

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15639

研究課題名(和文) プロスタサイクリン受容体異常性緑内障の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) The pathologic clarification and new therapy development for glaucoma derived from prostacyclin receptor abnormality

研究代表者

木村 至 (Kimura, Itaru)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60296663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)： 過去にプロスタサイクリン受容体のSNPについて検索を行った結果、変異型(R212C)について、緑内障患者のみに発現し正常対照には発現していないことが明らかとなり、緑内障発症の原因遺伝子であることが考えられた。
プロスタサイクリン受容体異常性緑内障ともいえる緑内障の診断が可能となり(特許第5169306号)、その病態解明と新たな治療法の開発に向けて研究を開始した。受容体のmRNAを用いて、pef/v5-hisa、pcdna5/frtにある制限酵素kpn1 not1を用いてprimer作製を行い、標識可能な受容体を作ることが可能となった。これを用いた種々の検討を今後行っていく。

研究成果の概要(英文)： We investigated SNPs of prostacyclin receptor in the past, and found that the variant (R212C) exists only in glaucoma patients, but not in controls. The variant was thought to be responsible for the etiology of glaucoma.
We are now able to diagnose glaucoma derived from prostacyclin receptor abnormality (Japanese patent No.5169306), and started collaboration with department of pharmacology. We made primer by using restriction enzyme kpn1 not1 in pef/v5-hisa, pcdna5/frt, in the mRNA of prostacyclin receptor, and established the system of fluorescence labeling method. We will study various investigation by using this method.

研究分野：緑内障

キーワード：緑内障 プロスタサイクリン受容体 一塩基多型 動脈硬化 血管生理

1. 研究開始当初の背景

緑内障はわが国では 40 歳以上の人口の約 5%に罹病していると考えられ、失明原因として首位である。そのうち眼圧が正常範囲内にある正常眼圧緑内障 (Normal Tension Glaucoma; NTG) が 7 割以上を占めている。遺伝的要因の存在も考えられ、Myocillin や Optineurin、WDR36 等が原因遺伝子として明らかにされているが、緑内障の発症メカニズムは未だ充分には解明されておらず、現在の唯一の治療法は眼圧を下降させることである。しかしながら、NTG の場合、眼圧を下降させることが困難であるうえ、眼圧下降が病状の進行を阻止できるかも明らかではない。最近では病因として循環障害が報告されるようになり、血管生理の機能異常の関与が示唆されている。本研究の研究者らは 975 例(緑内障 675 例)の DNA を用いてアミノ酸置換を伴うプロスタサイクリン受容体の SNP について検索を行った。その結果アミノ酸配列 212 番目のアルギニンがシステインに置換された変異型 (R212C)(refSNP ID: rs4987262)について、緑内障患者のみ 14 例に発現し正常対照には発現していないことが明らかとなり、緑内障発症の原因遺伝子であることが考えられた。これは当該遺伝子多型をもつ患者はすべて緑内障を発症していることを示し、また開放隅角緑内障患者の 2%は当該 SNP が原因となり緑内障を発症していることを示している。同じ母集団において Myocillin が原因の緑内障患者が 4 例、Optineurin が原因の患者が 2 例しか見出されなかったことから考えると、圧倒的に患者数が多いことも示している。血管因子の遺伝子多型が原因と考えられる緑内障患者が存在し、その変異型受容体をコードする遺伝子が明らかとなった。このことによりいわばプロスタサイクリン受容体異常性緑内障ともいえる緑内障

の診断が可能となり(特許第 5169306 号)、血管因子異常を主因とする緑内障の新たな治療法の開発の幕開けとなることが考えられる。

2. 研究の目的

血管生理の機能異常の観点から緑内障発症について調べたところ、プロスタサイクリン受容体異常に起因すると考えられる緑内障患者が一定数存在することが明らかとなった。

これまでの研究ではこのプロスタサイクリン受容体異常性緑内障ともいえる患者群を極力多数得たうえで、臨床像についての詳細な検討を行ってきたが充分とはいえず、本研究ではさらに眼科的検討だけでなく、循環器病学的精査を併せて行うことにより、心血管疾患との関連についても詳細な検討を行う。

また、動物モデルを作製し、緑内障の発症メカニズムについての基礎的な検討を進め、病態解明を目指す。そして従来の眼圧下降療法のみには頼らない新しい治療法の開発を進める。

3. 研究の方法

(1)当該 SNP が見出される開放隅角緑内障患者のリクルートおよび臨床的病型の検討

文書にて同意の得られた緑内障患者から静脈血を採血し当該 SNP の有無を確認する。当該 SNP の見出された患者と見出されない患者とで臨床的病型(視野障害の程度・パターン・進行速度、眼圧変動・平均眼圧・眼圧に対する薬剤有効性、OCT による視神経乳頭形状、網膜神経線維層厚の測定、視神経乳頭血流動態)について詳細な検討を行う。研究目的で述べたように、原発開放隅角緑内障患者のうちおよそ 2%の割合で当該 SNP が見出されることが考えられる。

