

原著

## 3次元培養法による上眼瞼溝深化 (deepening of the upper eyelid sulcus : DUES) の分子病態に関する検討

伊藤 格, 日景史人, 井田洋輔, 大黒 浩

札幌医科大学 眼科学講座

Molecular pathological study of deepening of the upper eyelid sulcus through a three-dimension tissue culture.

Kaku ITOH, Fumihito HIKAGE, Yosuke IDA, Hiroshi OHGURO.

Departments of Ophthalmology, Sapporo Medical University School of Medicine

### ABSTRACT

**PURPOSE:** To elucidate the molecular pathology of deepening of the upper eyelid sulcus (DUES) induced by prostaglandin analogues (PGs), through a three-dimension (3D) tissue culture system using human orbital fibroblasts (HOFs).

**METHODS:** Effects of either 100 nM bimatoprost acid (BIM) or 100 nM prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) were examined for the 3D organoids from HOFs. The size of BIM and PGF2 $\alpha$  organoids were measured during cultivation, and evaluated the expression of the extracellular matrix (ECM) by immunolabeling and quantitative PCR.

**RESULTS:** The size of the 3D organoids become smaller by the presence of PGs. Unique changes in ECM expressions were also observed upon the presence of PGs.

**CONCLUSIONS:** Our present study suggests that PGs have the influence to regulate the expression of ECMs' network within the HOFs 3D organoids. Thus, a 3D tissue culture system may be a suitable strategy toward understanding disease etiology of DUES.

(Received September 4, 2019 and Accepted October 23, 2019)

**Key words:** deepening of the upper eyelid sulcus (DUES), prostaglandin analogues, three-dimension (3D) tissue culture

### 1 緒言

緑内障は眼圧上昇に伴い徐々に視野欠損が進行し、失明に至る可能性がある視神経疾患で、機序として軸索障害や血流障害、遺伝的要因などを含め多くの要因が報告されている<sup>1-3)</sup>。緑内障の治療として、薬物療法、レーザーまたは手術により眼圧を適正に管理することがエビデンスに基づく唯一の方法である<sup>4-6)</sup>。薬物療法の中でもプロスタグランジン誘導体(Prostaglandin analogs: PGs)点眼薬は眼圧下降効果が高くかつ全身的な副作用が少ないことから、緑内障治療薬の第一選択薬として用いられている<sup>7, 8)</sup>。一方、本剤の長期使用により結膜充血、睫毛発育促進、虹彩および眼瞼の色素沈着に加え上眼瞼溝深化 (Deepening of the upper eyelid sulcus: DUES) が報告されている<sup>9-11)</sup>。中でも DUES は点眼薬の継続使用により、眼窩部脂肪

の減少に伴い上眼瞼の眼窩縁に窪み(溝)の深さが増大し、眉毛部下縁前頭骨縁が顕著になる整容的な副作用である。ビマトプロストで60%、トラボプロストで50%、ラタノプロストで24%、タフルプロストで18%の症例で併発するという報告がある<sup>12-14)</sup>。しかし、現状で DUES の詳しい機序は不明であるものの臨床的にMRI所見より眼窩部脂肪組織の萎縮性変化が原因であることが示唆されている<sup>15)</sup>。実際にTaketaniらはマウスの腹腔内脂肪である3T3-L1細胞を用いて、PGsがプロスタノイドF型プロスタグランジン受容体(prostanoid F-type prostaglandin receptor: FP受容体)を介して脂肪分化誘導を抑制することを報告した<sup>16)</sup>。またヒト眼窩部脂肪組織の2次元培養において、高濃度のPGsが脂肪分化誘導制御遺伝子の一つであるperoxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ )が抑制されたとの報告もある<sup>17)</sup>。

しかしながら成人の眼窩部脂肪組織は一般的に増殖能が活発ではなくむしろ停止安定化状態にあるためPGsによって引き起こされるDUESの病態機序は脂肪分化誘導の制御よりも、眼窩部脂肪とそれを取り巻く細胞外マトリクス (extra cellular matrix: ECM) の3次元構造の変化による可能性が示唆される。従ってこの仮説を検討するためには通常的眼窩部脂肪組織を用いた2次元培養ではなく、3次元的にECMを含めたより生体に近い形での評価が可能である実験系で検討する必要がある<sup>18)</sup>。最近我々のグループは、新しい3次元培養系を用いて甲状腺眼症の眼窩部脂肪組織の分子病態を検討したところ、炎症に伴って眼窩部脂肪増殖にhypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  (HIF2 $\alpha$ ) が関わることと治療ターゲットになりうる可能性を示唆した<sup>19)</sup>。

今回我々は、この新しい3次元培養法を用いてPGsにより引き起こされるDUESの分子病態を検討したので報告する。一般的に脂肪細胞は部位ごとに性質が異なり、皮下脂肪と内臓脂肪の間においてもそれぞれ異なる分子病態をもつことが報告されている<sup>20)</sup>。したがって本研究では脂肪研究で最も頻繁に使用されるマウスの腹腔内脂肪である3T3-L1細胞よりもより臨床に近いヒト眼窩部脂肪組織を用いた。

