

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09670

研究課題名（和文）前眼部組織間のトランスオミクス解析による包括的な眼圧上昇機序の解明

研究課題名（英文）Comprehensive mechanism of elevated intraocular pressure by trans-omics analysis among anterior segment tissues.

研究代表者

横山 悠（Yokoyama, Yu）

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：00597312

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）：本研究は、当初、緑内障病態解明のため線維柱帯を含めた前眼部環境を解析するものであったが、線維柱帯の安定した採取ができなかったため、前房水の解析を中心に実施した。緑内障病型ごと（原発開放隅角緑内障 POAG、正常眼圧緑内障 NTG、落屑緑内障 PE）、前房水採取を行い、リポミクス解析をおこなった。その結果、9,000以上の脂質分子が検出された。そのうちいくつかの分子は緑内障病型で違いがあることが判明した。さらに、細胞外小胞（EVs）の解析により、各病型で異なる脂質分子の分布が確認された。これらの成果は、緑内障の眼圧上昇機序の解明および治療予後関連因子の特定に資するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障の治療法が眼圧下降のみがエビデンスに基づいた治療法であるが、未だ眼圧下降困難例が多く手術治療を必要とする症例も少なくない。現在の眼圧下降療法は房水排出促進、産生抑制であるが、眼圧上昇のメカニズムが解明できれば、病態に応じた根本的治療を目指すことができる。緑内障がわが国における中途失明疾患1位であることを考えると研究の成果意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：This study was initially intended to analyze the anterior ocular environment, including the trabecular meshwork (TM), to elucidate the pathophysiology of glaucoma, but since stable collection of the tissue of TM was not possible, analysis of the anterior chamber aqueous humor was performed mainly. Anterior chamber aqueous humor samples were collected for each glaucoma type, primary open angle glaucoma (POAG), normal tension glaucoma (NTG) and pseudexfoliation glaucoma (PE), and lipidomics analysis was performed. As a result, more than 9,000 lipid molecules were detected. Several of these molecules were found to differ among glaucoma types. Furthermore, analysis of extracellular vesicles (EVs) confirmed the different distribution of lipid molecules in each pathological type. These results contribute to the elucidation of the mechanism of elevated intraocular pressure in glaucoma and the identification of factors related to treatment prognosis.

研究分野：Ophthalmology

キーワード：Glaucoma リポミクス 細胞外小胞 眼圧

1. 研究開始当初の背景

緑内障は我が国における中途失明一位の疾患であり、疾患が患者や社会に与える影響は非常に大きい。しかし、緑内障の治療方法は唯一眼圧下降療法のみがエビデンスにより裏付けられている。その治療における眼圧下降機序は房水産生抑制と房水排出促進の二つに分けられる。つまり、眼圧下降療法は房水平衡を眼内房水量減少の方向に下降させることによる。房水平衡が眼内房水量上昇の方に病的に移動する理由は様々である。例えば前房水の網羅的解析により TM 細胞は酸化ストレスや小胞体ストレスといった各種のストレスが房水排出の主経路である TM 流出路の抵抗を上げることが知られている。しかし、眼圧上昇機序も、治療効果も症例ごとに異なっている。現在の緑内障治療方針は原発開放隅角緑内障であればまずは点眼薬による内科的治療を行い、効果不十分であれば外科的治療を行うが、詳細な病態までは考察されることは少ない。そのため眼圧下降値に達するために、治療者は試行錯誤を繰り返す必要がある。正常範囲内の眼圧下降は、TM 切開術で 5 年後に 60% 弱、(Tanihara H et al. Arch Ophthalmol. 1993) 濾過手術で 5 年後に 70% 弱といわれている (Sugimoto Y et al. Ophthalmology. 2015)。緑内障手術では、術後経過とともに眼圧が再上昇する症例が存在し問題となっている。今、臨床の現場に求められているものはより包括的な眼圧上昇機序解明と、臨床成績につながる眼圧下降のための眼内環境のコントロールである。

2. 研究の目的

そこで本研究では、手術で採取される前房水・虹彩・線維柱帯 (trabecular meshwork: TM) を活用し、最新のトランスオミクス解析により、前眼部組織間の相互作用、および包括的な眼圧上昇機序の解明を目的とする。また、房水から多段階的 (プロテオーム解析、メタボローム解析、microRNA: miRNA) な網羅的解析を行う。

