

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462745

研究課題名(和文) 網羅的糖鎖解析グライコムクスによるぶどう膜炎炎症増悪マーカー探索

研究課題名(英文) Exploratory research about intraocular inflammation refractory marker using newly developed carbohydrate structural analysis; Glycoblottointing

研究代表者

南場 研一 (NAMBA, KENICHI)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：70333599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々はぶどう膜炎の発症時に特異的に上昇する糖鎖について検討をおこなった。インフリキシマブ導入後もぶどう膜炎を生じる患者、特に抗インフリキシマブ抗体が陽性患者、およびコントロールとしてインフリキシマブ導入後経過良好な患者の血清について、新しい糖鎖構造解析グライコブロットティング法をもちいて網羅的糖鎖解析をおこなった。2群間比較でm/z1680, m/z2337, m/z2379, m/z3195の4つの糖鎖において比較的明確な差異が認められ、いずれも無効例に多くみられるという結果であった。

研究成果の概要(英文)：In this study we examined about the specific carbohydrate chains associated with refractory intraocular inflammations. Glycoblottointing which was newly developed carbohydrate structural analysis was performed with the serum of 2 groups; 1) Behcet's disease patients who were refractory to infliximab treatment and were positive of anti-infliximab antibody. 2) Behcet's disease patients who were well controlled with infliximab treatment. Four carbohydrate chains; m/z1680, m/z2337, m/z2379, m/z3195 were detected with significant difference between 2 groups, and all of them were increased in refractory patients.

研究分野：ぶどう膜炎

キーワード：網膜ぶどう膜炎 ベーチェット病 糖鎖解析 炎症増悪マーカー

1. 研究開始当初の背景

糖鎖修飾は蛋白質の動的な構造・機能制御機構にとって重要な生合成機構であり、糖鎖解析の研究は、癌、免疫、感染症、再生医療、生活習慣病などにおける病態の解明、そして早期診断、予後判定、治療指針の判断、新薬ターゲットの同定などに繋がっていくと考えられている。しかし、これまでの糖鎖構造解析にはピリジルアミノ(PA)化法が最も用いられてきたが、時間がかかる上、複雑な作業を要し、一部の糖鎖が欠落する可能性があるのが問題点であった。新しく開発された糖鎖構造解析技術であるグライコプロッティング法では、糖鎖捕捉から網羅的構造解析までの工程を半日以内で完了でき、糖鎖の欠落がなく、大量の検体(100検体)を一度に解析できる、といった点で優れている。現在、これだけの検体量を短期間に精製、解析できる装置は他に存在しない。

これまでに我々はぶどう膜炎では健常人と比較して変動する糖鎖が存在することを明らかにしてきた。例えば2本鎖糖鎖はぶどう膜炎では増加、ハイマンノース糖鎖は逆に減少していた。また、マウス実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎では、発症とともに変動する糖鎖がみられることを明らかにした。

2. 研究の目的

我々は新しい糖鎖構造解析グライコプロッティング法をもちいて、ベーチェット病などぶどう膜炎患者血清中の糖鎖が変動していることを見いだした。しかしながら、その変動が何を意味しているのか不明である。今回我々は、ぶどう膜炎患者血清を用いて網羅的糖鎖解析をおこない、炎症増悪マーカーとなる糖鎖について探索をすすめることとした。

3. 研究の方法

(1)患者血清の収集

患者同意の下、ぶどう膜炎患者(ベーチェット病、サルコイドーシス、原田病、HLA-B27関連ぶどう膜炎を含む)の炎症増悪期、炎症寛解期の血清を収集する。糖鎖は性別、罹病期間、治療内容などにより変動することが予想されるためそれぞれ採血時の状況について詳細なデータ収集をおこなう。

(2)ベーチェット病における抗インフリキシマブ抗体測定

ベーチェット病ではインフリキシマブによる治療が多くの患者において奏効するが、中には治療抵抗性の患者がみられる。治療抵抗性には抗インフリキシマブ抗体の関与が示唆されており、そのことと糖鎖変化について検討する。

(3)グライコムクス結果解析

グライコプロッティング法は大量の検体から一度に40種類の糖鎖を網羅的に解析する手法であるため得られる結果も膨大である。データ解析用の専用のソフトウェアを有

するコンピュータによるデータ解析をおこなう。特に採血時の患者情報との解析が重要であり、以下の項目について検討をおこなう。

4. 研究成果

インフリキシマブ導入後もぶどう膜炎を生じる患者の血清について、新しい糖鎖構造解析グライコプロッティング法をもちいて網羅的糖鎖解析をおこなった。なお、コントロールとしてインフリキシマブ治療導入によりぶどう膜炎が生じなくなったベーチェット病患者の血清をもちいた。