さらに当該 SNP の見出された患者のなかで、眼圧が正常範囲を逸脱する患者と、NTG とに分け、臨床的病型について詳細な検討を行う。

当該 SNP の有無につき分類し、緑内障病型の相違につき検討を行う。

当該 SNP をもつ患者のうち、眼圧が正常範囲を逸脱する患者と NTG とで分類し、緑内障病型の相違につき検討を行う。

(2) 当該 SNP が見出される開放隅角緑内障患者の循環器病学的精査

文書にて同意の得られた原発開放隅角緑内障患者のうち、当該 SNP の見出された患者および見出されなかった患者に対して、循環器病学的精査(心電図、心エコー、Pulse Wave Velocity(動脈硬化度測定)、必要に応じてホルター心電図)を行う。

生活習慣についても詳細な問診を行い、総合的にデータを収集し、分析を行う。

緑内障と心血管疾患発症との相関について、当該 SNP の有無につき分類し、検討を行う。

(3) 変異型プロスタサイクリン受容体を過剰発現させたノックインマウスの作製と解析

マウスの変異型受容体を過剰発現させたノックインマウスを作製する。

分子細胞生物学および病理組織学の手法を用いてノックインマウスの検討を行う。週齢で段階に分け、眼球組織切片を作製し、形態学的、免疫組織学的変化について観察を行う。30 週ないし 50 週程度あるいはそれ以上の長期的な観察が必要になる可能性も想定される。網膜神経節細胞のアポトーシスの免疫染色による確認、網膜フラットマウントにおける細胞数カウントにて評価を行うほか、各種酸化ストレスマーカーを使用し、評価を試みることを検討する。ノックインマウスにおいて高眼圧のマウスが出現するかどうかについても注意を払い、定期的な眼圧測定を行う。眼圧について高眼圧タイプと正常眼圧タイプの2種類が一定の割合で出現する場合には、眼圧のタイプ別に分類し、形態学的、組織学的検討をはじめとした解析を行う。

ノックインマウスの心機能のチェック(心電図、心エコー、血行動態測定)を週齢で段階に分け、定期的に行う。何らかの心機能異常が見出された場合には、眼球摘出を行う際に灌流を行い心臓摘出を併施し、必要に応じて心筋についての基礎的検討を行う。

(4) 変異型受容体を培養細胞に過剰発現させた in vitro における検討

過去にサルの網膜神経節細胞(RGC)、網膜色素上皮細胞の初代培養細胞を用いて変異型受容体を過剰発現させ、cAMP の定量的評価を行う計画を立案したが、計画通りに進めることが困難であったため、まずは血管平滑筋細胞にて cAMP の定量的評価を行う。その次に RGC 等の細胞での検討を進めることとする。血管平滑筋細胞、RGC では野生型との比較において各種ストレス刺激を加えた場合の細胞生存率を検討する。また、変異型受容体において、野生型では反応がみられないようなタンパクの探索を行い、病態解明の一助となるようにする。研究が当初計画どおりに進まない場合(ノックインマウスの作製が計画どおりに進まない場合)はこちらの検討を優先して行うこととなる。

4. 研究成果

研究方法(1)~(4)において、(4)から着手することとなり、薬理学教室との共同研究を開始した。まずは、プロスタサイクリン受容体の mRNA を用いて、pef/v5-hisa、pcdna5/frt にある制限酵素 kpn1 not1 を用いて primer 作製を行い、標識可能な受容体を作ることが可能となった。これを用いた種々の検討を今後行っていく。

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5件)

Ota Y, Ozeki N, Yuki K, Shiba D, Kimura J, Tsunoda K, Shinoda K, Ohde H, Tsubota K. The efficacy of Transcorneal electrical stimulation

for the treatment of primary open-angle glaucoma: A pilot study. Keio J Med, 査読有, 2018, Epub ahead of print

DOI: 10.2302/kjm.2017-0015-0A

伊藤陽介, 木村至, 玉城和範, 望月祐人, 渡邊慧, 海老原伸行. ドライアイ合併緑内障患者におけるレバミピド点眼液の有用性の検討. 眼科, 査読有, 60, 2018, pp.175-180

DOI: 10.18888/ga.0000000571

Shoji T, Kato N, Ishikawa S, Ibuki H, Yamada N, Kimura I, Shinoda K. In vivo crystalline lens measurements with novel swept-source optical coherent tomography: an investigation of variability of measurement. BMJ Open Ophthalmol, 査読有, 2017.

