

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11432

研究課題名(和文) 涙液中ガレクチン3を用いた新規ドライアイマーカーの探索

研究課題名(英文) The reasearch of tear galectin-3 as new marker for dry eye

研究代表者

内野 裕一 (Uchino, Yuichi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：80365337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ドライアイ患者と正常者の涙液を採取し、涙液中ガレクチン3濃度を比較したところ、ドライアイ患者群で有意に増加していることが判明した。ガレクチン3は眼表面バリアを構築する上で重要なタンパクであり、ドライアイではこのバリアが破綻していることが推測された。またドライアイ重症度と涙液中ガレクチン3濃度が相関すること、また通常のカレクチン3がタンパク分解酵素などにより小さく切断された切断型ガレクチン3も、重症なドライアイに多く認められた。このことからドライアイの重症度を評価する上でガレクチン3が新しい評価マーカーとしても有用な可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

涙液中ガレクチン3濃度はドライアイの重症度と有意に相関すること、非侵襲的に眼表面のバリア破綻を評価することができること、また眼表面における炎症にともなうタンパク分解酵素の影響などにより、切断型ガレクチン3がドライアイ重症例に多く認められることが判明した。今後は涙液中ガレクチン3を簡易的に測定する方法を開発することで、ドライアイ重症度を簡易に評価することが可能となるだけでなく、切断型ガレクチン3陽性率をクロマトグラフィなどを用いて判定する技術が開発されれば、ドライアイ重症度判定キットとしてドライアイ専門家の手によらず、医療スタッフでもドライアイ重症度を判断できるようになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We found that galectin-3 in the tears of patients with dry eye disease was significantly correlated with ophthalmic evaluation factors, especially the lissamine green staining score, which is used to evaluate the disruption of ocular surface glycocalyx. Cleaved galectin-3 was also found to have a higher detection rate in more severe cases of dry eye disease. These data suggested that galectin-3 and cleaved galectin-3 may have the possibility of being novel ocular surface biomarkers to evaluate the severity of ocular surface barrier disruption.

研究分野：角膜疾患 ドライアイ 眼表面疾患

キーワード：ドライアイ ガレクチン グライコカリックス シェーグレン症候群

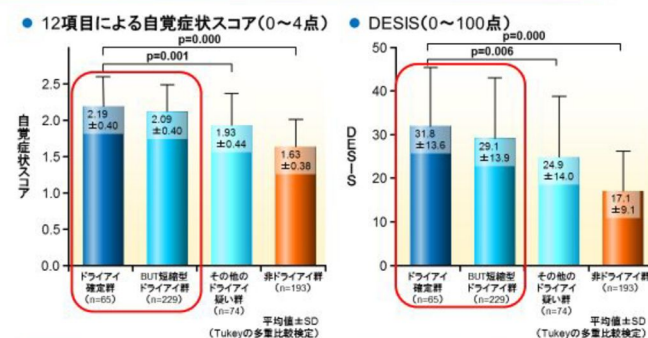
1. 研究開始当初の背景

ドライアイは日本国内推定患者数が 1200 万人以上といわれ、多くのドライアイ患者は強い眼乾燥感や疲労感に常に悩まされており、慢性的な自覚症状から労働生産性の低下 (Uchino et al. AJO 2014) や QOL 低下が社会問題となっている (Schamberg et al. AJO 2007)。

実際に申請者が所属する研究チームがドライアイ臨床データと自覚症状スコア (DESIS も含む) を解析したところ、日本ドライアイ診断基準で分類したドライアイ確定群、ドライアイ疑い群、非ドライアイ群のうち、ドライアイ疑い群であるものの眼表面の水濡れ性が低下して涙液層破綻時間 (Tear Break Up Time : BUT) が短い群 (BUT 短縮型ドライアイ群) では、より重症とみなされる眼表面の上皮欠損を多く伴うドライアイ確定群と同程度の自覚症状を呈することが判明した (図 1) (Yokoi et al. AJO 2015)。

つまりドライアイ自覚症状の多くは涙液の眼表面における水濡れ性低下が原因の一つと考えられ、水分保持に必須である眼表面膜型ムチンの量的質的变化を捉えることが重要とされてきた (Gipson et al. Exp Eye Res2004)。