## 2 実験方法

### 2・1 実験に用いた主な試薬

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (No. 11965118; Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), Fetal Bovine Serum (FBS) (No. A3160402; Gibco/Thermo Fisher Scientific), L-glutamine (No. 25030081; Gibco/Thermo Fisher Scientific), Antibiotic-Antimycotic (No. 15240062; Gibco/Thermo Fisher Scientific), Methylcellulose (Methocel A4M) (No. 94378; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red (No. 25200056; Gibco/Thermo Fisher Scientific), Phosphate Buffered Salts pH7.4 (PBS) (No.10010049; Gibco/Thermo Fisher Scientific), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (No. D2650; Sigma-Aldrich), Bimatoprost free acid (No. 16810; Cayman chemical), Prostaglandin (PG) F2 $\alpha$  (No. 16010; Cayman chemical), Anti-Collagen Type 1, Rabbit-Poly (No. 600-401-103-0,1; ROCKLAND, Limerick, PA), Anti-Collagen Type 4, Rabbit-Poly (No. 600-401-106-0,1; ROCKLAND), Anti-Collagen Type 6, Rabbit-Poly (No. 600-401-108-0,1; ROCKLAND), Fibronectin (EP5), mouse monoclonal IgG (No. sc-8422; Santa Cruz Biotechnology, Mississauga, Canada), 4',6-diamidino-2-phenylindole solution (DAPI) (No. D523; Dojindo, Japan), Phalloidin-

iFluor 594 Conjugate (No. 20553; Cayman Chemical), F(ab')<sub>2</sub>-Goat anti-Rabbit IgG(H+L) Secondary Antibody, Alexa Flour 488 (No. A11070; Gibco/Thermo Fisher Scientific), F(ab')<sub>2</sub>-Goat anti-Mouse IgG(H+L) Secondary Antibody, Alexa Flour 488 (No. A11070; Gibco/Thermo Fisher Scientific), Albumin solution, from bovine serum (BSA) (No. A8327, Sigma-Aldrich), Prolong Gold Antifade Mountant (No. P36934; Gibco/Thermo Fisher Scientific)

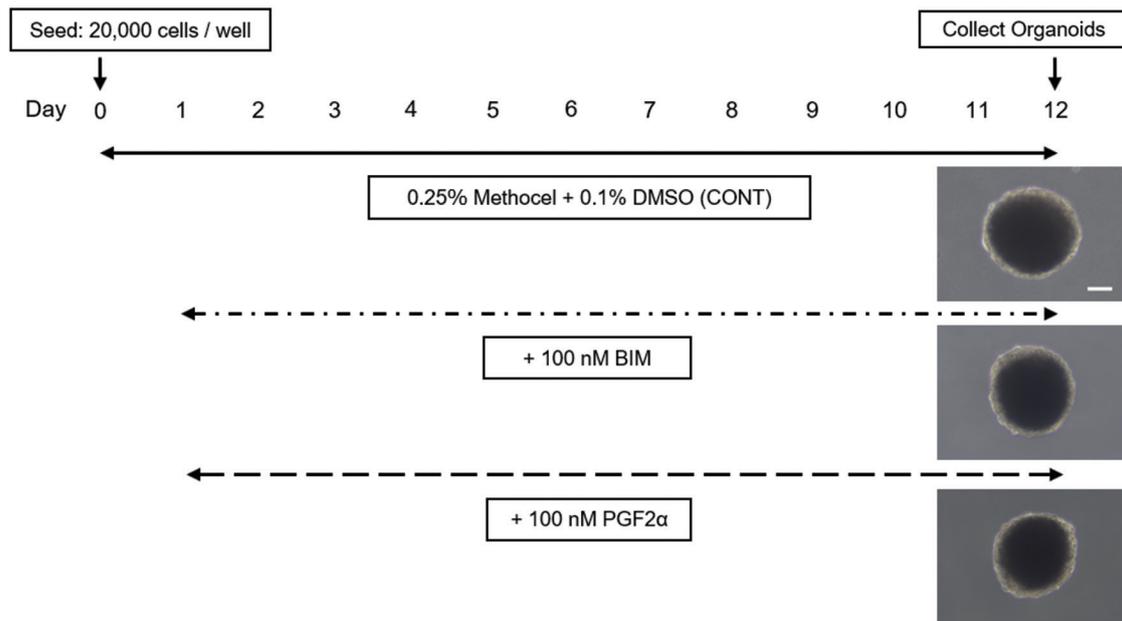
### 2・2 ヒト眼窩部脂肪組織の培養

眼科非炎症性疾患4症例(眼窩脂肪ヘルニア2例:60歳台男性,70歳台女性,斜視2例:40歳台男性,50歳台男性)に対して札幌医科大学附属病院で眼科手術を施行した際に廃棄される眼窩部の脂肪組織塊を、本学倫理委員会の承認(承認番号:312-3190)の下、患者様に術前に十分な説明と同意を得たうえで本研究の実験に用いた。脂肪組織塊を採取後直ちに100mmの滅菌シャーレ上で細かく分割し、10% FBS, 1% L-Glutamineおよび1% Antibiotic-Antimycoticを含むDMEM培養液を加え、37℃かつ5% CO<sub>2</sub>の湿潤環境下にて培養した。培養液は2-3日に一度交換し、得られた線維芽細胞(Human orbital fibroblasts: HOFs)を継代(3-7回)して以下の3次元培養に使用した。

