

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16969

研究課題名（和文）開放隅角緑内障における新規病態マーカーの戦略的探索

研究課題名（英文）Roles of inflammatory proteome in open angle glaucoma

研究代表者

川本 由紀美 (KAWAMOTO, Yukimi)

鳥取大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00759920

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：緑内障眼において、IL-1、IL-2、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IFN- γ 、TNF- α 、MCP-1、VEGFなど多くのサイトカインが術前眼圧と高度に相関していた。緑内障の有無の判別には、IL-8上昇が最も高いオッズ比を示した。また、IL-8上昇が線維柱帯切除術後の予後不良（眼圧再上昇）に関連していた。さらに、ヒト線維柱帯に対して、IL-8、MCP-1、さらにサイトメガロウイルス感染が、何れも細胞間結合や細胞骨格経路の再構築を活性化させ、細胞移動能力を制御していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障の病態マーカーは、これまで報告があるが、病態において特異的に上がるサイトカイン種の解析に限られていた。しかしながら、疾患を分類し得るのみでは、それが実際に病態を反映しているのか明らかではない。本研究では、緑内障において重要な病態を代表する項目として、眼圧、視野、緑内障手術予後に関わるマーカーを抽出することを試みた。このようなマーカーは、実際に標的治療としても利用できる可能性があるため、ヒト線維柱帯細胞を用いて、その分子病態的意義まで検証を進めた。この経路の詳細な解析あるいは検証により、新たな治療薬やストラテジーの創出につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In eyes with primary open angle glaucoma (POAG) or pseudoexfoliation glaucoma (PEG), the level of interleukin (IL)-1, IL-2, IL-4, IL-8, IL-23, and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 were significantly elevated. IL-8 had the highest odds ratio for determining the presence or absence of glaucoma. Levels of IL-8 and MCP-1 were significantly correlated with preoperative intraocular pressure or visual field defects in PEG eyes. Structural equation modeling analysis indicated elevated IL-8 was significantly associated with poor prognosis after trabeculectomy. This suggested that IL-8 directly affects outflow tract obstruction or remodeling. When contractility and cell movement were used as in vitro model of trabecular outflow obstruction, IL-8, MCP-1, and cytomegalovirus infection activated cell-cell junctions and remodeling of cytoskeletal pathways. This pathway was suggested to play important roles in regulation of cell migration or contractility.

研究分野：眼科学

キーワード：緑内障 サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)緑内障は、日本人の失明原因の1位であるが、近年、多くのカテゴリーの点眼薬が利用可能となり治療の選択肢が広がってきた。しかし、その進行は一般に遅く年余にわたる。また、悪化スピードも左右で異なり、治療薬への反応性も個人個人で異なる。このため、治療方針に迷うことも多い。現状では、長期的な眼圧コントロール能力を推測して治療薬を選択し、視野障害の進行予測に基づいてマネージメントせざるを得ない。そこで、長期管理をする上で指標になる因子の解明が待たれる。しかし、治療への反応性や予後を予測するうえでの基準となり得るマーカーは未だ十分解明されているとは言いがたい。

(2)緑内障自体は、多岐にわたる障害の一連の疾患の集合体として考えたほうがよいと考えられる。実際、緑内障において報告された関連遺伝子の機能あるいは想定される局在は、線維柱帯、視神経、網膜、さらにそのコンポーネントである網膜神経節細胞(RGC)、アストロサイト、軸索など様々である。これまでの知見より、緑内障は遺伝子のみでは説明できず、加齢性、血管性、炎症性などの後天的因子の関与を考慮する必要がある。

(3)線維柱帯を始めとする conventional outflow の経路は、眼圧の制御に関わる重要な経路である。その経路は、前房水の中にプロテオームとして反映されると想定された。特に開放隅角緑内障(OAG)のリスク因子を考えた場合、強度近視はその一つとしてよく知られている。しかし、強度近視と OAG の疫学的関連性はあるもののいかに寄与するかの詳細は未だ判明していない。おそらく強度近視に関連する因子が直接のリスク因子である可能性が示唆される。

