

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

A Novel Multi-Observation System to Study the Effects of Anterior Ocular Inflammation in Zinn's Zonule Using One Specimen

同一検体を用いたチン小帯における前眼部炎症の影響を研究するための新しい複合的観察系

日本医科大学大学院医学研究科 眼科学分野
大学院生 高橋 慶

International Journal of Molecular Sciences, volume 24, number 7, page 6254,
Mar 26, 2023 掲載

DOI: 10.3390/ijms24076254

白内障手術の際、チン小帯の脆弱性は手術難易度を増し、水晶体の偏位や落下などの合併症を引き起こすリスクがある。この脆弱性は、マルファン症候群やホモシスチン尿症のような先天的素因、または外傷、偽落屑症候群、ぶどう膜炎、硝子体手術後、網膜色素変性症、アトピーなどの後天的原因によるものである。既報告では実験的角膜外傷による炎症性浸潤細胞がチン小帯を侵すことが示されたが、チン小帯の脆弱性に関する研究はまだ限られており、多くの未解決の問題がある。チン小帯の組織自体の細さ、脆さにより実験系でのチン小帯観察が困難であることがその主たる原因である。

本論文では、炎症によるチン小帯の形態変化とその原因を探るための実験系を構築した。ラットを使った角膜アルカリ外傷モデルを使用し、前眼部の炎症を誘発した。外傷発生後7日目 (day7) と通常の眼 (Normal) を比較し、前眼部のみにトリミングした眼球を蛍光免疫染色で観察した。低融点ゼラチンに固定し、4倍の倍率で観察した後、パラフィン置換して薄切、再び蛍光免疫染色を行った。さらに詳細な観察のため、重金属染色を施し、低真空走査型電子顕微鏡 (LV-SEM) を施行した。また、同じパラフィン検体から Reverse Transcription quantitative PCR (RT-qPCR) 用の検体を切り出し、RNA を抽出して分析した。

ゼラチン包埋観察ではチン小帯マーカーとして Microfibril-associated glycoprotein-1 (MAGP1) を使用し、外傷後の経過日数に伴いチン小帯の蛍光発色が徐々に減弱し、背景蛍光が強調される傾向が観察された。パラフィン切片の蛍光顕微鏡観察では、Normal と day7 の両群でチン小帯上に遊走する有核細胞が確認された。そこで浸潤細胞数を集計し、マクロファージマーカーの ED-1 陽性細胞、チン小帯分解能マーカーの MMP2 陽性細胞について評価すると、day7 では浸潤細胞が有意に増加し、ほとんどが ED1 陽性かつ MMP2 陽性細胞であることが分かった。LV-SEM での観察では、低倍率と高倍率でのチン小帯の変化を評価した。低倍率では、両群の色濃度に有意差を認めたが、面積比には差がなかった。高倍率では、day7 でのチン小帯が全体的に細くなっていた。Day7 の超高倍率観察では、マクロファージがチン小帯を浸潤している像を確認出来た。RT-qPCR では、ハウスキーピング遺伝子 β -actin を用いた $\Delta\Delta$ CT 法では、Normal 群に比べ day7 で MMP2 の発現量が有意に増加していたことが示された。以上より、角膜炎症によるチン小帯のマクロからマイクロレベルにわたる形態変化を詳細に確認することができた。MMP2 がチン小帯の MAGP1 を分解する役割を持つことが示唆され、マクロファージの遊走がチン小帯の形態変化を引き起こしていることが観察された。つまりマクロファージがチン小帯を分解し、遊走することによって直接的な損傷を与えることでチン小帯が脆弱になると推察された。

第二次審査では本実験モデルの他疾患への基礎応用、そして臨床応用への可能性について、Fibrillar girdle の臨床的意義、アルカリ外傷そのものによるチン小帯への影響の有無などの質問に対し、的確な回答を得た。

本論文は白内障手術における合併症の原因であるチン小帯の脆弱性についてのメカニズムの一端を明らかにした論文であり、臨床に密接に関わる意義の高い論文と考えられる。以上より、本論文は学位論文として価値あるものと認定した。