

## ミニ・レビュー —中村賞受賞者—

難治性網膜硝子体疾患における線維性増殖組織形成に対する  
Sex hormoneの作用

木村和博

山口大学大学院医学系研究科眼科学分野(眼科学) 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 網膜硝子体疾患, 線維性増殖組織, 網膜色素上皮細胞, 細胞外基質

## 和文抄録

増殖性硝子体網膜症, 糖尿病網膜症や加齢黄斑変性などの難治性網膜硝子体疾患では, 網膜出血や網膜剥離が治療によって治癒したとしても, これに続き二次的に形成された網脈絡膜での線維性増殖組織にて視力不良となることがある。それ故, 網脈絡膜での増殖性線維組織の形成, 収縮を如何に制御できるかが重要である。この線維性増殖組織形成に網膜色素上皮細胞が中心的な役割を果たしており, この細胞の上皮-間葉系移行及びこれを取り巻くコラーゲンを含む細胞外基質の組織リモデリングが線維性増殖組織形成に重要な働きをすると考えられている。それ故, これらの制御を行うことで, 網脈絡膜での線維性増殖組織による網膜障害が抑制できる可能性がある。網膜硝子体疾患において, その発症に関して性差の影響が報告されているものもある。実際, 難治性網膜硝子体疾患の加齢黄斑変性は閉経後の女性に多いことが報告されている。また, Sex hormoneは網脈絡膜組織でのホメオスタシス維持に関与していると考えられている。我々は, そこで網膜色素上皮細胞を起点として細胞収縮, 上皮-間葉系移行並びに細胞外基質リモデリングへのSex hormoneの作用を検討した。結果, 女性ホルモンが網膜色素上皮細胞の細胞収縮, 上皮-間葉系移行並びに細胞外基質リモデリング抑制に作用することが明らかになった。女性ホルモンは難治性網膜硝子体

疾患の線維性増殖組織形成および収縮に抑制作用がある可能性が示唆された。このことは核内受容体を介した難治性網膜硝子体疾患への新規治療薬の開発へ繋がると確信している。

## 1. 緒言

加齢黄斑変性症や増殖性硝子体網膜, 増殖糖尿病網膜症などの難治性網膜硝子体疾患は, 著しい視力低下をきたす疾患である。これらの疾患は高齢化社会を迎えた我が国における中途失明原因の上位を占め今後もその割合がさらに上昇すると考えられる。近年, 眼科の診断, 治療機器の発展, 硝子体手術の改良や抗VEGF眼内注射製剤等の生物製剤の導入によって予後が改善されてきている。しかしこれらの疾患において網膜虚血や網膜剥離あるいは新生血管からの出血などは治療によって改善しても, 長期間放置・反復するなどの重症例の視機能予後は依然として不良である。このような重症例の場合, 網膜脈絡膜に二次的に線維性増殖組織形成をきたしているケースが少なくない。このことは, 難治性網膜硝子体疾患では現行治療も有効であるが, 仮にそれが達成出来ても, 二次的な過剰な炎症・組織ダメージによって視細胞機能が低下することを示唆している。網膜機能の温存には如何に少ないダメージで出血, 炎症とそれに引き続く瘢痕形成などの二次的応答を制御できるかが重要である。そこで二次的に形成された網脈絡膜における線維性増殖組織の形成, 収縮の分子メカニズム及びその抑制作用薬を明らかにす

ることに焦点をあてた。網膜構成細胞の中でも特に網膜色素上皮細胞が中心的な役割を果たしている。一方で、Sex hormoneは網脈絡膜組織でのホメオスターシス維持に関与していると考えられている<sup>1,2)</sup>。我々は、そこで網膜色素上皮細胞を起点として細胞収縮、上皮-間葉系移行および細胞外基質リモデリングへのSex hormoneの作用に着目した。そこで本稿では、線維性増殖組織の形成、収縮に関与すると推察される網膜色素上皮細胞の線維芽細胞様形態変化つまり上皮-間葉系移行、細胞外基質のリモデリングへの性ホルモンの作用ならびにその分子作用機序について検討を行ったので概説する。

