

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861463

研究課題名(和文)サルコイドーシスの病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of the pathogenesis of sarcoidosis

研究代表者

永田 健児(Nagata, Kenji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究員)・助教

研究者番号：00457988

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)：アクネ菌が眼サルコイドーシスに関与するかどうか検討するため、生検した網膜を用いて、アクネ菌に特異的なPAB抗体による免疫組織化学での検討を行った。サルコイドーシス群では82%の症例において網膜内にPAB陽性の円形体を認めた。一方コントロール群では1例も検出せず、アクネ菌の眼サルコイドーシスへの関与を強く示唆する結果が得られた。また、肉芽は網膜内層に主に認められ、血管周囲に目立つことから、眼サルコイドーシスの病態としてアクネが網膜血管を介して血行性に網膜に到達し、マクロファージやCD4陽性細胞による肉芽形成されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate whether *Propionibacterium acnes* is an etiological agent for sarcoid uveitis, retinal sections were immunohistochemically analyzed with a *P. acnes*-specific monoclonal antibody (PAB antibody). *P. acnes*, identified as round bodies that reacted with the PAB antibody, were present in 9/11 patients (82.0%) with sarcoidosis. In the control group, no round bodies were detected. Our results suggested that *P. acnes* could be a cause of sarcoid uveitis. Granulomas were mainly located in the inner retinal layer. In some cases, inflammatory cells, which were positive for CD4 or CD68, infiltrated conspicuously in the perivascular area in the inner retinal layer. We hypothesize that sarcoid granulomas may be formed by an immune response to *P. acnes* hematogenously transmitted to the retina.

研究分野：ぶどう膜炎

キーワード：サルコイドーシス ぶどう膜炎 *Propionibacterium acnes*

1. 研究開始当初の背景

(1) サルコイドーシス患者では肺とリンパ節において *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) の検出率が高いことがこれまでに分離培養、PCR で報告されており、さらに *P. acnes* に特異的に結合する PAB 抗体を用いた免疫組織化学的検討により肺およびリンパ組織においてその存在を明らかにされており¹⁾、病因として最も有力なものと考えられていた。ただし、*P. acnes* は常在菌であり、肺やリンパ節においては対照群からも検出されているため病因として特定するに至っていなかった。

(2) ぶどう膜炎の代表的臨床症状としては、血管炎による網膜血管の透過性亢進に始まる黄斑浮腫や硝子体混濁による視力低下が挙げられる。我々はサルコイドーシス内眼炎の硝子体液中のサイトカインを 27 種類測定し、IP-10、MCP-1、IL-1ra、IL-6、IL-8、VEGF などが対照群に比べて特に濃度が高いことを報告した²⁾。特に黄斑浮腫に関しては硝子体中のサイトカインが関与することが考えられるが、特にどのサイトカインが黄斑浮腫に関係するかは十分な検討がなされていなかった。

2. 研究の目的

(1) サルコイドーシスは原因不明の多臓器疾患で、病理組織学的に非乾酪性類上皮細胞肉芽腫が見られることを特徴とする疾患である。その原因として *P. acnes* の関与が示唆される臓器病態も知られるが、ぶどう膜炎においてはその検証は全く不十分であった。本研究では本来無菌であるはずの眼内組織を用いて *P. acnes* がサルコイドーシス内眼炎に関与するか検証した。

(2) ぶどう膜炎による黄斑浮腫と関与する硝子体中のサイトカインを網羅的に解析し、新規治療ターゲットを検索した。

3. 研究の方法

(1) PAB 抗体は *P. acnes* に特異的に反応することが報告されている。*P. acnes* がサルコイドーシスぶどう膜炎に関与するかどうかを検討するため、サルコイドーシスぶどう膜炎の症例において生検した網膜を用いて、PAB 抗体で免疫染色を行い網膜内に *P. acnes* が存在するかどうかを検討した。対照群としては裂孔原性網膜剥離における弁状裂孔の部位の生検を行い比較した。CD4、CD68 などのマーカーを用いて、網膜内の肉芽腫の構成細胞を検討した。

(2) サルコイドーシスぶどう膜炎の硝子体手術時と術後 3 か月の硝子体液に対し multiplex ELISA を行った。その結果、手術前後で変化したサイトカインプロファイルから、黄斑浮腫の程度と相関のあるサイトカ

インを検索した。対照として黄斑上膜あるいは黄斑円孔の硝子体液と比較した。また、黄斑浮腫の定量は spectral domain Optical Coherence Tomography (SD-OCT) にて行った。

4. 研究成果

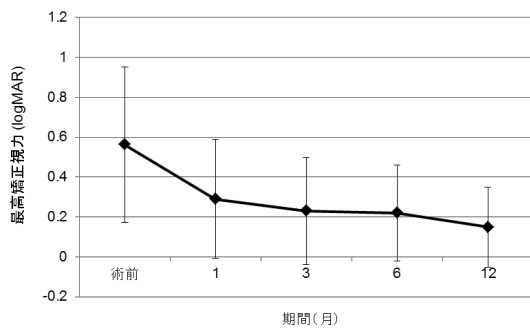
(1) 眼サルコイドーシスの症例の網膜内には肉芽腫を認め、これは網膜の中でも特に内層に多く見られた。また外層にも肉芽腫が広がっているものも見られたが、外層のみに見られる症例はなかった。

(2) 上記で見られた肉芽腫は主に CD4 陽性の T リンパ球と CD68 陽性のマクロファージで構成されており、特に網膜血管周囲にこれらの細胞が見られるものも観察された。網膜血管は網膜内層を主に栄養しており、これが肉芽腫が主に内層に存在する理由と考えられた。