インフリキシマブ導入が必要であった眼炎症発作を繰り返すベーチェット病患者は34例であり、そのうち25例はインフリキシマブ導入後にはぶどう膜炎はみられなくなった(有効例)が、9例ではインフリキシマブ導入後もぶどう膜炎がみられた(無効例)。抗インフリキシマブ抗体について検討したところ、有効例25例では検出されず、無効例9例中4例で抗インフリキシマブ抗体がみられた。

患者血清について網羅的糖鎖解析をおこなったところ、検出を試みた70糖鎖のうち、有効例では53糖鎖、無効例では56糖鎖が検出され、そのうち40糖鎖について糖鎖ピークに有意な相関係数が得られた。2群間比較では、m/z1680, m/z2337, m/z2379, m/z3195の4つの糖鎖において比較的明確な差異が認められ、いずれも無効例に多くみられるという結果であった。

無効例に多くみられた4つの糖鎖はぶどう膜炎の発症マーカーとなる可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計18件)

1. Hase K, Namba K, Saito W, Ohno S, Ishida S. A case of tuberculous endophthalmitis successfully treated with vitrectomy followed by antituberculous agents. *J Ophthalmic Inflamm Infect.* 2015; 5: 14. 査読有. doi: 10.1186/s12348-015-0046-z
2. Hirooka K, Saito W, Namba K, Mizuuchi K, Iwata D, Hashimoto Y, Ishida S. Significant role of the choroidal outer layer during recovery from choroidal thickening in Vogt-Koyanagi-Harada disease patients treated with systemic corticosteroids. *BMC Ophthalmol.* 2015; 15: 181. 査読有. doi: 10.1186/s12886-015-0171-3
3. Hirooka K, Saito W, Namba K, Takemoto Y, Mizuuchi K, Uno T, Tagawa Y, Hashimoto Y, Ishida S. Relationship

