

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670758

研究課題名(和文) 脂質メタボロミクスによる眼表面炎症疾患の病態解明ならびに疾患マーカーの探索

研究課題名(英文) Analysis of Pathogenesis and disease marker of ocular surface inflammatory diseases using lipid metabolomics

研究代表者

木下 茂 (KINOSHITA, SHIGERU)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30116024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脂質メタボロミクスの手法を用いて生体内の脂質メディエーターの解析を行い、眼表面炎症疾患の病態を解析するとともに生体内の代謝産物を指標とした疾患マーカーの発見を行った。具体的には、アトピー性角結膜炎、眼合併症型Stevens-Johnson症候群(SJS)、ならびに、正常コントロールの血漿中脂質プロファイリングを明らかにした。さらに眼表面炎症疾患患者と健常者の比較、ならびに、眼表面炎症疾患の各疾患毎の違いを明らかにし、各眼表面炎症疾患の病態に関わる分子を同定し、また疾患マーカーの候補をいくつか見つけることができた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the lipid mediator of ocular surface inflammatory diseases using lipid metabolomics techniques and elucidate the plasma lipid profiling of atopic keratoconjunctivitis, eye complications type Stevens-Johnson syndrome, and healthy controls. We also compare between each ocular surface inflammatory disease and normal controls, and between various ocular surface inflammatory diseases, and found the difference in ocular surface inflammatory diseases. We also identified the molecules involved in the pathogenesis of ocular surface inflammatory diseases and the related specific marker of them.

研究分野：眼科学

キーワード：眼表面炎症性疾患 脂質メディエーター メタボロミクス

## 1. 研究開始当初の背景

脂質は生体膜の主要な構成成分であり、エネルギー源となるだけでなく、脂質メディエーターとして生体防御において重要な役割を果たしている。プロスタグランジン(PG)は、代表的な脂質メディエーターの一つである。近年、ポストゲノムサイエンスにおいて、細胞内にあるこれらの脂質代謝物を分析する手法として脂質メタボロミクスが注目されている。

申請者らは、今まで脂質メディエーターの受容体に着目して眼表面炎症疾患の病態解析を行い、アレルギー性結膜炎や Stevens-Johnson 症候群 (SJS) などの様々な眼表面炎症疾患の病態に、脂質メディエーターである PG が関与していることを解明してきた。具体的には、重篤な眼表面炎症を生じる SJS の発症には、PG の産生を抑制する非ステロイド系抗炎症薬を含んだ感冒薬が関与していること、また、SJS 発症に PGE<sub>2</sub> 受容体の一つである PTGER3 遺伝子の遺伝子多型が強く関連すること (Ueta 2010 JACI, Ueta 2012 JACI) (次頁図 1)、SJS 患者眼表面組織では、EP3 (PTGER3 の蛋白) の発現が著明に減弱していることを明らかにした (Ueta 2010 JACI, Ueta 2012 PLoS One) (次頁図 2)。アレルギー性結膜炎マウスモデルを用いた解析では、PGE<sub>2</sub> が EP3 を介してアレルギー炎症を抑制していることを明らかとした (Ueta 2009 JACI) (次頁図 3)。

本研究では、眼表面炎症疾患の病態における脂質メディエーターの役割を明らかにするために、受容体の解析に加えて脂質メディエーター自体の病態における変化を解析する。そして、脂質メディエーターの病態への関与の証明、生体内の代謝産物を指標とした疾患マーカーの探索を行う。

## 2. 研究の目的

近年、ポストゲノムサイエンスにおいて、生体内に存在する全代謝産物を網羅的に解析するメタボロミクスが、様々な疾患の病態解明の新しい手法として注目されている。申請者らは、今まで脂質メディエーターの受容体に着目して解析を行い、アレルギー性結膜炎や Stevens-Johnson 症候群などの様々な眼表面炎症疾患の病態に、プロスタグランジンをはじめとした脂質メディエーターが大きく関与していることを解明してきた。本研究では、受容体の解析に加えて、新たに脂質メタボロミクスの手法を用いて生体内での脂質メディ

