

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18855

研究課題名(和文)自己免疫疾患における眼表面の血管異常の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of pathogenesis in vascular abnormality of ocular surface in autoimmune diseases and development of new therapeutic intervention

研究代表者

林 勇海 (HAYASHI, Isami)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：00837445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性移植片対宿主病(cGVHD：chronic graft-versus-host disease)モデルマウスにおいて血管やマイボーム腺の病理組織学的検討を行い、血管拡張、蛇行、増生のような形態異常を見出し、研究成果を報告した。
またcGVHDモデルマウスの涙腺組織切片においてエクソソーム関連抗体を用いた免疫染色を行い、血管内皮などへの局在を確認した。さらにcGVHDモデルマウスの血清から専用器機を用いてエクソソームを抽出後、そのサイズや濃度を分析し、cGVHD群では対照群と比較して平均粒子径が有意に大きいことを見出した。
以上の成果をもとに本疾患の新たな治療標的を探索中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患および慢性GVHDの症例には高度なマイボーム腺機能不全やドライアイが高頻度に合併し、眼瞼に多彩な血管異常を伴う場合が多く認められる。本研究ではcGVHDの病態における血管異常の解明のため、モデルマウスを使用した病理組織学的な検討を行なった。
またcGVHDに関連した眼表面の線維化には血液由来の線維芽細胞が関与することが知られ、この細胞はエクソソーム分泌により血管新生を促進することから、エクソソームが病態形成に重要な役割を果たしている可能性に着想し研究を実施した。根治的な標準治療が存在しない本疾患に対して、エクソソームが新たな治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We performed histopathological examination of blood vessels and meibomian glands in mouse models of chronic graft-versus-host disease (cGVHD) after hematopoietic stem cell transplantation, and revealed morphological abnormalities such as vasodilatation, tortuosity, and hyperplasia. We reported our research results in an academic journal (Yang F, Hayashi I, et al Ocul Surf. 2022).

In addition, we performed immunostaining with exosome-related antibodies on lacrimal gland tissue sections of cGVHD model mice, and found that exosomes localize to the vascular endothelium. Furthermore, after extracting exosomes from the serum of cGVHD model mice using an automatic fraction collector, we analyzed their size and concentration, and found that the mean particle size was significantly larger in the cGVHD group than in the control group.
Based on the above results, we are searching for new therapeutic targets for this disease.

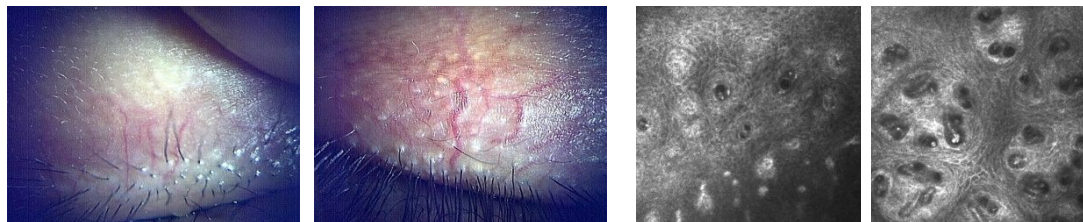
研究分野：眼科学

キーワード：慢性移植片対宿主病 自己免疫疾患 眼表面血管異常 エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患および GVHD によるドライアイ症例は高度な眼表面障害を生じ、時に失明に至る疾患として対策が重要である。申請者は診療上、自己免疫疾患および GVHD の症例には高度なマイボーム腺機能不全が高頻度に合併し、眼瞼の血管走行異常を伴う場合が高頻度に認められることに気づき本疾患の病態における血管の果たす役割について着目した(下図)。



生体顕微鏡写真上眼瞼所見：
左図 GVHD (-)，右図 GVHD 症例

共焦点レーザー生体顕微鏡上眼瞼所見：
左図 GVHD (-)，右図 GVHD 症例

自己免疫疾患および GVHD における眼瞼の血管の形態異常は多彩であり、これらの病的変化により通常のマイボーム腺機能不全と異なり免疫性ドライアイに特徴的な変化をきたし、高度なマイボーム腺機能不全およびドライアイをきたすのではないかと着想するに至った。臨床での GVHD 症例の診療所見と共焦点レーザー生体顕微鏡検査より以下の所見を得ている。

	non-GVHD		GVHD		p value
	Mean	SD	Mean	SD	
ELM vessels-Avg	16.23	5.603	24.59	7.006	0.002 *
血管吻合 -平均	3.98	2.129	6.14	2.604	0.029 *
血管径-平均	9.68	2.225	14.00	3.495	0.002 *
線維化面積/pixel	7716.37	3529.915	10815.44	4611.510	0.064
X25 Avg.diameter	6.57	2.926	9.37	2.266	0.014 *
血管吻合分岐点	4.13	3.167	5.18	2.219	0.367
蛇行の程度 (Grade) -平均	1.94	0.701	2.37	0.765	0.223
蛇行の合計数-平均	10.65	4.754	14.14	4.594	0.083 *

*有意差あり

また、これまでに GVHD 関連眼表面の線維化には血液由来ファイibroサイトの関与があることを見出している (Ogawa Y, eLife 2016)。ファイibroサイトはエクソソーム分泌により、血管新生促進することから、この血液由来ファイibroサイトの放出するエクソソームが病態形成に重要な役割を果たす可能性を着想した。

これまでに自己免疫疾患および GVHD における眼瞼をはじめとした眼表面の血管の変化について、臨床と基礎の両面から詳細かつ包括的に報告された論文は国内外で認められない。また基礎研究においては本疾患における眼表面の免疫担当細胞と血管内皮との相互作用において近年、血管新生にかかわるとして注目されているエクソソームとの関わりを調べた報告はなく、この点に注目して病態解明へのアプローチの手がかりとする。また本研究での病態解明は未だ難治性疾患である自己免疫疾患および GVHD の全身標的臓器である肺、肝臓、小腸等の慢性炎症に至る病態プロセスの解明をすすめていくうえで有用であり、多くの疾患に対する新規治療薬の開発に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では cGVHD の病態における血管の果たす役割について着目し、眼表面の血管病変という観点から臨床と基礎の両面にアプローチし、病態の解明と新規治療法の開発に繋げることを目的とする。

自己免疫疾患および GVHD 症例における共焦点レーザー生体顕微鏡を用いた血管の形態学的異常

の評価に加えて、ヒト GVHD をよく反映するマウス GVHD モデルによる基礎研究の観点から病態解明に取り組み、以下の点を追究する。

- (1)自己免疫疾患および GVHD における眼瞼血管異常の有無について対照との比較検討
 - (2)初期病変にかかわると考えられる、血管内皮の異常に至る病態機序と分子基盤の解明
 - (3)病的変化を来す血管内皮に発現する分子の中和抗体による病態抑制および新規治療法開発
- また近年、様々な生理機能や病態発症との関連が示唆されている細胞外小胞(エクソソーム)と GVHD の血管病変部の関与を検証する。

3 . 研究の方法

確立されたマウスモデル (Zhang, J Immunol, 2002) を用いて、自己免疫疾患様病態を示す GVHD モデルを作成する。これまでに申請者が所属する研究室から GVHD マウスモデルで、Vascular Adhesion Protein- 1(VAP-1)の発現が涙腺、その他の標的臓器での血管内皮に局在し、各標的臓器での遺伝子と蛋白レベルで VAP-1 の発現が比較対照群に比して上昇していることを見出している (Mukai S, Ogawa Y, et al. FASEB J 2018)。これまでに約 70 回のマウス骨髄移植を行い、安定した成果を生み出している (Ogawa Y, eLife 2016, 2017, Mukai S, FASEB J, 2018, Shimizu E, PLoS One, 2018)。

同 GVHD マウスモデルを用いて、眼瞼、涙腺、結膜の毛細血管の病態変化を病理組織学的検討によって移植前、初期病変から経時的に検証し、GVHD における血管内皮の異常に至る病態機序と分子基盤を解明する。また同モデルマウスの血清から専用器機を用いてエクソソームを抽出し、そのサイズや濃度についてコントロール群との比較検討を行う。

4 . 研究成果

本研究期間では、cGVHD モデルマウスにおける血管やマイボーム腺の病理組織学的検討を行い、血管拡張、蛇行、増生のような形態異常を見出し、学術研究雑誌 The Ocular Surface に研究成果を報告した (Yang F, Hayashi I, et al. Ocul Surf. 2022)。

また cGVHD モデルマウスの涙腺組織切片においてエクソソームの表面マーカーとなる抗体を用いた免疫染色を行い、血管内皮などへの発現が示唆された。

最終年度では cGVHD モデルマウス 18 匹の血清から専用器機を用いてエクソソームを抽出、そのサイズや濃度についてコントロール群と比較検討し、cGVHD 群ではエクソソームの平均粒子径が有意に大きいことを見出した。

以上の成果をもとに本疾患の新たな治療標的を探索中である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yang Fan, Hayashi Isami, Sato Shinri, Saijo-Ban Yumiko, Yamane Mio, Fukui Masaki, Shimizu Eisuke, He Jingliang, Shibata Shinsuke, Mukai Shin, Asai Kazuki, Ogawa Mamoru, Lan Yuqing, Zeng Qingyan, Hirakata Akito, Tsubota Kazuo, Ogawa Yoko	4. 巻 26
2. 論文標題 Eyelid blood vessel and meibomian gland changes in a sclerodermatous chronic GVHD mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Ocular Surface	6. 最初と最後の頁 328 ~ 341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtos.2021.10.006	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------