DOI: 10.1136/bmjophth-2016-000058

渡邊慧, 木村至, 中澤有吾, 海老原伸行. チューブシャント手術(EX-PRESS)と線維柱帯切除術の術後2年間の治療成績の検討. 眼科, 査読有, 59, 2017, pp.1605-1616

DOI: 10.18888/ga.0000000511

木村至. 黄斑マップをみるコツはありますか? 臨床眼科, 査読無, 69, 2015, pp.130-133

[学会発表](計30件)

渋谷雅之, 樺澤昌, 山田教弘, 勝本武志, 長島崇充, 秋山淳, 兒玉章宏, 庄司拓平, 木村至, 篠田啓. 黄斑円孔初回手術非閉鎖眼の検討. 第71回日本臨床眼科学会, 2017年10月

尾崎公威, 石川聖, 吉川祐司, 渋谷雅之, 勝本武志, 山田教弘, 河内建人, 宮腰瞳, 近藤弘美, 金子恵里奈, 松本惣一, 木村至, 篠田啓. シリコンオイル注入眼の皮膚電極を用いた網膜電図(RETeval)記録. 第71回日本臨床眼科学会, 2017年10月

石井宏和, 庄司拓平, 吉川祐司, 菅野順二, 伊吹寿士, 尾崎公威, 長島崇充, 市川良和, 兒玉章宏, 勝本武志, 渋谷雅之, 山田教弘, 木村至, 篠田啓. スウェプトソース光干渉断層アンギオグラフィーによる黄斑部網膜血管密度の定量化. 第71回日本臨床眼科学会, 2017年10月

吉川祐司, 庄司拓平, 菅野順二, 伊吹寿士, 尾崎公威, 石井宏和, 秋山淳, 木村至, 篠田啓. スウェプトソース光干渉断

層アンギオグラフィーによる視神経乳頭周囲網膜血管密度の検討. 第28回日本緑内障学会, 2017年9月

尾崎公威, 吉川祐司, 庄司拓平, 菅野順二, 伊吹寿士, 石井宏和, 秋山淳, 木村至, 篠田啓. スウェプトソース光干渉断層アンギオグラフィーによる乳頭内網膜血管密度の検討. 第28回日本緑内障学会, 2017年9月

Hanabusa A, Shibuya M, Shoji T, Kimura I, Kanno J, Deguchi T, Shinoda K, Hangai M. Postoperative results and complications of inverted internal limiting membrane (ILM) flap technique to repair macular holes. European Society of Ophthalmology, 2017年6月

Kimura I, Kuroda H, Suzuki M, Ibuki H, Shoji T, Shinoda K, Araie M, Yoneya S.

Ellipsoid zone thickness measurements by high resolution mode-locked laser optical coherence tomography in

healthy eyes. ARVO Annual Meeting, 2017年5月

木村至, 黒田寛人, 鈴木将之, 伊吹寿士, 庄司拓平, 篠田啓, 新家眞, 米谷新. レーザー光干渉断層計による Ellipsoid zone thickness の検討. 第120回日本眼科学会総会, 2017年4月

木村至. スタートアップ! 眼底所見で診る緑内障乳頭 視神経乳頭の局所解剖と正常乳頭所見. 第70回日本臨床眼科学会, 2016年11月

勝本武志, 石沢圭介, 佐々木惇, 木村至, 小島孚允. 診断に苦慮した腺様嚢胞癌の1例. 第70回日本臨床眼科学会, 2016年11月

佐々木貴優, 木村至, 石川聖, 石沢圭介, 茅野秀一, 小島孚允. 転移性虹彩腫瘍により全身転移が明らかとなった卵巣癌の1例. 第70回日本臨床眼科学会, 2016年11月