エーターの解析を行い、眼表面炎症疾患の病態を解析するとともに生体内の代謝産物を指標とした疾患マーカーの発見につなげる。また、得られたメタボロミクスの解析結果は、すでに得られているゲノム解析、遺伝子発現解析、蛋白発現解析の結果と組み合わせることで、多層的疾患オミクスの形成が可能となり、今までの手法では明らかにできなかった発症機序の解明につながることを期待される。

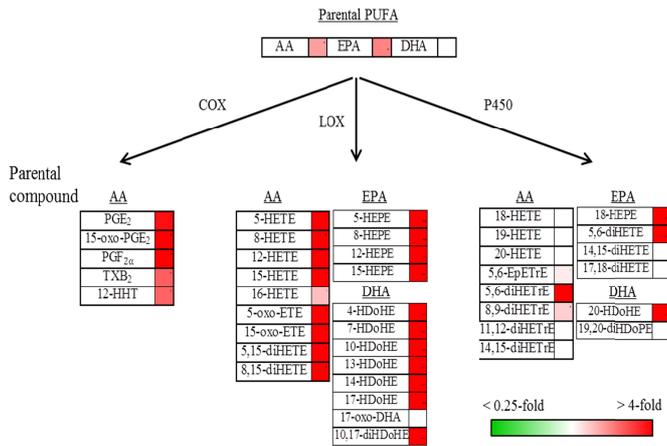
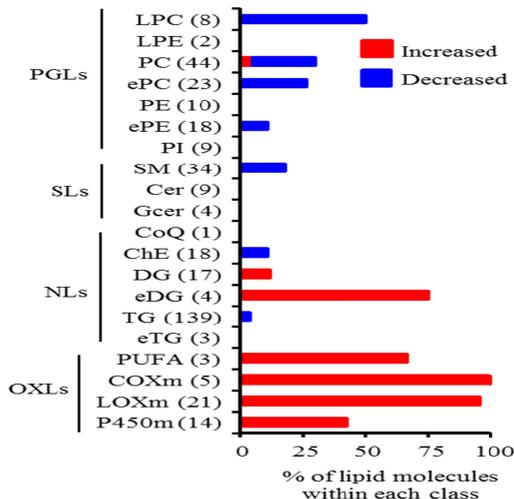
## 3. 研究の方法

十分なインフォームドコンセントの上、同意をいただいたアトピー性角結膜炎患者、SJS などの様々な眼表面炎症疾患患者の血漿を京都府立医科大学で採取した。得られた血漿サンプルは、国立医薬品食品衛生研究所にて、脂質メタボロミクスの手法を用いて解析した。具体的には、血漿 100  $\mu$ L をそれぞれ内部標準物質 (IS) 存在下、中性条件で Bligh & Dyer 法により脂溶性代謝物を抽出し、下層 (有機層) 及び上層 (水層) を分取した。グリセロリン脂質 (GPL)・スフィンゴ脂質 (SP)・中性脂質等の脂溶性の高い代謝物を含む下層は、超高性能液体クロマトグラフ - 飛行時間型質量分析計 (UPLC-TOFMS) を用いて、脂質代謝物を網羅的に相対定量した。並行して、GPL、SP の脂肪酸の組成を同定する目的で、超高性能液体クロマトグラフ - イオントラップ型質量分析計 (UPLC-OrbiTrap) を用いて、同定された脂質代謝物の構造解析を行った。酸化脂肪酸 (oxFA) を含む上層は、さらに固相抽出を行い、ギ酸メチル画分を分取し、これを超高速液体クロマトグラフ - 三連四重極リニアイオントラップ型質量分析計 (UPLC-MS/MS) を用いたネガティブイオンモードでの多重反応モニタリング法にて測定した。データ解析として、UPLC-TOFMS により得られたデータは 2DICAL を用いてピークを抽出し、UPLC-TOFMS の保持時間、精密質量及びマススペクトル、さらに UPLC-OrbiTrap の構造解析のデータに基づき、代謝物の同定を行った。相対定量には、IS により補正を行った全ピークの height 値を用いた。UPLC-MS/MS より得られたデータは、MultiQuant を用いて検出された代謝物ピークの面積値を求めた後、IS により抽出操作の補正を行ったピーク値を用いた。

