

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09998

研究課題名(和文) 特発性黄斑円孔の発症病理における分子生物学的メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular biological analysis of pathogenesis in macular hole development

研究代表者

森 圭介 (Mori, Keisuke)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：90251090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らは臨床的観察により、性ホルモンや細胞接着因子等が、網膜の脆弱性や網膜硝子体間の接着異常を引き起こしている可能性を考え、黄斑円孔(MH)の網羅的遺伝子発現解析(GWAS)を開始した。その結果、現時点では240例とPreliminaryだが、5番染色体にある細胞接着因子およびその関連領域に $10e-7$ レベルでの関連が示された)。ゲノムワイド有意水準には達していないPreliminaryなデータで、かつ未発表のため、ここに具体的な感受性遺伝子を記載することはできないが、症例数が少ない割にはP値は高いと考えられる。今後、少なくともCase 500例を集めていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MHは発病した時点で、視力に直接影響のある黄斑部網膜が硝子体の牽引により欠損してしまう疾患であり、急激な視力低下を伴う。唯一認められている治療法は硝子体手術で、それにより円孔を閉鎖することはできるが、欠損した網膜は神経組織のため再生せず、グリア組織で置き換えられる。そのため、白内障手術のような劇的な視力の改善は得られにくく、特に発症後時間が経過したものの視力予後は不良である。MHの原因遺伝子や分子生物学的機序が特定できれば、疾患概念が大きく変わるの言うまでもなく、当該研究によりMHに対する分子創薬や個別化医療への新しい道が開かれる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Based on clinical observations, we considered the possibility that sex hormones and/or cell adhesion molecules may cause retinal fragility and adhesion abnormalities at the vitreoretinal interface and conducted a comprehensive gene expression analysis (GWAS) of macular hole. Preliminary data of 240 cases showed a significant association between macular hole and gene variants of cell adhesion molecule and its related regions on chromosome 5 ($p < 10e-6$, unpublished data). Since the data are preliminary that have not reached the level of genome-wide significance and have not been published, specific susceptibility genes cannot be described here, but the P value is considered to be high enough for continuous analysis despite the small number of cases. We plan to collect at least 500 cases in the future.

研究分野：眼科学

キーワード：黄斑円孔 網羅的遺伝子解析 光干渉断層計 後部硝子体剥離 細胞接着因子

1. 研究開始当初の背景

Gass の報告以来、黄斑円孔は後部硝子体皮質の収縮による接線方向の牽引で生じると考えられてきた (Gass JDM. Arch Ophthalmol 1988;106:629; Am J Ophthalmol 1995;119:752)。一方、黄斑円孔の硝子体サンプルからは、細胞成分や線維増殖組織などはほとんど含まれていなかったことから (Sadda SR, et al. Arch Ophthalmol 1999;117:478)、後部硝子体皮質の収縮には懐疑的な意見もあったが (Smiddy WE, et al. Am J Ophthalmol 1989;108:360)、決定的な事実が確認されなかったため、長い間未解決であった。

近年、光干渉断層計 (OCT) の画像が飛躍的に進歩し、網膜硝子体界面を詳細に観察することが可能となった。モンタージュの手法を用いた広角 OCT 画像では、MH の硝子体皮質はピンと張って緊張しているのではなく、緩んで皺壁を形成していた (Mori K, et al. Ophthalmology 2012、**図 1**)。また、トラッキングシステムを使用して、眼球運動前後の同一部位を撮像した OCT

