベルでもその発現が確認された。これに加えて、その局在は翼状片組織に確認され、

特にVEGF-C産生細胞である上皮細胞に局在することが判明した。これらの免疫組織学的検討より、VEGF-CはTNFR1を有する翼状片の上皮細胞から分泌されることが示唆された。

今回、TNFR1は翼状片の上皮細胞のみならず、正常結膜の上皮細胞にもその局在が認められたことは、恒常的なTNFR1の発現量というよりむしろ、ligand-receptor systemにおいてはTNF-αの発現量によりリンパ管新生が調節され、その結果、正常結膜ではなく翼状片でリンパ管新生が亢進した結果なのではないかと考えている。翼状片の原因の一つに紫外線への曝露が挙げられるが、既報では紫外線曝露により角膜幹細胞からIL-1、IL-6、IL-8、そしてTNF-αといった炎症性サイトカインが分泌されることが示されている[104]。以上より、眼表面におけるTNF-α発現の調整因子の一つとして紫外線が推測されるが、これを証明するためにはさらなる研究が必要である。

現在のところ、翼状片治療においては外科的な切除しか有効な治療法はない。しかしながら、術後の再発率は半数以上とする報告も存在する[105]。それ故、翼状片の進展予防および術後の再発の病態を検討することは重要であると考える。今回の検討により、TNF-αを介したVEGF-Cの発現上昇が確認され、TNF-αを阻害することが新たな翼状片の治療標的となり得ることが示唆された。

結論

１．培養ヒト結膜上皮細胞では、TNF-α刺激によりVEGF-Cの発現が増加した。

２．培養ヒト結膜上皮細胞でTNF-α刺激により上昇したVEGF-Cの発現は、抗TNF-α中和抗体の投与によってその発現が有意に抑制された。

３．培養ヒト結膜上皮細胞、正常結膜組織および翼状片組織におけるTNFR1の発現を確認した。また、翼状片組織の上皮細胞ではVEGF-CとTNFR1は共局在していた。

４．本研究の結果から、TNF-α抑制によりVEGF-Cによるリンパ管形成を介した翼状片の進展を制御できる可能性が示された。

以上の検討結果を、我々は学術誌International Journal of Molecular Medicineに報告した。

総括

・第１章

増殖糖尿病網膜症の病態形成におけるリン酸化αBC の関与

増殖糖尿病網膜症の血管新生に伴った線維血管組織の病態進展に、p-p38 MAPK を介してリン酸化を受けた pSer59αBC が VEGF-A の分子シャペロンとして関与している可能性が示された。

・第２章

増殖糖尿病網膜症の病態形成におけるアクロレインの関与

アクロレイン結合タンパクが細胞増殖や血管新生を介して増殖糖尿病網膜症の病態進展に関与している可能性が示された。

・第３章

特発性黄斑上膜の病態形成における受容体結合プロレニン系の関与

Müller 細胞における RAPS の活性化が線維化を誘導するサイトカインや栄養因子の発現を亢進し、特発性黄斑上膜の病態に関与している可能性が示された。

・第４章

翼状片の病態形成における VEGF-C の関与

TNF-α刺激により結膜上皮細胞から VEGF-C の分泌が亢進し、その結果 VEGF-C を介したリンパ管形成が促進され、翼状片の病態の進展に関与している可能性が示された。

現在これらの増殖を病態基盤に有する眼疾患の治療は外科的加療しかなく、治療を経ても増殖組織により生じた変化は不可逆的であり、視力低下は免れないことも多い。このため、薬剤を用いた侵襲の少ない早期の治療介入が求められており、その開発は急務である。今後これらの研究を基に更なる病態解明と治療薬の開発に結びつけていきたいと考えている。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて下さり、また御指導と御校閲を賜りました北海道大学大学院医学研究科眼科学分野　石田　晋教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究全般にわたり直接御指導を頂きました野田航介准教授に深く感謝の意を表します。そして、研究にあたり多くの御助言を頂きました加瀬　諭講師、神田敦宏特任講師、村田美幸技術補助員に厚く御礼を申し上げます。さらに研究室のサポートを頂いた、廣瀬育代技術補助員、吉田志帆研究補助員、石塚タンエルダル研究補助員に心より感謝の意を表します。最後に公私ともにサポートして下さいました大学院の諸先輩方、ならびに大学院生の仲間達に深く感謝いたします。

引用文献

1 Kawasaki, R. *et al.* The prevalence of age-related macular degeneration in Asians: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* **117**, 921-927, (2010).

