

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592600

研究課題名(和文) 涙液脂質の網羅的分析によるドライアイの病態解析と治療法の開発

研究課題名(英文) Identification of disease marker for dry eye syndrome by comprehensive analysis of tear components

研究代表者

山田 昌和 (Yamada, Masakazu)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・視覚研究部・研究員

研究者番号：50210480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は涙液試料から成分解析を行い、ドライアイの疾患マーカーを同定することを目的とした。液体クロマトグラフィを用いて網羅的な涙液分析を行った結果、涙液減少型ドライアイ患者では涙液中シアル酸濃度が低下していること、ドライアイ治療薬によって増加することが示され、シアル酸がドライアイの疾患マーカーとなると考えられた。一方、ソフトレンズ装用によるドライアイでは涙液中シアル酸の低下を認めず、角膜上皮の膜型ムチン減少が主な病態であることも示唆された。涙液中のシアル酸測定は、ドライアイのサブタイプ分類や病態解析、治療効果の判定にも有用である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This study was undertaken to identify disease-specific marker for dry eye syndrome by comprehensive analysis of tear components. Tear samples were collected by Schirmer test strips. Major tear proteins including secretory IgA, lactoferrin, lipocalin-1, lysozyme and sialic acid, as a marker of secretory mucins, were measured by high performance liquid chromatography. In aqueous deficiency type dry eye, levels of sialic acid in tears of patients were significantly lower than those of normal controls. Treatment with topical application of diquafosol significantly increased sialic acid levels in tears of these patients. In patients with contact lens-induced dry eye, levels of sialic acid in tears were about the same as those of normal controls. Sialic acid in tears may be a good candidate for disease-specific marker for dry eye syndrome, especially for aqueous deficiency type dry eye.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：蛋白質 プロテオーム 分析化学 生体分子 脂質

### 1. 研究開始当初の背景

ドライアイは成人の 10-15%と非常に有病率の高い疾患である。ドライアイによって重度の視覚障害を呈することは希であるものの、目の不快感や痛みによる作業効率の低下や精神的負担など日常生活機能 (quality of life) に及ぼす影響は大きく、医学的にも社会的にも重要な疾患と考えられる。しかも現在の治療法に対する患者の満足度は必ずしも高くなく、病態の解明と治療法の開発が急務となっている。

ドライアイの基本的な病態は涙液の減少と涙液膜の安定性低下である。涙液の脂質は涙液膜の表面張力を低下させ、蒸発を抑制するなど涙液膜の安定性維持に重要であることが知られている。しかし現在のところ、ドライアイでの涙液脂質の変化は不明の部分が多く、涙液脂質を標的としたドライアイの治療法は開発されていない。ドライアイの病態解析や新規治療法の開発のためには、涙液の液性成分の詳細な分析が必須と考えられる。涙液は微量であるために、従来の方法では感度が十分でなく、分析できる物質の種類も限られていた。近年、生体機能や病態解析には特定の候補物質の分析だけでなく、網羅的な分析の重要性が指摘されている。従来、涙液中の成分分析は薄層クロマトグラフィ、酵素反応、酵素抗体法などの方法で解析されてきた。薄層クロマトグラフィでは物質の大まかなクラスしか分析できず、酵素反応や酵素抗体法で特定の脂質を測定した場合には、標的物質は検出できるが、その関連物質や代謝産物は測定できないという問題点があった。最近、質量分析計を用いたプロテオーム、メタボロームなどの高感度で網羅的な解析法が医学領域に応用されており、涙液の脂質分析の報告も散見されるようになってきている。

本研究では正常者とドライアイ患者の涙液中脂質成分の網羅的な解析により、涙液のどの成分が病態形成に関与しているかを解析する。更にドライアイをサブタイプに分け、比較分析を行うことで、サブタイプ別の違いを明らかとする。ドライアイで欠乏、または過剰状態にある分子を同定し、その標的分子の生成、分解、運搬に関与する酵素やキャリア蛋白を検討していく。ドライアイの治療法になりうる標的分子とその制御方法を検討することで、ドライアイの新しい治療法の開発に発展させていくようにする。

### 2. 研究の目的

ドライアイの病態解析や新しい治療法の開発には、涙液成分の詳細な分析が重要と考えられる。本研究では、濾紙で採取した涙液試料から液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いて涙液成分解析を行った。涙液成分解析によって疾患マーカーや治療の標的分子を同定することで、ドライアイの新しい治療法に発展させていくことを目的とした。また、

