

令和 4 年 3 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04349

研究課題名（和文）統合的緑内障データベースの構築とメタボロミクスによるバイオマーカー探索

研究課題名（英文）Construction of integrated glaucoma database and discovery of glaucoma biomarker by metabolomics

研究代表者

中澤 徹（Nakazawa, Toru）

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30361075

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：メタボロミクスによる有力なバイオマーカー候補の一次選抜を行うことを目的として、まずはヒト検体の解析を実施した。広義解放隅角緑内障患者の前房水、末梢血、尿をサンプルとし、メタボライトのプロファイルを網羅的に解析した。対照群として、白内障、網膜前膜および黄斑円孔の患者のサンプルを用いた。前房水、血液および尿検体は同一患者から採取されたものを使用した。緑内障群34例、対照群37を解析した結果、主成分分析ならびに判別分析で抽出された緑内障群で変動する代謝物が同定された。さらに、前房水内の代謝物量とMD値、眼軸長などの臨床パラメータとの相関を調べたところ、各パラメータと相関を示す代謝物が複数見つかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、眼局所のイベントを反映すると考えられる前房水内の代謝物に加え、緑内障患者の体質を反映すると考えられる血液中ならびに尿中の代謝物群を同定した。緑内障は不可逆な視野欠損を示す本邦の中途失明原因の第一位の疾患であり、早期診断は失明対策において重要である。本研究により同定された代謝物はバイオマーカー候補として緑内障の診断補助への応用に加え、緑内障病態の理解ならびに個別化医療の実現に向けた基盤研究となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Human samples were analyzed for the purpose of primary selection of powerful biomarker candidates by metabolomics. Comprehensive metabolomics were performed using samples of anterior chamber fluid, peripheral blood, and urine of patients from open-angle glaucoma. As a control group, samples from patients with cataract, preretinal membrane and macular hole were used. The anterior chamber fluid, blood, and urine samples were collected from the same patient. As a result of analyzing 34 cases in the glaucoma group and 37 in the control group, the metabolites varying in the glaucoma group was extracted by the principal component analysis and the discriminant analysis. Furthermore, correlation between the amount of metabolites in the anterior chamber fluid and clinical parameters such as MD value and axial length was investigated, and several metabolites that correlated with each parameter were found.

研究分野：緑内障

キーワード：緑内障 メタボロミクス バイオマーカー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

緑内障は、本邦では中途失明原因第1位の疾患であり、人口の高齢化とともに患者数は増加の一途を辿っている。眼圧下降が唯一エビデンスのある治療だが、十分な眼圧下降が得られても半数の症例では視野障害がさらに進行することが明らかになっている。これまで眼圧以外の様々な緑内障病因について報告がなされているが、緑内障の治療は眼圧下降治療のみに依存している。眼圧下降以外の緑内障治療開発が進まない本質的な理由として、①患者から採取した検体の解析が不十分である、②治療効果を判定するのに長い年月がかかることが挙げられる。これらの課題を同時に克服し効率よく新規治療を開発するためには、大規模な多面的患者検体分析と詳細な客観的臨床データを搭載した統合的バイオデータベースを基盤とした、鋭敏に緑内障病態を反映するバイオマーカーの同定が最重要課題である。申請者はこれまでに大規模緑内障データベースの構築を可能とするネットワークの構築、緑内障バイオマーカーの同定のための探索的研究と検体情報の収集、病態を鋭敏に反映する臨床パラメータの探索・臨床情報の収集のアプローチに分けて戦略的に課題解決の準備を進めてきた。

2. 研究の目的

上述した背景のもと、申請者はすでに良好な予備検討結果が得られたメタボロミクスを中心に、本研究では①統合的緑内障バイオデータベースの構築、②メタボロミクスによる緑内障バイオマーカーの同定、③メタボライトバイオマーカーの病態研究の3つを実施する。緑内障は複雑な背景を持つ多因子疾患であり、患者毎に病因が異なる可能性がある。これらの問題を克服し、治療開発につながる緑内障病態の本質に迫る新たな知見を得るためには、大規模な検体解析が重要である。詳細な臨床情報に加え、ゲノム解析データを含む本申請のバイオデータベースは質、量ともに他施設に先駆けた先進的な取り組みである。また、本申請で試みる緑内障バイオマーカーの探索は、ヒトサンプルと緑内障モデル動物による、最先端の網羅解析技術を駆使した双方向に弱点を補った基盤研究である。本研究の成果は、数十年渡って停滞している緑内障治療に大きな進歩的変革をもたらし、さらに遅々として進まない病態に基づく緑内障細分化に大きく寄与することが期待される。また、本研究で有用な成果が得られた場合は、作製した統合的緑内障バイオデータベースのフレームワークを雛形に、全国的な検体解析ネットワークに発展させ、ビッグデータ解析を行う基盤の形成を目指す。