## 2. 難治性網膜硝子体疾患における線維性増殖組織形成と網膜色素上皮細胞

網膜は、およそ厚さが300ミクロンで10層構造している。網膜色素上皮細胞層の上に9層を占める神経網膜層がのっている状態である。さらにこの網膜の中心部が黄斑といい、もっとも感度の高い部位である。網膜硝子体疾患ではこの網膜が種々の原因で障害をうける。中でも増殖性硝子体網膜症、増殖糖尿病網膜症や加齢黄斑変性などの難治性網膜硝子体疾患は、近年眼科医療の進歩で予後が著しく改善されてきた。しかしながら長期黄斑部網膜剥離例、黄斑部新生血管再発例および網膜虚血に伴う多発する新生血管形成などの重症例の視機能予後は依然として不良である。例えば、加齢黄斑変性の本態は、網脈絡膜新生血管の発生および破綻による出血であるが、初期ならば、抗VEGF製剤の硝子体内投与で改善する症例がある。一方で抗VEGF製剤で新生血管は消退しても黄斑部に瘢痕形成をきたし視機能が回復しない重症例を経験する。また、増殖性硝子体網膜症や悪化した増殖糖尿病網膜症においても、網膜に線維性増殖組織を形成する。これにより、黄斑部網膜剥離の遷延化、黄斑部網膜面、網膜下へ線維性増殖組織形成、収縮などにより網膜に障害をきたし、著しい視機能低下をきたす。このような難治性網膜硝子体疾患では、新生血管の消褪、網膜虚血の改善、網膜剥離の復位が重要であるが、過剰な炎症・組織ダメージを制御し出血、炎症とそれに引き続く瘢痕などの線維性増殖組織形成などの二次的応答を制御できるかが最終的に視機能維持には重要である<sup>3-5)</sup>。

これら線維性増殖組織の病理学的検討では、マクロファージなどの炎症細胞、グリア細胞、ミュラー細胞、線維芽細胞や網膜色素上皮細胞とコラーゲンをはじめとした細胞外マトリックスが検出されている<sup>6-10)</sup>。なかでも網膜色素上皮細胞は、線維性増殖組織形成に関与する重要な細胞の1つであると考えられている。線維性増殖組織の形成機序は非常に複雑であるが、網膜剥離や網脈絡膜出血の後、網膜色素上皮細胞が硝子体内に放出されるか、あるいは網膜下で外的要因にて刺激され、上皮-間葉系移行をうけて線維芽細胞様に変化し、細胞移動、増殖および脱分化し線維性増殖組織の形成を促進すると考えられている。

## 3. 網膜色素上皮細胞における女性ホルモンによるコラーゲンゲル収縮抑制とその分子機序

本研究は、難治性網膜硝子体疾患における網膜脈絡膜での線維性増殖組織の形成、収縮の病態解明並びにその治療薬の解明を行うことを最終目的として

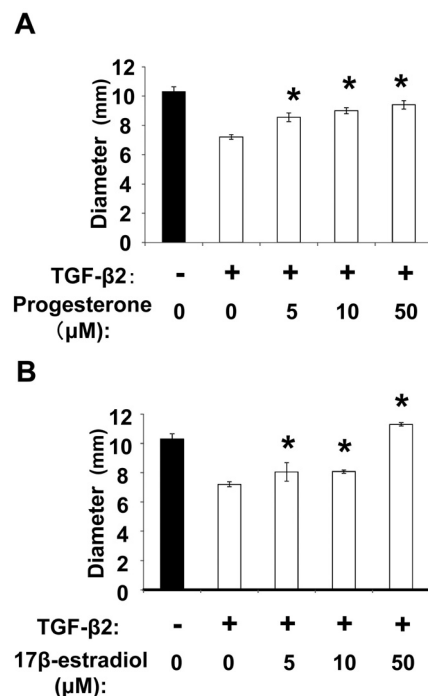


図1

網膜色素上皮細胞における女性ホルモン progesterone,  $17\beta$ -estradiol による濃度依存性コラーゲンゲル収縮抑制作用。\* $P < 0.05$  (Dunnett's test) versus the corresponding value for cells cultured with TGF- $\beta$  2 alone. (文献11より改変して転載)