(3) PAB 抗体による *P. acnes* の検討では、サルコイドーシス群で 82.0% の症例において網膜内に *P. acnes* の存在が確認された。一方で、コントロール群では 1 例も *P. acnes* は検出されなかった。このことは、*P. acnes* が眼サルコイドーシスに関与していることを示唆するものと考えられた。これまでサルコイドーシス症例の肺やリンパ節では *P. acnes* の存在が確認されてきたが、これらの臓器では常在菌としてサルコイドーシス以外の症例でも一定の割合で *P. acnes* が検出されていた。しかしながら、眼球内は外界に暴露されない組織であるため、通常無菌であると考えられる。この臓器において特に網膜内で *P. acnes* の存在が確認されたことは本疾患の原因としてより有力な証拠であると考えられた。これまでに硝子体液での PCR などで *P. acnes* が検出された報告はあるものの、硝子体採取時には眼表面の常在菌としての *P. acnes* が存在するため、コンタミネーションの可能性も考えられた。しかしながら今回、網膜でしかも免疫組織化学による検討において、その存在が網膜内に確認されたことは極めて重要である。

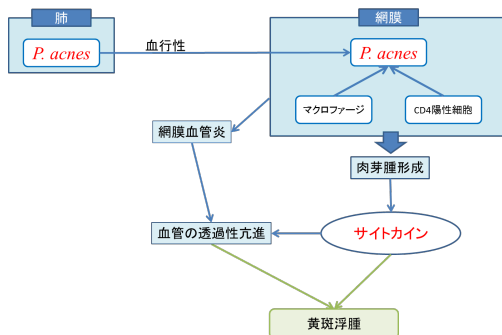
(4) 上記(1)(2)(3)の結果から、眼サルコイドーシスの発症機序として、血行性に肺などの組織から *P. acnes* が網膜に到達し、CD4 陽性 T リンパ球やマクロファージが反応して肉芽形成が生じるということが考えられた。

(5) 網膜生検した症例の経過としては、術前と比較して術後有意な視力改善が得られた。



(6) 手術時と比較して術後3カ月では、Interleukin (IL)-1ra、IL-4、IL-6、IL-9、IL-12、Interferon- γ 、Interferon gamma-induced protein (IP)-10、Platelet-derived growth factor (PDGF)-bb、regulated on activation, normal T cell expressed and secreted、Tumor necrosis factor (TNF)- α が有意に低下したが (P<0.05)、対照群よりは高値であった。中でも IL-4、IP-10、PDGF-bb、TNF- α は P<0.01 であり、術後のこれらの硝子体サイトカイン濃度と中心網膜厚は正の相関の傾向を認めた。これらのサイトカインは黄斑浮腫治療の新規治療ターゲットとなる可能性が考えられた。

【本研究で得られた眼サルコイドーシスの病態】



(7) その他、眼内液の解析を行う中で、貴重な症例が発見され、症例報告を行った。

<引用文献>

Negi M, et al. Localization of Propionibacterium acnes in granulomas supports a possible etiologic link between sarcoidosis and the bacterium. Mod Pathol. 25;1284-97: 2012.

Nagata K, et al. Simultaneous Analysis of Multiple Cytokines in the Vitreous of Patients with Sarcoid Uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 53; 3827-3833: 2012.

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2件)

Kitazawa K, Nagata K, Yamanaka Y, Kuwahara Y, Iehara T and Sotozono C.

Diffuse Anterior Retinoblastoma with Sarcoidosis-like nodule. Case Rep Ophthalmol. 査読有 6:443-447, 2015
DOI: 10.1159/000442744

Nagata K, Inaba T, Kinoshita S. CD5-Positive Primary Intraocular B-Cell Lymphoma Arising during Methotrexate and Tumor Necrosis Factor Inhibitor Treatment. Case Rep Ophthalmol. 査読有 6:301-306, 2015
DOI: 10.1159/000440646.

〔学会発表〕(計5件)

Kenji Nagata, Junji Hamuro, Naomi Tobita, and Shigeru Kinoshita. Pre- and Postoperative Cytokine Levels in the Vitreous Fluid of Uveitis Patients. American Academy of Ophthalmology (AAO) 2015, Las Vegas, USA, 2015.11.16

永田 健児, 羽室 淳爾、木下 茂、ぶどう膜炎に対する硝子体手術前後の硝子体中サイトカイン、第119回日本眼科学会総会、ロイトン札幌(北海道札幌市)、2015.4.16

永田 健児, 木下 茂、ぶどう膜炎に対する硝子体手術成績、第120回京都眼科学会、京都府立医科大学附属図書館合同講義棟(京都府京都市)、2014.6.1

Kenji Nagata, Kazuhito Yoneda, Hiroki Hatanaka, and Shigeru Kinoshita. Retinal biopsy in patients with ocular sarcoidosis and patients with rhegmatogenous retinal detachment. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2014, Orlando, USA, 2014.5.8

永田 健児, 江石 義信、木下 茂、眼サルコイドーシスにおける硝子体中の Propionibacterium acnes、第118回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム(東京都千代田区)、2014.4.4

〔図書〕(計3件)

永田 健児、ぶどう膜炎眼に対する手術戦略。活動性ぶどう膜炎に対する硝子体手術、眼科手術、メディカル葵出版、vol.28、No.4、2015、pp533-539

永田 健児, 丸山 和一、特集 眼炎症(ぶどう膜炎、強膜炎)の治療方針 硝子体手術の位置づけ、あたらしい眼科、メディカル葵出版、vol.31、No.9、2014、pp1303-1309

永田 健児、網脈絡組織の採取と処理のコツ、眼科手術、メディカル葵出版、vol.27、No.4、2014、pp566-569

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 健児 (NAGATA, KENJI)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00457988

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：