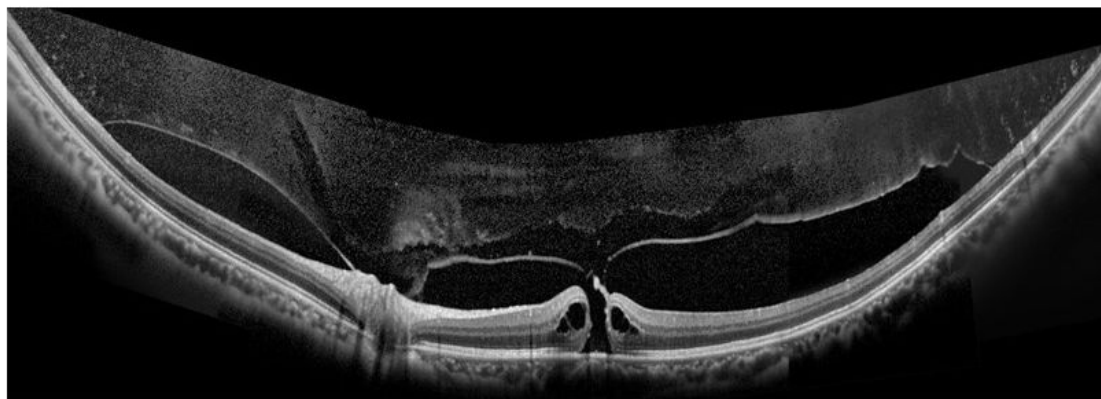


図1. 黄斑円孔の広角OCT画像。硝子体皮質は緩んで皺壁を形成している。

の重ね合わせ画像では、網脈絡膜のずれは見られなかったが、硝子体皮質は幾重にもかさなりあっており、硝子体皮質が眼球運動により容易に移動することが示された (Mori K, et al. Am J Ophthalmol 2015、**図 2**)。加えて、早期円孔では中心窩だけでなく、周辺部網膜にも分層化が見られた (Mori K, et al. Ophthalmol 2012、**図 3**)。これらのことから、黄斑円孔では、後部硝子体皮質

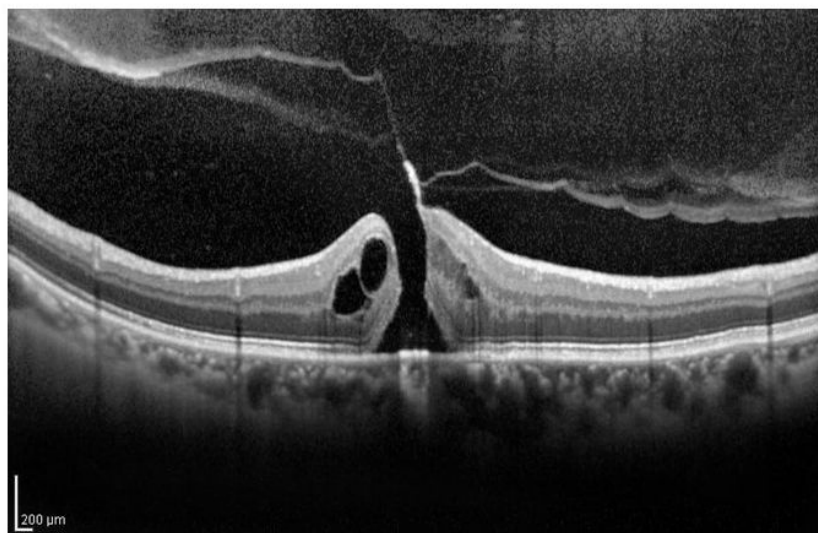


図2. 眼球運動前後のOCT重ね合わせ画像。後部硝子体皮質の動きが鮮明に描出されている。

の細胞増殖等による接線方向の収縮など、今まで考えられてきたような硝子体側の病変ではなく、網膜、特に中心窩だけでなく「網膜全域」に病変の首座があることが強く疑われた。MH の好発年齢が、正常 PVD の好発年齢と近似していることから、正常 PVD の進行過程において、網膜側の病因、例えば、後部硝子体と網膜内層の強い接着力、網膜の脆弱性 (特に Muller 等の Glia 支持組織の脆弱性) などがあると考えれば一元的に解釈できる。黄斑円孔は女性に多いこともあり、性ホルモンや結合織・細胞接着因子等に関する部分の特異性が作業仮説として成立する。

2. 研究の目的

上記の事実および作業仮説に基づき、我々は、黄斑円孔の発症メカニズムを臨床的および分子生物学的両面からを解明することを目的とした。この目的のため、黄斑円孔発症の原因遺伝子の特定とその遺伝子の生体内での発現について、血清中、硝子体液中、および内境界膜で確認することとした。

3. 研究の方法

上記の研究目的のため、以下の項目について検討した。

- (1) 後部硝子体剥離 (PVD) に対する臨床的解析
黄斑円孔眼 (50 眼) と正常眼 (150 眼) において、PVD の発症年齢および後部硝子体の形態について検討した。後部硝子体の形態は、光干渉断層計 (DRI OCT Triton, Topcon, Tokyo) を用いた。具体的には、PVD の進行している周辺部硝子体に見られる顆粒状高輝度帯 (Granular hyperreflektion) 波状皺壁 (wavy-shaped posterior cortical vitreous configuration) および PVD の進展している方向性 (上方、下方、鼻側、耳側) に特異性があるかどうか、の点について比較検討した。

