

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：32650

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21663

研究課題名（和文）多層オミクス解析から得た病態に基づく水疱性角膜症の治療薬剤の探索

研究課題名（英文）Proposal of a novel therapy for bullous keratopathy based on human-derived multiomics analysis

研究代表者

山口 剛史（Takefumi, Yamaguchi）

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20383771

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：前房関連角膜内皮症の多層オミクス解析から特定された生体経路から得た薬剤NMNをDBA2Jに投与角膜内皮細胞の障害が有意に低減することがわかった。前房関連角膜内皮症の前房水ではNAD⁺濃度が正常と比較して有意に低下していることを証明し、水疱性角膜症で変化する代謝産物を特定した。研究用のヒト角膜内皮細胞を正常前房水で培養しても細胞障害はないが、前房関連角膜内皮症の前房水で培養すると細胞障害が起きること、これにNMNを入れると細胞障害は低減されることが分かった。前房水培養後の内皮細胞のRNAseqから水疱性角膜症で変化する遺伝子経路、NMN添加で変化する遺伝子群を特定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

角膜内皮移植の発展によって水疱性角膜症の予後は劇的に改善したが、一部の水疱性角膜症では術後に角膜内皮細胞が減少し、移植片が早期に機能不全に陥るため何度も角膜移植を繰り返す必要がある。これは単に「角膜内皮細胞が減少し角膜浮腫をきたす」水疱性角膜症ではなく、「虹彩損傷・房水血管網破綻を背景とする前房環境の病的変化による角膜内皮細胞の変性疾患」である。角膜提供が少ない我が国において多くの角膜を消費する本疾患概念の確立と病態解明は喫緊の課題である。本研究から前房環境の代謝異常の視点から「前房関連角膜内皮症」という疾患概念と、病態解析、治療法の開発につながる知見が得られ、今後の研究基盤が確立できた。

研究成果の概要（英文）：In our previous study, we identified several biological pathways from multiomic analyses using refractory bullous keratopathy, which we named as "aqueous humor associated endotheliopathy". Based on these results, we hypothesized that NMN, a regulator of mitochondria and intracellular energy production, can alleviate corneal endothelial cell damage due to pathological aqueous humor. First, in DBA2J, a animal model of aqueous humor associated endotheliopathy, we repeated experiments of NMN-fed DBA2J for 1 month, and found that NMN decreased corneal endothelial damage. Second, we measured NAD/NADH levels in human aqueous humor and showed that the NAD/NADH levels were decreased in eyes with aqueous humor associated endotheliopathy. Third, in ex-vivo experiments using the aqueous humor from normal eyes and eyes with aqueous humor associated endotheliopathy, endothelial cell damage was increased in the cells that were cultured in aqueous humor from aqueous humor associated endotheliopathy.

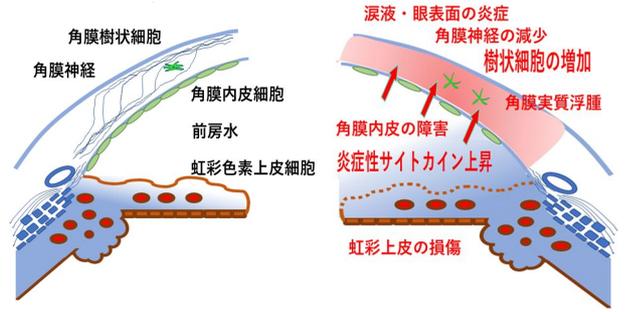
研究分野：角膜移植

キーワード：前房水 角膜内皮細胞 細胞老化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界で角膜による失明は200万人を超え年間20万人が角膜移植を受けている。角膜移植の長期予後の決定因子に術後の角膜内皮細胞の減少があるが、角膜内皮細胞が減少する水疱性角膜症の詳細な病態は分かっていない。これまで我々は水疱性角膜症において「虹彩萎縮と前房水環境の病的変化による角膜内皮細胞減少」する病態(右図)を提唱し、虹彩萎縮が角膜移植の予後不良因子であることを証明した。さらにヒト多層オミクス解析から病態候補経路を特定した。