ドライアイの新しい治療薬であるジクアホソルナトリウムやレバミピドが涙液成分に及ぼす影響についても検討した。

### 3. 研究の方法

濾紙で採取した涙液試料から涙液蛋白の網羅的解析と可溶性ムチンの指標としてシアル酸の測定を行った。涙液蛋白の解析方法以下の通りである。

総蛋白濃度測定は Bradford 法で行い、ウシ胎児血清を標準物質として用いた。涙液に特異的な主要蛋白である分泌型 IgA、Lactoferrin、Lipocalin-1、Lysozyme の測定には HPLC を用いた。測定カラムは TSK 3000SWXL を使い、移動相は 0.5 M sodium chloride/ 0.1 M sodium phosphate, pH 5.0 とし、流量は 0.7 ml/min で、UV 検出器を用いて測定波長 230 nm での検出を行った。

ムチンの指標となるシアル酸の測定はシアル酸を DMB 試薬で蛍光標識して HPLC で検出することで行った。涙液試料に 4 M acetic acid を加え、80°C で 3 時間加熱してシアル酸を遊離させた。次に DMB 試薬と coupling solution (containing acetic acid,  $\beta$ -mercaptoethanol and sodium hydrosulfite)、水を 1:5:4 の比率で加え、50°C で 2.5 時間、暗所で攪拌し、蛍光標識を行った。HPLC では測定カラムは COSMOSIL5C18-AR-2 を使い、移動相は acetonitrile-methanol-water (2:14:84) とし、流量は 0.9 ml/min で、蛍光検出器を用いて励起波長 375 nm、測定波長 448 nm で測定を行った。

### 4. 研究成果

涙液減少型のドライアイ患者 25 例、正常者 20 例の涙液試料を検討したところ、正常者とドライアイ患者では、涙液蛋白成分に有意の違いはみられなかった。しかし、涙液中のシアル酸濃度はドライアイ患者で  $49 \pm 40$   $\mu\text{g/mL}$  と正常者の  $91 \pm 39$   $\mu\text{g/mL}$  と比較して、有意の減少が認められた。涙液中シアル酸濃度はドライアイ患者では低下しており、ムチン異常が涙液減少型ドライアイの病態に関与していることが示唆された。

正常者 10 例にジクアホソルナトリウム (DQS) を単回点眼し、点眼後 5 分から 60 分まで経時的な涙液成分の変化を検討したところ、涙液蛋白成分には sIgA 濃度の一過性の減少以外には有意の変化はなかった。しかし、涙液中のシアル酸濃度は点眼前の  $133 \pm 43$   $\mu\text{g/mL}$  から点眼後 5 分で  $165 \pm 33$   $\mu\text{g/mL}$  と一過性であるが、有意な増加が見られた。シアル酸濃度は DQS 点眼によって増加することが示された。ドライアイ患者での涙液中シアル酸濃度低下と併せて、シアル酸がドライアイの病態を示す良い涙液マーカーとなる可能性があると考えられた。

次にソフトコンタクトレンズ (SCL) 装用者のドライアイに対する 2 種類の治療薬、レ

パミピド(MC) とジクアホソル(DQS)の効果  
を臨床所見、膜型ムチンの蛍光強度、涙液中  
の蛋白・分泌型ムチンの分析から検討した。

MC点眼ではSCL装用者16例を対象とし、  
2週間の試験期間で評価を行った。膜型ムチ  
ンの指標としてフルオレセイン標識レクチ  
ン(F-WGA)点眼後の角膜蛍光強度を用いた。  
シルマー試験紙で採取した涙液試料から涙  
液蛋白と分泌型ムチンの指標であるシアル  
酸をHPLCで測定した。MCの点眼前後で臨  
床所見の有意な変化はなかったが、F-WGA  
の有意な増加がみられた。涙液蛋白ではsIgA  
が有意に増加し、シアル酸にも増加傾向がみ  
られたが、他は有意な変化を示さなかった。  
DQS点眼ではSCL装用者12例を対象とし、  
4週間の試験期間で評価を行った。DQS点  
眼前後の臨床所見では涙液層破壊時間(BUT)  
と角結膜染色スコアが有意に改善したが、シ  
ルマー値に変化はなかった。F-WGAには有  
意な増加がみられたが、涙液分析ではシアル  
酸、涙液蛋白などに有意な変化はみられな  
かった。

ドライアイ治療薬であるMCやDQSの点  
眼後にはF-WGAの有意な増加がみられ、  
SCL装用者に対するドライアイ治療薬の点  
眼は、膜型ムチンを増加することで治療上  
有用である可能性が示された。また涙液減少  
型ドライアイでは涙液中のシアル酸濃度の低  
下が見られたが、SCL装用者では低下を認め  
なかった。サブタイプの病態の違いを示す涙  
液マーカーとしてシアル酸が良い指標とな  
る可能性があると考えられた。