3. 研究の方法

(1) 統合的緑内障バイオデータベースの構築

通常診療で行っている臨床情報をもとにデータベースを作成する。データ項目は視力、眼圧、角膜厚、ハンフリー視野、光学的眼軸長、SD-OCTによる網膜神経線維層厚・視神経乳頭形状の測定値を用いた。また、先進的な検査であるレーザースペックルフルオログラフィ (LSFG) による視神経乳頭血流測定、SS-OCTによる篩状板解析、皮膚 AGE 測定装置による終末糖化産物測定、血中酸化ストレス値 (dROM, BAP) 測定および尿中酸化ストレス値 (8-OHdG) 測定も行い、データ項目として登録した。申請者はこれまでに理化学研究所との共同研究により実施した大規模ゲノムワイド関連解析より得られた13個の緑内障感受性 SNP を同定しており、当院通院中の約1300人の緑内障患者については既にジェノタイプピング済みである。この遺伝子情報データベースを拡充するためさらに登録患者数を追加した。上述の検査に必要な採血は外来検査時ならびに手術時に患者の同意を得たうえで実施した。

(2) メタボロミクスによる緑内障バイオマーカーの同定

メタボロミクスは研究分担者である東北大学東北メディカルメガバンク機構の三枝大輔博士との共同研究で行った。LC-FTMSによる解析ではHILICカラムを用い、UPLC-QTOF/MSではC18カラムを用いて、それぞれにおいて陽イオン、陰イオンモードによる測定とPCA、OPLS-DAおよびS-plotによる解析を行った。本測定では、研究分担者により確立された測定誤差を補正するための新たなアルゴリズムに基づく解析手法を用いた(PLoS One. 2016. 11(8):e0160555)。広義解放隅角緑内障患者の前房水、末梢血、尿をサンプルとし、メタボライトのプロファイルを網羅的に解析した。対照群として、白内障、網膜前膜および黄斑円孔の患者のサンプルを用いた。緑内障群と対照群でデータを比較し、変動を示すメタボライトをピックアップした。バイオマーカー候補の優先順位付けを行うため、網膜神経節細胞障害モデルマウス(視神経軸索挫滅モデル)の網膜を同様の手法により解析し、マウスメタボロミクスの結果を参考に共通するメタボライトを同定した。緑内障は網膜神経節細胞が障害される疾患であり、網膜神経節細胞が限局する網膜神経節細胞層の限局的な解析が必要となるため、バイオマーカー候補代謝物のイメージングMSによる局所的な代謝物同定も合わせて実施した。

(3) メタボライトバイオマーカーの病態研究

ヒト線維柱帯細胞株に対する眼内変動代謝物の影響を評価するため、細胞収縮をGel contraction assay, 細胞形態をphalloidin rhodamines染色を実施した。また、網膜神経節細胞内の遺伝子発現を評価するため、マウス眼内に網膜神経節細胞を蛍光標識するウイルスベクターであるAAV2-mCherryを硝子体内に投与し、一か月間通常飼育した。その後視神経挫滅をおこない、その2日後に眼球摘出、シングルセル化しセルソーターで網膜神経節細胞のみを単離した。その後、RNA抽出、cDNA合成しリアルタイムPCRにより標的遺伝子の発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 統合的緑内障バイオデータベースの構築

データベース構築にあたり臨床検査データを一括でエクスポートし取得するためのデータサーバーを調整した。これにより手作業入力に比べて格段に速く精度の高いデータベースの構築が可能となった。また、血中酸化ストレスを中心とした緑内障関連因子の測定を実施し 500 例以上の緑内障患者を新たにバイオデータベースにエントリーした。加えて、エントリー済みの緑内障患者ゲノムをジャポニカアレイでタイピングした。現在インピュテーションによる緑内障感受性 SNPs を確認中である。