図1 ドライアイ診断と自覚症状スコアとの関係



BUT短縮型ドライアイ群の自覚症状の強度はドライアイ確定群に匹敵する

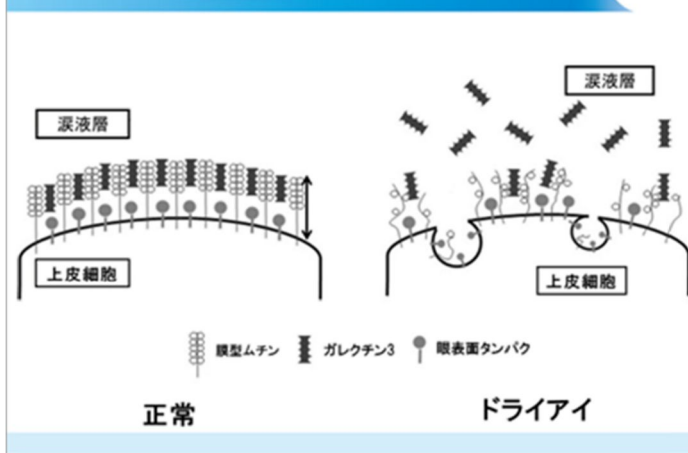
Yokoi N, et al. Am J Ophthalmol. 159(4): 748-754, 2015

膜型ムチンの変化は切除採取した眼表面組織の染色所見から検出可能だが、外来で角結膜のサンプルを集めて評価するのは現実的ではない。そこで我々は、眼表面にて膜型ムチンと結合しバリア機能に寄与するガレクチン3というタンパク質に着目して研究してきた。

ガレクチン 3 は角結膜上皮細胞が産生しているものの、分泌された直後に膜型ムチンの糖鎖に結合してグリコカリックスバリアを形成するため、正常眼の涙液中では認められない。一方、ドライアイでは眼表面膜型ムチン発現量が減少し、角結膜上皮細胞が産生しているガレクチン 3 を膜型ムチンが十分保持できなくなる結果、グリコカリックスバリアが破綻するため、ガレクチン 3 が涙液中に認められるようになる (図 2) (Uchino et al. AJO 2015)。

本研究では、涙液採取という非侵襲的な検査法で測定可能である、「涙液中ガレクチン 3 濃度のモニタリング」が眼表面膜型ムチンの量的質的变化をとらえ、自覚的もしくは他覚的ドライアイ重症度を評価できる新規マーカーとなりうる可能性について探索する。

図2 ドライアイによるグリコカリックスバリアの破綻



2. 研究の目的

ドライアイ患者における涙液中ガレクチン 3 濃度を測定し、ドライアイとの涙液中ガレクチン 3 濃度の関連性をより明らかにする探索的試験であり、涙液中ガレクチン 3 とドライアイ重症度の関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

対象となる GVHD やシェーグレン症候群のドライアイ患者群、およびコントロールとなる非ドライアイ患者群 (白内障など眼表面が概ね正常と思われる患者) から涙液や結膜サンプル採取や自覚症状スコアに関する質問票 (OSDI) の配布回収に関する研究許可を得た。次に当院ドライアイ/角膜外来にて実際に涙液を無麻酔下で生理食塩水とともに回収、眼表

