

氏名	前田 美智子
(ふりがな)	(まえだ みちこ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成29年6月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Effects of gelatin hydrogel containing anti-transforming growth factor- $\beta$ antibody in a canine filtration surgery model  (抗TGF- $\beta$ 抗体包含ゼラチンハイドロゲルのイヌ濾過手術モデル眼への応用)
論文審査委員	(主) 教授 朝 日 通 雄 教授 菅 澤 淳 教授 近 藤 洋 一

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

### 《緒言》

緑内障は、視神経と視野に特徴的変化（一般に視神経乳頭障害とそれに伴う視野障害）を有し、通常眼圧を十分に下降させることにより視神経障害を改善もしくは抑制しうる眼の機能的構造的異常を特徴とする疾患であり、我が国における中途失明原因の第一位である。現在、緑内障に対するエビデンスに基づいた唯一確実な治療法は眼圧を下降させることであり、薬物治療やレーザー治療など他の治療法によっても十分な眼圧下降が得られない場合、観血的手術が適応になる。緑内障手術でもっとも一般的に行われている濾過手術、特に線維柱帯切除術は、線維柱帯を中心とした強膜組織を切除して房水を結膜下に誘導し、濾過胞を作製して眼圧を下降させる術式である。現在濾過手術はマイトマイシン C（以下 MMC）併用濾過手術による濾過胞癒痕化抑制により長期に濾過胞が維持され、より強い眼

圧下降効果が得られている。しかし、術後晩期に生じる濾過胞(bleb)の菲薄化や濾過胞感染、眼内炎などの重篤な合併症が問題となっており、MMC 術中暴露に代わる薬剤や投与方法が求められている。

組織の線維化、瘢痕化に関与すると言われていた TGF- $\beta$ (Transforming growth factor- $\beta$ ) は、ヒトにおいては  $\beta$ 1、 $\beta$ 2、 $\beta$ 3 の 3 つのアイソフォームがあり、特に  $\beta$ 2 は眼内にあるアイソフォームとして知られ、緑内障では著しく増加している。緑内障手術における結膜瘢痕化反応は強膜創から漏出してくる房水 (特に TGF- $\beta$ ) により強く促進されると言われているが、抗 TGF- $\beta$  抗体の緑内障術後濾過胞瘢痕抑制への応用は、これまで結膜下注射にて臨床試験まで行われたが、十分な臨床効果を得るまでには至っていない。臨床効果を高めるため、当教室では現在までゼラチンハイドロゲル (以下 GH) を用いて薬剤を徐放させる実験を行ってきた。GH は再生医療における細胞増殖因子の徐放化キャリアとして開発されたもので、タンパク質と同じ水溶性・生体吸収性高分子から作製されている。GH 内の水相中でのタンパク質の拡散は防止され、ゲルの分解・水溶化によってのみ徐放化される特徴がある。

そこで今回我々は、抗 TGF- $\beta$  抗体の徐放化における効果を検証するため、抗 TGF- $\beta$  抗体包含 GH の緑内障濾過手術犬モデル眼への眼圧下降や組織への影響を GH 単独使用と比較検討した。

#### 《方法》

対象はビーグル犬 14 匹 14 眼を用いた。全身麻酔下にて緑内障手術モデル眼を作製し、結膜下に抗 TGF- $\beta$  抗体を包含させた GH を挿入した群を抗 TGF- $\beta$  抗体-GH 群 (n=7)、GH のみを挿入した群を GH 群 (n=7) とした。術前と術後 2 週、4 週に眼圧と bleb score を測定し、4 週で安楽死させ、眼球摘出後に手術部位の組織学的検討を行った。

組織学的検討は、結膜下組織の変化はヘマトキシリン・エオジンおよびアザン染色を用いて強膜との面積比で検討した。また、肥満細胞、PCNA (proliferation cell nuclear antigen) 陽性細胞、Vimentin 陽性細胞、抗 TGF- $\beta$  抗体陽性細胞の数を各群でカウントし