これまで私は、強度近視や加齢黄斑変性に見られる脈絡膜新生血管発症における炎症性側面の病態解明を試みてきた¹⁾。そこで、OAGと近視性脈絡膜新生血管に共通する炎症性側面に関する因子が、OAGのマーカーあるいは治療標的候補として利用できるのではと想定した。

2. 研究の目的

(1)OAG患者における眼圧上昇には、conventional outflow 低下の寄与が最も高い。そこで本研究は、conventional outflow 低下につながる線維柱帯障害に関連する因子あるいはマーカーを前房内の炎症性メディエーターの観点から探索する。

(2)次に、その因子がいかに線維柱帯を障害するのかをヒト線維柱帯細胞で検証し、その分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

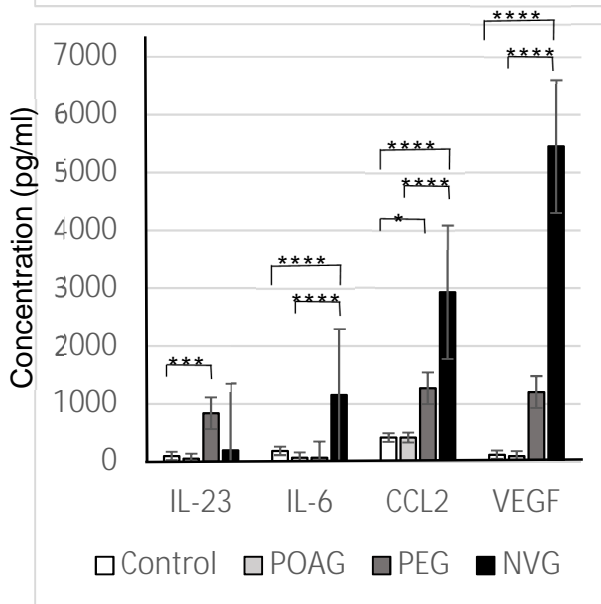
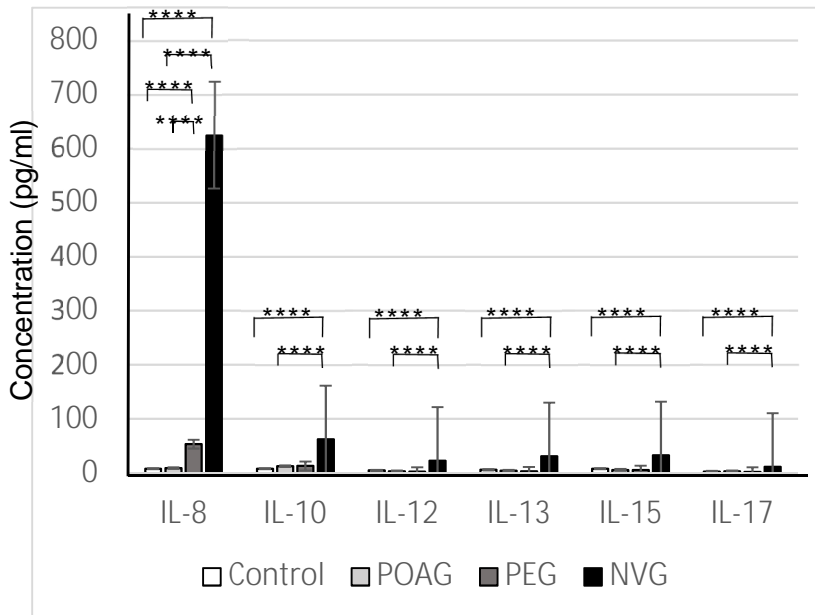
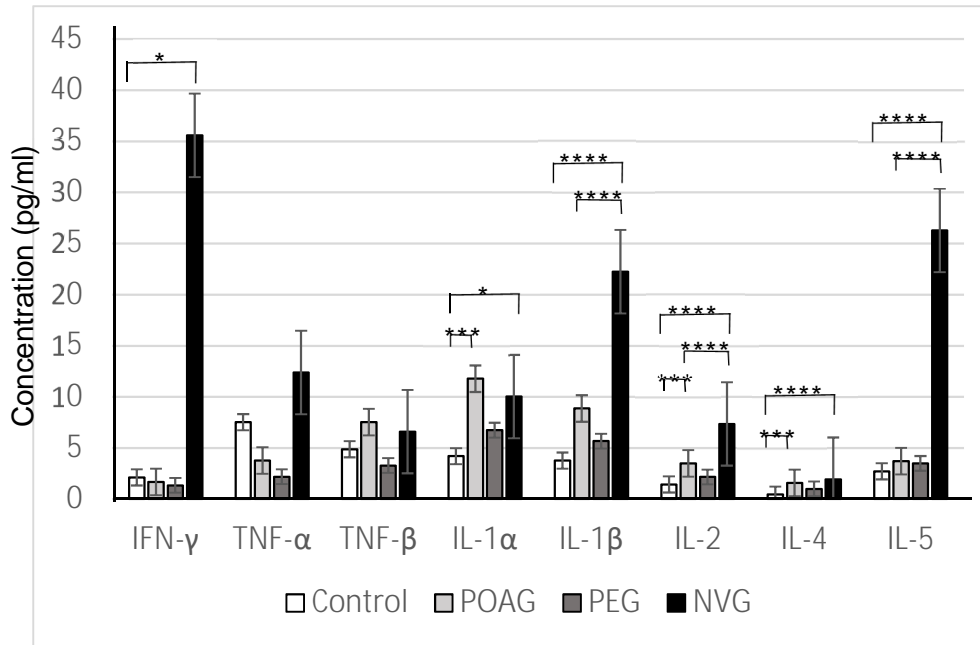
(1)緑内障患者、白内障患者(正常および強度近視者)より採取した前房水の炎症性タンパクプロファイル(プロテオーム)を、炎症性サイトカイン誘導に着目して解析する。眼圧、視野変化、C/D比、治療への反応性など臨床的パラメーターと関連する因子について、疫学的手法及び bioinformatics 手法を併用して、責任候補因子を抽出し、マーカーとしての臨床的有用性を評価する。種々のパターン認識解析手法による情報をもとに、OAG、あるいは正常者の判別、さらに臨床パラメーターとの関連について、線形混合回帰、コックス比例ハザードモデルを用い、その寄与を疫学的手法で検証し、マーカーとしての有用性を検証する。