## 4. 研究成果

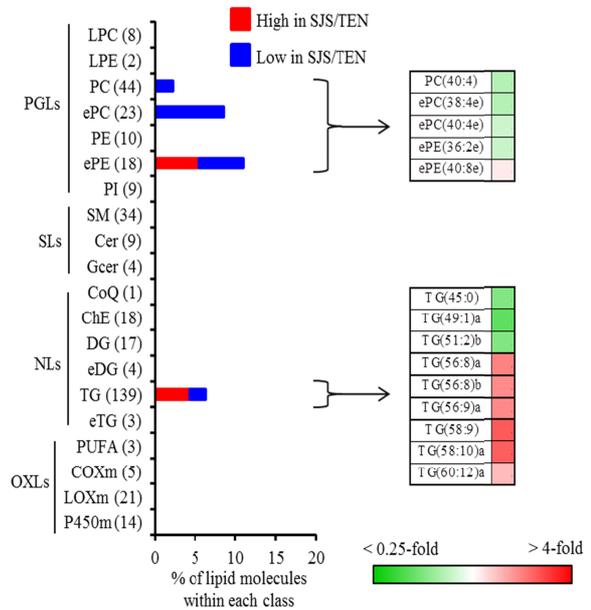
### 血漿脂質プロファイリング

アトピー性角結膜炎、眼合併症型 Stevens-Johnson 症候群 (SJS)、ならびに、正常コントロールの血漿中脂質プロファイリングを解析したところ、114 グリセロリン脂質、47 スフィンゴ脂質、182 中性脂質及び 43 オキシリピンを含む 386 の脂質分子が検出された。また、これらの脂質分子は、LPC、LPE、PC、EPC、PE、EPE、PI、SM、Cer、Gcer、CoQ、コリンエステラーゼ、DG、エーテル型 DG (EDG)、TG、エーテル型 TG (ETG)、PUFA、COX 代謝産物、LOX 代謝物および P450 代謝物を含んでいた。



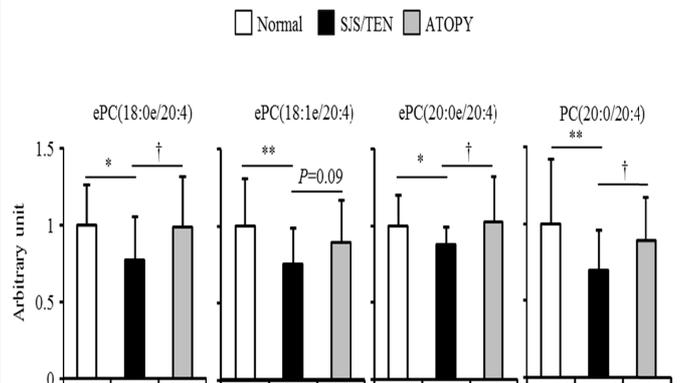
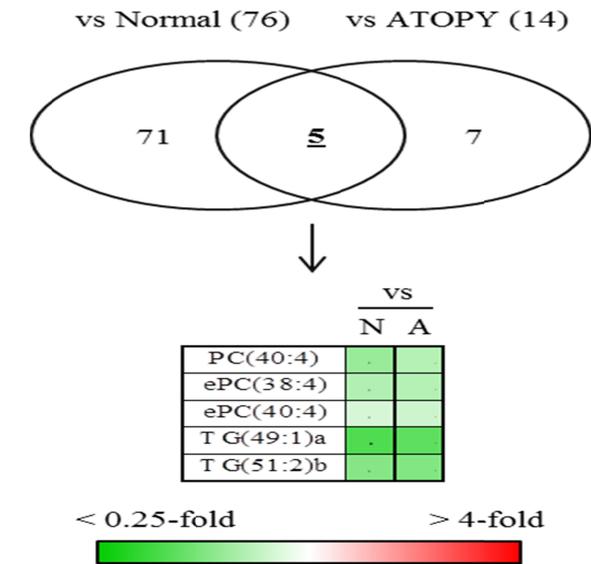
### SJS 患者と健康なボランティアの間で血漿脂質プロファイリングの比較

