

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10891

研究課題名(和文) ミトコンドリアDNAの発現解析を通じた眼疾患における慢性炎症の病態解析

研究課題名(英文) Roles of mitochondria expression in ocular inflammation

研究代表者

橋田 徳康 (Noriyasu, Hashida)

大阪大学・医学系研究科・特任講師(常勤)

研究者番号：30456959

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)：ヒト慢性炎症性眼疾患の病態形成におけるミトコンドリアDNAの直接的な関与を明らかにすることを目的とした、自然免疫センサーを刺激する内因性リガンドの検出定量を眼疾患ごとに行った。ドライアイなどの眼表面疾患・ぶどう膜炎などの眼炎症疾患・加齢黄斑変性などの網膜疾患患者の涙液・血清で行った。その結果、角膜疾患すべてにおいて健常人と比較して優位に濃度が高いことが分かった。涙液、及び血清中の因子を培養細胞に作用させると炎症性サイトカインの発現上昇がみられることより、涙液中の因子が慢性炎症の病態発現に關与する可能性を明らかにして、特許申請を行った

研究成果の概要(英文)：To investigate the physiological function of mitochondrial DNA in tear and serum from the patient of ocular diseases with various etiologies. The tears and serum were collected. The relationship between serum mitochondrial DNA (mtDNA) concentration and those pathophysiology were investigated. MtDNA was isolated and mtDNA level of tear and serum were measured real time-PCR. To investigate the immunological functions, human primary CD14-positive monocyte was used to measure the concentration of inflammatory mediators by using enzyme-linked immunosorbent assay after co-incubation with serum of patients in culture media. Results: The elevation of mtDNA was observed in tears of patients with cornea diseases such as dry eye, keratoconus, and limbal stem cell deficiency. However, the concentration of mtDNA from tear did not show a significant increase of in all ocular surface diseases. Cytokine analysis showed that tear of keratoconus patient had the immunological functions.

研究分野：眼科

キーワード：バイオマーカー 慢性炎症

1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴い動脈硬化性疾患（心筋梗塞・脳血管障害など）、神経変性疾患（アルツハイマー病など）、自己免疫疾患や加齢性の疾病が増加傾向にある。これら疾患の病態形成・進展等に慢性的な炎症が深く関わっていることが報告されており、その原因の一つとして免疫システムの異常や酸化ストレスが指摘されている。

眼科領域においても、炎症が明らかなぶどう膜炎疾患に限らず、加齢性黄斑変性・緑内障・糖尿病網膜症、ドライアイ等の疾患の発症・増悪プロセスに慢性炎症が関与していることが指摘され、炎症沈静化を目的とした治療も行われ始めている。しかし、一般的な抗炎症剤であるステロイドやNSAIDsは、副作用や効力面での問題があり、また、このような慢性炎症性疾患への効果も限られているのが現状で、病態のメカニズムに根ざした新しい治療薬の開発が望まれている。

一方、角膜・結膜などの眼表面組織は、恒常的に乾燥・浸透圧変化・感染（細菌・真菌・ウイルス）・温度変化の影響を受け、絶えず細胞の脱落や再生を繰り返しながらその恒常性を保っている。外部環境の影響を受けて脱落した細胞由来のミトコンドリア(mtDNA)を代表とした様々な内在抗原が、炎症反応を起こす可能性があり、「一見正常に見える眼表面疾患でも、慢性炎症が存在しているのではないかと考えた。実際にこれら mtDNA を定量することにより、直接的に病態への関与を明らかにして、その発現レベルを調整することができれば、従来の病態メカニズムとは異なった慢性炎症に対する治療薬の開発に結び付く可能性があるのではないかと考え、本研究を行った。

2. 研究の目的

眼表面疾患・ぶどう膜炎疾患だけでなく、移植免疫など炎症が関与する眼疾患において眼局所及び全身におけるミトコンドリアDNA (mtDNA) の発現動向に焦点を絞り、慢性眼炎症における mtDNA の関与を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