### 2・3 HOFsの3次元培養

100mm及び150mmの滅菌培養シャーレにて90-100%コンフルエントの状態まで培養したHOFsをPBSで2回洗浄後、0.25% trypsin-EDTAを用いてシャーレより剥離回収し、培養液を加え300×gで5分間遠心させHOFsペレットとした。3次元培養プレートには、hanging drop culture plate (No.HDP1385; Sigma-Aldrich)を用いた。3次元培養で形成されるオルガノイドの形状を安定させる目的で0.25% Methocelを加えた培養液でHOFsペレットを懸濁し、1-well (28 $\mu$ L)あたり約20,000細胞になるよう調整後培養を開始した(Day-0)。培養液の交換は毎日1-wellあたり14 $\mu$ Lを吸引除去し、新しい培養液14 $\mu$ Lと交換した。

Figure 1に示すようにHOFsの3次元培養は12日間のプロトコルで行った。従来から使用されているトラボプロスト、ラタノプロスト、タフルプロストはprostaglandin F2 $\alpha$ 誘導體で、いずれもFP受容体を介して眼圧下降効果を示す一方、bimatoprostはプロスタマイドF2 $\alpha$ 誘導體で、PM受容体を介して眼圧下降効果を示す薬剤である。いずれの薬剤も最も高頻度でDUESを引き起こすことが知られており、本研究においてはPGs群としてはbimatoprost (BIM)



**Figure 1.** HOFsを用いた3次元培養プロトコル。

Day-0で各Wellに20,000個の細胞を撒き、Day-1より0.25% Methocel, 0.1% DMSOを加えた培養液をDay-12まで毎日交換した (CONT群)。CONT群と同じ培養液にそれぞれ100 nM bimatoprost (BIM群), 100 nM prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ 群)を加えて同様に3次元培養した。Scale bar: 100  $\mu$ m。

または prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ )を用いた。濃度は1  $\mu$ M から10,000  $\mu$ Mまで検討し、各濃度での結果に差がないことを他の実験で確認しており、本研究では既報に則って100  $\mu$ Mでの濃度を設定した<sup>16)</sup>。薬剤の溶媒として使用したDMSOの濃度を揃えるため、コントロール群 (CONT) の培養液には0.1% DMSOを加え、オルガノイドの培養を行った。

#### 2・4 HOFsオルガノイドのサイズ測定および解析

HOFsオルガノイドのサイズ測定は培養中3次元培養プレートを顕微鏡 (Nikon ECLIPSE TS2; Tokyo, Japan) で連日撮像 (倍率 $\times$ 4) し行った。各群でHOFsオルガノイドの最大径が描出される高さにて撮像し (n=16), Image-J software version 1.51n (National Institutes of Health, Bethesda, MD) で解析した。同様の測定を異なる脂肪組織からの4サンプルにて行った。

#### 2・5 オルガノイドの免疫組織染色

培養12日目 (Day-12) で回収したオルガノイドを4% PFA in PBSを用いて24時間固定し、3% BSAを用いてブロッッキング、PBSで2回洗浄後、1:200に濃度調整した一次抗体 (Collagen Type 1, Type 4, Type 6, および Fibronectin) を加えて4 $^{\circ}$ Cの環境下で24時間培養した。PBSを用いて3回洗浄後、1:500に濃度調整した二次抗体、1:1000に濃度調整したDAPIおよびPhalloidinを加えて室温で3時間培養した。そ

れぞれのオルガノイドをカバーガラスへ移し、ProLong Goldを用いて封入した。共焦点顕微鏡 (Nikon A1 confocal microscopy, Tokyo, Japan) を用いて免疫染色されたオルガノイドを撮像した。倍率20倍の対物レンズを用い、オルガノイドの底面から35  $\mu$ mの高さまで、2.2  $\mu$ m間隔で16枚、1024 $\times$ 1024ピクセルに設定し撮像を行い、NIS element 4.0 softwareのmaximum intensity projectionを用いてZ-stack画像を得た。得られた画像のオルガノイドに含まれる染色輝度総量をImage-J software version 1.51nを用いて定量した。COL-1, COL-4はn=6, COL-6はn=7, Fibronectinはn=4でそれぞれ解析した。