- between choroidal blood flow velocity and choroidal thickness during systemic corticosteroid therapy for Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2015; 253: 609-617. 査読有. doi: 10.1007/s00417-014-2927-5
4. Saito S, Saito W, Saito M, Hashimoto Y, Mori S, Noda K, Namba K, Ishida S. Acute zonal occult outer retinopathy in Japanese patients: Clinical features, visual function, and factors affecting visual function. *PLoS One.* 2015; 10: e0125133. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0125133
 5. Tagawa Y, Namba K, Ogasawara R, Kanno H, Ishida S. A case of mature natural killer-cell neoplasm manifesting multiple choroidal lesions - Primary intraocular NK-cell lymphoma. *Case Rep Ophthalmol.* 2015; 21: 380-384. 査読有. doi: 10.1159/000442018
 6. Takase H, Goto H, Mizuki N, Mizuuchi K, Namba K, Ohguro N, Okada A, Sonoda K, Tomita M, Keino H, Kezuka T, Kubono R, Shibuya E, Takahashi H, Yanai R, Mochizuki M. Development and validation of new diagnostic criteria for acute retinal necrosis. *Jpn J Ophthalmol.* 2015; 59: 14-20. 査読有. doi: 10.1007/s10384-014-0362-0
 7. Namba K, Goto H, Kaburaki T, Kitaichi N, Mizuki N, Asukata Y, Fujino Y, Meguro A, Sakamoto S, Shibuya E, Yokoi K, Ohno S. A major review: current aspects of ocular Behçet's disease in Japan. *Ocul Immunol Inflamm.* 2015; 23: S1-S23. 査読有. doi: 10.3109/09273948.2014.981547
 8. Dong Z, Iwata D, Kitaichi N, Takeuchi M, Sato M, Endo N, Iwabuchi K, Ando R, Fukuhara J, Kinoshita S, Lennikov A, Kitamura M, Mizuuchi K, Kanda A, Noda K, Namba K, Yamagishi S, Ohno S, Ishida S. Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis by inhibition of glyceraldehyde derived-advanced glycation end product formation. *J Leukoc Biol.* 2014; 96: 1077-1085. 査読有. doi: 10.1189/jlb.3A0513-288RRR
 9. International Team for the Revision of the International Criteria for Behçet's Disease (ITR-ICBD). Davatchi F, Assaad-Khalil S, Calamia KT, Crook JE, Sadeghi-Abdollahi B, Namba K (42 番目) et al 計63名. The International Criteria for Behçet's Disease (ICBD): a collaborative study of 27 countries on the sensitivity and specificity of the new criteria. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014; 28: 338-347. 査読有. doi: 10.1111/jdv.12107. Epub 2013 Feb 26
 10. Kaburaki T, Namba K, Sonoda KH, Kezuka T, Keino H, Fukuhara T, Kamoi K, Nakai K, Mizuki N, Ohguro N, Ohno S, Kitaichi N, Keino H, Okada AA, Watanabe T, Takeda A, Ishibashi T, Yawata K, Iwahashi C, Mochizuki M, Sugita S, Goto H, Takamoto M, Nakahara H, Kondo Y, Shibuya E, Kimura I. Behçet's disease ocular attack score 24: evaluation of ocular disease activity before and after initiation of infliximab. *Jpn J Ophthalmol.* 2014; 58: 120-130. 査読有. doi: 10.1007/s10384-013-0294-0
 11. Lennikov A, Kitaichi N, Noda K, Mizuuchi K, Ando R, Dong Z, Fukuhara J, Kinoshita S, Namba K, Ohno S, Ishida S. Amelioration of endotoxin-induced uveitis treated with the sea urchin pigment echinochrome in rats. *Mol Vis.* 2014; 20: 171-177. 査読有. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3919668/>
 12. Takeuchi M, Kezuka T, Sugita S, Keino H, Namba K, Kaburaki T, Maruyama K, Nakai K, Hijioka K, Shibuya E, Komae K, Hori J, Ohguro N, Sonoda KH, Mizuki N, Okada AA, Ishibashi T, Goto H, Mochizuki M. Evaluation of the long-term efficacy and safety of infliximab treatment for uveitis in Behçet's disease: a multicenter study. *Ophthalmology.* 2014; 121: 1877-1884. 査読有. doi: 10.1016/j.ophtha.2014.04.042
 13. Iwahashi -Shima C, Azumi A, Ohguro N, Okada A. A, Kaburaki T, Goto H, Sonoda K, Namba K, Mizuki N, Mochizuki M. Acute retinal necrosis: factors associated with anatomic and visual outcomes. *Jpn J Ophthalmol.* 2013; 57: 98-103. 査読有. doi: 10.1007/s10384-012-0211-y
 14. Jin XH, Namba K, Saito W, Iwata D, Ishida S. Bacterial endophthalmitis caused by an intraocular cilium in a patient under treatment with infliximab. *J Ophthalmic Inflamm and Infect.* 2013; 3:50. 査読有. doi: 10.1186/1869-5760-3-50
 15. Kase S, Namba K, Kitaichi N, Iwata D, Ohno S, Ishida S. Clinical features of human T lymphotropic virus type-1 associated uveitis in Hokkaido, Japan. *Jpn J Ophthalmol.* 2013; 57:

- 379-384. 査読有. doi:
10.1007/s10384-013-0244-x
16. Lee YJ, Horie Y, Wallace GR, Choi YS, Park JA, Song R, Kang YM, Kang SW, Baek HJ, Kitaichi N, Meguro A, Mizuki N, Namba K, Ishida S, Kim J, Niemczek E, Lee EY, Song YW, Ohno S, Lee EB. Genome-wide association study identifies GIMAP as a novel susceptibility locus for Behçet's disease. *Ann Rheum Dis.* 2013; 72: 1510-1516. 査読有. doi:
10.1136/annrheumdis-2011-200288
 17. Mizuuchi K, Kitaichi N, Namba K, Horie Y, Ishida S, Ohno S. Trabecular meshwork depigmentation in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Jpn J Ophthalmol.* 2013; 57: 245-251. 査読有. doi: 10.1007/s10384-012-0229-1
 18. Takemoto Y, Namba K, Mizuuchi K, Ohno S, Ishida S. Two cases of subfoveal choroidal neovascularization with tubulointerstitial nephritis and uveitis (TINU) syndrome. *Eur J Ophthalmol.* 2013; 23: 255-257. 査読有. doi: 10.5301/ejo.5000240.
- [学会発表] (計 27 件)
1. Kase S, Namba K, Mizuuchi K, Iwata D, Kitaichi N, Ohno S, Ishida S. Clinicopathological study on epiretinal membrane of ocular sarcoidosis. AAO (American Academy of Ophthalmology) 2015. 2015/11/14-17. Sands Expo (Las Vegas, USA)
 2. Kase S, Namba K, Iwata D, Mizuuchi K, Ishida S. Diagnostic efficacy of cell block method for vitreoretinal lymphoma. 13th IOIS (International Ocular Inflammation Society), 2015/9/25-27, Hilton San Francisco Union Square (San Francisco, USA)
 3. Namba K. Choroidal circulation. Symposium: Imaging in Behçet's disease. Uveitis Workshop 2015, 2015/5/15, Radisson Blu Hotel (Cebu, Philippines)
 4. Namba K. Biologics for uveitis associated with Behçet's disease in Japan. Retina Symposium. Taiwan Academy of Ophthalmology 2015 Spring Scientific Congress. 2015/3/22. NTUH International Convention Center (Taipei, Taiwan)
 5. Namba K. The appearance of antibodies to infliximab in the course of infliximab administration in Behçet's disease. 9th Japan-Korea International Symposium in Ophthalmology. 2014/12/1. Hokkaido University (Sapporo Japan)
 6. Horie Y, Meguro A, Ohta T, Lee EB, Namba K, Mizuki N, Ishida S, Ohno S, Kitaichi N. HLA-B*51 carrier is susceptible to Behçet's disease and its ocular lesions in East Asian population. 16th International Conference on Behçet's disease. 2014/9/18-20. Cite Internationale Universitaire de Paris (Paris France)
 7. Kitaichi N, Lennikov A, Noda K, Mizuuchi K, Namba K, Ohno S, Ishida S. Amelioration of endotoxin-induced uveitis treated with the sea urchin pigment echinochrome. 16th International Conference on Behçet's disease. 2014/9/18-20. Cite Internationale Universitaire de Paris (Paris France)
 8. Namba K, Mizuuchi K, Takemoto Y, Tagawa Y, Uno T, Fukuhara T, Ohno S, Kitaichi N, Ishida S. The appearance of antibodies to infliximab in the course of infliximab administration in Behçet's disease. 16th International Conference on Behçet's disease. 2014/9/18-20. Cite Internationale Universitaire de Paris (Paris France)
 9. Kaburaki T, Namba K, Sonoda K, Kezuka T, Keino H. Reasons of the application of infliximab therapy to the patients with ocular behçet's disease. World Ophthalmology Congress 2014 Tokyo. 2014/4/2-4. 東京国際フォーラム (Tokyo, Japan)
 10. Mizuuchi K, Namba K, Takemoto Y, Ohno S, Ishida S. Correlation between ocular inflammatory attacks and serum trough level of infliximab or serum concentration of cytokines in the clinical course of behçet's disease patients with infliximab treatment. World Ophthalmology Congress 2014 Tokyo. 2014/4/2-4. 東京国際フォーラム (Tokyo, Japan)
 11. Kaburaki T, Namba K, Sonoda S, Kezuka T, Keino H, Fukuhara T, Kamoi K, Nakai, K, Mizuki N, Ohguro N. Evaluation of ocular disease activities using Behçet's disease ocular attack score 24 before and after infliximab. 12th International Ocular Inflammation Society (IOIS) Congress/ 2nd International Assembly of Ocular Inflammation Societies/ 27th Spanish Uveitis Study Group Meeting. 2014/2/27-3/1. Valencia Conference Center (Valencia, Spain)
 12. Namba K. Recent advances in the