炎症が明らかなぶどう膜炎疾患に限らず、加齢性黄斑変性・糖尿病網膜症などの網膜疾患、ドライアイや円錐角膜などの眼表面疾患患者を解析の対象にした。

1) 涙液および血清中における mtDNA の定量的な検出方法の確立

既存の報告で涙液中において定量的な mtDNA の検出方法が確立されていないので条件検討を行い、検出方法を確立した。

2) 涙液、血清中における mtDNA の検出

涙液および血清における mtDNA を検出する目的で、健康人や疾患患者より採血を

行い、また涙液は 30 μ L の PBS で涙液ごと採取して DNA extraction kit を用いて mtDNA を含む DNA 分画として精製した。DNA 分画を定量 PCR により検出・定量した。定量のための様々な条件検討を行った。

3) mtDNA を中心とした炎症関連物質の関与

炎症に血清や涙液中の mtDNA を中心とした炎症関連物質が関与しているか解析を行った。

4. 研究成果

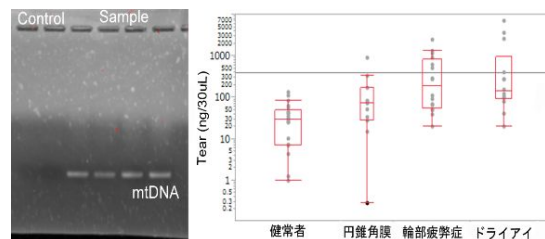
1) 定量的採取方法の確立

血清は取り方に依存せず安定した採取が得られるが、涙液は採取方法によるばらつきがあるので採取方法を検討した。涙液の採取に関して既知量のフルオレセインによる定量法を用いることにより定量的に採取する方法を確立した。

2) 涙液中における mtDNA の検出

健康者および眼表面炎症疾患の患者の涙液及び血清中に mtDNA を検出する条件検討を行った。その結果、眼表面炎症疾患において正常者と比べて眼局所の涙液における mtDNA の発現上昇がみられることを明らかにした。さらに、角膜疾患患者で上昇することを明らかにした(図1)。

図1 mtDNA の検出と角膜疾患ごとの発現



さらに、これら角膜疾患患者において、血清中 mtDNA は疾患ごと健康者と比較しても優位差がなかったのに対して(図2)、涙液中の mtDNA は各角膜疾患患者において健康人と比較して有意に上昇していた(図3)。

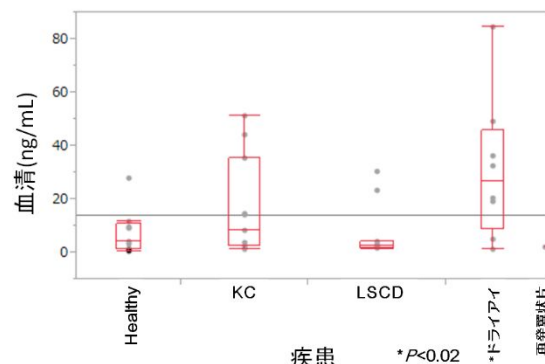


図2 血清における mtDNA 濃度

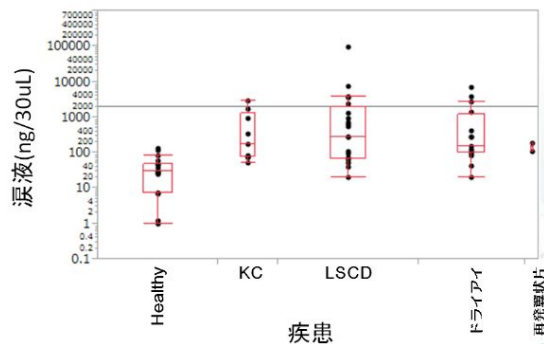
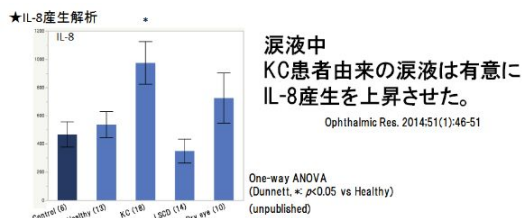


図3 涙液における mtDNA 濃度

3) mtDNA を中心とした炎症関連物質の関与

あらかじめ健常人より血液を採取して CD14 陽性の単球を単離し、各患者涙液を採取して細胞培養上清にかけて培養細胞 (CD14 陽性単球) から分泌されるサイトカインの解析を行った。炎症関連タンパクの網羅的解析の結果、IL-6、TNF-alpha などのサイトカインの上昇を認めた。統計的な解析の結果採取的に、様々なサイトカインの中で IL-8 が KC 患者の涙液を添加した場合にのみ統計的に有意に上昇することが明らかになった。円錐角膜は、その病態が未だ明らかになっていないが、患者涙液は炎症性サイトカインを分泌させることにより慢性的な炎症に関与している可能性があることが明らかになった。