(2)緑内障や線維柱帯に関連するすべての遺伝子や分子を用いて、緑内障のネットワークモデルを作成する。このモデルは、これまでに判明しているすべての緑内障のすべての文献より網羅的に抽出した遺伝子、分子の有意な統計的関連性に基づくネットワークとして記述する。これにより中心となる未知のシグナル因子の予測、さらに実際の分子生物学的解析の前の統計的仮説検証を可能とする。ステロイド反応性あるいはヘルペスウイルス感染により線維柱帯が緑内障性変化を来することが知られているため、次にそのマイクロアレーデータと前述のモデルを統合する。再度 outflow に関連する因子を抽出し、最終的な緑内障性線維柱帯(outflow)モデルを作成し、候補遺伝子の寄与や関連性を解析する。

(3)実際に因果関係があるかを、ヒト培養線維柱帯細胞を用いて検証する。前房水からの候補マーカー群の寄与を検証するためには、候補マーカー群の培養ヒト線維柱帯細胞におけるレセプター発現を検証した後、線維柱帯細胞へ曝露させる。また、サイトメガロウイルス感染は線維柱帯細胞障害のモデルとなる。これらの障害モデルを用いて、mRNA を抽出しマイクロアレーにより網羅的に検証した後、ELISA、ウェスタンブロットを用いてシグナリング経路を検証する。