いる。そこで、まずは初期培養したマウス網膜色素上皮細胞を用い、in vivoでの線維性増殖組織を模倣した三次元培養系を作成した。網膜色素上皮細胞を線維性増殖組織で最も多く認められるI型コラーゲン内で三次元培養し、線維性増殖組織の形成、収縮において重要な働きをしている因子の1つであるTGF- $\beta$ 2を用いてゲル収縮を誘導することを確認した。そこでこの培養系に、男性ホルモンの

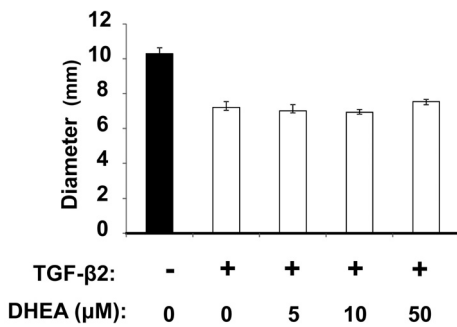


図2

網膜色素上皮細胞における男性ホルモンDHEAによるコラーゲンゲル収縮への無効果。(文献11より改変して転載)

dehydroepiandrosterone (DHEA), 女性ホルモンの17 $\beta$ -estradiol, progesteroneを添加し、TGF- $\beta$ 2によるゲル収縮への作用を検討した。女性ホルモンの17 $\beta$ -estradiol, progesteroneは濃度および時間依存性にゲル収縮を有意に抑制した(図1)。一方で、男性ホルモンのDHEAは全く抑制効果がなかった(図2)。このことは、女性ホルモンが線維性増殖組織の形成、収縮に寄与している可能性を示唆する。この網膜色素上皮細胞によるゲル収縮には網膜色素上皮の細胞収縮が関与している。そこで細胞収縮の分子メカニズムのひとつとしてアクトミオシン収縮がある。その際myosin light chain (MLC)はリン酸化を受ける。そこでTGF- $\beta$ 2によるMLCのリン酸化に対する17 $\beta$ -estradiol, progesteroneの作用を検討したところ、両方ともMLCのリン酸化を有意に抑制した(図3)。さらに網膜色素上皮細胞とそれを取り巻く細胞外基質のリモデリングがゲル収縮に重要な働きをする。そこでタンパク質分解酵素であるMMP-2, MMP-9の分泌発現への17 $\beta$ -

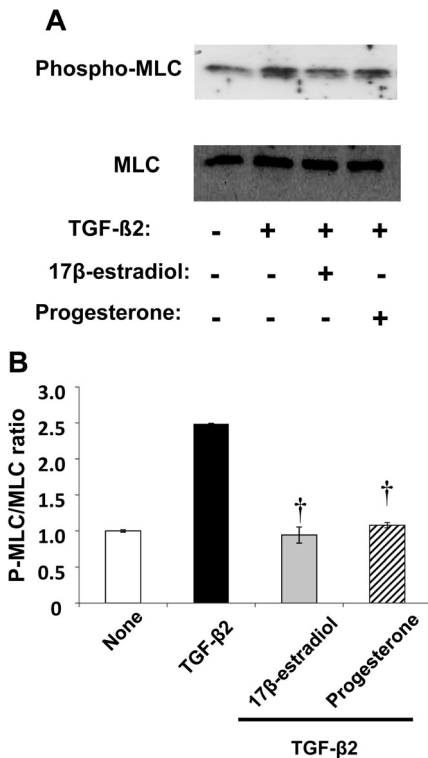


図3

網膜色素上皮細胞におけるTGF- $\beta$ 2によるMLCリン酸化の亢進へのprogesterone, 17 $\beta$ -estradiolの抑制作用。\* $P$ <0.05 (Dunnett's test) versus the corresponding value for cells cultured with TGF- $\beta$ 2 alone。(文献11より転載)