図4 KC 患者の涙液は IL-8 産生を上昇させ



る

様々な眼疾患の患者から涙液および血清を採取しそこに含まれる様々な炎症関連物質を抽出し、健常者と比較検討し、慢性炎症に関与する物質を同定し、その成果を眼疾患のバイオマーカーとして特許申請した (PCT/JP2017/12689、PCT/JP2017/12690)。

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9件)

1. Incidence and clinical features of recurrent Vogt-Koyanagi-Harada disease in Japanese individuals. Iwahashi C, Okuno K, Hashida N, Nakai K, Ohguro N, Nishida K. Jpn J Ophthalmol. 2015;59(3):157-63.

2. Rare Association of Perivascular Granulomatous Lesions in a Patient with Acute Retinal Necrosis. Sogawa T, Hashida N, Sawa M, Nishida K. Case Rep Ophthalmol. 2015;6(3):373-9.

3. Rong SS, Chen LJ, Leung CK, Matsushita K, Jia L, Miki A, Chiang SW, Tam PO, Hashida N, Young AL, Tsujikawa M, Zhang M, Wang N, Nishida K, Pang CP. Ethnic specific association of the CAV1/CAV2 locus with primary open-angle glaucoma. Sci Rep. 2016;6:27837.

4. Kitao M, Hashida N, Nishida K. Recurrent pseudohypopyon in association with primary vitreoretinal lymphoma: a case report. BMC Ophthalmol. 2016;16:103.

5. Ma L, Liu K, Tsujikawa M, Chen H, Brelen ME, Chan VC, Lai TY, Sayanagi K, Hara C, Hashida N, Tam PO, Young AL, Chen W, Nishida K, Pang CP, Chen LJ. Association of ABCG1 With Neovascular Age-Related Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy in Chinese and Japanese. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016;57(13):5758-5763.

6. Saito T, Ohguro N, Iwahashi C, Hashida N. Optical coherence tomography manifestations of primary vitreoretinal lymphoma. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2016;254(12):2319-2326.

7. Ma L, Brelen ME, Tsujikawa M, Chen H, Chu WK, Lai TY, Ng DS, Sayanagi K, Hara C, Hashida N, Chan VC, Tam PO, Young AL, Chen W, Nishida K, Pang CP, Chen LJ. Identification of ANGPT2 as a New Gene for Neovascular Age-Related Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy in the Chinese and Japanese Populations. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2017;58(2):1076-1083.

8. Inoue T, Masai N, Shiomi H, Oh RJ, Uemoto K, Hashida N. Feasibility study of a non-invasive eye fixation and monitoring device using a right-angle prism mirror for intensity-modulated radiotherapy for choroidal melanoma. J Radiat Res. 2017 May 1;58(3):386-396.

9. Kobayashi R, Hashida N, Soma T, Koh S, Miki A, Usui S, Maeda N, Nishida K. Clinical Findings of Anterior Segment Spectral Domain Optical Coherence Tomography Images in Cytomegalovirus Corneal Endotheliitis. Cornea. 2017 Apr;36(4):411-414.

〔学会発表〕(計41件)

2015年

1. 大阪眼科集談会: ヘルペス性ぶどう膜炎におけるRTVue-100角膜モジュールの診断的有用性についての検討 小林礼子、橋田徳康、高静花、相馬剛至、前田直之、西田幸二