4. 研究成果

(1)OAGのマーカーあるいは予後に影響する眼内因子を探索するため、緑内障手術加療を必要としたOAG 101例、さらに正常者(白内障患者) 100例を対象に前房水サイトカインプロファイルの探索を行った。その結果、多くのサイトカインの有意な上昇を認めた(図1、文献2より引用)。緑内障眼においては IL-1、IL-2、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IFN-、TNF-、MCP-1、VEGF など多くのサイトカインが術前眼圧との高度な相関を認めた。また、緑内障の有無の判別には IL-8 上昇が最も高いオッズ比を示した。



*: P<0.05, **: P<0.01,
: P<0.005, *: P=0.000

図1 緑内障病型別 前房水サイトカインの濃度
(Control:正常者、POAG:原発開放隅角緑内障、PEG:落屑緑内障、NVG:血管新生緑内障)

次に、これらの分子群が実際に診断マーカーにとどまるのか、あるいは予後予測にかかわる因子群であるのかを検証した。その結果、IL-8 上昇が線維柱切除術後の予後不良（眼圧再上昇）に関連していた。以上より、IL-8 は、流出路の閉塞やおそらくリモデリングに直接影響すると考えられた。また、マーカーとして特に有意な関連を示したもう一つのケモカイン MCP-1 は、こうした線維柱帯流出路の閉塞やリモデリング経路の活性化を修飾しているのではと想定された。

(2)次に、眼圧上昇に寄与する流出路に対する影響を検討するため、ヒト培養線維柱帯細胞を用いた検証に着手した。また、サイトメガロウイルス感染は、線維柱帯炎による眼圧上昇が知られており、あわせて評価を行った。その結果、ヒト線維柱帯に対して、IL-8、MCP-1、さらにサイトメガロウイルス感染は、何れも細胞間結合や細胞骨格経路の再構築を活性化させ、細胞移動能力を制御していることが判明した。線維柱帯細胞における発現変動遺伝子群のネットワーク解析を行った結果、最も有意な標準的経路は、上皮の接着結合のリモデリングとそのシグナリングと注釈付けされた。治療標的候補を含む変動遺伝子群のネットワークを図2に示した。

