

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
丸 一 みどり	主査 教授 池 田 恒 彦 主査 教授 宮 崎 瑞 夫 副査 教授 清 水 章 副査 教授 南 敏 明 副査 教授 鏡 山 博 行
主論文題名  イヌ緑内障手術後の濾過胞癒痕化におけるキマーゼの役割 (The role of chymase in scarring after glaucoma filtration surgery in dogs)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>緑内障に対する眼圧降下療法の目的で、眼房水濾過手術である線維柱帯切除術が施行される。しかし、結膜下組織の線維化・癒着癒痕化による濾過胞の機能不全が時に生じる。その原因の一つは、創部におけるテノン囊線維芽細胞の増殖である。近年、抗癌剤であるマイトマイシン C や 5-フルオロウラシルにより線維芽細胞の増殖を抑制することで手術の成功率は向上しているが、一方でこれらの薬剤による強膜融解や感染性眼内炎などの新たな合併症の頻度も増加している。従って、より安全な線維芽細胞増殖抑制薬の開発が必要である。</p> <p>最近、ハムスター緑内障手術モデルの創傷治癒過程で、結膜下組織のキマーゼ活性やキマーゼ陽性肥満細胞の増加が報告されている。キマーゼは肥満細胞が産生するセリンプロテアーゼの一つで、好中球や好酸球などの集簇を惹起させ、タイプ I プロコラーゲンの線維化を促進する。今回、イヌテノン囊から培養した線維芽細胞に対するキマーゼの作用とイヌ結膜フラップ緑内障モデルの癒着癒痕化に対するキマーゼ阻害薬の抑制効果を検討した。</p> <p>《対象と方法》</p> <p>(1)細胞培養系 イヌテノン囊から単離した線維芽細胞を、イヌ精製キマーゼ(5-20ng/mL)単独あるいはキマーゼ(20ng/mL)とキマーゼ阻害薬 Suc-Val-Pro-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>(10 μ M)との共在下に培養した。細胞数増殖の程度は Bromodeoxyuridine(BrdU)の取り込み量として評価した。</p> <p>(2)緑内障モデル</p> <p>①手術手技 雄性ビーグル成犬をペントバルビタール(35mg/kg,i.v.)にて全身麻酔後、角膜上部結膜に角膜輪部に沿って一辺 10mm、その両巾 5mm の切開を行い、結膜フラップを作成した。7 頭の左眼にキマーゼ阻害薬 Suc-Val-Pro-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub>(10 μ M)、右眼に生理食塩水(プラセボ)含有スポンジを術中 5 分間結膜フラップ下に留置した後、ナイロン糸にて結膜を一針縫合した。術後7日目にペントバルビタール(100mg/kg,i.v.)の投与にて屠殺した後、癒着スコアを評価し、フラップ部の組織をキマーゼ活性測定、組織学的解析、テノン囊線維芽細胞培養に供した。別の 4 頭より摘出した右眼を非処置眼として対象評価に用いた。</p> <p>②キマーゼ活性測定 キマーゼ活性は、4mM angiotensin I を基質とし、angiotensin II 産生量(μ mol angiotensin II/分)で示した。</p> <p>③癒着スコア 癒着癒痕化は、フラップ全体(5×10mm<sup>2</sup>)の癒着程度を肉眼で観察し、4 段階にスコア化し評価した。</p> <p>④組織学的解析 結膜強膜創部を 10%ホルマリン固定し、パラフィン包埋後、5 μ m の切片を作成し、H-E 染色、ア</p>	

ザン染色、van Gieson elastic 染色を行なった。フラップ作成部の結膜強膜部(角膜縁より 5mm の範囲)の断面積測定とトルイジンブルーを用いて染色された肥満細胞数(cells/mm<sup>2</sup>)の定量を行なった。

#### 《結果》

##### (1)キマーゼの線維芽細胞増殖に対する効果

線維芽細胞への BrdU 取り込み量はキマーゼ添加で約 1.9 倍に増加した。この取り込み量の増加はキマーゼ阻害薬 Suc-Val-Pro-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub> 併用によって有意に抑制された。

##### (2)緑内障モデルの組織キマーゼ活性

術後 7 日後、プラセボ群のキマーゼ活性は非処置群と比較して有意に増加した。しかし、キマーゼ阻害薬群のキマーゼ活性はプラセボ群の値と比較して有意に低かった。

##### (3)結膜癒着に対するキマーゼ阻害薬の効果

スコア値からプラセボ群と比較してキマーゼ阻害薬群で癒着の程度は有意に減少した。

プラセボ群の結膜断面積は非処置群と比較して有意に増大し、強膜断面積は、増加傾向を示すが、有意差は認めなかった。プラセボ群における結膜/強膜断面積比は非処置群と比較して有意に増加していた。プラセボ群の結膜断面積に対するキマーゼ阻害薬群の結膜断面積比は 52.6%と有意な減少を認めた。結膜/強膜断面積比も同様にプラセボ群と比較してキマーゼ阻害薬群において有意に減少していた。