700 眼を超える前房水解析と長期臨床データベースから示唆される角膜内皮減少の機序

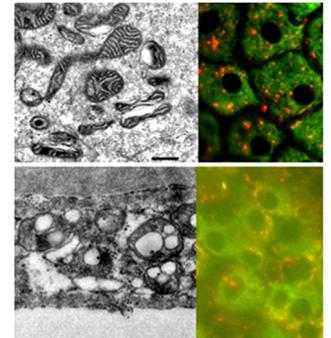
2. 研究の目的

本研究では、ヒトサンプルを用いて多層オミクス解析に基づく探索的治療薬効果を検証し角膜内皮疾患の病態に基づく新規治療法を確立する。

3. 研究の方法

(1)NAD/NADH 濃度測定と NMN の治療的効果

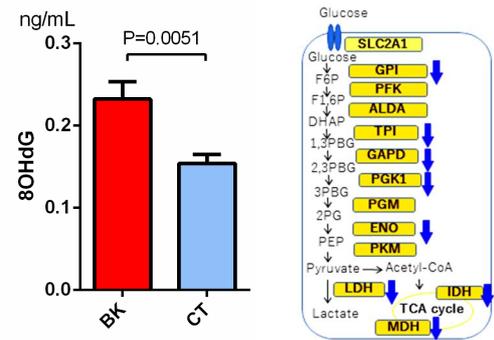
ヒト角膜内皮細胞の電子顕微鏡で水疱性角膜症でミトコンドリアに空泡変性があり(左下)、ミトコンドリア膜電位を検出する JC-1 染色で膜電位低下像がみられた。本研究では正常眼と水疱性角膜症患者から得られた NAD/NADH 濃度を測定する。水疱性角膜症のモデル DBA2J で NMN の内皮細胞への効果を検証する。



(2)ヒト前房水と角膜内皮細胞の Metabolome 解析

水疱性角膜症の角膜内皮細胞の Transcriptome 解析で酸化ストレス応答や解糖系の低下がみられ、酸化ストレスを反映する 8OHdG が正常眼と比べ水疱性角膜症で有意に高かった(右図)。前房水 Proteome 解析でも解糖系/TCA サイクルの GPI-TPI-GAPD-PGK1-LDH-MDH-IDH の代謝酵素ほぼ全てに有意な低下があった(右図)。これを詳細に把握するためにヒトの角膜内皮細胞で Metabolome 解析を行い、Proteome 解析と Transcriptome 解析結果を検証する。これと同時に、角膜移植時に切除廃棄される角膜内皮細胞と前房水で、ミトコンドリア機能を示す細胞内 ATP や糖代謝産物の乳酸やピルビン酸の濃度を測定して、多層オミクス解析の結果を検証する。

ヒト角膜内皮細胞の電顕像とミトコンドリア膜電位染色：正常(上)水疱性角膜症(下)



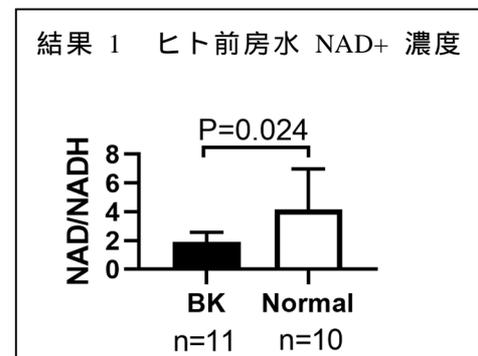
水疱性角膜症 (BK) 正常眼 (CT)

4. 研究成果

(1)NAD/NADH 濃度測定と NMN/Sirolimus の治療的効果

ヒト「前房関連角膜内皮症」の前房水では NAD⁺ 濃度が正常と比較して有意に低下していた(結果 1)。ヒト前房関連角膜内皮症の研究から特定された生体経路(Sci Adv 2020)から考えられた候補薬剤 NMN を DBA2J 1 か月間全身投与(飲水)に添加し投与すると、角膜内皮細胞の障害が有意に低減した(次ページ結果 2)。