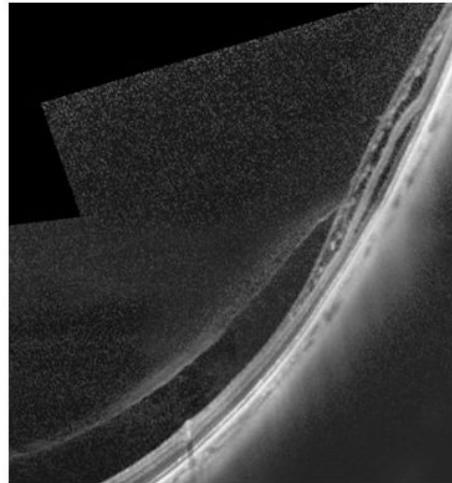


図3. 黄斑円孔の周辺部のOCT像。網膜の分層化が見られる。

- (2) 網羅的遺伝子発現解析 (genome-wide association study; GWAS)

対象は黄斑円孔に罹患した患者 144 名と眼底疾患を持たない正常対照者 144 名であった。黄斑円孔はいわゆる特発性のものに限り、各種眼底疾患 (強度近視、外傷、網膜血管病変に伴う嚢胞様黄斑浮腫や網膜前膜、網膜剥離等) から続発性に起こしたものは除外した。使用した GWAS のプラットフォームは、Illumina Human CoreExome-24v1-4 で、Data filtering は、sample call rate < 95%, SNP call rate < 95%, HWE test $p < 0.001$ とした。その結果、以下のように quality control された粗データが得られた。

```
0 of 288 individuals removed for low genotyping (MIND > 0.05)
567218 variants loaded from plink input files
491 markers to be excluded based on HWE test (p <= 0.001)
1801 SNPs failed missingness test (GENO > 0.05)
After frequency and genotyping pruning, there are 564926 SNPs
```

4. 研究成果

- (1) PVD に対する臨床的解析

正常眼の PVD の進展過程は、既報に示した (Tsukahara M, et al. Ophthalmology 2018) ように、Stage 0~4 の 5 段階に分けられる。黄斑円孔眼も同様な過程を経て、PVD が進展していく。特に円孔が発症する段階は PVD の Stage 2, 3 に相当するため、この段階が重要となる。具体的には、parafoveal PVD (硝子体皮質は中心窩と乳頭で網膜と接着しているが、他の部位では剥離している) と parapapillary PVD (中心窩での接着が外れ、乳頭でのみ接着している) に相当する。Stage 2 で、中心窩への牽引がかかり、黄斑円孔が形成されるわけだが、その平均発症年齢は、表に示すように、stage 2 では、円孔眼 64.2 歳、正常眼 67.7 歳で二群間の差に有意差はなかった ($p=0.26$)。同様に Stage 3 についても有意差はなく ($p=0.21$)、黄斑円孔の発症原因とされる PVD は正常眼の発症時期と差異はなかった。

また、PVD をおこしている後部硝子体皮質の形態についても、顆粒状高輝度帯 (Granular hyperreflektion) 波状皺壁 (wavy-shaped posterior cortical vitreous configuration) および PVD の進展している方向性 (上方、下方、鼻側、耳側) いずれの因子についても、黄斑円孔眼と正常眼とで有意差はなかった。これらのことから、PVD の進展時期、およびその形態は正常眼と黄斑円孔眼とでは、少なくとも臨床的には差はなく、類似した形で進行していくものと考えられた。

表 . PVD の Stage と年齢よび後部硝子体皮質の形態 .

	Age (yo) *		Granular Hyper- reflection	Wavy- shaped PCV	Geographic Distribution of PVD
	MH	Normal			
Parafoveal PVD	64.2±6.8	67.7±8.8	0.58	0.37	0.91
Normal PVD: stage 2	0.26				
Parapapillary PVD	66.2±8.4	72.7±11.9	0.84	0.88	0.86
Normal PVD: stage 3	0.21				

表中の数字は黄斑円孔群と正常群とを比較した場合の危険率(p 値) .Chi-square test. * t-test.

(2) GWAS

GWAS の結果を図 4 に示す。5 番染色体にある細胞接着因子 (矢印) に $p=6.47 \times 10^{-7}$ のレベルでの関連がみられた。また遺伝子座で近傍にある、その関連遺伝子群でも比較的高い関連がみられた。

上記の臨床的および細胞生物学的検索によって、黄斑円孔眼の PVD の進展様式は正常眼のそれと差異はなく、ピンとはって中心窩を接線方向に牽引していることは否定されること、つまり、硝子体の異常収縮による黄斑牽引ではなく、網膜硝子体界面における細胞接着の異常により発症している可能性が高いことが示唆された。今後、これらのデータを補充して、Replicateするとともに、生体内・眼内、および網膜内での発現の差異を確認していく。

