

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10912

研究課題名(和文)セマフォリンの眼病態形成機序の解明

研究課題名(英文)The serum concentration of SEMA4A in eye diseases

研究代表者

佐々 由季生(Yukio, Sassa)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：80580315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性たんぱくであるセマフォリン4A(Semaphorin:SEMA4A)は免疫、血管新生、癌の進展に寄与することがわかっている。当該研究では、まず血清中のSEMA4Aたんぱくの濃度について評価し、眼疾患に特異的に上昇がないか検討した。SEMA4Aは視神経炎・原田病でた疾患と比較して高い濃度であることが示唆された。硝子体中のSEMA4A濃度は血清と比較して約1/10程度と低く、疾患特異性は認めなかった。

研究成果の概要(英文)： We evaluated the serum concentrations of SEMA4A in eye diseases. The average serum concentration of SEMA4A in all patients evaluated was 3702+/-8583U/ml(n=248). In the optic neuritis patients, SEMA4A might be higher than other diseases(5746+/-12390U/ml, n=12). SEMA4A might also be higher in patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease.(12502+/-11202U/ml, n=5). The vitreous concentration of SEMA4A was much lower compared with the serum concentration(232+/-95.6U/ml n=12).SEMA4A might play a role on progressing these eye diseases but might not be useful as a specific biomarker.The further study must be needed to clarify these results because of the small sample number.

研究分野：眼科

キーワード：SEMA4A 視神経炎 炎症性眼疾患

1. 研究開始当初の背景

セマフォリンファミリーは元来、発生過程における神経細胞の軸索の方向性を決定する因子として同定された分子群であるが、現在その機能は神経系にとどまらず免疫、器官形成、血管新生、癌の進展など、様々な局面で働くことが明らかとなっている。中でも、Semaphorin 4A(SEMA4A)は、網膜色素上皮細胞に存在して、網膜色素変性の原因遺伝子としても最近注目を集めているタンパク質である。(A point mutation in *Semaphorin 4A* associates with defective endosomal sorting and causes retinal degenerative disease Nojima S, Toyofuku T, Kamao H, **Okuno T**, et al. Nature Communications;4:1406, 2013) しかしながら、そのほかの眼疾患との関連については未だにその役割は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、このセマフォリンファミリータンパクの眼疾患への関与を解明することが目的である。

大きく2つの疾患に注目して、研究を進める予定であった。

- I) 視神経炎の新規バイオマーカーの確立
- II) 眼内増殖性疾患(増殖糖尿病網膜症:PDR・増殖硝子体網膜症:PVR)におけるセマフォリンの分布と機能解析

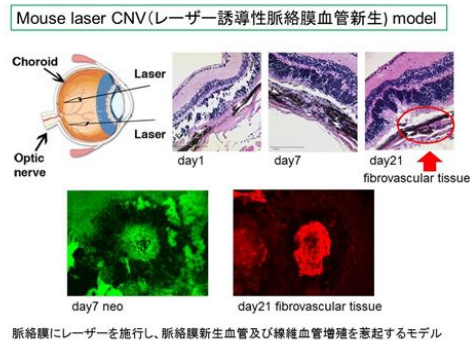
予備研究で視神経炎患者血清中 SEMA4A 濃度が高いという予備実験結果を得ていた。症例数を増やして血清中の SEMA4A 濃度を測定して、疾患特異性の評価を試みた。

3. 研究の方法

1) まずは疾患ごとの SEMA4A 濃度を調べた。視神経炎は比較的珍しい疾患であるため、2年間で12症例のみであった。比較疾患として、ぶどう膜炎、強膜炎などの炎症性疾患及び増殖糖尿病網膜症、裂孔原生網膜剥離、水晶体関連疾患の術前検査時に得られた血清

を用いて研究を行った。SEMA4A 濃度は ELISA 法を用いて、サンプル採取は福岡大学筑紫病院および九州大学で、ELISA は大阪大学で行った。疾患名を隠してサンプル名で評価を行った。

2) レーザー脈絡膜新生血管モデルにおいて SHG 顕微鏡を用いて新生血管発症後の線維化の評価が可能かどうかの検討も加えて行った。



4. 研究成果

SEMA4A 血清中濃度評価

我々は水晶体疾患、視神経炎、ぶどう膜炎、増殖糖尿病網膜症、裂孔原生網膜剥離、網膜前膜、黄斑円孔、強膜炎、網膜中心静脈閉塞症疾患など248症例の患者血清内の SEMA4A 値を評価した。年齢は7-89歳(平均年齢60±17.4歳)であった。SEMA4A 値は高いもので49534 IU/ml-検出感度以下まで(平均濃度3702±8583 IU/ml)であった。年齢と SEMA4A 値との相関係数は-0.07と年齢相関は認めなかった。(図1)