#### 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23件)

1. Shigeyasu C, Hirano S, Akune Y, Mochizuki H, Yamada M. Evaluation of the frequency of ophthalmic solution application: washout effects of topical saline application on tear components. *Curr Eye Res*. 2013;38:722-728.
2. 山田昌和. ドライアイ治療の最新戦略. *東京都医師会雑誌* 66:246-252, 2013
3. 山田昌和. ドライアイの点眼治療. *眼科* 55:805-811, 2013
4. Kaido M, Yamada M, Sotozono C, Kinoshita S, Shimazaki J, Tagawa Y, Hara Y, Chikama T, Tsubota K. The relationship between visual performance and clinical ocular manifestations in Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 154:499-511, 2012
5. Mizuno Y, Yamada M, Shigeyasu C, The Dry Eye Survey Group of National Hospital Organization of Japan. Annual Direct Cost of Dry Eye in Japan. *J Clin Ophthalmol* 6:755-760, 2012

6. Yamada M, Mizuno Y, Shigeyasu C. Impact of dry eye on work productivity. *Clin Econom Outcome Res* 4:307-312, 2012

7. Shigeyasu C, Mizuno Y, Yokoi T, Nishina S, Azuma N, Yamada M. Clinical features of anterior segment dysgenesis associated with congenital corneal opacities. *Cornea*. 2012;31:293-298.

8. 重安千花, 山田昌和, 水野嘉信, 望月弘嗣. ソフトコンタクトレンズ装用者の涙液浸透圧. *日コレ誌* 54:172-177, 2012

9. 山田昌和, 水野嘉信, 重安千花. ドライアイが日常生活に及ぼす影響. インターネットアンケート調査より. *診療と新薬* 2012;49:243-251.

10. 山田昌和. ドライアイの点眼治療アップデート. *日本医事新報* 4619:80-85, 2012

11. 山田昌和. 結膜弛緩症. *眼科手術* 25:532-536, 2012

[学会発表](計35件)

1. 中島史絵, 重安千花, 藤井かんな, 井之川宗右, 阿久根陽子, 山田昌和. 特異な涙液蛋白パターンを示した先天性無涙腺症の1例. 第30回日本角膜学会, 2014.1.30, 那覇
2. 山田昌和. ドライアイに抗炎症は重要か? シンポジウム, 第30回日本角膜学会, 2014.1.30, 那覇
3. 山田昌和, 重安千花, 阿久根陽子, 川島素子. SCL装用者のドライアイに対するジクアホソルナトリウム点眼の効果, 第30回日本角膜学会, 2014.2.1, 那覇
4. 重安千花, 阿久根陽子, 川島素子, 山田昌和. SCL装用者のドライアイに対するレバミピド点眼の効果, 第30回日本角膜学会, 2014.2.1, 那覇
5. 中村奈津子, 重安千花, 山田昌和. 眼窩脂肪ヘルニアに対する結膜強膜縫着術の術後成績. 第67回日本臨床眼科学会, 横浜, 2013.11
6. 山田昌和. ドライアイの薬物療法レビュー. シンポジウム, 第67回日本臨床眼科学会, 横浜, 2013.11.2
7. 重安千花, 阿久根陽子, 水野嘉信, 大澤浩, 望月弘嗣, 山田昌和. 涙液の薬物動態分析によるS-1角膜障害の検討. 第2回日本涙液涙道学会, 大阪, 2013.7.13
8. 山田昌和, 重安千花, 阿久根陽子, 望月弘嗣. ランダム化比較試験データを用いたドライアイ治療薬の臨床評価. 第37回日本角膜学会, 白浜, 2013.2.14
9. 重安千花, 阿久根陽子, 水野嘉信, 大澤浩, 望月弘嗣, 山田昌和. 涙液分析によるS-1角膜障害の発症要因. 第37回日本角膜学会, 白浜, 2013.2.16
10. 平野慎一郎, 阿久根陽子, 重安千花, 水野嘉信, 望月弘嗣, 山田昌和. ジクアホソルナトリウム点眼による涙液中蛋白・ムチン濃度の変化. 第66回日本臨床眼科学会, 京都, 2012.10.27

11. 重安千花、山田昌和、阿久根陽子、水野嘉信、望月弘嗣．ジクアホソルナトリム点眼による臨床効果と涙液成分の変化．第 66 回日本臨床眼科学会、京都、2012.10.27

12. 重安千花、山田昌和．シンポジウム、涙液浸透圧．第 65 回日本臨床眼科学会、東京、2011.10.28

13. 重安千花、水野嘉信、望月弘嗣、山田昌和．ソフトコンタクトレンズ装用者の涙液浸透圧．第 54 回日本コンタクトレンズ学会、京都、2011.7.4

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔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

山田 昌和 (YAMADA, Masakazu)

独立行政法人国立病院機構東京医療センター・臨床研究センター・研究員

研究者番号：50210487

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし