

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18900

研究課題名(和文) 網膜色素変性の病態における酸化ストレスの関与

研究課題名(英文) Involvement of oxidative stress in the pathophysiology of retinitis pigmentosa

研究代表者

吉田 倫子 (YOSHIDA, NORIKO)

佐賀大学・医学部・特任教授

研究者番号：70725853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素変性(RP)患者群と健康な対照群の血液、前房水及びサンプルを用いて酸化ストレスマーカーの解析を行った。黄斑部病変を伴う重度の網膜変性群では軽度の網膜変性群と比較して血清スーパーオキシドジスムターゼ(SOD3)活性は有意に低下していた。また、末梢血中の単球を解析して臨床所見との相関性を評価した。RP患者では末梢血中のintermediate monocytes(CD14++CD16+)が有意に増加しており、黄斑部の網膜感度の低下と相関関係があった。したがって、血清SOD3活性はRPの重症度に関与していること、末梢血中の単球の活性化はRPにおける錐体細胞死に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性(RP)は、様々な遺伝子異常によって視細胞が障害される疾患群で未だ有効な治療法がない。我々は、ゲノムの酸化損傷によるミクログリアの活性化を介した慢性炎症への関与や視細胞死の誘導など、網膜への酸化ストレスがRPの病態に広く関与することを報告してきた。本研究では、RP患者の臨床サンプルを用いて酸化ストレスマーカーを解析し、血清SOD3活性がRPの病態を反映するバイオマーカーであることの可能性について検証した。また、末梢血中の単球を解析して末梢血中のintermediate monocytesの増加とRPにおける錐体細胞死への関与を明らかにし、新たな治療標的として同定した。

研究成果の概要(英文)：The antioxidant/oxidant markers were analyzed in the serum, aqueous humor and vitreous samples from the RP patients and the healthy controls. The serum superoxide dismutase 3 (SOD3) activity in the severe degeneration group with macular involvement was significantly lower compared with those in the mild degeneration group. In addition, we assessed the levels of peripheral blood monocytes to evaluate their correlation with clinical findings. The CD14++CD16+ intermediate monocytes was significantly increased in RP patients, which was correlated with the rate of decline of retinal sensitivity in the macular area. These results suggest that the serum SOD3 activity may be related to disease severity, and that activation of peripheral blood monocytes is important for cone cell death in RP.

研究分野：眼科学

キーワード：酸化ストレス 網膜色素変性

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性 (Retinitis Pigmentosa: RP) は、様々な遺伝子異常によって視細胞が障害される疾患群で未だ有効な治療法がない。近年、原因遺伝子の種類によらず共通して RP の病態を修飾する因子として酸化ストレスが重要であることが明らかとなっている。我々は、網膜への酸化ストレスが、視細胞死の誘導や、ゲノムの酸化損傷によるミクログリアの活性化を介した慢性炎症への関与等、RP の病態に広く関与することを報告してきた (文献 1、2)。

生体内の抗酸化防御機構は視細胞の酸化ストレス軽減に寄与する。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) ファミリー分子はスーパーオキシドアニオンの不均化を触媒する内因性抗酸化酵素である。RP 患者の前房水及び硝子体では SOD3 活性の低下を伴う抗酸化能の低下が報告されているが、血清では SOD 活性の低下を示す報告と示さない報告とがある (文献 3、4)。

中枢神経系 (CNS) に常在するマクロファージ (m) であるミクログリア及び末梢血由来 m は、神経免疫応答や酸化ストレスに重要な役割を担う。末梢血中の単球は健康な血液脳網膜関門を越えて CNS へ移動しないものの、患者または高齢者では浸潤して m に分化する可能性がある (文献 5)。RP においてもミクログリア/m は錐体細胞死を保護または促進することが報告されている (文献 6、7)。しかし、どの免疫細胞がどのような役割を担うのか不明であり、末梢血中の単球の役割についても不明である。

RP の病態における酸化ストレスの重要性に着目し、抗酸化防御機構やミクログリア/m の役割について解明するために研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、RP 患者の血液、前房水及び硝子体サンプルを用いて、酸化ストレスマーカーを同定する。また、同定した酸化ストレスマーカーと臨床所見との関与を検討することにより、RP の病態を反映する客観的な評価指標 (バイオマーカー) としての可能性について検証する。さらに、末梢血中の単球レベルを解析し臨床所見との相関性を検討することにより、RP の病態における末梢血中の単球の役割について明らかにする。これらにより、病態の分析・解明、疾患の予後予測及び新たな治療戦略に繋がるような成果を目指す。