#### 2・6 遺伝子発現解析

培養12日目 (Day-12) で各群16個ずつのHOFsオルガノイドを回収しRNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いてRNAを抽出した。cDNAの作成にはSuperScript IV kit (Invitrogen) を用いた。遺伝子発現解析にはStepOnePlus machine (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific) を使用、Power SYBR Green Master MixおよびUniversal TaqMan Master Mixを用いてreal-time PCR (qPCR) を行った。cDNA量のnormalizationには36B4 (RPLP0) を用いた。すべての群はn=4でそれぞれ解析した。プライマーのDNA塩基配列を以下に示す。

human RPLP0

(Probe: 5'-/56-FAM/CCCTGTCTT/ZEN/CCCTGG

GCATCAC/3IABkFQ/-3'),  
 (Forward: 5'-TCGTCTTTAAACCCTGCGTG-3'),  
 (Reverse: 5'-TGTCTGCTCCACAATGAAAC-3').  
 human COL1A1  
 (Probe: 5'-/56-FAM/TCCAGGGCC/ZEN/AAGAC  
 GAAGACATC/3IABkFQ/-3'),  
 (Forward: 5'-GACATGTTTACAGCTTTGTGGAC-3'),  
 (Reverse: 5'-TTCTGTACGCAGGTGATTGG-3').  
 human COL4A1  
 (Probe: 5'-/56-FAM/TCATACAGA/ZEN/CTTGG  
 CAGCGGCT/3IABkFQ/-3'),  
 (Forward: 5'-AGAGAGGAGCGAGATGTTCA-3'),  
 (Reverse: 5'-TGAGTCAGGCTTCATTATGTTCT-3').  
 human COL6A1  
 (Forward: 5'-CCTCGTGGACAAAGTCAAGT-3'),

(Reverse: 5'-GTGAGGCCTTGGATGATCTC-3').  
 human FN1  
 (Forward: 5'-CGTCCTAAAGACTCCATGATCTG-3'),  
 (Reverse: 5'-ACCAATCTTGTAGGACTGACC-3').

## 2・7 統計学的解析

解析には GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いた. グループ間の解析は one-way ANOVA (followed by a Tukey's multiple comparison test) にて行い, 95 % の信頼区間を設定した.