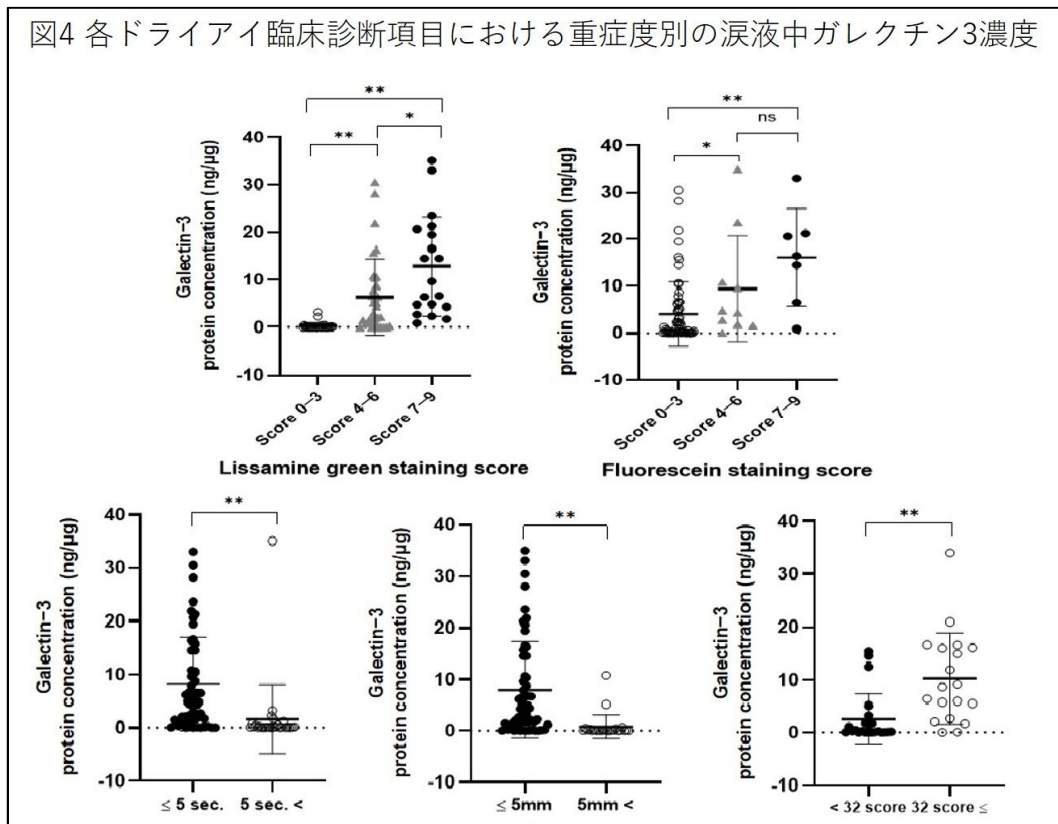
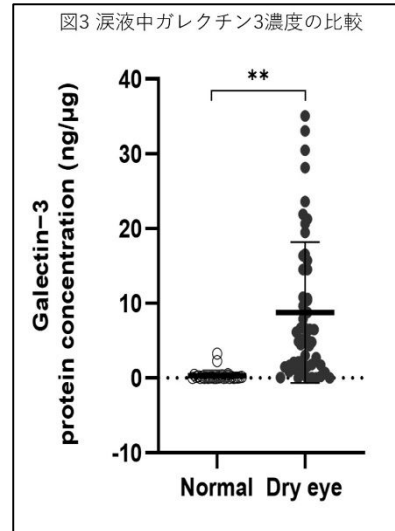
染色による眼表面障害の重症度評価と質問票回収を行った。回収した涙液からまず BCA 法による涙液中タンパク濃度測定を行った。次に涙液中から全長径のガレクチン 3 や涙液中プロテアーゼにより cleaved されたと考えられる切断型ガレクチン 3(Gal-3C)を Western Blotting 法で定量解析した。各臨床所見項目である眼表面上皮障害 (角膜フルオレセイン染色スコア/結膜リサミン染色スコア)、涙液分泌量 (シルマー検査 1 法)、自覚症状スコアごとに重症度をそれぞれ設定してグループ分けした。各グループ間における涙液中ガレクチン 3 濃度や、切断型ガレクチン 3 を認めた症例比率を算定した。また眼表面染色スコアや自覚症状スコアなどの定量化した臨床的ドライアイ重症度と涙液中ガレクチン 3 濃度との関連性を統計的に解析した。

#### 4. 研究成果

倫理委員会にて審査を受け承認されたプロトコールに従い、慶應義塾大学病院にてドライアイ患者 28 名 (男性 2 名 女性 26 名) (以下ドライアイ群) およびコントロール対象者 14 名 (男性 3 名 女性 11 名) (以下正常群) から涙液サンプル回収を行い、臨床的所見項目の確認とドライアイ関連自覚症状の質問票の回収を行った。