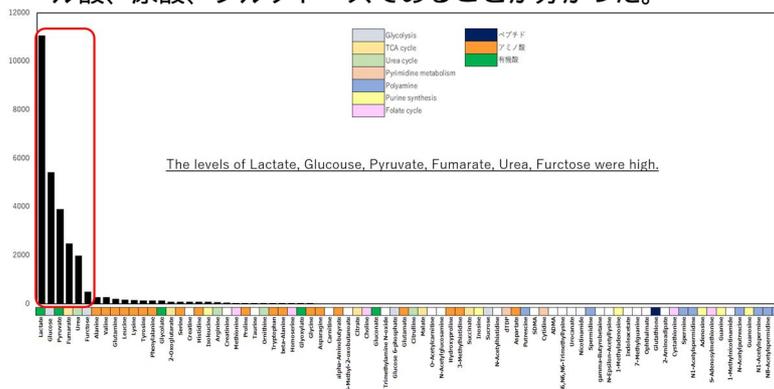
結果 1 ヒト前房水 NAD⁺ 濃度



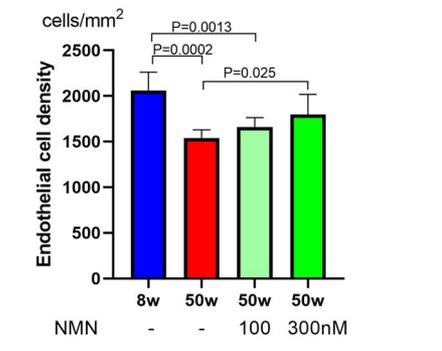
(2)ヒト前房水と角膜内皮細胞の Metabolome 解析
 水疱性角膜症 34 眼、正常眼 37 眼、フックス角膜内皮ジストロフィ 6 眼
 の前房水の Metabolome 解析を行った。

代謝物の測定

測定可能は 147 代謝物のうち 82 について測定ができた。前房水で濃度が高いのは、濃度の高い順に乳酸、グルコース、ピルビン酸、フマル酸、尿酸、フルクトースであることが分かった。

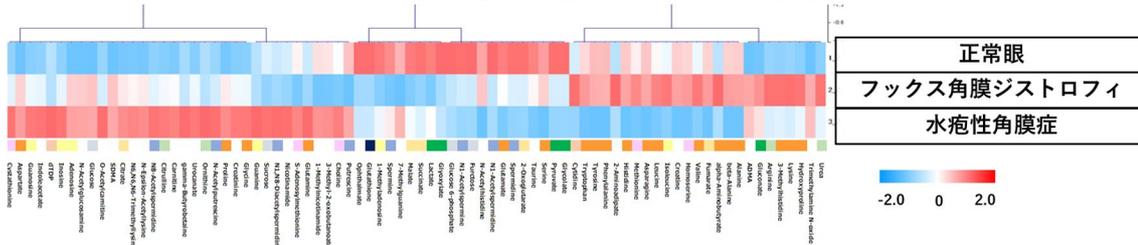


結果 2 DBA2J での NMN による角膜内皮細胞減少の抑制効果.