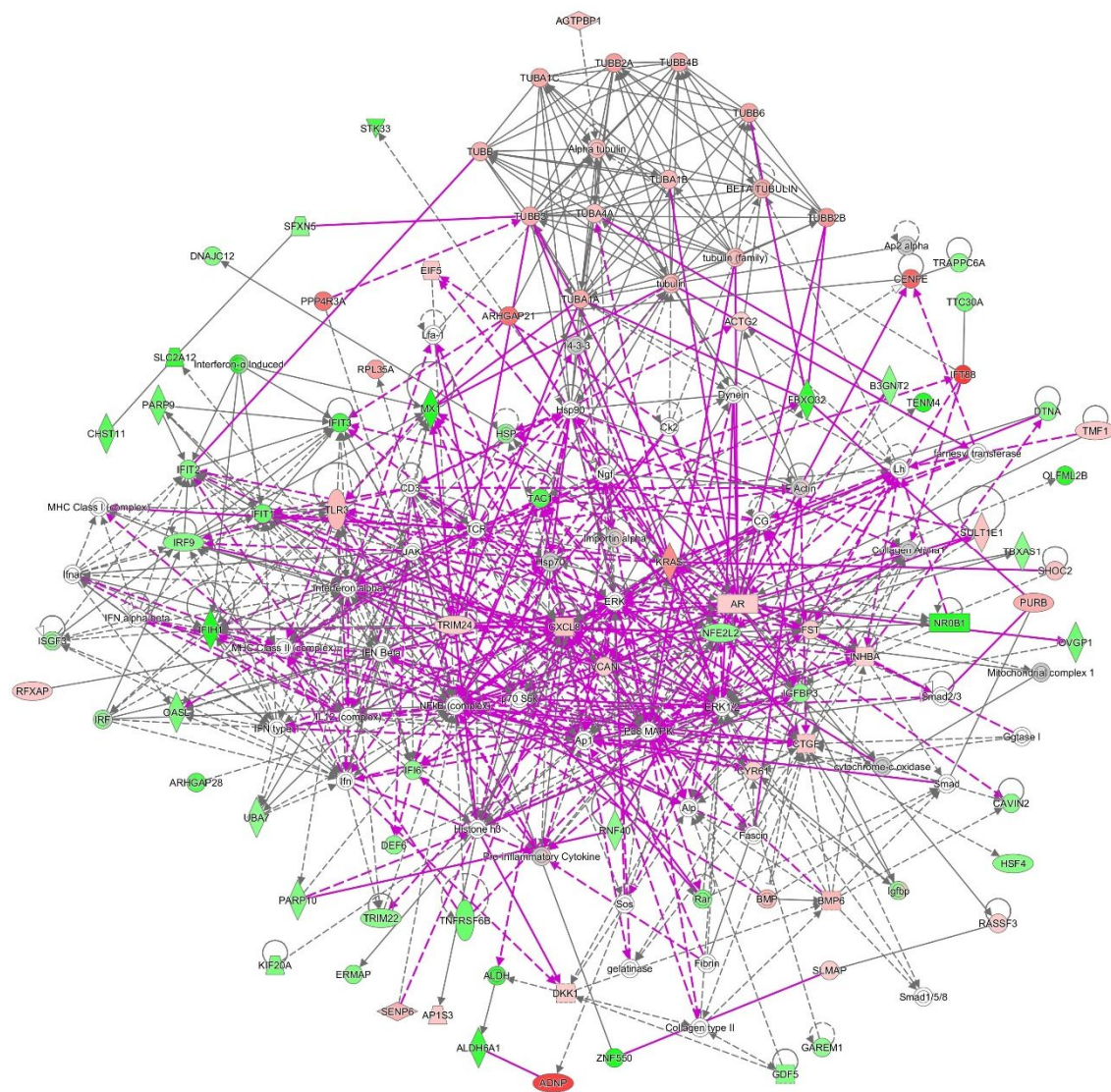


図2 線維柱帯細胞における発現変動遺伝子群のネットワーク

現在、線維柱帯を標的とする薬剤標的を探索するため、これらの解析結果をもとに下流シグナルの活性化を指標に共通経路の探索を進めつつある。これにより、これまで知られていなかった線維柱帯細胞が眼圧を検知する重要な経路の解明につながる可能性があり、引き続き研究を進めている。

< 引用文献 >

Yamamoto Y, et al. Associations of inflammatory cytokines with choroidal neovascularization in highly myopic eyes. Retina. 2015;35:344-350.

Chono I, et al. High interleukin-8 level in aqueous humor is associated with poor prognosis in eyes with open angle glaucoma and neovascular glaucoma. *Scientific Reports*. 2018;8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chono Ikuyo, Miyazaki Dai, Miyake Hitomi, Komatsu Naoki, Ehara Fumie, Nagase Daisuke, Kawamoto Yukimi, Shimizu Yumiko, Ideta Ryuichi, Inoue Yoshitsugu	4. 巻 8
2. 論文標題 High interleukin-8 level in aqueous humor is associated with poor prognosis in eyes with open angle glaucoma and neovascular glaucoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-32725-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮崎大、蝶野郁代、三宅瞳、小松直樹、武信二三枝、永瀬大輔、川本由紀美、清水由美子、井上幸次
2. 発表標題 前房内IL-8は、開放隅角緑内障と血管新生緑内障の予後不良に関連する
3. 学会等名 第36回鳥根大学眼科同窓会学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江原二三枝、宮崎大、清水由美子、川本由紀美、佐々木慎一、井上幸次、足立香織、甲斐政親、難波栄二
2. 発表標題 サイトメガロウイルス感染後ヒト線維柱帯細胞の転写応答
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	宮崎 大 (MIYAZAKI Dai)		