

主論文

The Role of Inverted Internal Limiting Membrane Flap in Macular Hole Closure (黄斑円孔の閉鎖における翻転内境界膜弁の役割)

【緒言】

特発性黄斑円孔は網膜の中心である黄斑部に網膜欠損を生じる疾患であり、変視症や中心視力低下を生じる。治療には硝子体手術が必要であり、現在のところ硝子体切除に加え内境界膜剥離、およびガスタンポナーデが標準術式と考えられている。黄斑円孔の90%以上の症例はこの標準術式で円孔閉鎖を得ることができる。この術式における黄斑円孔の閉鎖機序としては、内境界膜剥離による網膜牽引の除去と、ミュラー細胞(網膜の主要なグリア細胞)による創傷治癒過程が関与することが知られている。

一方、標準術式では閉鎖しない難治性黄斑円孔の存在が明らかにされている。具体的には巨大な黄斑円孔、長期間経過した黄斑円孔、高度近視・外傷・炎症等による二次的な黄斑円孔等が挙げられる。これらの難治性黄斑円孔に対する新たな術式として、2010年に内境界膜翻転法、2014年に内境界膜自家移植が報告された。これらの術式が従来までの標準術式と大きく異なる点は、これまで剥離除去していた内境界膜を活用し、黄斑円孔の閉鎖を促す点である。特に内境界膜翻転術は多くの追試がなされ、標準術式よりも高い円孔閉鎖率が得られることが報告されている。しかし、これらの術式が奏功するメカニズムは不明である。

そこで我々はミュラー細胞、動物実験を用いて、内境界膜翻転法が黄斑円孔の閉鎖に及ぼす役割について検討した。

【材料と方法】

動物実験

カニクイザル(3-4歳、体重3-5kg)3頭の右眼を用いた。塩酸ケタミンによる麻酔下に、硝子体手術装置を使用し既報に従って人工的黄斑円孔を作成した。作成した人工的黄斑円孔3眼のうち、2眼は内境界膜翻転法を行った。残りの1眼は内境界膜剥離を行い対照眼とした。網膜形態評価として、術前および術後10日目に光干渉断層計(OCT)の撮像を行った。術後11日目に眼球摘出し、組織学的に検討した。

細胞実験

ミュラー細胞株であるMIOM1細胞を用いて、細胞の増殖、遊走を評価した。遊走の評価については、細胞の遊走を促すモデルとして培養皿の中央に円形の遊走阻止被覆物を設置し細胞培養を行う実験系を開発した(円形の遊走阻止被覆物を黄斑円孔に見立てており、細胞が増殖した後、遊走阻止被覆物を除去すると、その空隙に向かって細胞が遊走する)。内境界膜の構成成分である、IV型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンを塗布した培養皿において、MIO-M1細胞の遊走、増殖の促進効果が認められるかどうかを検討した。

またミュラー細胞は、網膜神経細胞の傷害に応じて、神経栄養因子(脳由来神経栄養因子;BDNF、毛様体神経栄養因子;CNTF、グリア細胞株由来神経栄養因子;GDNF)や線維芽細胞増殖因子(bFGF)を発現し、神経保護に関与することが知られている。増殖、遊走したMIO-M1細胞における神経栄養因子の発現を、RT-PCRおよび免疫組織学的に評価した。

ヒト内境界膜の採取

ヒト内境界膜の硝子体腔側には、細胞外基質の層があることが明らかにされている。一般に細胞外基質は、栄養因子、増殖因子を保持する働きがある。ミュラー細胞から、神経栄養因子や増殖因子が産生されることから、内境界膜にこれらの因子が存在する可能性があるものと考えた。これを検討するため黄斑円孔患者10例10眼を対象とし、手術時に剥離した内境界膜を採取し、これらの因子の存在の有無を免疫組織化学的に検討した(岡山大学病院の倫理委員会承認済)。

【結果】

サル眼において、翻転した内境界膜の周囲にGFAP陽性細胞を認めた

内境界膜翻転法を行った 2 眼では黄斑円孔が閉鎖した。免疫染色では、翻転した内境界膜弁に沿って多くの GFAP 陽性細胞を認めた。その中には増殖細胞のマーカーとなる Ki67 が陽性である細胞も認められた。これは、翻転させた内境界膜弁がミュラー細胞の増殖、遊走の足場となった可能性を示唆している。