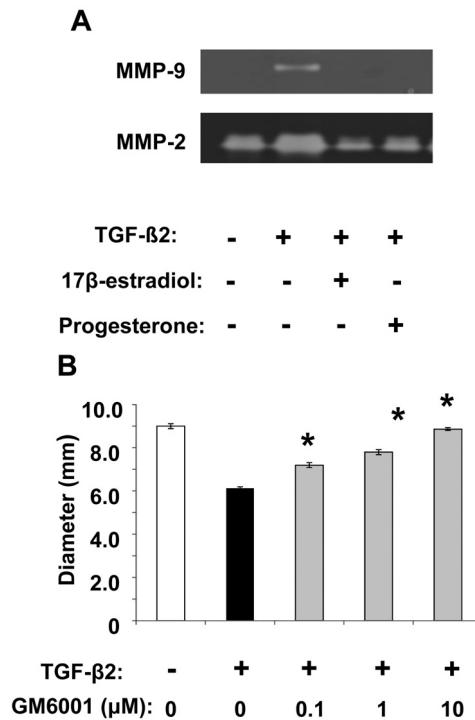


図4

網膜色素上皮細胞におけるTGF- $\beta$ 2によるMMP-2及びMMP-9の発現亢進に対するprogesterone, 17 $\beta$ -estradiolによる抑制作用。\* $P$ <0.05 (Dunnett's test) versus the corresponding value for cells cultured with TGF- $\beta$ 2 alone。(文献11より転載)

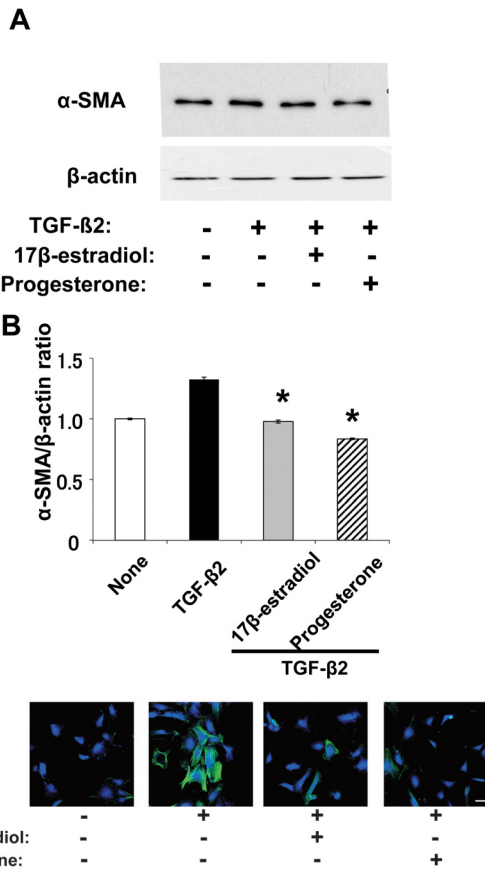


図5

網膜色素上皮細胞におけるprogesterone, 17β-estradiolによるTGF-β2によるα-SMAの発現亢進への抑制作用 (A) イムノブロット法による検討: α-SMA抗体, β-actin (internal control) 抗体. (B) 定量評価 \*P<0.05 (Dunnett's test) versus the corresponding value for cells cultured with TGF-β2 alone. (C) 免疫組織学的検討; Red signal: rhodamine-labeled phalloidin, Green signal: Alexa Fluor 488-conjugated α-SMA antibodies. Blue signal: Cyto59 (核). Bar, 50 μm. (文献11より転載)

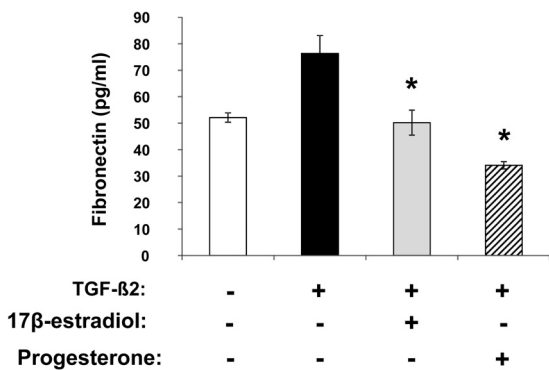


図6

網膜色素上皮細胞におけるTGF-β2によるFibronectinの発現亢進へのprogesterone, 17β-estradiolの抑制作用. \*P<0.05 (Dunnett's test) versus the corresponding value for cells cultured with TGF-β2 alone. (文献11より転載)