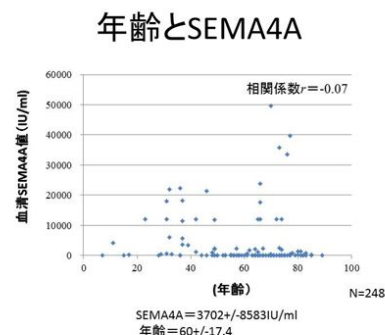


図1:年齢と SEMA4A 値の相関

眼疾患と SEMA4A 濃度

対象となった視神経症患者は 12 名であった。血清 SEMA4A 濃度は比較的軽症である視神経乳頭発赤患者 (2 名) も含めると $5746 \pm 12390 \text{U/ml}$ (39790U/ml -検出感度以下(3 名)) であった。標準偏差が大きいことからわかるように SEMA4A 値は患者間にかなりの個人差を認めた。対象とした疾患全体の平均濃度と比較して約 2 倍程度高い濃度であった。年齢は 7-77 歳 (平均年齢 40 ± 20.7 歳) 年齢と血清 SEMA4A 値との相関係数は $r = 0.35$ と弱い正相関となった。視神経炎以外の患者との SEMA4A 濃度の比較では統計学的に有意な差は認めなかった。 ($p = 0.11$ Student-T test) しかしながら、 $n=12$ と症例数が少ないため、今後症例数を増やした検討が待たれる。

炎症性眼疾患患者 (原田病・眼炎症を伴うサルコイドーシス・虹彩炎・強膜炎・内因性眼内炎・原因不明ぶどう膜炎 $n=30$) すべてを含む血清 SEMA4A 値は $4157 \pm 6855 \text{U/ml}$ であった。その中でも原田病患者血清中の SEMA4A 濃度は高かった。当院にて確認された原田病初回発作患者数は 5 名で血清 SEMA4A 濃度は $12502 \pm 11202 \text{U/ml}$ (22240 -検出感度以下(1 名)) と全平均値と比較して約 4 倍の濃度であった。九州大学より供出された検体 (凍結保存検体) を加えると、18 名で血清 SEMA4A 濃度は $4865 \pm 7763 \text{U/ml}$ と低くなった。九州大学から供出されたサンプルを用いた検討では血清 SEMA4A 値は 8973U/ml -検出感度以下 (4 人を含む)。当院で採取したサンプルと比較して血清 SEMA4A 値が低いものが多く含まれた。採血方法および保存期間が比較的長期のものを含んでおり、その影響が考えられた。視神経炎患者および原田病患者には共通して、発症頻度が低く、統計学的な差を認めていない。しかしながら、両疾患とも他疾患と比較して高い傾向にあり、今後症例数を増やした検討が待たれる。

上記 2 疾患と比較して増殖糖尿病網膜症患者 ($n=20$) 血清中の SEMA4A 値は $1686 \pm 3773 \text{U/ml}$ と低くなった。 (12000U/ml -検出感度以下(13 名を含む。)) 増殖糖尿病網膜症患者では全疾患の平均値を超えたものはわずか 2 症例のみであった。糖尿病患者では血清 CRP 濃度が高くなることが知られており、慢性炎症性疾患としての側面を持つ病態である。今回のサンプルは増殖糖尿病網膜症のために手術を要した患者血清サンプルである。おそらくは血管障害が全身性に進行した病態を持つ疾患であることが考えられる。今後は網膜症の病期に分けて検討する必要があると考える。

ステロイド治療による SEMA4A 濃度変化

原田病患者への治療は、ステロイドパルス療法に加えて、比較的長期間にわたってプレドニン内服を行っている。研究期間中に同一患者の発作時血清からステロイドパルス療法・内服までの約 8 か月間に副作用を観察する目的で採取した血清で SEMA4A 値を追跡した結果、ステロイドパルス後に SEMA4A 値は最も低くなり、ステロイドを漸減するにしたがって SEMA4A 値は高くなるのが分かった。最終的には発作時と変わらない値になった。このことから SEMA4A は発症に伴って反動的に上昇するのみではなく、炎症の起きやすさとして、背景的に上昇している可能性も示唆された。この患者はステロイド中止後 2 年間経過を診ていたが、原田病の炎症再燃は認めていない。(図 2)