## 3 結果

Figure 2に示すように3次元培養12日目 (Day-12) までに球形の HOFs は徐々に小さなサイズのオルガ

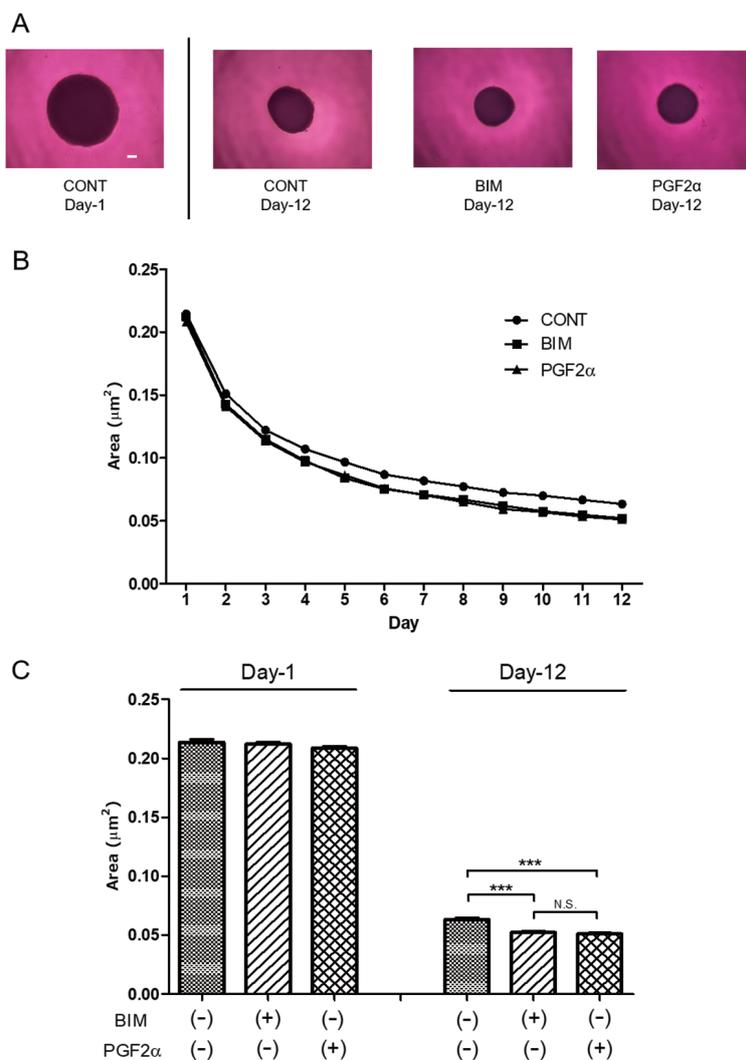


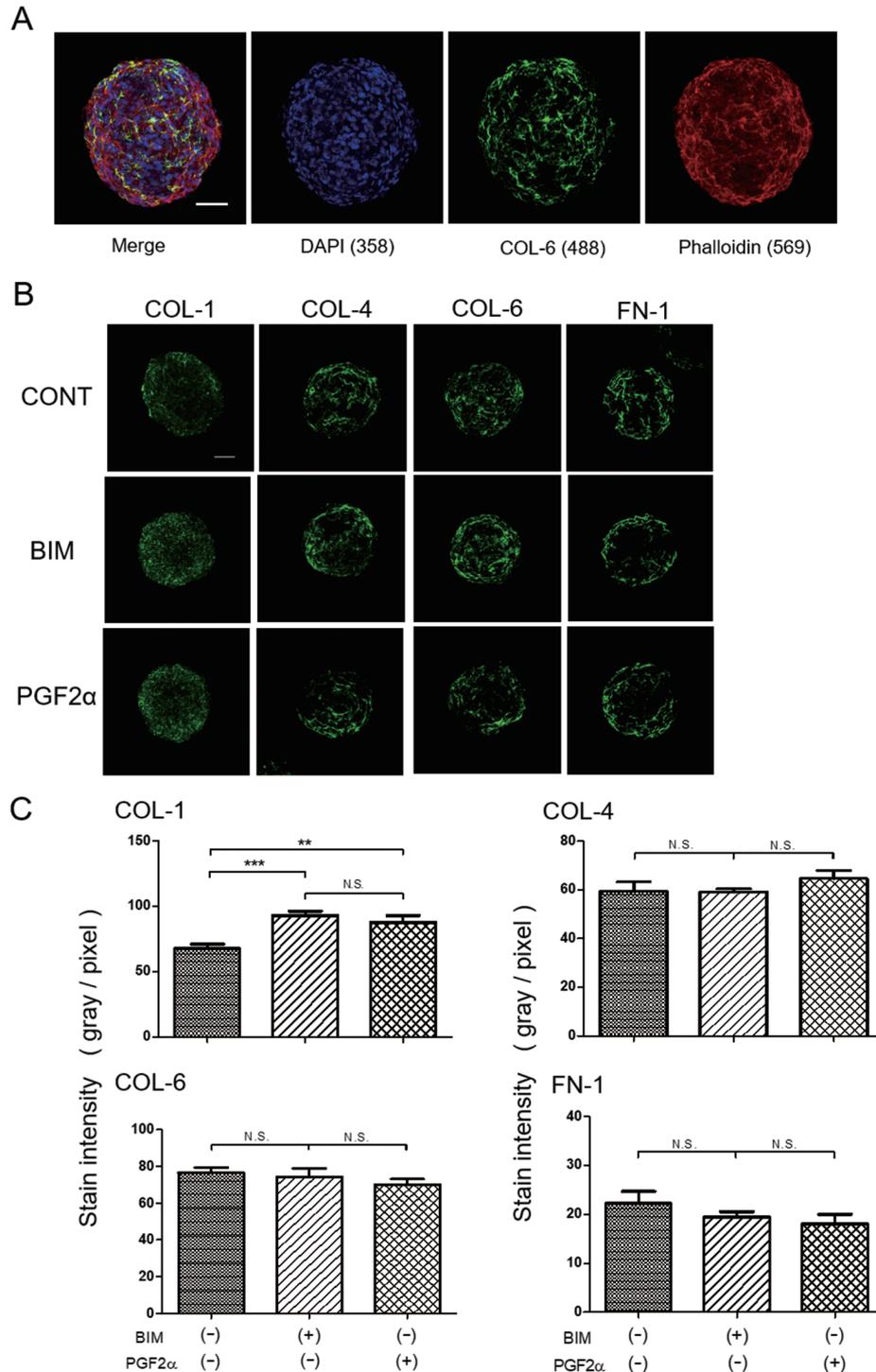
Figure 2. PG 剤の有無による HOFs オルガノイドの形態変化の推移

A) Day-1 及び Day-12 における各群の HOFs オルガノイドの写真. Scare bar : 100  $\mu\text{m}$ . B) Day-12 までの各群の HOFs オルガノイドの最大断面積 ( $\mu\text{m}^2$ ) 変化. C) Day-1 および Day-12 におけるオルガノイドの最大断面積 ( $\mu\text{m}^2$ ) 比較. Day-1 には有意差が認められなかったが, Day-12 では CONT 群に比べて PGs 群 (BIM 群, PGF2 $\alpha$  群) において有意にサイズ縮小が認められた. \*\*\*  $P < 0.005$ , N.S., not significant (ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test).

ノイドに成熟安定化した。CONT 群に比べ、BIM または PGF2  $\alpha$  を加えた群の HOFs 培養オルガノイドの最大径は 3-4 日目より有意に小さくなったものの、両薬剤間で有意差は見られなかった。4 検体とも同様の結果を得たため、Figure 3 では代表症例として 50

