

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18359

研究課題名（和文）線維柱帯へのペリオスチン沈着と眼圧上昇の関連

研究課題名（英文）The roles of periostin deposition in trabecular meshwork for the elevation of intraocular pressure

研究代表者

春日 俊光（Kasuga, Toshimitsu）

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80568189

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）：前房水中ペリオスチン(POSTN)濃度の測定を施行し、アトピー緑内障の臨床データとPOSTN濃度との関連を比較したところ、アトピー緑内障の重症度の高い人から得た前房水サンプルにおいて、POSTNタンパクの発現量が高値であった。POSTN欠損マウスとコンジェニックな野生型マウスを用いて濾過手術モデルを作成し、その濾過胞の形状について評価を行った。濾過手術施行後10-14日の時点でPOSTN欠損マウスにおいて野生型マウスより濾過胞の形成が良好であると判明した。遺伝子発現プロファイルを比較した結果、細胞増殖関連遺伝子の発現がPOSTN欠損マウスにおいて有意に低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症アトピー性皮膚炎に合併する緑内障（アトピー緑内障）患者由来の前房水中のペリオスチン濃度が上昇しており、ペリオスチンがアトピー性炎症によって誘導される分子であり、かつ組織の癒着化を引き起こす作用があることから、アトピー緑内障の病態に深く関係していると考えられた。またペリオスチン分子は緑内障濾過手術の濾過胞線維化にも関連しており、治療ターゲットとしても今後さらなる研究が待たれる。

研究成果の概要（英文）：Higher periostin (POSTN) expression was observed among the aqueous humor samples of severe atopic glaucoma patients compared to the control samples. We made mouse glaucoma filtration surgery models using POSTN knockout mouse and wild type mouse and compared the shapes of bleb after 10-14 days. The results showed better bleb formation in the eye of POSTN knockout mouse than that of wild type mouse. We further analyzed gene expression profiles of bleb tissue and found down regulation of cell cycle-related genes in the bleb tissue of POSTN knockout mouse.

研究分野：眼科学

キーワード：緑内障 アトピー性皮膚炎 ペリオスチン モデルマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

緑内障は 40 才以上の日本人の 5% が罹患する疾患で、中途失明原因の第一位である。緑内障の中でも高眼圧を伴う原発開放隅角緑内障(primary open angle glaucoma: POAG)においては、房水流出経路である線維柱帯の流出抵抗の増大が主な病因である。我々の研究グループは、重症アトピー性皮膚炎に合併する緑内障(アトピー緑内障)に著明な高眼圧を呈する症例が多いことを報告した。アトピー性疾患では 2 型炎症性サイトカイン(IL-4, IL-13)の発現が亢進していることから、(1)IL-4, IL-13 によってその発現が誘導され、(2)線維柱帯組織に発現が見られ、(3)コラーゲン分子を架橋する作用をもつ細胞外マトリックス periostin (POSTN)がアトピー緑内障の原因物質ではないかと考え研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、眼内のペリオスチン発現と緑内障眼における眼圧上昇の関係を明らかにすることである。POSTN 分子が緑内障の病態に関連している可能性を検証するために、本研究ではヒト臨床サンプルを用いた研究と遺伝子改変マウスを用いた研究を遂行する。アトピー緑内障の臨床研究から得た気づきを元に、これまでに蓄積してきた豊富な臨床サンプルや遺伝子改変マウスを利用した一連の病態解析を施行できるところに学術的なオリジナリティがある。また POSTN 発現制御による緑内障治療というコンセプトの形成に成功すれば創造性の高い研究となる。

3. 研究の方法

(1) 臨床サンプルの収集と解析、POSTN の線維柱帯組織への沈着

抗 POSTN 抗体を用いたヒト線維柱帯組織の免疫組織電顕：緑内障手術(線維柱帯切除術)時に得られた線維柱帯組織を用い、抗 POSTN 抗体を用い、pre-embedding 法、post-embedding 法の両方で条件検討する。

アトピー緑内障ならびに POAG からの前房水採取と臨床データの収集

POSTN トランスジェニックマウスの線維柱帯部位におけるペリオスチン分子の発現を qPCR ならびに免疫組織染色で確認する

(2) マウス POSTN 分子の制御による眼圧コントロール

POSTN 欠損および野生型マウスに対して、濾過手術を施行し、POSTN 分子の有無による濾過胞の形成、浸潤マクロファージ数、 α -SMA 発現量を定量し、濾過胞癒着化に対する POSTN の影響を評価する。また抗マウス POSTN 中和抗体を投与した状態での濾過手術を施行し、POSTN 発現抑制の臨床応用の可能性を探求する。

4. 研究成果

(1) 抗 POSTN 抗体を用いたヒト線維柱帯組織の免疫組織電顕：

緑内障手術(線維柱帯切除術)時に得られた線維柱帯組織を用い、抗 POSTN 抗体を用いた免疫電顕の条件検討を施行した。pre-embedding 法、post-embedding 法の両方で条件検討をしたが、グルタルアルデヒド固定下では我々が保有している抗 POSTN 抗体の抗原性が保たれず、免疫組織電顕での解析はできなかった。代わりに POSTN 欠損マウスと野生型マウスを用いて線維柱帯部位の電顕観察を施行した。野生型マウスにおいて同部位に沈着する線維組織を認めたが、それらが POSTN であるとの同定は困難であった。