2. 大阪眼科集談会: 家族性大動脈瘤に合併したiris flocculiの家族例: 松岡孝典、橋田徳康、西田健太郎、西田幸二
3. 大阪眼科集談会: HIV感染を併発していた梅毒性ぶどう膜炎の一例: 池田勝浩、橋田徳康、浅尾和伸、福島葉子、西田幸二
集談会12月12日
4. Bilateral Diffuse Uveal Melanocytic Proliferation (BDUMP)に虹彩嚢腫が合併した1例 白木彰彦、橋田徳康、坂口裕和、西田幸二
5. ASIA-ARVO 2015 Annual meeting
Diagnostic evaluation of RTVue-100 Fourier-domain optical coherence tomography in herpetic eye disease: Kobayashi R, Hashida N, Koh S, Soma T and Nishida K.
6. 第119回日本眼科学会総会: 視神経乳頭浸潤を来した悪性リンパ腫の臨床的特徴 浅尾和伸、橋田徳康、中井慶、西田幸二
7. フォーサムイン大阪: ヘルペス性ぶどう膜炎におけるRTVue-100角膜モジュールの診断的有用性についての検討 小林礼子、橋田徳康、高静花、相馬剛至、前田直之、西田幸二
8. フォーサムイン大阪: 家族性大動脈瘤に合併したiris flocculiの家族例 松岡孝典、橋田徳康、西田健太郎、西田幸二
9. 眼感染症学会2015: ヘルペス性ぶどう膜炎におけるRTVue-100角膜モジュールの診断的有用性についての検討 小林礼子、橋田徳康、高静花、相馬剛至、前田直之、西田幸二
10. 眼炎症学会 2015: サイトメガロウイルス感染に起因した慢性網膜壊死の1症例 浅尾和伸、橋田徳康、臼井 審一、西田幸二
11. 眼炎症学会2015: 高侵達OCTで観察可能であったBDUMPの網脈絡膜の構造的変化 穂積健太、橋田徳康、西起史、西田幸二
12. ARVO2015: Keratic precipitate morphology in uveitic eyes of various etiologies using RTVue-100 fourier-domain corneal anterior module OCT system Hashida N, Shizuka Koh S, Soma T, Nishida
13. ARVO2015: Clinical features of PIOL with optic nerve head involvement. Asao K, Hashida N, Nakai K, Nishida K
14. ARVO2015: The use of anterior segment optical coherence tomography (AS-OCT) for the assessment of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type lymphoma. Kurihara T, Hashida N, Matsushita K, Morimoto T, Nishida K
- 2016年**
15. The 31th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress: Inflammation: EAU and microRNA. Hashida N
16. 第120回日本眼科学会総会: 教育セミナー5. ぶどう膜炎診断と治療のコツ 隅角所見のとり方: 橋田徳康
17. ARVO 2016 Annual meeting: Diagnostic

- evaluation of RTVue-100 fourier-domain corneal anterior module OCT system in uveitic eyes of various etiologies. Hashida N, Koh S, Soma T, Oie Y, Maeda N, and Nishida K.
18. 第413回大阪眼科集談: 眼原発性悪性リンパ腫の治療経過中に精巣転移を来した1例: 三浦健、橋田徳康、西田幸二
 19. 第414回大阪眼科集談会: 特異的な脈絡膜炎を生じたCastleman病の一例: 野口裕未、橋田徳康、大黒伸行、西田幸二
 20. 第414回大阪眼科集談会: Multifocal choroiditis with subretinal fibrosisの1例 阿部 啓一(大阪大学), 橋田 徳康, 原 千佳子, 大黒 伸行, 西田 幸二
 21. 第415回大阪眼科集談会: メトトレキサート関連増殖性疾患に併発したサイトメガロウイルス網膜炎の1例: 外山裕志、橋田徳康、西田幸二
 22. 第50回日本眼炎症学会: Great Debate: iPS細胞で眼炎症性疾患が治せるか? ……反対: 橋田徳康
 23. 第50回日本眼炎症学会: Vogt-小柳-原田病に発症したfocal choroidal excavationの1症例: 浅尾和伸、橋田徳康、西田幸二
 24. 第50回日本眼炎症学会: サイトメガロウイルス角膜内皮炎におけるRTVue-100角膜モジュールの診断的有用性についての検討: 小林礼子、橋田徳康、相馬剛至、三木篤也 臼井審一、前田直之、西田幸二
 25. 家族性大動脈瘤に合併したiris flocculiの家族例: 松岡孝典、橋田徳康、森崎裕子、森崎隆幸 西田幸二
 29. H28年度6月例会北摂地域薬剤師交流研修会: 薬剤師が是非知っておきたい眼科疾患の基礎知識: 橋田徳康
 30. 第5回北摂病診療連携の会: 症例から考える眼炎症疾患 エピソード□: 脈絡膜が厚い: 橋田徳康
 31. 鳥取県眼科アカデミア: ぶどう膜炎診療の観点からみた術後炎症管理: 橋田徳康
 32. 第5回OTCの会: 症例から考える眼炎症疾患 エピソードV: ヘルペスウイルス“ダークサイド”: 橋田徳康
 33. 北摂アレルギーフォーラム: アレルギー性眼疾患を科学する-アレルギー性結膜炎アップデート-: 橋田徳康
 34. 大阪府中央区南医師会学術講演会: アレルギー性眼疾患を科学する-アレルギー性結膜炎アップデート-: 橋田徳康
 33. 阪神アレルギーセミナー: アレルギー性眼疾患を科学する-アレルギー性結膜炎アップデート-: 橋田徳康
 35. 大阪難病連学習講演会: ぶどう膜炎治療におけるiPS細胞の可能性: 橋田徳康
 - 2017年**
 36. 第121回日本眼科学会総会: Multifocal choroiditis with subretinal fibrosisの1例: 阿部啓一、橋田 徳康、原 千佳子、大黒 伸行、西田 幸二
 37. 32nd Asia-Pacific Academy of