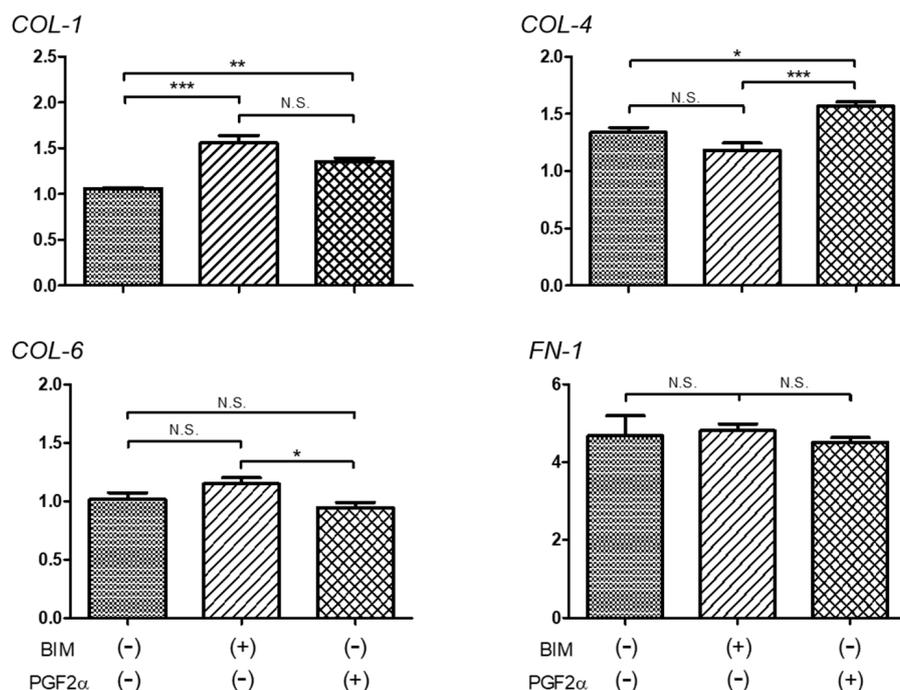
歳代男性における結果を提示した。

次に各群での ECM の変化を検討するために Day-12 で回収した HOFs オルガノイドを用いて HOFs の主要な ECM である Collagen type I (COL-1), type IV (COL-4), type VI (COL-6) および Fibronectin-1



**Figure 3.** 主要な ECM (COL-1, COL-4, COL-6, 及び FN-1) 抗体を用いた HOFs オルガノイドの免疫染色。

A) 多重染色の confocal image. CONT 群 COL-6 の一例。培養オルガノイドの細胞の状態を確認する目的で行い、内部壊死がないことを確認している。Scare bar : 100  $\mu$ m. B) confocal image. Scare bar : 100  $\mu$ m. C) 各 ECM 抗体による染色輝度の定量解析. \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.005$ , N.S., not significant (ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test).



**Figure 4.** HOFs オルガノイド (Day-12) における主な ECM (COL-1, COL-4, COL-6, 及び FN-1) の qPCR 遺伝子発現。PG 剤 (BIM 及び PGF2 $\alpha$ ) の付加により, 主に COL-1 の発現増強が認められた。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.005$ , N.S., not significant (ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test).

(FN-1) の発現を, 検体ごとの区別はせずに, それぞれ特異抗体を用いた免疫染色および qPCR 遺伝子発現定量解析を行った。Figure 3 および 4 に示すように COL-1 の発現は, CONT 群に比較して BIM 群及び PGF2 $\alpha$  群で有意に増加した。COL-4 は qPCR にて PGF2 $\alpha$  群において有意に増加したもののタンパク発現に変化はなく, COL-6 および FN-1 においては, 各群の有意な変化は見られなかった。従って PGs による HOFs 培養オルガノイドのサイズの変化は主要 ECM である COL-1 の発現増加による可能性が示唆された。

#### 4 考察

従来の 2 次元培養系を用いた検討では, DUES は眼窩内脂肪組織の萎縮性変化であり, その機序として PGs が脂肪分化誘導のマスター遺伝子である PPAR $\gamma$  の発現を抑制することで, 前脂肪細胞ならびに成熟脂肪細胞における脂肪分化誘導の抑制が考えられてきた<sup>16, 17)</sup>。また 3T3-L1 細胞を用いた検討で FP 受容体をノックアウトしたマウスの細胞を用いると, PGs による脂肪分化誘導は抑制されなかったことから, DUES は FP 受容体を介する機序により引き起こされることが示唆されている<sup>16)</sup>。実際に我々のグループも 3T3-L1 細胞を用いた 3 次元培養系において PGs が脂肪分化誘導により形成されるオルガノイドのサイズの抑制がみられ, 回収したオルガノイドの qPCR において,

Ppar $\gamma$  の発現抑制がみられることを見出している (他誌投稿中)。またヒト眼窩部脂肪細胞を用いた 3 次元培養においては, 3T3-L1 細胞を用いた場合, 培養期間 7 日程度で十分な脂肪分化誘導が見られるのに対して, ヒト眼窩部脂肪細胞は脂肪分化誘導しづらいため, 培養期間を 12 日間に延長することで十分な脂肪滴を伴う成熟脂肪細胞を得ることができることが報告されている<sup>19)</sup>。

本研究において, ヒト眼窩部より得られた脂肪組織より 3 次元培養した HOFs オルガノイドを作成し, 脂肪分化誘導をしないオルガノイドに対して PGs の影響を検討した結果, HOFs オルガノイドのサイズの減少と COL-1 の発現増加という新知見を得た。3 次元培養においては個々の細胞の自己組織化を利用し, 細胞-培養基材間より細胞間接着が強くなる環境を整えることで細胞塊 (spheroid) の構築を促進する。同時に ECM の産生を含めた細胞間接着等の影響により, 培養細胞が成熟した 3 次元構造に変化することでサイズが縮小変化することが報告されている<sup>21)</sup>。今回得られた結果は, DUES の病態には脂肪分化誘導の抑制以外に脂肪細胞を取り巻く 3 次元的な ECM ネットワークの環境が変化することが関与する可能性を強く示唆するものである。