76 脂質分子 (同定された脂質分子の 19.7%) は、SJS 患者と健康ボランティアとの間に有意差が認められました。SJS 患者において 36 脂質分子 (全体の 9.3%) のレベルが低かったのに対し、40 脂質分子 (全体の 10.4%) は、より高いレベルを示した。SJS 患者では LPC、PC、EPC、EPE などグリセロリン脂質が低く、PC(34:2)+0 や PC(36:2)+0 などの oxidized PC が高い傾向をしめした。



### SJS 患者とアトピー性角結膜炎患者間の血漿脂質プロファイリングの比較

SJS 患者とアトピー性角結膜炎患者では、14 の脂質分子 (同定された脂質分子の 3.6%) で有意な差が認められた。SJS 患者で 7 脂質分子が低く、7 脂質分子が高い傾向を示した。



## 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 4件)

1. Kohanim S, Palioura S, Saeed HN, Akpek EK, Amescua G, Basu S, Blomquist PH, Bouchard CS, Dart JK, Gai X, Gomes JA, Gregory DG, Iyer G, Jacobs DS, Johnson AJ, Kinoshita S, Mantagos IS, Mehta JS, Perez VL, Pflugfelder SC, Sangwan VS, Sippel KC, Sotozono C, Srinivasan B, Tan DT, Tandon R, Tseng SC, Ueta M, Chodosh J. Acute and Chronic Ophthalmic Involvement in Stevens-Johnson Syndrome/Toxic Epidermal Necrolysis - A Comprehensive Review and Guide to Therapy. II. Ophthalmic Disease. *Ocul Surf.* 2016 ;14(2):168-88.. doi:10.1016/j.jtos.2016.02.001. (査読有)
2. Kohanim S, Palioura S, Saeed HN, Akpek EK, Amescua G, Basu S, Blomquist PH, Bouchard CS, Dart JK, Gai X, Gomes JA, Gregory DG, Iyer G, Jacobs DS, Johnson AJ, Kinoshita S, Mantagos IS, Mehta JS, Perez VL, Pflugfelder SC, Sangwan VS, Sippel KC, Sotozono C, Srinivasan B, Tan DT, Tandon R, Tseng SC, Ueta M, Chodosh J. Stevens-Johnson Syndrome/Toxic Epidermal Necrolysis - A Comprehensive Review and Guide to Therapy. I. Systemic Disease. *Ocul Surf.* 2016 ;14(1):2-19. doi: 10.1016/j.jtos.2015.10.002. (査読有)
3. Jain R, Sharma N, Basu S, Iyer G, Ueta M, Sotozono C, Kannibiran C, Rathi VM, Gupta N, Kinoshita S, Gomes JA, Chodosh J, Sangwan VS. Stevens Johnsons Syndrome: The Role of an Ophthalmologist. *Surv Ophthalmol.* 2016 Jan 29. doi: 10.1016/j.survophthal.2016.01.004 (査読有)
4. Ueta M, Shoji J, Sotozono C, Kinoshita K. Downregulation of IL-8, ECP, and total IgE in the tears of patients with atopic keratoconjunctivitis treated with rebamipide eyedrops. *Clinical and Translational Allergy*, 2014;4:40. doi:10.1186/2045-7022-4-40 (査読有)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 特になし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

木下 茂 (KINOSHITA Shigeru)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：30116024

(2)研究分担者

斎藤 嘉朗 (SAITOU Yoshiro)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・部長

研究者番号：50215571

(3)研究分担者

上田 真由美 (UETA Mayumi)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60398386