2 Ye, H. *et al.* Prevalence and associations of epiretinal membrane in an elderly urban Chinese population in China: the Jiangning Eye Study. *Br. J. Ophthalmol*, (2015).

3 Aiello, L. P. *et al.* Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Engl. J. Med.* **331**, 1480-1487, (1994).

4 Wirostko, B., Wong, T. Y. & Simo, R. Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Prog. Retin. Eye. Res.* **27**, 608-621, (2008).

5 Aiello, L. P. Angiogenic pathways in diabetic retinopathy. *N. Engl. J. Med.* **353**, 839-841, (2005).

6 Osaadon, P., Fagan, X. J., Lifshitz, T. & Levy, J. A review of anti-VEGF agents for proliferative diabetic retinopathy. *Eye (Lond)* **28**, 510-520, (2014).

7 Lois, N. *et al.* Retinal pigment epithelial atrophy in patients with exudative age-related macular degeneration undergoing anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Retina* **33**, 13-22, (2013).

8 Rofagha, S. *et al.* Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: a multicenter cohort study (SEVEN-UP). *Ophthalmology* **120**, 2292-2299, (2013).

9 Moorthy, S. & Cheung, N. Cerebrovascular accidents and ranibizumab. *Ophthalmology* **116**, 1834-1835; author reply 1835, (2009).

10 van der Reis, M. I. *et al.* A systematic review of the adverse events of intravitreal anti-vascular endothelial growth factor injections. *Retina* **31**, 1449-1469, (2011).

11 Bressler, N. M. *et al.* Cerebrovascular accidents in patients treated for choroidal neovascularization with ranibizumab in randomized controlled trials. *Retina* **32**, 1821-1828, (2012).

12 Resnikoff, S. *et al.* Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull. World. Health. Organ.* **82**, 844-851, (2004).

13 Klein, B. E. Overview of epidemiologic studies of diabetic retinopathy. *Ophthalmic. Epidemiol.* **14**, 179-183, (2007).

14 Wistow, G. J. & Piatigorsky, J. Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 479-504, (1988).

15 Clark, J. I. Functional sequences in human alphaB crystallin. *Biochim. Biophys. Acta*, (2015).

16 Kase, S., Parikh, J. G. & Rao, N. A. Expression of heat shock protein 27 and alpha-crystallins in human retinoblastoma after chemoreduction. *Br. J. Ophthalmol.* **93**, 541-544, (2009).

17 Ousman, S. S. *et al.* Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature* **448**, 474-479, (2007).

18 Andley, U. P. Crystallins in the eye: Function and pathology. *Prog. Retin. Eye. Res.* **26**, 78-98, (2007).

19 Watanabe, G. *et al.* alphaB-crystallin: a novel p53-target gene required for p53-dependent apoptosis. *Cancer. Sci.* **100**, 2368-2375, (2009).

20 Arrigo, A. P. Pathology-dependent effects linked to small heat shock proteins expression: an update. *Scientifica (Cairo)* **2012**, 185641, (2012).

21 Kase, S. *et al.* alphaB-crystallin regulation of angiogenesis by modulation of VEGF. *Blood* **115**, 3398-3406, (2010).

22 Ito, H. *et al.* Phosphorylation of alphaB-crystallin in response to various types of stress. *J. Biol. Chem.* **272**, 29934-29941, (1997).

23 Li, R. & Reiser, G. Phosphorylation of Ser45 and Ser59 of alphaB-crystallin and p38/extracellular regulated kinase activity determine alphaB-crystallin-mediated protection of rat brain astrocytes from C2-ceramide- and staurosporine-induced cell death. *J. Neurochem.* **118**, 354-364, (2011).

24 Morrison, L. E., Hoover, H. E., Thuerauf, D. J. & Glembotski, C. C. Mimicking phosphorylation of alphaB-crystallin on serine-59 is necessary and sufficient to provide maximal protection of cardiac myocytes from apoptosis. *Circ. Res.* **92**, 203-211, (2003).

25 Lopez-Gonzalez, I. *et al.* alphaB-crystallin and HSP27 in glial cells in tauopathies. *Neuropathology* **34**, 517-526, (2014).

26 Dong, Z. *et al.* Expression of alphaB-crystallin and vascular endothelial growth factor in conjunctival squamous cell carcinoma. *Anticancer. Res.* **33**, 3745-3751, (2013).

27 Reddy, V. S. *et al.* Response of small heat shock proteins in diabetic rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, 7674-7682, (2013).