一般的に ECM は立体的な生体組織において, その構造の形成や維持, 細胞間のシグナル伝達や機能制御を含め, 非常に大切な役割を担っている<sup>22)</sup>。Collagen は

細胞-細胞間ないし細胞-ECM間において三重らせん構造を形成しているタンパクで、関連するものを含め30を超える分子種が存在する<sup>23)</sup>。中でも最も豊富に存在するものはCOL-1である<sup>24)</sup>。COL-4は基底膜に存在するCollagenとして知られている<sup>25, 26)</sup>。COL-6はCOL-1同士を架橋するCollagenとして存在し、主に分化した細胞においてその生存や機能制御を司る役割のほか、脂肪分化誘導を含めた多くの細胞の分化誘導を制御する役割も担っていると考えられている<sup>23)</sup>。FN-1は細胞形状や組織形状を構成するECMで、COL-1に隣接して存在している<sup>27)</sup>。ECMの発現や機能は2次元環境下と3次元環境下では大きく異なることが報告されており、より生体に近い形での分子病態を評価できる3次元培養系は、DUESの評価により適したモデルと考えられる<sup>22)</sup>。

今回得られたHOFsオルガノイドのECM遺伝子発現において、COL-6およびFN-1についてはPGsの影響はほとんど見られなかった。しかしHOFsオルガノイドを取り巻くこれらのECMの3次元ネットワークの中で主要なECMであるCOL-1の発現がPGsにより有意に増加したことは、COL-1がこれらのHOFsオルガノイドの3次元構造環境を大きく変化させる可能性を示唆する。実際にECMの発現と組織のサイズの関連において、COL-1の発現が多いと組織サイズは小さくなることやブレオマイシン誘発肺線維症病態モデルにおいて、PGF2 $\alpha$ により、COL-1の発現が増強に伴い肺組織の線維化が引き起こされる機序が報告されている<sup>28-32)</sup>。本研究は培養液中の薬剤の効果によりオルガノイドの縮小の度合いを評価したもので、ヒト眼窩部脂肪組織においてPGsによりもたらされるCOL-1の有意な発現増強がDUESの病態学的機序の一つとなりうることは容易に想像でき、またこの機序は新たなDUESに対する予防ならびに治療戦略になりうる可能性が示唆される。

結論として本研究において、新しい3次元培養系を用いることで、ヒト眼窩部脂肪組織の線維芽細胞に対するプロスタグランジン関連薬の影響を検討し、DUESの分子病態に関する新たな知見を得ると同時に、DUESの病態モデルとして3次元培養系が有効であることが改めて確認された。

本研究に関し、開示すべき利益相反状態は存在しない。

## 5 文献

1. Liton PB, Luna C, Challa P, Epstein DL, Gonzalez P: Genome-wide expression profile of human trabecular meshwork cultured cells, nonglaucomatous and primary open angle glaucoma tissue. *Mol Vis* 2006; 12:774-790
2. Smid SD: Role of prostaglandins and specific place in therapy of bimatoprost in the treatment of elevated intraocular pressure and ocular hypertension: A closer look at the agonist properties of bimatoprost and the prostamides. *Clin Ophthalmol* 2009; 3: 663-670
3. Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal-tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. *Am J Ophthalmol* 1998; 126: 487-497
4. Mackenzie P, Cioffi G: How does lowering of intraocular pressure protect the optic nerve? *Surv Ophthalmol* 2008; 53 Suppl1: S39-43
5. Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, Keltner JL, Miller JP, Parrish RK, 2nd, Wilson MR, Gordon MO: The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2002; 120: 701-713;discussion 829-730
6. Cheng JW, Cai JP, Wei RL: Meta-analysis of medical intervention for normal tension glaucoma. *Ophthalmology* 2009; 116: 1243-1249
7. Alm A: Latanoprost in the treatment of glaucoma. *Clin Ophthalmol* 2014; 8: 1967-1985
8. European Glaucoma Society Terminology and Guidelines for Glaucoma, 4th Edition - Chapter 3: Treatment principles and options Supported by the EGS Foundation: Part 1: Foreword; Introduction; Glossary; Chapter 3 Treatment principles and options. *Br J Ophthalmol* 2017; 101: 130-195
9. Peplinski LS, Albani Smith K: Deepening of lid sulcus from topical bimatoprost therapy. *Optom Vis Sci* 2004; 81: 574-577
10. Alm A, Grierson I, Shields MB: Side effects associated with prostaglandin analog therapy. *Surv Ophthalmol* 2008; 53 Suppl1: S93-105
11. Shah M, Lee G, Lefebvre DR, Kronberg B, Loomis S, Brauner SC, Turalba A, Rhee DJ, Freitag SK, Pasquale LR: A cross-sectional survey of the association between bilateral topical prostaglandin analogue use and ocular adnexal features. *PLoS One* 2013; 8: e61638 doi: 10.1371/journal.pone.0061638
12. Aihara M, Shirato S, Sakata R: Incidence of deepening of the upper eyelid sulcus after switching from latanoprost to bimatoprost. *Jpn J Ophthalmol* 2011; 55: 600-604
13. Sakata R, Shirato S, Miyata K, Aihara M: Incidence of deepening of the upper eyelid sulcus in prostaglandin-associated periorbitopathy with a latanoprost ophthalmic solution. *Eye (Lond)* 2014; 28: 1446-1451
14. Inoue K, Shiokawa M, Wakakura M, Tomita G: Deepening of the upper eyelid sulcus caused by 5 types of prostaglandin analogs. *J Glaucoma* 2013; 22: 626-631
15. Jayaprakasam A, Ghazi-Nouri S: Periorbital fat atrophy - an unfamiliar side effect of prostaglandin analogues. *Orbit* 2010; 29: 357-359
16. Taketani Y, Yamagishi R, Fujishiro T, Igarashi M, Sakata R, Aihara M: Activation of the prostanoid FP receptor inhibits adipogenesis leading to deepening of the upper eyelid sulcus in prostaglandin-associated periorbitopathy. *Invest Ophthalmol*