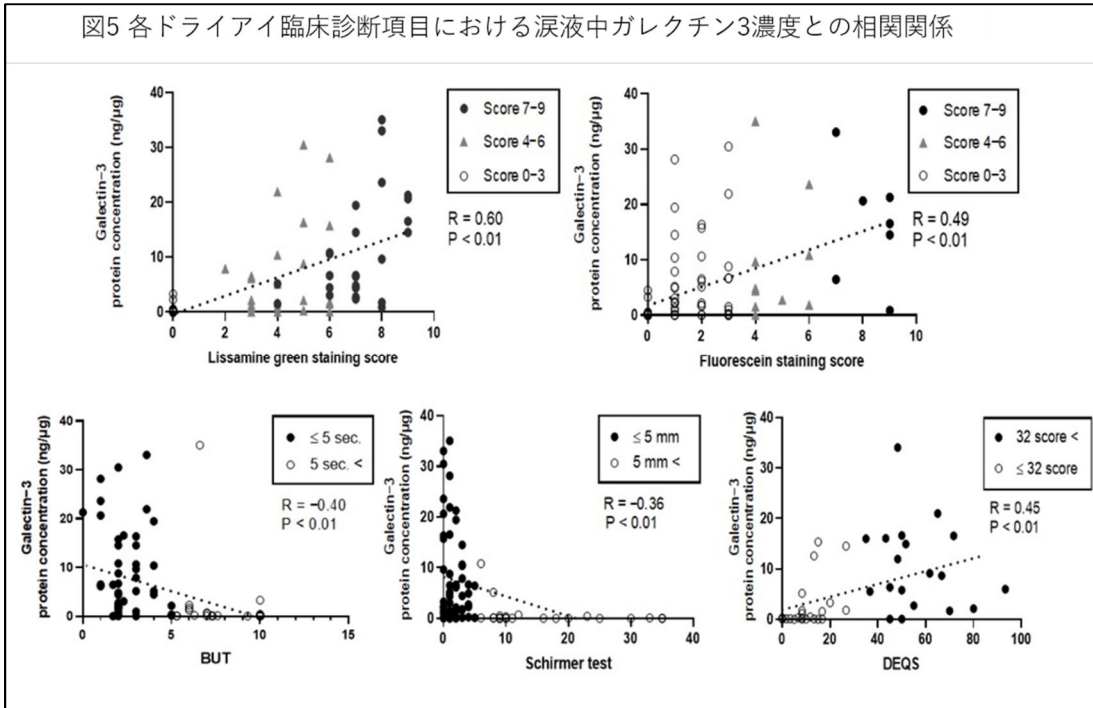
まず正常群とドライアイ群で涙液中ガレクチン 3 濃度 (涙液中タンパク濃度で補正済) を比較したところ、正常群で  $0.03 \pm 0.07$  ng/ $\mu$ g、ドライアイ群で  $0.88 \pm 0.93$  ng/ $\mu$ g 有意に涙液中ガレクチン 3 濃度が上昇していることが判明した (図 3)。

次に臨床所見ごとに重症度分類を行い、各グループ別にガレクチン 3 濃度を比較検討した。結膜上皮障害を判定したリサミングリーン染色スコア (9 点満点で軽症: 0-3 点、中等度: 4-6 点、重症: 7-9 点)、角膜上皮障害を判定したフルオレセイン染色スコア (9 点満点で軽症: 0-3 点、中等度: 4-6 点、重症: 7-9 点)、眼表面涙液層の安定をみた涙液層破綻時間 (Tear Break Up Time: BUT 5 秒以下で涙液層は不安定化と定義)、涙液分泌量 (シルマー-1 法: 5mm 以下で有意に涙液分泌量は少ないと定義)、ドライアイ自覚症状質問票 (DEQS: 32 点以上で有意にドライアイ自覚症状が強いとされる) における涙液中ガレクチン 3 濃度を比較したところ、各ドライアイ臨床診断項目でドライアイ所見が重症なほど涙液中ガレクチン 3 濃度が有意に高いことが判明した (図 4)。