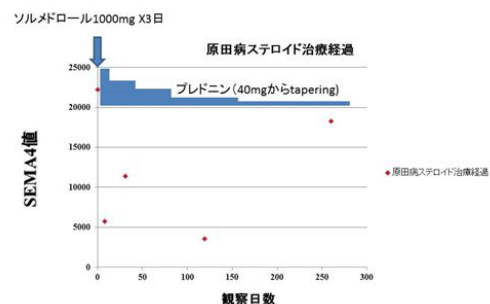


図 2:ステロイド治療と SEMA4A の変化
白内障患者における SEMA4A 高値患者の背景について

今回の検討では、白内障患者血清をコントロールとして使用することを予定していた。しかしながら、白内障患者内にも SEMA4A

値はかなりなばらつきがあることが分かった。対象となる水晶体疾患患者は 62 名である。SEMA4A 値は 4835 \pm 12050U/ml (49534U/ml-検出感度以下(17名を含む)であった。平均年齢(74 \pm 9.1歳)、年齢とSEMA4A値との相関は認めなかった($r = -0.11$)(図3)。

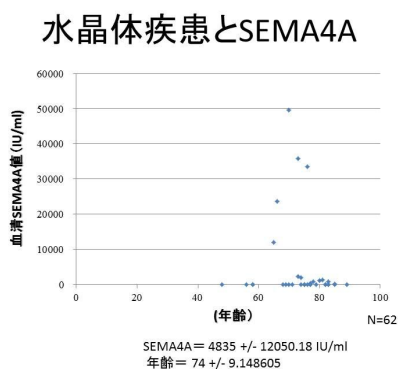


図3:水晶体疾患血清SEMA4A値と年齢

SEMA4A値が高かった患者では、背景として採血時糖尿持続している患者(49534U/ml)や半年前に右下肢蜂窩織炎・骨髄炎を患った既往のある患者(35842U/ml)50年来の結核既往および採血時に咽頭炎のため発熱(37度程度)の患者(23747U/ml)などの感染性疾患や、自己免疫性肝炎、SLE合併(33544U/ml)などが見受けられた。一方、サルコイドーシスによりプレドニゾロン(20mg)内服中の患者ではSEMA4A値は検出感度以下となった。SEMA4は炎症性疾患の背景となるもので、高ければ感染などに対する反応が高い可能性が報告されている。自己免疫性疾患の際にも炎症の背景として高くなっていることが考えられた。

以上のことから、SEMA4Aを視神経炎や原田病などの特異的なバイオマーカーとして使用する試みは困難であることが分かった。しかしながら、ステロイド治療後に大きく変化をしており、炎症性疾患の一因となっていることが示唆された。

硝子体サンプルを用いた検討

硝子体中(n=12)のSEMA4A値

232 \pm 95.6U/mlと血清と比較して約1/10程度の濃度であった。黄斑前膜(113U/ml, n=4)増殖糖尿病網膜症(237U/ml, n=4)黄斑前膜では平均よりやや低い値が多かった。我々がこれまで検討してきた炎症性たんぱくであるMCP-1・IL-6等と比較してn数は少ないものの、大きな変化はないと考えられた。

SHG顕微鏡を用いた脈絡膜線維化モデルの評価方法の確立

本研究期間でSHG顕微鏡を用いたレーザー脈絡膜新生血管モデルの線維化評価方法について確立した。この評価方法の特徴は染色などの特殊な過程を得ずに、線維化を定量化できる可能性を示すものである。(図4)

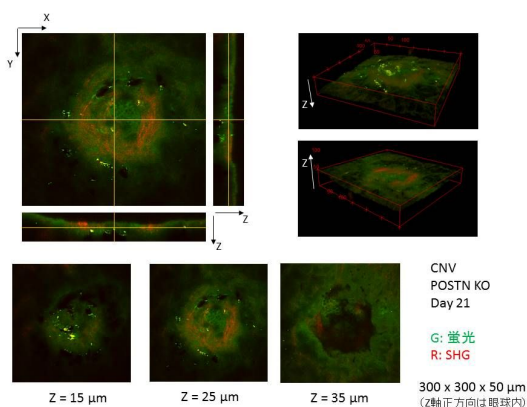


図4:SHG顕微鏡を用いたマウス脈絡膜線維化評価モデル

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7件)
- 1: Overexpression of CD163 in vitreous and fibrovascular membranes of patients with proliferative diabetic retinopathy: possible involvement of periostin. Kobayashi Y, Yoshida S, Nakama T, Zhou Y, Ishikawa K, Arita R, Nakao S, Miyazaki M, Sassa Y, Oshima Y, Izuhara K, Kono T, Ishibashi T. Br J Ophthalmol.;99(4):451-6. 2015
 - 2: Increased expression of M-CSF and IL-13 in vitreous of patients with proliferative diabetic

retinopathy: implications for M2 macrophage-involving fibrovascular membrane formation. Yoshida S, Kobayashi Y, Nakama T, Zhou Y, Ishikawa K, Arita R, Nakao S, Miyazaki M, Sassa Y, Oshima Y, Izuhara K, Kono T, Ishibashi T. Br J Ophthalmol. ;99(5):629-34. 2015