アトピー緑内障ならびに POAG からの前房水採取と臨床データの収集：研究倫理委員会の承認を得て、北海道大学、筑波大学、東京医科大、島根大学、佐賀大学と共同研究を遂行した。ELISA 法による前房水中ペリオスチン濃度の測定を施行し、アトピー緑内障の臨床データとペリオスチン濃度との関連を比較、検討したところ、アトピー緑内障の重症度の高い人から得た前房水サンプルでペリオスチンタンパクの発現量が高い傾向がみられた(学会報告済み)。一方で POAG 患者の中にも前房水中にペリオスチンが発現している症例があり、緑内障がない対照眼のペリオスチン濃度を合わせて検討した。その結果、緑内障群と対照群との間で、差は見られるものの、カットオフ値の濃度が比較的高くなるため、バイオマーカーとしての検出感度が低くなってしまふとの問題点が生じている。網膜剥離を合併するアトピー緑内障の重症例に絞れば、前房水中のペリオスチン濃度は有意に疾患群に高いため、重症アトピー緑内障のバイオマーカーとしては有用であり、今後血清中のペリオスチン濃度と前房水中のペリオスチン濃度の相関を検証し、血清中ペリオスチン濃度によってアトピー緑内障の補助診断(ステロイド緑内障との鑑別)ができないか、症例数を増やして検討している。

POSTN トランスジェニックマウスの線維柱帯部位におけるペリオスチン分子の発現を qPCR ならびに免疫組織染色で確認：POSTN トランスジェニックマウスでは野生型マウスと比較して、線維柱帯部位でのペリオスチン発現が亢進していることを q-PCR 法で確認した。一方、タンパクレベルでは野生型マウスと比較して、線維柱帯部位におけるペリオスチン発現量

には有意差を認めなかった。

(2) マウス POSTN 分子の制御による眼圧コントロール

POSTN 欠損マウスとコンジェニックな野生型マウスを用いて濾過手術モデル(Adachi K et al. Sci Rep.) を作成し、その濾過胞の形状について評価を行った。その結果、濾過手術施行後 10-14 日の時点で POSTN 欠損マウスにおいて野生型マウスより濾過胞の形成が良好であると判明した。経時的に濾過胞組織を採取して、POSTN 欠損マウス由来と野生型マウス由来の組織間で遺伝子発現プロファイルを比較した。その結果、POSTN 分子は術後 10 日目に発現のピークを迎えること、細胞増殖に関連するマーカー遺伝子の発現が POSTN 欠損マウスにおいて有意に低下していることが判明した。このことは濾過手術後の組織増殖を POSTN が促進していることを示唆する結果であると考えられた。一方で術後 10 日目の時点では POSTN 分子以外に POSTN 欠損マウス由来と野生型マウス由来の組織間で発現量に有意差が見られる遺伝子は細胞増殖に関連するマーカー遺伝子を除くとごく少数で、濾過胞の維持に鑑みて機能的に意義のある遺伝子は検出されなかった。それよりやや早い術後 7 日目の時点で POSTN 欠損マウス由来と野生型マウス由来の組織間で発現量に有意差が見られる遺伝子は十数個あり、現在濾過胞の維持に果たす POSTN 分子の機能的な意義について、それぞれの遺伝子に関して検討を重ねている。

また、マウス POSTN 分子の制御による眼圧コントロールを目指し、抗マウス POSTN 中和抗体を投与し、線維柱帯における POSTN の発現量を減少させられるか、また眼圧を低下させることが可能かを目標に実験をしている。当初、POSTN リコンビナントタンパクを作成し、POSTN 抗体の自作をする計画であったが、リコンビナント POSTN タンパクがその分子量の大きさのため、うまく産生されないため、POSTN 分子の構成ペプチドを複数個作成し、ペプチドによるカクテル抗体を作成した。現在、POSTN 中和抗体を濾過手術後に腹腔内投与して、濾過胞の維持に差が出ないかも併せて実験を進めている最中である。中和抗体を投与したマウスにおける濾過胞の形成が良好との印象を持っているが、現在個体数を増やして検討している。また抗体投与の時期並びに、適切な投与回数についても同時に検証し、今後の臨床応用に必要な情報を収集する。また、中和抗体以外に POSTN の機能を阻害する低分子化合物で入手可能な薬剤に関しての検討も同時に施行している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Asaoka S, Kasuga T, Matsunaga T, Hayashi Y, Asada Y, Iwamoto S, Hirakata T, Honda R, Obazawa H, Sasaki H, Ohta T, Matsuda A.	4. 巻 30
2. 論文標題 Operative complications of glaucoma drainage implant tube insertion through the sulcus for pseudophakic eye.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Glaucoma	6. 最初と最後の頁 e169-e174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/IJG.0000000000001783	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 Asaoka Satoko, Kasuga Toshimitsu, Matsunaga Toru, Hayashi Yusuke, Asada Yosuke, Iwamoto Satoshi, Hirakata Toshiaki, Honda Rio, Obazawa Hanako, Sasaki Hidenori, Ohta Toshihiko, Matsuda Akira	4. 巻 30
2. 論文標題 Operative Complications of Glaucoma Drainage Implant Tube Insertion Through the Sulcus for Pseudophakic Eye	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Glaucoma	6. 最初と最後の頁 e169 ~ e174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/IJG.0000000000001783	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 Adachi Keisuke, Asada Yosuke, Hirakata Toshiaki, Onoue Miki, Iwamoto Satoshi, Kasuga Toshimitsu, Matsuda Akira	4. 巻 10
2. 論文標題 Alteration of gene expression in mice after glaucoma filtration surgery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15036-15047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-72036-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kasuga Toshimitsu, Asaoka Satoko, Asada Yosuke, Iwamoto Satoshi, Hirakata Toshiaki, Honda Rio, Ohta Toshihiko, Matsuda Akira	4. 巻 29
2. 論文標題 Proline-assisted Tube Insertion Through Sulcus in Ahmed Valve	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Glaucoma	6. 最初と最後の頁 e106 ~ e107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/IJG.0000000000001602	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
---------	---------