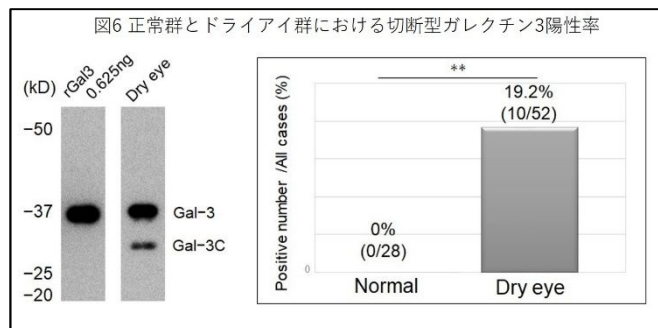


また各ドライアイ臨床項目の数値とガレクチン 3 濃度の相関関係を確認したところ、すべての項目で、有意に相関していることも判明した (図 5)。

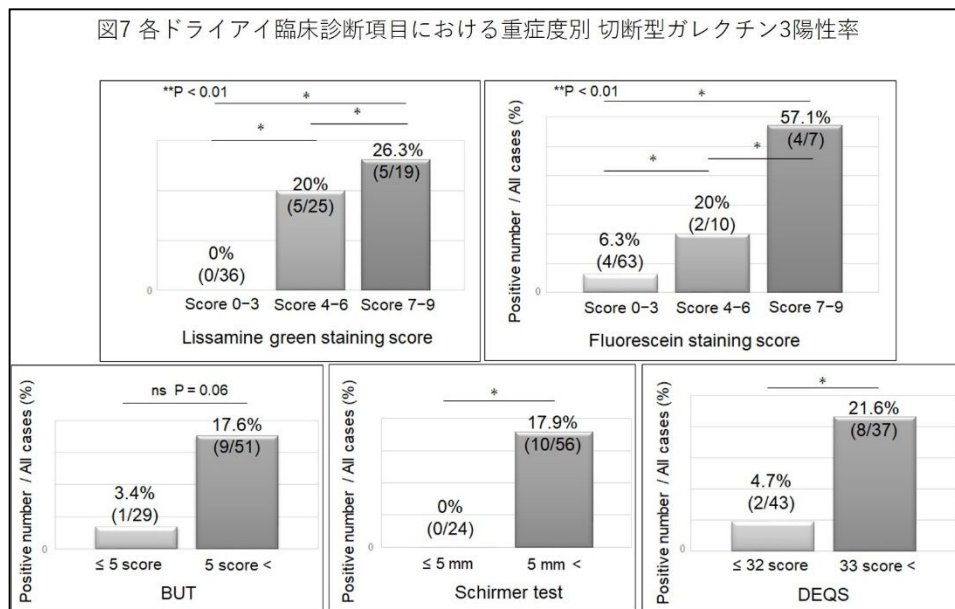
図5 各ドライアイ臨床診断項目における涙液中ガレクチン3濃度との相関関係



また正常群およびドライアイ群における切断型ガレクチン3の陽性率を確認したところ、正常群では切断型ガレクチン3を認めないものの、ドライアイ群では19.2% (10眼/52眼) に認めた (図6)。



切断型ガレクチン3の出現がドライアイの重症度に相関するか確認するために、ドライアイ臨床診断項目ごとに重症度分類をおこない比較したところ、臨床的にドライアイ重症度が高いほど切断型ガレクチン3を認める頻度が高くなることが分かった (図7)。



以上の結果から、涙液中ガレクチン3濃度はドライアイの重症度と有意に相関すること、非侵襲的に眼表面のバリア破綻を評価することができること、また眼表面における炎症とともにタンパク分解酵素の影響などにより、切断型ガレクチン3がドライアイ重症例に多く認められ

ることも分かった。

本報告はすでに以下の論文として発表されている。

Miki Hata-Mizuno, Yuichi Uchino, Miki Uchino, Shigeto Shimmura, Yoko Ogawa, Kazuo Tsubota, Kazuno Negishi. "Analysis of the Association between Galectin-3 Concentration in Tears and the Severity of Dry Eye Disease: A Case-Control Study." J Clin Med. 11(1):66. 2021

今後は涙液中ガレクチン 3 を簡易的に測定する方法などを開発することで、臨床的重症度を評価することが可能となるだけでなく、切断型ガレクチン 3 陽性率をクロマトグラフィなどを用いて判定する技術が開発されれば、ドライアイ重症判定キットとして臨床現場でも専門家の手によらず、コメディカルでも判断することができるようになる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hata-Mizuno Miki, Uchino Yuichi, Uchino Miki, Shimmura Shigeto, Ogawa Yoko, Tsubota Kazuo, Negishi Kazuno	4. 巻 11
2. 論文標題 Analysis of the Association between Galectin-3 Concentration in Tears and the Severity of Dry Eye Disease: A Case-Control Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 66 ~ 66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm11010066	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Miki Mizuno, Yuichi Uchino, Miki Uchino, Toshio Taira, Shigeto Shimmura, Yoko Ogawa, and Kazuo Tsubota
2. 発表標題 Analysis of EMMPRIN and MMP in tears of dry eye patients.
3. 学会等名 Boston Cornea Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miki Mizuno, Yuichi Uchino, Miki Uchino, Shigeto Shimmura, Yoko Ogawa, and Kazuo Tsubota
2. 発表標題 Alteration of Galectin-3 in tears of patients with severity of dry eye.
3. 学会等名 Asia Dry Eye Summit 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------