28 Dong, Z. *et al.* Alphab-crystallin expression in epiretinal membrane of human proliferative diabetic retinopathy. *Retina* **32**, 1190-1196, (2012).

29 van de Schootbrugge, C. *et al.* alphaB-crystallin stimulates VEGF secretion and tumor cell migration and correlates with enhanced distant metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* **13**, 128, (2013).

30 Abu El-Asrar, A. M., Missotten, L. & Geboes, K. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and the protein products of its target genes in diabetic fibrovascular epiretinal membranes. *Br. J. Ophthalmol.* **91**, 822-826, (2007).

31 Njie-Mbye, Y. F. *et al.* Lipid peroxidation: pathophysiological and pharmacological implications in the eye. *Front. Physiol.* **4**, 366, (2013).

32 Giacco, F. & Brownlee, M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* **107**, 1058-1070, (2010).

33 Stevens, J. F. & Maier, C. S. Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol. Nutr. Food. Res.* **52**, 7-25, (2008).

34 Aldini, G., Orioli, M. & Carini, M. Protein modification by acrolein: relevance to pathological conditions and inhibition by aldehyde

sequestering agents. *Mol. Nutr. Food. Res.* **55**, 1301-1319, (2011).

35 Feng, Z., Hu, W., Hu, Y. & Tang, M. S. Acrolein is a major cigarette-related lung cancer agent: Preferential binding at p53 mutational hotspots and inhibition of DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **103**, 15404-15409, (2006).

36 Uchida, K. Current status of acrolein as a lipid peroxidation product. *Trends. Cardiovasc. Med.* **9**, 109-113, (1999).

37 Tomitori, H. *et al.* Polyamine oxidase and acrolein as novel biochemical markers for diagnosis of cerebral stroke. *Stroke* **36**, 2609-2613, (2005).

38 Calingasan, N. Y., Uchida, K. & Gibson, G. E. Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **72**, 751-756, (1999).

39 Saiki, R. *et al.* Intense correlation between brain infarction and protein-conjugated acrolein. *Stroke* **40**, 3356-3361, (2009).

40 DeJarnett, N. *et al.* Acrolein exposure is associated with increased cardiovascular disease risk. *J. Am. Heart. Assoc.* **3**, (2014).

41 Daimon, M. *et al.* Increased urinary levels of pentosidine, pyrraline and acrolein adduct in type 2 diabetes. *Endocr. J.* **50**, 61-67, (2003).

42 Suzuki, D. & Miyata, T. Carbonyl stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Intern. Med.* **38**, 309-314, (1999).

43 Zhang, X. *et al.* Evaluation of N (epsilon)- (3-formyl-3,4-dehydropiperidino)lysine as a novel biomarker for the severity of diabetic retinopathy. *Diabetologia* **51**, 1723-1730, (2008).

44 Baynes, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* **40**, 405-412, (1991).

45 Kowluru, R. A. & Chan, P. S. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp. Diabetes. Res.* **2007**, 43603, (2007).

46 Noda, K. *et al.* Production and activation of matrix metalloproteinase-2 in proliferative diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 2163-2170, (2003).

47 Yong, P. H. *et al.* Evidence supporting a role for N-(3-formyl-3,

4-dehydropiperidino)lysine accumulation in Muller glia dysfunction and death in diabetic retinopathy. *Mol. Vis.* **16**, 2524-2538, (2010).

48 Conklin, D. J. *et al.* Acrolein generation stimulates hypercontraction in isolated human blood vessels. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **217**, 277-288, (2006).

49 Shi, R., Rickett, T. & Sun, W. Acrolein-mediated injury in nervous system trauma and diseases. *Mol. Nutr. Food. Res.* **55**, 1320-1331, (2011).

50 Lambert, C. *et al.* Acrolein inhibits cytokine gene expression by alkylating cysteine and arginine residues in the NF-kappaB1 DNA binding domain. *J. Biol. Chem.* **282**, 19666-19675, (2007).

51 Martyniuk, C. J. *et al.* Molecular mechanism of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by alpha,beta-unsaturated carbonyl derivatives. *Chem. Res. Toxicol.* **24**, 2302-2311, (2011).

52 Grochot-Przeczek, A., Dulak, J. & Jozkowicz, A. Heme oxygenase-1 in neovascularisation: A diabetic perspective. *Thromb. Haemost.* **104**, 424-431, (2010).

53 Wu, C. C. *et al.* Upregulation of endothelial heme oxygenase-1 expression through the activation of the JNK pathway by sublethal concentrations of acrolein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **214**, 244-252, (2006).