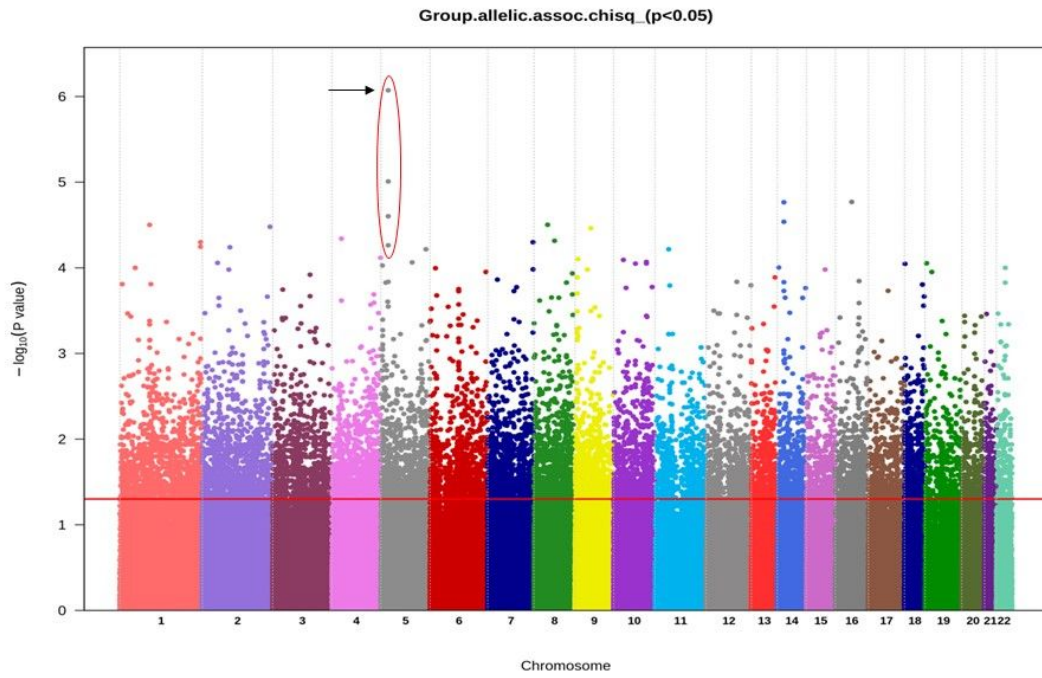


図4. 現時点までのGWASでのManhattan Plot. サンプル数はまだ少ないが、5番染色体にある細胞接着因子（矢印）に $P=6.47 \times 10^{-7}$ の関連が見られた。赤丸はそれに関連する遺伝子群。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 ITO YOKO, TAKATSUDO YUKI, GEHLBACH PETER L., MORI KEISUKE	4. 巻 238
2. 論文標題 Mechanistic Insights into the Pathogenesis of Proliferative and Nonproliferative Vitreomacular Traction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajo.2021.11.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi Ayumi, Ito Yoko, Takatsudo Yuki, Hara Naoto, Gehlbach Peter L., Mori Keisuke	4. 巻 62
2. 論文標題 Posterior Vitreous Detachment in Normal Healthy Subjects Younger Than Age Twenty	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 19~19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.62.13.19	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 -
1. 著者名 林あゆみ、井上樹、森圭介	4. 巻 33(4)
2. 論文標題 広角眼底システムと角膜間距離における観察範囲の変化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 眼科手術	6. 最初と最後の頁 591-594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 129.Bikbova G, Oshitari T, Baba T, Yamamoto S, Mori K.	4. 巻 2019
2. 論文標題 Pathogenesis and Management of Macular Hole: Review of Current Advances.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/3467381	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 伊藤洋子、塚原麻由佳、高津戸佑騎、森圭介.
2. 発表標題 Vitreomacular tractionの病変部位と発症機序.
3. 学会等名 第75回日本臨床眼科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森圭介
2. 発表標題 教育セミナー 2 網膜硝子体疾患の手術治療. 黄斑円孔の広角OCTによる観察と手術戦略.
3. 学会等名 第60回日本網膜硝子体学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森圭介
2. 発表標題 後部硝子体剥離と網膜硝子体界面病変における新しい考え方
3. 学会等名 第98回Tokyo Ophthalmology Club（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mori K.
2. 発表標題 Initiation and Progression of Posterior Vitreous Detachment.
3. 学会等名 Macula Society 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mori K.
2. 発表標題 Initiation and Progression of Posterior Vitreous Detachment.
3. 学会等名 Macula Society 2020 (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------