3. 研究の方法

手術適応となった原発開放隅角緑内障 (POAG)、落屑症候群 (PE)、正常眼圧緑内障 (NTG) 患者から得られた前房水を、それぞれ 45、14 および 24 検体準備した。検体の前処理方法は、前房水 (50 μ L) に、メタノール (850 μ L) 添加後、攪拌、遠心を行って上清 (800 μ L) を分注 (各 400 μ L) し、一方はそのまま、もう一方はクロロホルムと水を添加して攪拌したのち下層 (280 μ L) を採取し、それぞれ窒素ガスにより乾固させた。その後、各試料はメタノールで再溶解し、超高速液体クロマトグラフ-フーリエ変換型質量分析計 (UHPLC-FTMS) によるリピドミクス解析に供した。分析カラムは L-Column2 ODS (2.0 \times 100 mm, 2 μ m) を選択し、移動相 A: 水 / アセトニトリル / 1.0M ギ酸アンモニウム = 60 / 40 / 1, v/v/v (0.1% ギ酸) と移動相 B: イソプロパノール / アセトニトリル = 90 / 10, v/v (0.1% ギ酸) のグラジエント法により脂質を分離した。次に、3 疾患群で多変量解析を実施し、主成分分析と 2 群間の volcano プロットから各疾患の特徴成分を同定した。さらに、トリグリセリド (TG)、ホスファチジルコリン (PC) およびリゾゴスファチジルコリン (LPC) のマスキロマトグラムを確認し、内部標準物質とのピーク面積比を算出し、同様に変化する脂質分子種について 3 群間で階層クラスター解析により同定した。

前房水中の細胞外小胞 (extracellular vesicles, EVs) は MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 を用いて抽出した。次に EVs 抽出液 (50 μ L) を用い、Bligh & Dyer 法により脂質分子を抽出し、前述と同様に UHPLC-FTMS 分析 (Ultimate3000 - QExactive) に供した。得られたデータは、LipidSearch による脂質分子同定後、MetaboAnalyst 5.0 による統計解析を実施した。

4. 研究成果

当初、解析検体を収集するため線維柱帯切開術を行うことを予定された広義原発開放隅角緑内障を対象にサンプル採取を行う計画であった。患者に研究計画を説明し同意を書面上で取得した。手術のための末梢ライン確保時に採血、また同日に検尿を行った上で Kahook dual blade を用いた線維柱帯採取を試みた。しかし、Kahook Dual blade は新しい型へと変更しており、より Blade 部が小さく改良された。そのため検体採取が手技的に難しくなった。現在は旧タイプの Kahook Dual blade の入手は困難となったため、25 ゲージ硝子体手術用鑷子、さらにはまだ試用中であった TrabEx+(TM) を用いた線維柱帯採取を試みたが採取部位が非常に小さいこと、出血による視認困難などの理由によりこの方法でも採取が困難だった。安定した採取が難しく、コストが増大することが考えられた。そのため、緑内障手術中にサンプル採取が可能な前房水の解析に着手した。

前房水のリピドミクス解析の結果、9,000 成分以上が検出された。次に、3 群間の多変量解析から抽出された特徴成分で代表的に変化した脂質のうち、TG、PC および LPC を 96 種精密同定し、volcano プロットで再解析したところ、特に POAG と NTG に対して PE で高値となる分子種が多いことが判った。これら脂質分子種は、眼圧依存的に増加する可能性があ

ると考えられた。また、PE と比べて POAG と NTG で同様の变化であった分子種は、主に落屑物質に依存して変化すると考えられた。さらに、階層クラスター解析の結果から、PE において一価不飽和脂肪酸 (MUFA) および飽和脂肪酸 (SFA) 含有 PC、LPC が変化し、NTG において MUFA および SFA 含有 TG が変化することがわかった。

さらに、前房水中に含まれる EVs を抽出し、透過型電子顕微鏡により観察したところ、原発開放隅角緑内障、落屑症候群、正常眼圧緑内障の全ての病型において細胞外小胞が存在することが確認された。そのため原発開放隅角緑内障、落屑症候群、正常眼圧緑内障のそれぞれから女性 4 検体、男性 4 検体の計 8 検体ずつ、合計 24 検体を選出し、クラスカル・ウォリス検定を行い、選出した検体が年齢、性別に有意差がないことを確認したうえで、選出した 24 検体から細胞外小胞を抽出した。前房水由来 EVs リピドーム解析の結果、4,500 成分以上の脂質分子種が検出され、3 群間比較における主成分分析の結果、スコアプロット上で NTG は POAG および PE と比較して異なる位置に分布することが判った。今後、眼疾患毎の脂肪酸種の違いに着目した解析に加え、治療予後関連因子の同定を実施する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西原詩織、佐藤孝太、藤岡周、横山悠、福内友子、山岡法子、中澤徹、三枝大輔
2. 発表標題 ヒト前房水の細胞外小胞由来リポドームを標的とした緑内障早期診断マーカー探索
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024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
研究分担者	中澤 徹 (Nakazawa Toru) (30361075)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	國分 太貴 (Kokubun Taiki) (30646443)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	矢花 武史 (Yabana Takeshi) (30725213)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	佐藤 孝太 (Sato Kota) (50732327)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	津田 聡 (Tsuda Satoru) (60791093)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	前川 重人 (Maekawa Shigeto) (80625294)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	三枝 大輔 (Saigusa Daisuke) (90545237)	帝京大学・薬学部・准教授 (32643)	

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