54 Zhang, H. & Forman, H. J. Acrolein induces heme oxygenase-1 through PKC-delta and PI3K in human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **38**, 483-490, (2008).

55 Shanab, A. Y. *et al.* Candesartan stimulates reparative angiogenesis in ischemic retinopathy model: role of hemeoxygenase-1 (HO-1). *Angiogenesis* **18**, 137-150, (2015).

56 Deshane, J. *et al.* Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* **204**, 605-618, (2007).

57 Sebag, J. Anomalous posterior vitreous detachment: a unifying concept in vitreo-retinal disease. *Graefes. Arch. Clin. Exp.*

Ophthalmol. **242**, 690-698, (2004).

58 Bringmann, A. & Wiedemann, P. Involvement of Muller glial cells in epiretinal membrane formation. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **247**, 865-883, (2009).

59 Foos, R. Y. Vitreoretinal juncture; epiretinal membranes and vitreous. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **16**, 416-422, (1977).

60 Kishi, S. & Shimizu, K. Oval defect in detached posterior hyaloid membrane in idiopathic preretinal macular fibrosis. *Am. J. Ophthalmol.* **118**, 451-456, (1994).

61 Joshi, M., Agrawal, S. & Christoforidis, J. B. Inflammatory mechanisms of idiopathic epiretinal membrane formation. *Mediators. Inflamm.* **2013**, 192582, (2013).

62 Nagai, N. *et al.* Suppression of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis by blocking the angiotensin II type 1 receptor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 2925-2931, (2005).

63 Satofuka, S. *et al.* (Pro)renin receptor-mediated signal transduction and tissue renin-angiotensin system contribute to diabetes-induced retinal inflammation. *Diabetes* **58**, 1625-1633, (2009).

64 Satofuka, S., Kanda, A. & Ishida, S. Receptor-associated prorenin system in the pathogenesis of retinal diseases. *Front. Biosci. (Schol Ed)* **4**, 1449-1460, (2012).

65 Kanda, A., Noda, K., Saito, W. & Ishida, S. (Pro)renin receptor is associated with angiogenic activity in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia* **55**, 3104-3113, (2012).

66 Kanda, A., Noda, K., Saito, W. & Ishida, S. Vitreous renin activity correlates with vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Br. J. Ophthalmol.* **97**, 666-668, (2013).

67 Maruichi, M. *et al.* Measurement of activities in two different angiotensin II generating systems, chymase and angiotensin-converting enzyme, in the vitreous fluid of vitreoretinal diseases: a possible involvement of chymase in the pathogenesis of macular hole patients. *Curr. Eye. Res.* **29**, 321-325, (2004).

68 Limb, G. A. *et al.* In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Muller cell line (MIO-M1). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 864-869, (2002).

69 Bu, S. C. *et al.* Immunohistochemical Evaluation of Idiopathic Epiretinal Membranes and In Vitro Studies on the Effect of TGF-beta on Muller Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **56**, 6506-6514, (2015).

70 Minchiotti, S. *et al.* Human idiopathic epiretinal membranes express NGF and NGF receptors. *Retina* **28**, 628-637, (2008).

71 Smiddy, W. E. *et al.* Idiopathic epiretinal membranes: ultrastructural characteristics and clinicopathologic correlation. 1989. *Retina* **25**, 811-820; discussion 821, (2005).

72 Kohno, R. I. *et al.* Possible contribution of hyalocytes to idiopathic epiretinal membrane formation and its contraction. *Br. J. Ophthalmol.* **93**, 1020-1026, (2009).

73 Kase, S. *et al.* Expression of glutamine synthetase and cell proliferation in human idiopathic epiretinal membrane. *Br. J. Ophthalmol.* **90**, 96-98, (2006).

74 Harada, C., Mitamura, Y. & Harada, T. The role of cytokines and trophic factors in epiretinal membranes: involvement of signal transduction in glial cells. *Prog. Retin. Eye. Res.* **25**, 149-164, (2006).

75 Iannetti, L. *et al.* Role of the intravitreal growth factors in the pathogenesis of idiopathic epiretinal membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 5786-5789, (2011).

76 Kuiper, E. J. *et al.* Association of connective tissue growth factor with fibrosis in vitreoretinal disorders in the human eye. *Arch. Ophthalmol.* **124**, 1457-1462, (2006).

77 Lijnen, P. J., Petrov, V. V. & Fagard, R. H. Angiotensin II-induced stimulation of collagen secretion and production in cardiac fibroblasts is mediated via angiotensin II subtype 1 receptors. *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone. Syst.* **2**, 117-122, (2001).