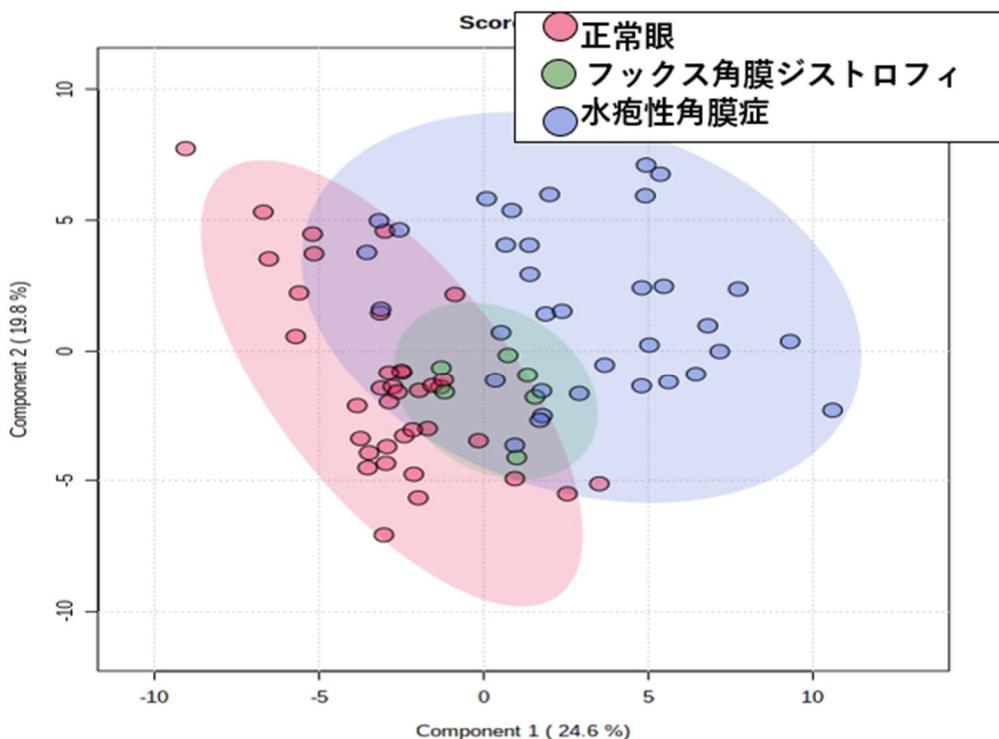
クラスター解析

クラスター解析では水疱性角膜症では正常と比較して、葉酸回路・プリン合成系が亢進しているのに対して、解糖系・TCA 回路が著しく低下していることが分かった。

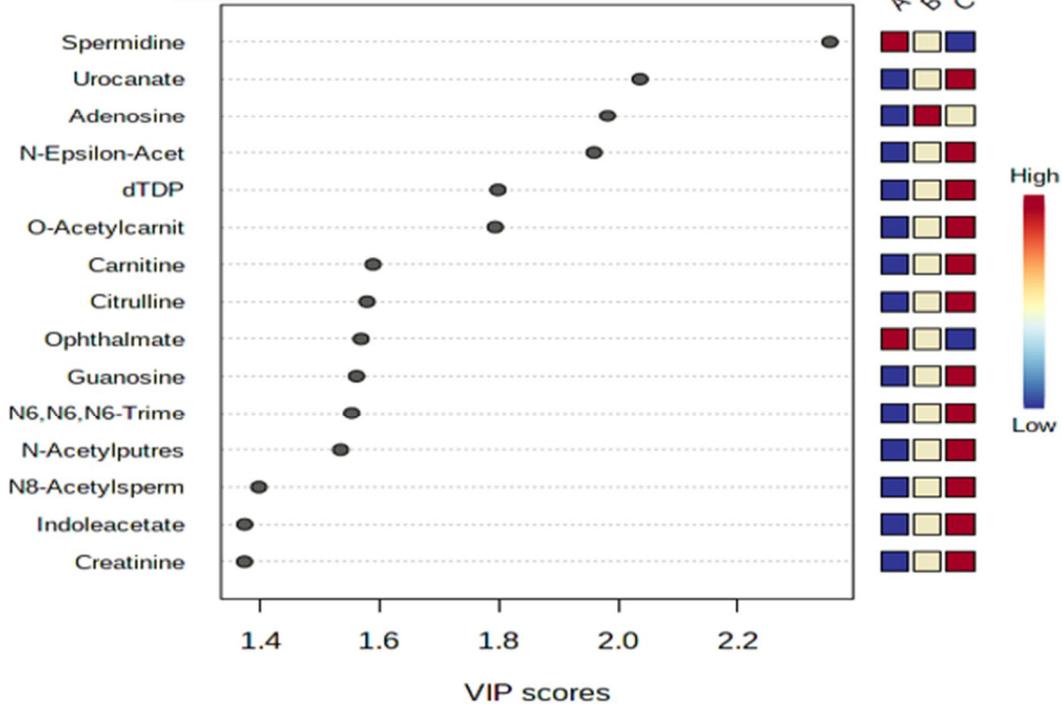


主成分分析

正常眼、フックス角膜内皮ジストロフィ、水疱性角膜症では主成分分析を行った。代謝物での主成分分析でフックス角膜内皮ジストロフィは正常と近いが、正常と水疱性角膜症は大きく異なることがわかった。