estradiol, progesteroneの作用を検討したところ, TGF-β2によるMatrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9の分泌発現を抑制した (図4). 網膜色素上皮細胞が三次元培養系にてゲル収縮作用を発揮するには, 網膜色素上皮細胞の上皮-間葉系移行が重要な働きをしていると考えられている. そこで, 網膜色素上皮細胞の上皮-間葉系移行に対する女性ホルモンの17β-estradiol, progesteroneの作用を検討した. Alpha-smooth muscle actin (α-SMA), Fibronectinの発現変化を上皮-間葉系移行の分子マーカーとし, これら分子の発現に対する17β-estradiol, progesteroneの作用を検討した. その結果, TGF-β2によって亢進したこれら分子の発現を17β-estradiol, progesteroneともに抑制した (図5, 図6). これらのことから, 女性ホルモンの17β-estradiol, progesteroneは, 網膜色素上皮細胞におけるアクチン細胞骨格, 細胞-細胞外基質相互作用及び上皮-間葉系移行に影響を及ぼし線維性増

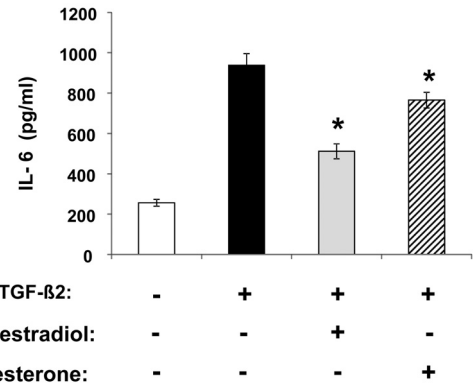


図7

網膜色素上皮細胞におけるprogesterone, 17β-estradiolによるTGF-β2のIL-6の分泌発現亢進への抑制作用. \*P<0.05 (Dunnett's test) versus the corresponding value for cells cultured with TGF-β2 alone. (文献11より転載)

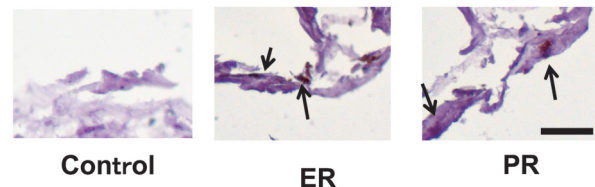


図8

増殖性硝子体網膜症患者から採取した線維性増殖組織におけるエストロゲン受容体 (ER), プロゲステロン受容体 (PR) 発現の免疫組織学的検討. Scale bars, 20 μm. (文献11より改変して転載)



殖組織の形成，収縮に寄与していると推察される。また，我々はこれまで女性ホルモンが角膜潰瘍の病因である角膜実質細胞によるI型コラーゲン分解を抑制することを報告してきており，女性ホルモンは眼組織における細胞外基質のリモデリングに重要な働きをしていると考えられる。

さらに，網膜色素上皮細胞は炎症の起点として網脈絡膜での局所炎症に関与する。実際，網膜色素上皮細胞はTGF- $\beta$ 2によって炎症性サイトカインIL-6の分泌発現亢進をきたす。これら女性ホルモンはこのIL-6の発現をも抑制した(図7)。最後に，実際に増殖性硝子体網膜症の患者から増殖組織を手術にて摘出し，これら女性ホルモンの特異的受容体(ER, PR)の発現を免疫組織学的に検討した。結果，得られた病理組織サンプル全てでER, PRの発現を認めた(図8)。このことから性ホルモンの中で17 $\beta$ -estradiol, progesteroneの女性ホルモンがin vivoで網脈絡膜の線維性増殖組織形成および収縮に関与する可能性が示唆された<sup>11)</sup>。疾患によっては，病状進展に女性ホルモンが逆に炎症の増強や線維化促進へ関与している報告もあるので，今後もさらなる検討を加える必要があると思われる。

レチノイン酸誘導体であるATRA (all-trans retinoic acid, retinoic acid)が網膜色素上皮細胞におけるコラーゲンゲル収縮を抑制する報告がある<sup>12)</sup>。ATRAも特異的な核内受容体と結合しその作用を発揮することから，本研究結果と合わせて考えると網膜色素上皮細胞における核内受容体を介した転写ネットワーク制御が線維性増殖組織形成，収縮抑制に重要なものかもしれない。これまでの研究成果が，核内受容体の中心とした転写ネットワーク制御を標的とした難治性網膜硝子体疾患の線維性増殖組織形成，収縮抑制に対する新規治療薬の開発へとつながると確信している。