3: Increased vitreous concentrations of MCP-1 and IL-6 after vitrectomy in patients with proliferative diabetic retinopathy: possible association with postoperative macular oedema. Yoshida S, Kubo Y, Kobayashi Y, Zhou Y, Nakama T, Yamaguchi M, Tachibana T, Ishikawa K, Arita R, Nakao S, Sassa Y, Oshima Y, Kono T, Ishibashi T. Br J Ophthalmol. ;99(7):960-6. 2015

4: 増殖糖尿病網膜症に対する硝子体手術 10 年後視力予後因子の統計学的検討 増殖糖尿病網膜症長期視力予後因子 佐々 由季生、秋山 雅人、吉田 茂生、佐伯 有祐、高橋 理恵、光武 智子、向野 利寛 臨床眼科 69(8) 1269-1275 2015

5: The kinetics of VEGF and MCP-1 in the second vitrectomy cases with proliferative diabetic retinopathy. Sassa Y, Yoshida S, Ishikawa K, Asato R, Ishibashi T, Kono T. Eye (Lond).;30(5):746-53. 2016

6: Tenascin-C promotes angiogenesis in fibrovascular membranes in eyes with proliferative diabetic retinopathy. Kobayashi Y, Yoshida S, Zhou Y, Nakama T, Ishikawa K, Arima M, Nakao S, Sassa Y, Takeda A, Hisatomi T, Ikeda Y, Matsuda A, Sonoda KH, Ishibashi T. Mol Vis. 30;22:436-45. 2016.

7: Differential association of elevated inflammatory cytokines with postoperative fibrous proliferation and neovascularization after

unsuccessful vitrectomy in eyes with proliferative diabetic retinopathy. Yoshida S, Kobayashi Y, Nakao S, Sassa Y, Hisatomi T, Ikeda Y, Oshima Y, Kono T, Ishibashi T, Sonoda KH. Clin Ophthalmol. ;11:1697-1705. 2017

〔学会発表〕(計 3 件)

1: Ten-year visual outcome following vitreous surgery for proliferative diabetic retinopathy. Yukio Sassa, Shigeo Yoshida, Yusuke Saeki, Rie Takahashi, Sachiko Mitsutake, Toshihiro Kono The 8th Joint Meeting of Korea-China-Japan 2015 年 10 月

2: 増殖糖尿病網膜症の手術適応と手術成績 佐々 由季生 鳥栖・三養基眼科医勉強会(招待講演) 2015 年 10 月

3: 失明原因第 2 位! 知っておきたい糖尿病網膜症 佐々 由季生 浜の町病院市民公開講座(招待講演) 2018 年 3 月

〔図書〕(計 0 件)

〔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 1 件)

名称: 第二次高調波光を用いた新規コラーゲン線維化評価モデル
発明者: 佐々由季生、向野利寛、石橋達朗、吉田茂生、福島修一郎、荒木勉、安井武史

権利者: 学校法人福岡大学
種類: 特許
番号: P6106883
取得年月日: 2017/03/17
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々 由季生 (YUKIO SASSA)
(九州大学・医学部・共同研究員)

研究者番号：80580315

(2)研究分担者

奥野 龍禎 (TATSUSADA OKUNO)
(大阪大学・医学系研究科・助教)

研究者番号：00464248

石橋 達朗 (TOTSURO ISHIBASHI)
(九州大学・大学病院・病院長)

研究者番号：30150428

向野 利寛 (TOSHIHIRO KONO)
(福岡大学・医学部・教授)

研究者番号：40117106

福島 修一郎 (SHUICHIRO FUKUSHIMA)
(大阪大学・基礎工学研究科・助教)

研究者番号：40362644

吉田 茂生 (SHIGEO YOSHIDA)
(九州大学・医学系研究科・準教授)

研究者番号：50363370

安井 武史 (TAKESHI YASUI)
(徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス
学部・教授)

研究者番号：70314408