3. 研究の方法

本研究の実施期間中は COVID-19 の世界的な流行拡大により、研究を取り巻く環境に劇的な変化があった。外来受診の制限及び白内障手術を含めた各種手術の延期により、本研究のために必要である臨床サンプルの採取及び蓄積が困難であった。また、COVID-19 対応の優先や在宅勤務の推奨等による勤務体制の変化により、研究実施そのものが困難であった。したがって、研究実施のための体制整備について繰り返し検討し、実施可能な研究内容及び方法を厳選したうえで研究を遂行した。

(1) RP 患者の末梢血中の酸化ストレスマーカーの解析と臨床所見との関与の検討

RP 患者群と健康な対照群の血液サンプルを SOD3 活性アッセイキットによって分析し、血清 SOD 活性を測定した。それに加えて ELISA 法による 8-oxo-dG、ニトロチロシン及びマロンジアルデヒド等の酸化ストレスマーカーの定量解析を行った。これらの解析結果について、RP 患者群と対照群との比較検討を行った。また、臨床所見との関与の検討として、RP 患者の視力検査及び HFA10-2 視野検査を行った。RP 患者を軽度 (周辺視野狭窄を認める患者)、中等度 (中心暗点を認める患者)、重度 (黄斑部病変を有する患者) の 3 群に分け、重症度別に酸化ストレスマーカーの比較検討を行った。

(2) RP 患者の末梢血中の単球の解析と臨床所見との関与の検討

本研究では、RP 患者群 31 人と健康な対照群 16 人の末梢血サンプルをフローサイトメトリーによって分析し、末梢血単球を non-classical monocytes (CD14+CD16++)、intermediate monocytes (CD14++CD16+) 及び classical monocytes (CD14++CD16-) へと分類した。これらの結果について RP 患者と対照群との比較検討を行った。また、臨床所見との関与の検討として、RP 患者を 1 年以上経過観察し、上述した末梢血中の単球レベルの解析結果を踏まえて、RP 患者の視力検査及び HFA10-2 視野検査における MD スロープを評価した。

(3) RP 患者の前房水及び硝子体中の酸化ストレスマーカーの解析と臨床所見との関与の検討

前房水及び硝子体サンプルは、臨床手術適応のある症例など採取が可能な症例が限定されるうえ、採取が可能なサンプル量も極少量である。本研究の実施期間中における COVID-19 の世界的な流行拡大による研究環境の変化のため、前房水及び硝子体サンプルの蓄積について当初の計画より大幅に遅れた。しかしながら、臨床サンプルの準備が整ったため酸化ストレスマーカーの定量解析を行った。現在、解析結果の検討を行っており、その詳細については論文及び学会等で報告予定としている。

3. 研究成果

(1) 血清 SOD3 活性の RP の重症度への関与

RP 患者群と対照群では血清 SOD3 活性を含む酸化ストレスマーカーに明らかな有意差を認めなかった。RP の重症度別の酸化ストレスマーカーの比較検討において、黄斑部病変を伴う重度の網膜変性群では軽度の網膜変性群と比較して血清 SOD3 活性は有意に低下していた。したがって、血清 SOD3 活性は RP の重症度に関与している可能性が示唆された。

(2) 末梢血中の intermediate monocytes (CD14⁺⁺CD16⁺) の錐体細胞死への関与

末梢血サンプルの解析の結果、RP 患者群と対照群とで末梢血中の総単球の割合に有意差はなかったものの、intermediate monocytes (CD14⁺⁺CD16⁺) は対照群と比較して RP 患者群で有意に増加していた (図 1)。また、intermediate monocytes (CD14⁺⁺CD16⁺) と HFA10-2 視野検査の MD スロープには負の相関関係 (黄斑部の網膜感度の低下) があることが示された (図 2)。したがって、末梢血中の単球の活性化は RP における錐体細胞死に重要であることが示唆された。