石井宏和, 秋山淳, 石沢圭介, 佐々木惇, 木村至, 小島孚允. 内容物吸引後被膜切除

が有効であった眼窩内神経鞘腫の1例.
第70回日本臨床眼科学会, 2016年11月
花房彩, 渋谷雅之, 庄司拓平, 勝本武志,
菅野順二, 木村至, 篠田啓, 板谷正紀. 黄
斑円孔に対するinverted internal
limiting membrane(ILM) flapの術後成績
と合併症. 第70回日本臨床眼科学会,
2016年11月
渡邊慧, 木村至, 中澤有吾, 海老原伸行.
チューブシャント手術(EXPRESS)と線維
柱帯切除術の2年間の治療成績の検討.
第27回日本緑内障学会, 2016年9月
太田友香, 尾関直毅, 結城賢弥, 芝大介,
木村至, 角田和繁, 篠田啓, 大出尚郎,
坪田一男. 原発開放隅角緑内障に対する
経角膜電気刺激の効果. 第27回日本緑内
障学会, 2016年9月
石井宏和, 庄司拓平, 吉川祐司, 秋山淳,
木村至. EX-PRESS併用濾過手術後の術後1
年の治療成績と予後因子の検討. 第27回
日本緑内障学会, 2016年9月
秋山淳, 庄司拓平, 吉川祐司, 勝本武志,
木村至. 緑内障EX-PRESS手術時における
compression sutureの効果. 第27回日本
緑内障学会, 2016年9月
木村至, 黒田寛人, 鈴木将之, 伊吹寿士,
庄司拓平, 新家眞, 米谷新. レーザー光
干渉断層計による中心窩無血管領域の検
討(国内報告2). 第33回日本眼循環学会,
2016年7月
Kimura I, Kuroda H, Suzuki M, Ibuki H,
Shoji T, Araie M, Yoneya S. Foveal
avascular zone measurements by high
resolution mode-locked laser optical
coherence tomography in healthy eyes.
European Glaucoma Society 2016, 2016
年6月
Shoji T, Kuroda H, Suzuki M, Ibuki H,
Kimura I, Araie M, Yoneya S. Changes in
the structure of lamina pores within

- the lamina cribrosa using wide
bandwidth, femtosecond mode-locked
laser optical coherence tomography:
Effect of glaucoma. European Glaucoma
Society 2016, 2016年6月
- 21 Kimura I, Kuroda H, Suzuki M, Ibuki H,
Shoji T, Araie M, Yoneya S. Foveal
avascular zone measurements by high
resolution mode-locked laser optical
coherence tomography in healthy eyes.
ARVO Annual Meeting, 2016年5月
- 22 Shoji T, Kuroda H, Suzuki M, Ibuki H,
Kimura I, Araie M, Yoneya S. Changes in
the structure of lamina pores within
the lamina cribrosa using wide
bandwidth, femtosecond mode-locked
laser optical coherence tomography:
Effect of glaucoma. ARVO Annual Meeting,
2016年5月
- 23 Ota Y, Ozeki N, Yuki K, Shiba D, Kimura
I, Tsunoda K, Shinoda K, Ohde H, Tsubota
K. Transcorneal electrical stimulation
in patients with primary open-angle
glaucoma: A prospective long-term,
case-series study. ARVO Annual Meeting,
2016年5月
- 24 木村至, 黒田寛人, 鈴木将之, 伊吹寿士,
庄司拓平, 新家眞, 米谷新. レーザー光
干渉断層計による中心窩無血管領域の検
討. 第120回日本眼科学会総会, 2016年4
月
- 25 庄司拓平, 黒田寛人, 鈴木将之, 伊吹寿
士, 木村至, 新家眞, 米谷新. 篩状板孔
形状と緑内障および篩状板深度・位置の
関連. 第120回日本眼科学会総会, 2016年
4月
- 26 木村至. スタートアップ! 眼底所見で診
る緑内障乳頭 視神経乳頭の局所解剖と
正常乳頭所見. 第69回日本臨床眼科学会,
2015年10月

- 27 吉川祐司,花房彩,勝本武志,庄司拓平,木村至,古内康寛,羽根淵昌明,板谷正紀. 光干渉断層計アンギオグラフィーを用いた進行緑内障の篩状板毛細血管網構築の観察(パイロットスタディー). 第26回日本緑内障学会, 2015年9月
- 28 Kimura I, Tamaki K, Yoshikawa T, Imamura Y, Watanabe S, Nakazawa Y, Ebihara N. The investigation of changes in subfoveal choroidal thickness and sensitivity of visual field in highly myopic glaucoma. ARVO Annual Meeting, 2015年5月
- 29 花房彩, 吉川祐司,勝本武志,庄司拓平,木村至,古内康寛,羽根淵昌明,板谷正紀. 深部強調画像法光干渉断層計アンギオグラフィーによる篩状板毛細血管網描出(パイロットスタディー). 第 26 回日本緑内障学会, 2015 年 9 月
- 30 木村至, 玉城和範, 吉川智子, 今村裕, 渡辺慧, 中澤有吾, 海老原伸行. 強度近視眼の緑内障における視野感度変化量と脈絡膜厚、屈折の検討. 第 119 回日本眼科学会総会, 2015 年 4 月

〔図書〕(計1件)

木村至 ほか 18 名. 富田剛司, 木村至 編, 実戦緑内障 眼底所見で診る緑内障乳頭. 2015, 文光堂, 東京, 総ページ数 155 頁

〔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

木村 至 (KIMURA, Itaru)
 埼玉医科大学・医学部・准教授
 研究者番号 : 6 0 2 9 6 6 6 3

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

()