(2) メタボロミクスによる緑内障バイオマーカーの同定

メタボロミクスによる有力なバイオマーカー候補の一次選抜を行うことを目的として、まずはヒト検体の小規模解析を実施した。広義解放隅角緑内障患者の前房水、末梢血、尿をサンプルとし、メタボライトのプロファイルを網羅的に解析した。対照群として、白内障、網膜前膜および黄斑円孔の患者のサンプルを用いた。前房水、血液および尿検体は同一患者から採取されたものを使用した。緑内障群 34 例、対照群 37 を解析した結果、主成分分析ならびに判別分析で抽出された緑内障群で変動する代謝物が同定された。緑内障群の前房水内で増加した代謝物が 13 種、減少した代謝物が 9 種、緑内障群の血漿中で増加した代謝物が 13 種、減少した代謝物が 28 種、緑内障群の尿中で増加した代謝物が 7 種、減少した代謝物が 1 種同定された。さらに、前房水内の代謝物量と年齢、術前眼圧、角膜厚、MD 値、眼軸長などの臨床パラメータとの相関を調べたところ、各パラメータと中程度の相関を示す代謝物が複数見つかった。本結果は眼内代謝物の組成が緑内障病態を反映しうるマーカーとしての可能性がある一方、前房水採取は侵襲があり手術時以外のサンプリングが困難である。そのため、前房水内代謝物環境を反映する血中および尿中代謝物を探索するため、同一患者から得られた前房水との相関比較解析をおこなったが目的とする代謝物は同定されなかった。本結果は、前房水内の代謝物変動は眼局所のイベントであり血中および尿といった全身性液性成分に反映されないことが示された。

一方、緑内障群の血液中で増加および減少した代謝物群は緑内障患者の体質を反映するバイオマーカーの可能性もある。そのため、緑内障群の血液中で変動した代謝物のうち特に統計的有意差のあり、なおかつ特徴的な同一カテゴリーに属する 7 代謝物について再現性の確認ならびに代謝物定量のため、別コホートの緑内障群ならびに対照群をそれぞれ約 100 検体ずつ準備した。近日中に GC/MS によるメタボローム解析を実施する予定である。

このような多検体の収集ならびに解析作業は煩雑であり、検体を取り違えるリスクが伴う。この問題を解消するため、東北大学メディカルメガバンク機構の協力のもと、サンプルの取り違えなどを防ぐため 2 次元バーコードがラベルされたチューブで検体を識別管理し、多数の検体を解析する上で必要なプラットフォームを整えた。

(3) メタボライトバイオマーカーの病態研究

緑内障の治療において唯一エビデンスのある治療は眼圧下降のみであり、眼圧が緑内障病態における重要な因子である一方、その眼圧上昇における分子機序については不明な点が多く残されている。上述のメタボロミクスにおいて同定された緑内障群の前房水内で変動する代謝物群のうち、術前眼圧と相関する代謝物の存在を明らかにした。これら代謝物の眼圧に対する影響を評価するため、標的として線維柱帯細胞に着目した。市販のヒト線維柱帯細胞株における作用を培養条件下で評価した結果、本代謝物が線維柱帯細胞の収縮や形態変化に影響を及ぼすことを明らかにした。本結果は、前房水内代謝物が線維柱帯細胞の形質変化を促すことで眼圧上昇に寄与する可能性を示唆している。

また、視神経軸索控滅モデルマウスの網膜内ならびに網膜神経節細胞層において L-アセチルカルニチンの増加がメタボロミクスならびにイメージング MS の結果から明らかとなった。L-アセチルカルニチンの合成酵素であるカルニチンアセチルトランスフェラーゼの発現を評価するため、網膜神経節細胞を単離し qPCR による mRNA 遺伝子発現を測定したところ、視神経控滅 2 日後の網膜神経節細胞において未処置マウスに対して有意なカルニチンアセチルトランスフェラーゼの遺伝子発現の増加が認められた。L-アセチルカルニチンは緑内障群の前房水内でも対照群に対して有意な増加が認められており、緑内障病態の本態である網膜神経節細胞障害のバイオマーカー候補である可能性が示された。

なお、下記を本研究成果として知財申請した。

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：視神経障害の診断用バイオマーカー

発明者：中澤徹、佐藤孝太、三枝大輔

権利者：国立大学法人 東北大学

種類：基礎出願

番号：2017-238492

出願年：2017/12/13
国内外の別：国内

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kota Sato
2. 発表標題 Metabolomic analysis of optic nerve-injured mouse retina
3. 学会等名 The 29th Meeting of Japan Glaucoma Society
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 視神経障害の診断用バイオマーカー	発明者 中澤徹、佐藤孝太、 三枝大輔	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2017-238492	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 視 神経障害の診断用バイオマーカー	発明者 中澤徹、佐藤孝太、 三枝大輔	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2017-238492	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	三枝 大輔 (Saigusa Daisuke) (90545237)	東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・講師 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------