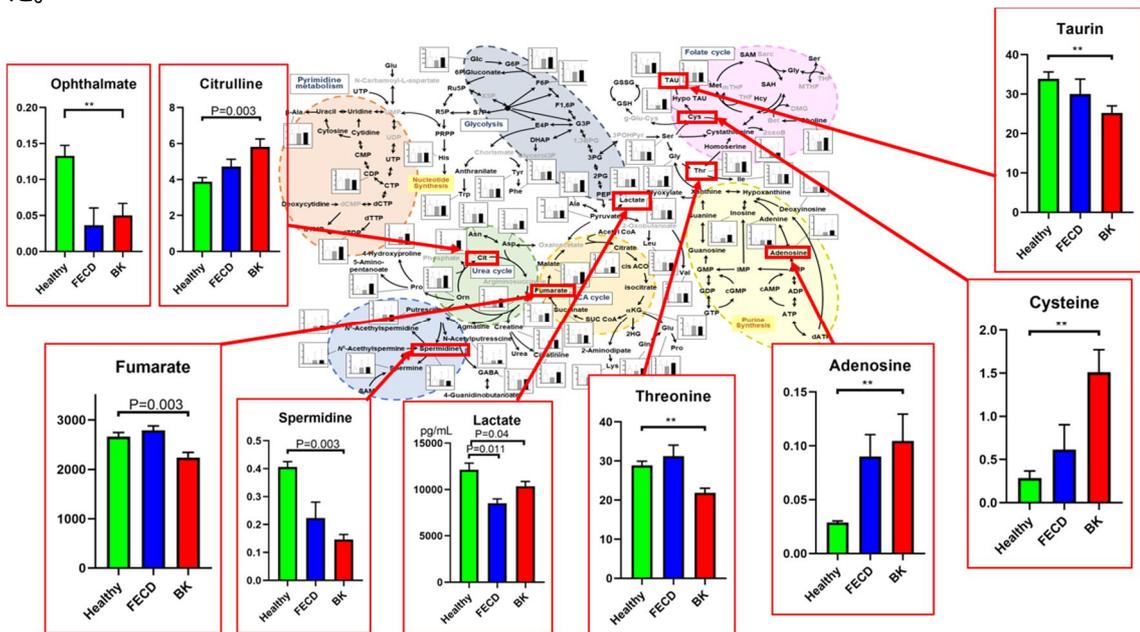
A: 正常眼
 B: フックス角膜ジストロフィ
 C: 水疱性角膜症



VIPスコアで寄与の高い代謝産物をみると、Spermidine、Urocanateが正常眼と水疱性角膜症で大きく異なることがわかった。さらにAdenosineやCarnitine、Citrulline、Ophthalmateも両者を大きく差がつく結果であることがわかった。