##### (4)肥満細胞集簇に対するキマーゼ阻害薬の効果

プラセボ群における単位面積(mm<sup>2</sup>)あたりの肥満細胞数は非処置群と比較して有意増加を認めた(非処置群 0.53±0.20; プラセボ群 1.20±0.30)。キマーゼ阻害薬群の肥満細胞数(0.68±0.30)は、プラセボ群の値と比較して有意に減少していた。

#### 《考察》

本研究において、イヌキマーゼがイヌテノン囊から培養した線維芽細胞を有意に増殖させること、また、この増殖がキマーゼ阻害薬 Suc-Val-Pro-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub> によって有意に抑制されることを示した。緑内障モデルにおいては、キマーゼ活性と結膜断面積は正常コントロールと比較して術後に増加するが、キマーゼ阻害薬を併用することにより有意に減少することを示した。プラセボ群の肥満細胞数の増加もキマーゼ阻害薬で抑制された。以上の成績は、線維芽細胞が増殖し結膜の癒着癒着化が形成される過程で肥満細胞由来のキマーゼが重要な役割を果たしていることを示すものと考えられる。

イヌキマーゼの線維芽細胞増殖効果を捉えたが、ヒトではキマーゼは TGF-β を介して線維芽細胞を増殖することが知られている。イヌキマーゼの酵素学的特性はヒトやハムスターのキマーゼのそれと類似性が極めて高く、TGF-β の活性化作用を有すると考えられる。動物モデルにおいては、抗 TGF-β 抗体や TGF-β アンチセンスオリゴマーが結膜の癒着癒着化を減弱させることも報告されている。これらの事実より、今回のキマーゼ阻害薬の癒着抑制効果も TGF-β 活性化抑制が主たる機序と考える理由である。

今回、イヌ緑内障モデルにおいて、創部の肥満細胞集簇が、キマーゼ阻害作用を持つ Suc-Val-Pro-Phe<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub> により抑制されたことは、キマーゼ自身が肥満細胞の集簇作用を有する典型的サイトカインの一つである stem cell factor の活性化に関与する可能性を示唆する。

キマーゼはテノン囊の線維芽細胞増殖作用を有しており、術後の癒着癒着形成の過程において肥満細胞の集簇を介して重要な役割を果たしており、キマーゼ阻害薬は抗癌剤に代わる細胞を破壊しない安全な緑内障濾過手術後の癒着癒着化抑制薬として有用である可能性を示した。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第685号	氏名	丸一 みどり
論文審査担当者		主査 教授 池田 恒彦 主査 教授 宮崎 瑞夫 副査 教授 清水 章 副査 教授 南 敏明 副査 教授 鏡山 博行	
主論文題名			
イヌ緑内障手術後の濾過胞癒着癒痕化におけるキマーゼの役割 (The role of chymase in scarring after glaucoma filtration surgery in dogs)			
論文審査結果の要旨			
<p>本研究は緑内障濾過手術後の濾過胞癒着癒痕化におけるキマーゼの役割と癒着癒痕抑制に対するキマーゼ阻害薬の応用の可能性を検討したものである。</p> <p>申請者は、イヌテノン嚢から培養した線維芽細胞に対するキマーゼの増殖効果とキマーゼ阻害薬の抑制効果を検討している。また、<i>in vivo</i> のモデルとしてイヌ結膜フラップ緑内障モデルを作製し、非処置群、プラセボ群、キマーゼ阻害薬群の術後 7 日目のキマーゼ活性、癒着スコア、結膜強膜断面積、肥満細胞数を検討している。</p> <p>その結果、キマーゼによる培養線維芽細胞の細胞数増加と、キマーゼ阻害薬による抑制効果を示している。また、結膜のキマーゼ活性、断面積、肥満細胞数は非処置群に比較してフラップ作成手術で有意に上昇し、キマーゼ阻害薬により、これらを有意に減少させている。癒着スコアからもキマーゼ阻害薬の有効性を示している。</p> <p>本研究は、肥満細胞由来のキマーゼがテノン嚢の線維芽細胞増殖作用を有しており、術後の癒着癒痕形成の過程において重要な役割を果たしており、キマーゼ阻害薬が抗癌剤に代わる細胞を破壊しない安全な緑内障濾過手術後の癒着癒痕化抑制薬として有用である可能性を示している。今後、このキマーゼ阻害薬を臨床応用することにより、緑内障手術の安全性、手術成績の向上に寄与する可能性を示した点で有意義な研究成果である。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第9条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。</p> <p>(主論文公表誌) 大阪医科大学雑誌 63(1): 28-36, 2004</p>			