比較検討した。

#### 《結果》

抗 TGF- $\beta$  抗体-GH 群と GH 群は術後 2 週目で術前と比較して眼圧が有意に下降したが、術後 4 週目の眼圧は、GH 群の方が再び上昇に転ずる傾向が強く、抗 TGF- $\beta$  抗体-GH 群で有意な眼圧下降効果が見られた。術後 2 週目で得られた Bleb score は GH 群では 4 週目に有意に低下したのに対し、抗 TGF- $\beta$  抗体-GH 群では 4 週目においても高値が持続し濾過胞が維持できた。

組織学的には抗 TGF- $\beta$  抗体-GH 群の方が、GH 群より術後の結膜下組織の肥厚を抑制し、有意に Vimentin 陽性細胞、抗 TGF- $\beta$  抗体陽性細胞、PCNA 陽性細胞、肥満細胞の数が減少していた。

#### 《考察》

以上の結果から、GH から徐放された抗 TGF- $\beta$  抗体が TGF- $\beta$  の作用を抑制し、結膜下の線維芽細胞の増殖を抑制することで結膜下の癒痕化が減少し、濾過胞が維持され、その結果としてより眼圧下降作用が持続したと考えられる。

ヒトの緑内障濾過手術においても、GH に包含させて抗 TGF- $\beta$  抗体を徐放させることによって、より長期間にわたって TGF- $\beta$  による線維芽細胞増殖などの癒痕形成作用を抑制し、濾過胞や眼圧下降を維持できる可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

緑内障は、視神経と視野に特徴的変化（一般に視神経乳頭障害とそれに伴う視野障害）を有し、通常眼圧を十分に下降させることにより視神経障害を改善もしくは抑制しうる眼の機能的構造的異常を特徴とする疾患で、我が国における中途失明原因の第一位である。現在、緑内障に対するエビデンスに基づいた唯一確実な治療法は眼圧を下降させることであり、薬物治療やレーザー治療など他の治療法によっても十分な眼圧下降が得られない場合、観血的手術が適応になる。しかし、術後晩期に生じる濾過胞の菲薄化や濾過胞感染、眼内炎などの重篤な合併症が問題となっており、その対策は喫緊の課題である。

申請者は、ビーグル犬の緑内障手術モデル眼を用いて、結膜下に抗 TGF- $\beta$  抗体を包含させた GH を挿入した群を抗 TGF- $\beta$  抗体-GH 群、GH のみを挿入した群を GH 群とし、その両者の手術部位の経時的変化を比較検討した。術前と術後 2 週、4 週に眼圧と bleb score を測定し、4 週で安楽死させ、眼球摘出後に手術部位の組織学的検討を行った。抗 TGF- $\beta$  抗体-GH 群と GH 群は術後 2 週目で術前と比較して眼圧が有意に下降したが、術後 4 週目の眼圧は、GH 群と比較して、抗 TGF- $\beta$  抗体-GH 群の方が有意に下降した。Bleb score は抗 TGF- $\beta$  抗体-GH 群で有意に高く、濾過胞が維持できた。また、抗 TGF- $\beta$  抗体-GH 群の方が、GH 群より術後の結膜下組織の肥厚を抑制し、有意に Vimentin 陽性細胞、抗 TGF- $\beta$  抗体陽性細胞、PCNA 陽性細胞、肥満細胞の数が減少していた。

以上の結果から、GH から徐放された抗 TGF- $\beta$  抗体が TGF- $\beta$  の作用を抑制し、結膜下の線維芽細胞の増殖を抑制することで結膜下の癒痕化を抑え、濾過胞を維持し、その結果より長期の眼圧下降作用が得られたものと考えられる。緑内障手術モデル眼の結膜下に抗 TGF- $\beta$  抗体を包含させた GH を挿入し、術後の濾過胞や眼圧変化の評価、手術部位の組織学的検討を行った報告は過去になく、得られた知見は意義深いと考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

International journal of molecular sciences

18(5): 985, 2017 doi: 10.3390/ijms18050985 <オンライン掲載>