図 1

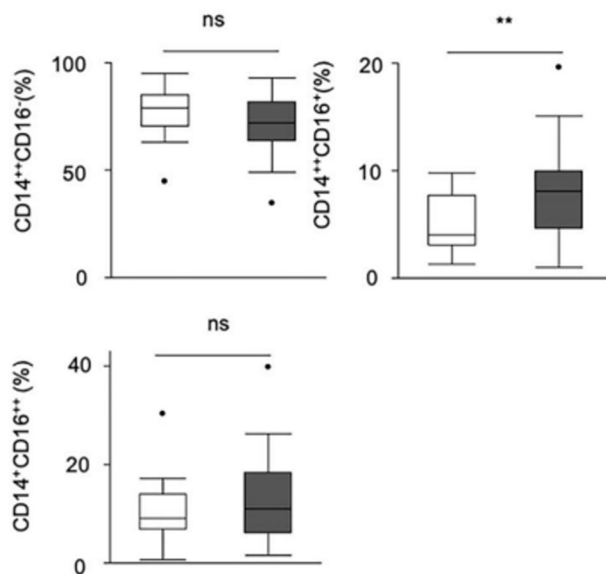
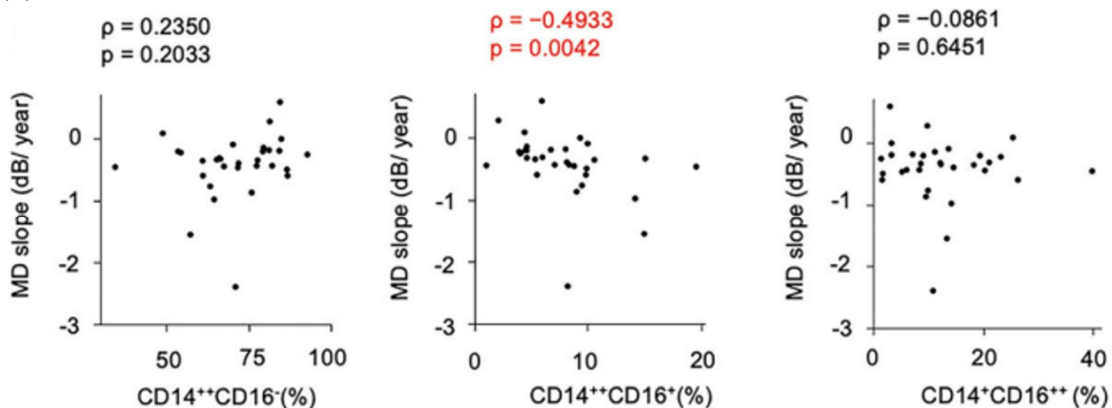


図 2



< 引用文献 >

1. Yoshida N, et al., Laboratory evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*. 2013; 120(1): e5-12.
2. Murakami Y, Ikeda Y, Yoshida N, et al. MutT homolog-1 attenuates oxidative DNA damage and delays photoreceptor cell death in inherited retinal degeneration. *Am J Pathol*. 2012; 181(4): 1378-86.
3. Martínez-Fernández de la Cámara C, et al., Altered antioxidant-oxidant status in the aqueous humor and peripheral blood of patients with retinitis pigmentosa. *PLoS One*. 2013; 8(9): e74223.
4. Campochiaro PA, et al., Is there excess oxidative stress and damage in eyes of patients with retinitis pigmentosa? *Antioxid Redox Signal*. 2015; 23: 643-648.
5. Paschalis EI et al., Permanent neuroglial remodeling of the retina following infiltration of CSF1R inhibition-resistant peripheral monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018; 115(48): E11359-E11368.
6. Zhao L et al., Microglial phagocytosis of living photoreceptors contributes to inherited retinal degeneration. *EMBO Mol Med*. 2015; 7(9): 1179-1197.
7. Silverman SM et al., C3- and CR3-dependent microglial clearance protects photoreceptors in retinitis pigmentosa. *J Exp Med*. 2019; 216(8): 1925-1943.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Fujiwara Kohta, Ikeda Yasuhiro, Murakami Yusuke, Tachibana Takashi, Funatsu Jun, Koyanagi Yoshito, Nakatake Shunji, Shimokawa Shotaro, Yoshida Noriko, Nakao Shintaro, Hisatomi Toshio, Ishibashi Tatsuro, Sonoda Koh-Hei	4. 巻 61
2. 論文標題 Aqueous Flare and Progression of Visual Field Loss in Patients With Retinitis Pigmentosa	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 26 ~ 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.61.8.26	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 -

1. 著者名 Shimokawa Shotaro, Fujiwara Kohta, Murakami Yusuke, Funatsu Jun, Nakatake Shunji, Yoshida Noriko, Sonoda Koh-Hei, Ikeda Yasuhiro	4. 巻 4
2. 論文標題 Effect of Topical Dorzolamide on Cystoid Macular Edema in Retinitis Pigmentosa	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ophthalmology Retina	6. 最初と最後の頁 1036 ~ 1039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oret.2020.05.012	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 -

〔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
---------	---------