代謝経路

各代謝経路内に、今回の測定における前房内濃度に統計学的有意差がみられた各代謝物をグラフで示す(緑:正常、青:フックス角膜内皮ジストロフィ、赤:水疱性角膜症)。葉酸経路のTaurin、Cystein、プリン合成経路のAdenosine、解糖系後代謝産物の乳酸、TCA回路のフマル酸、その下流のSpermidineに、水疱性角膜症と正常眼で大きな差があることがわかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hiroyuki Komatsu, Yoshihiko Usui, Kinya Tsubota, Risa Fujii, Takefumi Yamaguchi, Kazuichi Maruyama, Ryo Wakita, Masaki Asakage, Hiroyuki Shimizu, Naoyuki Yamakawa, Naoya Nezu, Koji Ueda, Hiroshi Goto	4. 巻 22
2. 論文標題 Comprehensive Proteomic Profiling of Vitreous Humor in Ocular Sarcoidosis Compared with Other Vitreoretinal Diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Clin Med	6. 最初と最後の頁 3606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11133606	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 Shimizu T, Hayashi T, Ishida A, Kobayashi A, Yamaguchi T, Mizuki N, Yuda K, Yamagami S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Evaluation of corneal nerves and dendritic cells by in vivo confocal microscopy after Descemet's membrane keratoplasty for bullous keratopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 6936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-10939-w	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 Nishisako S, Yamaguchi T, Hirayama M, Higa K, Aoki D, Sasaki C, Noma H, Shimazaki J.	4. 巻 4
2. 論文標題 Donor-Related Risk Factors for Graft Decompensation Following Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Med	6. 最初と最後の頁 810536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2022.810536	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 Takahiko Hayashi, Hidenori Takahashi, Satoru Inoda, Toshiki Shimizu, Akira Kobayashi, Hidetoshi Kawashima, Takefumi Yamaguchi, Satoru Yamagami	4. 巻 11
2. 論文標題 Aqueous humour cytokine profiles after Descemet's membrane endothelial keratoplasty	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17064
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96566-3	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 Yuki Kusano, Takefumi Yamaguchi, Sota Nishisako, Takehiro Matsumura, Masaki Fukui, Kazunari Higa, Toshihiro Inoue, Jun Shimazaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Aqueous Cytokine Levels Are Associated With Progression of Peripheral Anterior Synecchia After Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Visual Science Technology	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/tvst.10.11.12	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 Yuki Kusano, Takefumi Yamaguchi, Sota Nishisako, Takehiro Matsumura, Masaki Fukui, Kazunari Higa, Toshihiro Inoue, Jun Shimazaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Elevated Cytokine Levels in Aqueous Humor Are Associated with Peripheral Anterior Synecchia after Penetrating Keratoplasty	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222212268	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 1.Yamaguchi T*, Higa K, Yagi-Yaguchi Y, Ueda K, Noma H, Shibata S, Nagai T, Tomida D, Yasu-Mimura R, Ibrahim MO, Matoba R, Tsubota K, Hamrah P, Yamada J, Kanekura K, Shimazaki J.	4. 巻 6
2. 論文標題 Pathological processes in aqueous humor due to iris atrophy predispose to early corneal graft failure in humans and mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaaz5195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aaz5195	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 該当する

1. 著者名 3.Tomida D, Yagi-Yaguchi Y, Higa K, Satake Y, Shimazaki J, Yamaguchi T*	4. 巻 20
2. 論文標題 Correlation between tear and aqueous humor cytokine levels in bullous keratopathy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ocular Surface	6. 最初と最後の頁 S1542-0124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtos.2020.06.010	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takefumi Yamaguchi, Rintaro Ogino, Yukari YagiYaguchi, Kazunari Higa, Jun Shimazaki
2. 発表標題 Nicotinamide mononucleotide prevents iris atrophy-associated corneal endothelial cell loss
3. 学会等名 ARV02023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ニコチンアミドモノヌクレオチド含有角膜保存液、ニコチナミドモノヌクレオチド点眼および内服による角膜内皮細胞の保護、角膜移植片の生存延長および角膜内皮細胞減少眼での水疱性角膜症の発症予防	発明者 山口剛史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、出願準備中	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	比嘉 一成 (Kazunari Higa) (60398782)	東京歯科大学・歯学部・講師 (32650)	
研究分担者	杉本 昌弘 (Sugimoto Masahiro) (30458963)	東京医科大学・医学部・教授 (32645)	

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
---------	---------