- etiopathogenesis and management of ocular Behcet's disease : Novel scoring system of ocular lesions in Behcet's disease. World Ophthalmology Congress 2014. 2014/4/3. 東京国際フォーラム(東京都、千代田区)
13. Namba K. Paradigm shift in the treatment of ocular Behcet's disease. 12th International Ocular Inflammation Society (IOIS) Congress/ 2nd International Assembly of Ocular Inflammation Societies/ 27th Spanish Uveitis Study Group Meeting. 2014/3/1. Group Meeting. 2014/2/27-3/1. Valencia Conference Center (Valencia, Spain)
 14. 水内一臣、南場研一、竹本裕子、田川義晃、宇野友絵、岩田大樹、北市伸義、大野重昭、石田 晋. 抗インフリキシマブ抗体価の上昇とともに眼発作と投与時反応がみられたベーチェット病. 第 68 回日本臨床眼科学会. 2014/11/13-16. 神戸ポートピアホテル(兵庫県、神戸市)
 15. 蕪城 俊克、南場 研一、園田 康平、毛塚剛司、慶野 博、福原 崇子、鴨居 功樹、中井 慶、Ocular Behcet Disease Research Group of Japan. 新しい Behcet 病ぶどう膜炎の活動性スコアによる評価の再現性の検討. 第 118 回日本眼科学会総会. 2014/4/2-6. 東京国際フォーラム(東京都、千代田区)
 16. Hase K, Namba K, Saito W, Takemoto Y, Mizuuchi K, Ohno S, Ishida S. A Case of tuberculous endophthalmitis. International Workshop on Granulomatous Uveitis and Ocular Behcet's disease and Asia-Pacific Intraocular Inflammation Study Group. 2013/4/12-14. Han Hsten International Hotel (Kaohsiung, Taiwan)
 17. 宇野友絵、南場研一、齋藤 航、水内一臣、福原崇子、田川義晃、石田 晋. ぶどう膜炎を合併した急性帯状潜在性網膜外層症の 1 例. 第 67 回 臨床眼科学会. 2013/10/31-11/3. パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)
 18. 蕪城俊克、南場研一、園田康平、毛塚剛司、慶野 博、福原崇子、鴨居功樹、中井慶、水木信久、大黒伸行. ベーチェット病眼発作スコア 24 によるインフリキシマブ治療前後の疾患活動性の評価. 第 67 回 臨床眼科学会. 2013/10/31-11/3. パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)
 19. 高橋明裕、齋藤 航、岩田大樹、齋藤理幸、南場研一、神田敦宏、石田 晋. 平滑筋肉腫による腫瘍随伴網膜症の 1 例. 第 67 回 臨床眼科学会. 2013/10/31-11/3. パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)
 20. 水内一臣、南場研一、齋藤 航、堀江幸弘、田川義晃、宇野友絵、竹本裕子、福原崇子、北市伸義、石田 晋. ぶどう膜炎に続発した血管増殖性網膜腫瘍の 2 症例. 第 67 回 臨床眼科学会. 2013/10/31-11/3. パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)
 21. 田川 義晃、南場 研一、水内 一臣、宇野友絵、加瀬 諭、福原 崇子 齋藤 航、石田 晋. 両眼に多発性脈絡膜腫瘍を呈した NK 細胞リンパ腫の一例. 第 31 回 眼腫瘍学会. 2013/9/14-15. 総合あんしんセンター. (高知県、高知市)
 22. 福原淳一、加瀬 諭、野田実香、南場研一、畑中佳奈子、石田 晋. 血管新生緑内障を合併した眼内悪性リンパ腫の 2 例. 第 31 回 眼腫瘍学会. 2013/9/14-15. 総合あんしんセンター. (高知県、高知市)
 23. 福原崇子、吉川 洋、武田篤信、吉村 武、吉本五一、宮本敏浩、南場研一、石田 晋、石橋竜朗. 原発性眼内悪性リンパ腫に対する初回拡大治療の効果. 第 31 回 眼腫瘍学会. 2013/9/14-15. 総合あんしんセンター. (高知県、高知市)
 24. 田川義晃、南場研一、齋藤 航、水内一臣、北市伸義、大野重昭、石田 晋. 脈絡膜新生血管を合併しベバシズマブ硝子体注射を要した小児原田病の 1 例. フォーサム 2013 大阪. 2013/7/12-14. 大阪国際会議場. (大阪府、大阪市)
 25. 大口剛司、新明康弘、新田卓也、山本麻梨亜、南場研一、大野重昭、陳 進輝、石田 晋. 周辺虹彩前癒着を伴うぶどう膜炎に続発した緑内障に対する suture-trabeculotomy の成績. 第 117 回 日本眼科学会. 2013/4/4-7. 東京国際フォーラム. (東京都、千代田区)
 26. 南場研一、北市伸義、安藤 亮、竹本裕子、水内一臣、堀江幸弘、大野重昭、天野麻穂、西村紳一郎、石田 晋. ぶどう膜炎における網羅的糖差解析. 第 117 回 日本眼科学会. 2013/4/4-7. 東京国際フォーラム. (東京都、千代田区)
 27. 水内一臣、竹本裕子、南場研一、宇野友絵、大野重昭、石田 晋. ベーチェット病眼炎症発作とインフリキシマブトラフ値・サイトカイン血中濃度との相関. 第 117 回 日本眼科学会. 2013/4/4-7. 東京国際フォーラム. (東京都、千代田区)
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者

南場 研一 (NAMBA KENICHI)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：70333599
 - (2) 研究分担者

北市 伸義 (KITAICHI NOBUYOSHI)
北海道医療大学・個体差医療科学センター・教授
研究者番号：40431366

西村 紳一郎 (NISHIMURA SHINICHIRO)
北海道大学・先端科学研究科(研究院)・
教授
研究者番号：00183898

天野 麻穂 (AMANO MAHO)
北海道大学・先端生命科学研究科 (研究
院)・特任助教
研究者番号：80365808

(3) 連携研究者
なし