内境界膜の構成成分は、ミュラー細胞の増殖と遊走を促進した

内境界膜の構成成分のうち、IV 型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンは MIO-M1 細胞の増殖を促進させた。IV 型コラーゲンとフィブロネクチンは MIO-M1 細胞の遊走を促進させた。

ヒト内境界膜に神経栄養因子や増殖因子が存在していた

BDNF、CNTF、GDNF、bFGF の 4 因子が、採取したヒト内境界膜の表面に認められた。遊走中のミュラー細胞は、神経栄養因子や増殖因子の発現が亢進した

上記の遊走実験系を用いて MIO-M1 細胞を遊走させ、蛍光免疫染色を行った。BDNF、CNTF、GDNF、bFGF の 4 因子とも、蛍光免疫反応を認めた。また、4 因子すべてにおいて遊走細胞における免疫反応は非遊走細胞よりも強かった。この結果を確認するため、遊走実験系において遊走細胞と非遊走細胞を採取し、BDNF、CNTF、GDNF、bFGF の mRNA の発現量を RT-PCR によって定量した。その結果、4 因子すべてにおいて遊走細胞が非遊走細胞よりも発現が有意に亢進しており、免疫染色と一致する結果であった。

[考察]

本研究では、1)翻転した内境界膜がミュラー細胞の増殖や遊走の足場として機能する可能性を示し、2)活性化したミュラー細胞からは神経栄養因子や増殖因子が産生されること、そして、3)内境界膜そのものにも神経栄養因子や増殖因子が存在し、黄斑円孔内に置かれた内境界膜弁によって神経栄養因子や増殖因子が円孔に提供される可能性を示した。これらの結果は、内境界膜翻転法や内境界膜自家移植による難治性黄斑円孔の閉鎖には、円孔内に置かれた内境界膜弁とミュラー細胞の間の相互作用や、神経栄養因子や増殖因子等の液性因子が関与することを示唆するものである。

ミュラー細胞の活性化(グリオシス)が黄斑円孔の閉鎖に有効である一方で、過剰なグリオシスは網膜神経細胞を傷害し、術後経過を悪くさせる可能性がある。内境界膜翻転法や内境界膜自家移植の問題点の一つは、内境界膜の翻転量や移植量に基準がなく、円孔は閉鎖するものの過剰なグリオシスを招く危険性があることである。翻転、移植した内境界膜は術後数ヶ月に渡って網膜内に遷延した報告がある。長期間グリオシスが遷延し、瘢痕形成となった場合には網膜構造の回復を制限すると考えられる。グリオシスの程度を調整する仕組みを明らかにし、過剰なグリオシスを防ぐ方法を開発することが今後の課題である。

内境界膜を操作する手術手技が困難であることも、内境界膜翻転法や内境界膜自家移植の問題点の一つである。本研究では、内境界膜の構成成分のうち、IV 型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンがミュラー細胞の増殖を、IV 型コラーゲン、フィブロネクチンが遊走を促進することを示した。この結果は、これらの成分が内境界膜に替わるアジュバントになる可能性を示唆するものである。これまでに transforming growth factor-beta-2 (TGFβ-2) や自己血清がアジュバントとして有効かどうかを検討されたことがあるが、いずれも有意な効果はみられなかった。内境界膜に替わるアジュバントが明らかになれば、内境界膜翻転法や内境界膜自家移植よりも安全、確実に難治性黄斑円孔を治療することが可能となるため、今後、IV 型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンが黄斑円孔の閉鎖に及ぼす影響について in vivo で検討する必要がある。

本検討では円孔閉鎖後の視機能に重要な、視細胞層 (OCT における Ellipsoid zone) の回復のメカニズムについては検討していない。筆者らは、術前に不連続であった Ellipsoid zone が、内境界膜自家移植の術後数ヶ月で回復した症例を報告している。ラットやマウスでは網膜神経細胞や視細胞の再生にグリア細胞が関与している可能性が示されている。今後ヒト眼の視細胞層の回復におけるミュラー細胞の役割について検討が必要である。

[結論]

難治性黄斑円孔に対する内境界膜翻転法や内境界膜自家移植の奏効メカニズムとして、円孔内に置かれた内境界膜がミュラー細胞を介して円孔修復機転を促す可能性を示した。