稿を終えるにあたり，これまで臨床・研究の暖かい激励とご指導，ご鞭撻を頂いた園田康平先生(山口大学大学院医学系研究科眼科学教授)に深謝いたします。また，眼科学教室の先生方から熱心な協力と数多くのご助言を賜りましたことに，心より感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) Gupta PD, Kalariya N, Nagpal K, Vasavada A. Pinteraction of sex steroid hormones with the eye. *Cellular and molecular biology* 2002 ; 48 Online Pub : OL379-386.
- 2) Ogueta SB, Schwartz SD, Yamashita CK, Farber DB. Estrogen receptor in the human eye : influence of gender and age on gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999 ; 40 : 1906-1911.
- 3) Kaiser PK, Gragoudas ES. The subretinal fibrosis and uveitis syndrome. *International ophthalmology clinics* 1996 ; 36 : 145-152.
- 4) Clemons TE, Milton RC, Klein R, Seddon JM, Ferris FL 3rd, Age-Related Eye Disease Study Research G. Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19. *Ophthalmology* 2005 ; 112 : 533-539.
- 5) Kojima S, Yamada T, Tamai M. Quantitative analysis of interleukin-6 in vitreous from patients with proliferative vitreoretinal diseases. *Jpn J Ophthalmol* 2001 ; 45 : 40-45.
- 6) Xu H, Chen M, Forrester JV. Para-inflammation in the aging retina. *Prog Retin Eye Res* 2009 ; 28 : 348-368.
- 7) Kim MK, Chan CC, Belfort R Jr., et al. Histopathologic and immunohistopathologic features of subretinal fibrosis and uveitis syndrome. *Am J Ophthalmol* 1987 ; 104 : 15-23.
- 8) Baudouin C, Hofman P, Brignole F, Bayle J, Loubiere R, Gastaud P. Immunocytology of cellular components in vitreous and subretinal fluid from patients with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmologica. Journal international d'ophtalmologie International journal of ophthalmology. Zeitschrift fur Augenheilkunde* 1991 ; 203 : 38-46.
- 9) Hollborn M, Tenckhoff S, Jahn K, et al. Changes in retinal gene expression in

proliferative vitreoretinopathy : glial cell expression of HB-EGF. *Mol Vis* 2005 ; 11 : 397-413.

- 10) Wickham L, Charteris DG. Glial cell changes of the human retina in proliferative vitreoretinopathy. *Developments in ophthalmology* 2009 ; 44 : 37-45.
- 11) Kimura K, Orita T, Fujitsu Y, et al. Inhibition by female sex hormones of collagen gel contraction mediated by retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014 ; 55 : 2621-2630.
- 12) Chang YC, Kao YH, Hu DN, Tsai LY, Wu WC. All-trans retinoic acid remodels extracellular matrix and suppresses laminin-enhanced contractility of cultured human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 2009 ; 88 : 900-909.

### **Action of Sex Hormone for Proliferative Fibrocellular Tissue Formation in Refractory Vitreoretinal Diseases**

Kazuhiro KIMURA

Department of Ophthalmology (Ophthalmology), Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

### **SUMMARY**

Secondary formation of retinal proliferative fibrous tissue in refractory vitreoretinal diseases such as age-related macular degeneration proliferative vitreoretinopathy, and diabetic retinopathy sometimes causes visual loss. It is important, therefore, to control the formation of proliferative fibrous tissue in retina or contraction. Retinal pigment epithelial cells play a central role in this proliferative fibrous tissue formation mediated by epithelial-mesenchymal transition (EMT) and remodeling of the extracellular matrix. Sexual difference has been reported to have effects on the development of some vitreoretinal diseases. Sex hormones are also involved in maintaining homeostasis of retina. We have examined the action of sex hormones to contraction by RPE cells and extracellular matrix remodeling. As a result, the female hormones suppressed cell contraction of RPE cells, MMPs expression and EMT. Female sex hormones might thus prove effective for the treatment of the development and contraction of fibrous tissue in refractory vitreoretinal diseases.