- Vis Sci 2014; 55: 1269-1276
17. Choi HY, Lee JE, Lee JW, Park HJ, Lee JE, Jung JH: In vitro study of antiadipogenic profile of latanoprost, travoprost, bimatoprost, and tafluprost in human orbital preadipocytes. *J Ocul Pharmacol Ther* 2012; 28: 146-152
  18. Huh D, Hamilton GA, Ingber DE: From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol* 2011; 21: 745-754
  19. Hikage F, Atkins S, Kahana A, Smith TJ, Chun TH: HIF2A-LOX Pathway Promotes Fibrotic Tissue Remodeling in Thyroid-Associated Orbitopathy. *Endocrinology* 2019; 160: 20-35
  20. Mori S, Kiuchi S, Ouchi A, Hase T, Murase T: Characteristic expression of extracellular matrix in subcutaneous adipose tissue development and adipogenesis; comparison with visceral adipose tissue. *Int J Biol Sci* 2014; 10: 825-833
  21. Langan LM, Owen SF, Trznadel M, Dodd NJF, Jackson SK, Purcell WM, Jha AN: Spheroid Size Does not Impact Metabolism of the beta-blocker Propranolol in 3D Intestinal Fish Model. *Front Pharmacol* 2018; 9: 947
  22. Chun TH, Hotary KB, Sabeh F, Saltiel AR, Allen ED, Weiss SJ: A pericellular collagenase directs the 3-dimensional development of white adipose tissue. *Cell* 2006; 125: 577-591
  23. Chun TH: Peri-adipocyte ECM remodeling in obesity and adipose tissue fibrosis. *Adipocyte* 2012; 1: 89-95
  24. Varma S, Orgel JP, Schieber JD: Nanomechanics of Type I Collagen. *Biophys J* 2016; 111: 50-56
  25. Aratani Y, Kitagawa Y: Enhanced synthesis and secretion of type IV collagen and entactin during adipose conversion of 3T3-L1 cells and production of unorthodox laminin complex. *J Biol Chem* 1988; 263: 16163-16169
  26. Mak KM, Mei R: Basement Membrane Type IV Collagen and Laminin: An Overview of Their Biology and Value as Fibrosis Biomarkers of Liver Disease. *Anat Rec (Hoboken)* 2017; 300: 1371-1390
  27. Kadler KE, Hill A, Canty-Laird EG: Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20: 495-501
  28. Huang SK, Peters-Golden M: Eicosanoid lipid mediators in fibrotic lung diseases: ready for prime time? *Chest* 2008; 133: 1442-1450
  29. Olman MA: Beyond TGF-beta: a prostaglandin promotes fibrosis. *Nat Med* 2009; 15: 1360-1361
  30. Oga T, Matsuoka T, Yao C, Nonomura K, Kitaoka S, Sakata D, Kita Y, Tanizawa K, Taguchi Y, Chin K, Mishima M, Shimizu T, Narumiya S: Prostaglandin F(2alpha) receptor signaling facilitates bleomycin-induced pulmonary fibrosis independently of transforming growth factor-beta. *Nat Med* 2009; 15: 1426-1430
  31. Aihara K, Handa T, Oga T, Watanabe K, Tanizawa K, Ikezoe K, Taguchi Y, Sato H, Chin K, Nagai S, Narumiya S, Wells AU, Mishima M: Clinical relevance of plasma prostaglandin F2alpha metabolite concentrations in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* 2013; 8: e66017. doi: 10.1371/journal.pone.0066017
  32. Lijnen HR, Maquoi E, Demeulemeester D, Van Hoef B, Collen D: Modulation of fibrinolytic and gelatinolytic activity during adipose tissue development in a mouse model of nutritionally induced obesity. *Thromb Haemost* 2002; 88: 345-353

---

別刷請求先：伊藤 格

〒060-8543 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部眼科学講座

TEL : 011-611-2111 (内線 34350)

FAX : 011-613-6575

E-mail : kaku.itoh@sapmed.ac.jp