78 Harada, T. *et al.* Neurotrophic factor receptors in epiretinal membranes after human diabetic retinopathy. *Diabetes. Care.* **25**, 1060-1065, (2002).

79 Ishizuka, E. T. *et al.* Involvement of the receptor-associated prorenin system in the pathogenesis of human conjunctival lymphoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **56**, 74-80, (2015).

80 Ichihara, A. *et al.* Contribution of nonproteolytically activated prorenin in glomeruli to hypertensive renal damage. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 2495-2503, (2006).

81 Ichihara, A. *et al.* Nonproteolytic activation of prorenin contributes to development of cardiac fibrosis in genetic hypertension. *Hypertension* **47**, 894-900, (2006).

82 Shiota, N., Saegusa, Y., Nishimura, K. & Miyazaki, M. Angiotensin II-generating system in dog and monkey ocular tissues. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **24**, 243-248, (1997).

83 Funatsu, H., Yamashita, H., Nakanishi, Y. & Hori, S. Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Br. J. Ophthalmol.* **86**, 311-315, (2002).

84 Gebhardt, M. *et al.* Differential expression of vascular endothelial growth factor implies the limbal origin of pterygia. *Ophthalmology* **112**, 1023-1030, (2005).

85 Kase, S. *et al.* Expression of p27(KIP1) and cyclin D1, and cell proliferation in human pterygium. *Br. J. Ophthalmol.* **91**, 958-961, (2007).

86 Kase, S. *et al.* Immunolocalisation of E-cadherin and beta-catenin in human pterygium. *Br. J. Ophthalmol.* **91**, 1209-1212, (2007).

87 Detorakis, E. T., Zaravinos, A. & Spandidos, D. A. Growth factor expression in ophthalmic pterygia and normal conjunctiva. *Int. J. Mol. Med.* **25**, 513-516, (2010).

88 Kase, S. *et al.* Increased expression of erythropoietin receptor in human pterygial tissues. *Int. J. Mol. Med.* **20**, 699-702, (2007).

89 Ling, S. *et al.* Increasing lymphatic microvessel density in primary pterygia. *Arch. Ophthalmol.* **130**, 735-742, (2012).

90 Fukuhara, J. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor C in human pterygium. *Histochem. Cell. Biol.* **139**, 381-389, (2013).

91 Lin, H. *et al.* Lymphatic microvessel density as a predictive marker for the recurrence time of pterygium: a three-year follow-up study. *Mol. Vis.* **19**, 166-173, (2013).

92 Solomon, A., Li, D. Q., Lee, S. B. & Tseng, S. C. Regulation of collagenase, stromelysin, and urokinase-type plasminogen activator in primary pterygium body fibroblasts by inflammatory cytokines. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 2154-2163, (2000).

93 Cha, H. S. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha induces vascular endothelial growth factor-C expression in rheumatoid synoviocytes. *J. Rheumatol.* **34**, 16-19, (2007).

94 Kimura, H. *et al.* Telmisartan, a possible PPAR-delta agonist, reduces TNF-alpha-stimulated VEGF-C production by inhibiting the p38MAPK/HSP27 pathway in human proximal renal tubular cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **454**, 320-327, (2014).

95 Du, Q. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha promotes the lymphangiogenesis of gallbladder carcinoma through nuclear factor-kappaB-mediated upregulation of vascular endothelial growth factor-C. *Cancer. Sci.* **105**, 1261-1271, (2014).

96 Peppicelli, S., Bianchini, F. & Calorini, L. Inflammatory cytokines induce vascular endothelial growth factor-C expression in melanoma-associated macrophages and stimulate melanoma lymph node metastasis. *Oncol. Lett.* **8**, 1133-1138, (2014).

97 Wen, Y. *et al.* A Comparison of Fentanyl and Flurbiprofen Axetil on Serum VEGF-C, TNF-alpha, and IL-1ss Concentrations in Women Undergoing Surgery for Breast Cancer. *Pain. Pract.* **15**, 530-537, (2015).

98 Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T))

Method. *Methods* **25**, 402-408, (2001).

99 Brenner, D., Blaser, H. & Mak, T. W. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 362-374, (2015).

100 Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell. Death. Differ.* **10**, 45-65, (2003).

101 Cook, E. B., Stahl, J. L., Graziano, F. M. & Barney, N. P. Regulation of the receptor for TNFalpha, TNFR1, in human conjunctival epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 3992-3998, (2008).