Ophthalmology Congress: Diagnostic evaluation of RTVue-100 fourier-domain corneal anterior module OCT system in uveitic eyes of various etiologies: Hashida N, Koh S, Soma T, Oie Y, Maeda N, Nishida K

38. 第418回大阪眼科集談会: 治療経過の評価に前眼部光干渉断層計を使用したMALTリンパ腫の2例: 河本晋平、橋田徳康、丸山和一、西田幸二

39. 第6回博多眼科学術講演会: 症例から考える眼炎症疾患 エピソードIII: 脈絡膜が厚い: 橋田徳康

40. 兵庫県整形外科医会リウマチフォーラム“眼は病の窓”-眼からみた整形外科・リウマチ疾患と分子標的診断・治療-: 橋田徳康

41. 第58回日本花粉学会ランチョンセミナー アレルギー性眼疾患を科学する - 眼のアレルギー対策の常識と非常識: 橋田徳康

〔図書〕(計5件)

1. 橋田徳康、西田幸二: 日本医事新報 臨床医学の展望 30領域のトピックス30 眼科学 2015 4740 (2): 138-141

2. 橋田徳康: 眼科 VZV・HSVによる虹彩毛様体炎 2015 57(6): 819-825.

3. 田倉智之、橋田徳康、西田幸二: 第119回日本眼科学会総会 日本眼科社会保険会議シンポジウム「新たな医療技術評価軸による診療報酬の考え方」日本の眼科 2015:86(7):1015-16.

4. 橋田徳康: 前眼部画像診断A to Z解読のポイント 1)Time domain OCT (VISANTE) p20-25 2016年3月10日発行 株式会社メジカルビュー

5. 橋田徳康: 一目でわかる眼疾患の見分け方 3-3-a) 結核性ぶどう膜炎 p18 3-3-b) 梅毒性ぶどう膜炎 p19 2016年4月1日発刊 株式会社メジカルビュー社

〔産業財産権〕

○出願状況(計4件)

名称: 眼科疾患のバイオマーカー

発明者: 橋田徳康、熊ノ郷淳、西田幸二

権利者: 大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-64685

出願年月日: 2016年3月29日

国内外の別: 国内

名称: ストレスバイオマーカー

発明者: 橋田徳康、熊ノ郷淳、西田幸二

権利者: 大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-64686

出願年月日: 2016年3月29日

国内外の別: 国内

名称: 眼疾患のバイオマーカー

発明者: 橋田徳康、熊ノ郷淳、西田幸二

権利者: 大阪大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2017/12689

出願年月日: 2017年3月28日

国内外の別: 国内外

名称: ストレスバイオマーカー

発明者: 橋田徳康、熊ノ郷淳、西田幸二

権利者: 大阪大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2017/12690

出願年月日: 2017年3月28日

国内外の別: 国内外

○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

橋田 徳康 (HASHIDA Noriyasu)

大阪大学医学系研究科・特任講師

研究者番号: 30456959

(2)研究分担者

川崎 諭 (KAWASAKI Satoshi)

大阪大学医学系研究科・特任准教授

研究者番号: 60347458