

機関番号：82643

研究種目：基盤研究（C）（一般）

研究期間：2008 年～2010 年

課題番号：20592068

研究課題名（和文）プロテオーム、リポドミクスによるドライアイ患者涙液の網羅的解析

研究課題名（英文）Proteomic and Lipidomic Analysis of Tear Fluids from Dry Eye Patients

研究代表者

山田 昌和 (Yamada Masakazu)

国立病院機構東京医療センター臨床研究センター視覚研究部・部長

研究者番号：50210480

研究成果の概要（和文）：

ドライアイの病態解析のために、涙液蛋白と脂質の詳細な分析をマイクロ液体クロマトグラフィとエレクトロスプレー質量分析計で行った。本分析法では数百種類以上の蛋白・脂質成分を高感度に同定、半定量することが可能であった。シェーグレン症候群患者涙液では補体 C3 が増加し、リン脂質であるフォスファチジルコリンとスフィンゴミエリンが減少していることが示され、これらの分子が疾患マーカーや新規治療法の標的となる可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

To understand the pathophysiology of dry eye syndrome, there is a need for precise and intensive biochemical analysis of tear fluids. We employed liquid chromatography combined with electron-spray ionization mass spectroscopy to profile tear proteins and lipids from tears of patients with dry eye syndrome. Hundreds of various molecules were successfully identified from a small volume of tear sample. Of these, prominent differences were found in the scores of complement C3, phosphatidylcholine, and sphingomyelin. The score of complement C3 in patients with dry eye syndrome was much higher than that of normal subjects. The levels of phosphatidylcholine and sphingomyelin in tears of dry eye syndrome were significantly lower than those of normal controls. Proteomic and lipidomic approaches appear to be useful in exploring the biomarkers of dry eye and the new potential targets for the treatments of dry eye syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,500	450	1,950
21 年度	1,000	300	1,300
22 年度	1,000	300	1,300
年度			
年度			
総計	3,500	1,050	4,550

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：蛋白質、プロテオーム、分析化学、生体分子、脂質

1. 研究開始当初の背景

ドライアイは成人の 10-15%と非常に有病率の高い疾患である。ドライアイによって重度の視覚障害を呈することは少ないものの、目の不快感や痛みによる作業効率の低下や精神的負担など日常生活機能 (quality of life) に及ぼす影響は大きく、医学的にも社会的にも重要な疾患と考えられる。しかも現在の治療法に対する患者の満足度は必ずしも高くなく、病態の解明と治療法の開発が急務となっている。

ドライアイの病態解析や新しい治療法の開発のためには、涙液成分、特に蛋白成分や脂質成分の詳細な分析が必須と考えられる。しかし、涙液は微量であるために、従来の方法では、感度が十分でなく、分析できる物質の種類も限られていた。

2. 研究の目的

ドライアイ患者の涙液に含まれる蛋白、脂質を網羅的に解析する方法としてマイクロ液体クロマトグラフィ (HPLC) とエレクトロスプレー-質量分析計 (ESI-MS) を組み合わせた分析法を用いた。HPLC と ESI-MS をオンラインで接続した分析法では 1 つの試料から数百種類以上の成分を同定、定量することが可能であり、しかも高感度であるために、涙液のような微量検体の分析に適していると考えられた。本方法を用いて、正常者とドライアイ患者の涙液中蛋白成分、脂質成分の網羅的な解析を行い、涙液のどの成分が病態形成に関与しているかを解析し、病態の解析や新しい治療法の開発につなげていくことを目的とした。

3. 研究の方法

ドライアイ患者または正常者からシルマー試験紙を用いて 5 マイクロリットル程度の涙液を採取した。涙液試料から脂質と蛋白を各々抽出して分析資料とし、HPLC と ESI-MS をオンラインで接続した分析法を用いて検討した。

脂質分析にはカラムスイッチング 3 溶媒グラジエント HPLC とイオントラップ MS 法を用い、涙液中性脂質 (コレステロールエステル、ワックスエステル) とリン脂質を分析した。蛋白分析に関しては試料をトリプシン消化し、分解産物であるペプチドを HPLC で分離、質量分析計でアミノ酸配列を決定し、Mascot ソフトウェアによるランク付けを行った。ランク付けで正常者よりドライアイ患者で高いスコアを示した蛋白については酵素抗体法 (EIA) を用いて定量的分析を行った。

4. 研究成果

HPLC と ESI-MS による分析法で涙液のリン脂質の多くの成分を検出できるようになった。分子種組成は非常に複雑であったが、モノエン脂肪酸を含む分子種が主に検出された。シェーグレン症候群患者涙液と正常者の涙液を比較したところ、シェーグレン症候群患者ではフォスファチジルコリンの C16:0、C18:1 と C18:0、C18:2、及びスフィンゴミエリンが減少していることが示された。これらのリン脂質は涙液の安定性に寄与する分子であることが示唆された。従って、これらのフォスファチジルコリンの分子種やスフィンゴミエリン分子がドライアイの疾患マーカーもしくは新規治療法の標的になる可能性があると考えられた。

正常者とシェーグレン症候群に伴うドライアイ患者の涙液蛋白を分析した結果、正常でスコアが高い蛋白としてリポカリン、zinc alpha2 glycoprotein, prolactin-induced protein がランクされ、逆にシェーグレンでスコアの高い蛋白として complement C3 と gelsolin などがランクされた。complement C3 と C4 に関しては ELISA 法で涙液中濃度を測定したところ、シェーグレン症候群では正常対照に比べて有意に高い値を示すことが定量的に確認された。また、コンタクトレンズ (CL) 装用によるドライアイ患者の涙液を分析し、涙液中蛋白やサイトカインの測定を行った結果、CL 非装用時と比較した場合、涙液の主要蛋白であるラクトフェリン、リポカリン、リゾチームには変化が見られなかったが、サイトカインのうち TNF- α と IL-1 β の増加が見られた。特に装用感や乾燥感などドライアイ自覚症状の程度と涙液中 TNF- α 濃度は正の相関を示した。TNF- α と IL-1 β は代表的な炎症性サイトカインであり、CL 装用によるドライアイの発症に炎症が関与していることが示唆された。

このような涙液中の脂質、蛋白の網羅的解析を進めていくことによって、ドライアイのバイオマーカーや新しい治療の標的分子の同定が可能となるものと考えられた。

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 37 件)

1. Shigeyasu C, Mizuno Y, Yokoi T, Nishina S, Azuma N, Yamada M. Clinical features of anterior segment dysgenesis associated with congenital corneal opacities. *Cornea* (印刷中)

2. Eye Care Comparative Effectiveness Research Team (ECCERT). Cost-effectiveness of cataract surgery in Japan. *Jpn J Ophthalmol.* (印刷中)
3. Fujiike K, Mizuno Y, Hiratsuka Y, Yamada M, the Strabismus Surgery Study Group. Quality of Life and Cost-Utility Assessment of Strabismus Surgery in Adults. *Jpn J Ophthalmol.* (印刷中)
4. 山田昌和. 臨床疫学研究の基本的事項. *あたらしい眼科* 28:5-10, 2011 (査読無)
5. 山田昌和. 巻頭言：点眼液によるドライアイの治療. *日眼会誌* 115:105-106, 2011 (査読無)
6. Hatou S, Yamada M, Akune Y, Mochizuki H, Shiraishi A, Joko T, Nishida T, Tsubota K. Role of Insulin in Regulation of Na⁺-K-Dependent ATPase Activity and Pump Function in Corneal Endothelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:3935-3942. (査読有)
7. Mizuno Y, Yamada M, Miyake Y, the Dry Eye Survey Group of National Hospital Organization in Japan. Weak Association between Clinical Diagnostic Tests and Health-Related Quality of Life Surveys in Patients with Dry Eye Syndrome. *Jpn J Ophthalmol.* 2010;54:259-265. (査読有)
8. Hatou S, Fukui M, Yatsui K, Mochizuki H, Akune Y, Yamada M. Biochemical Analyses of Lipids Deposited on Silicone Hydrogel Lenses. *J Optom.* 2010;3:164-168. (査読有)
9. Mochizuki H, Fukui M, Hatou S, Yamada M, Tsubota K. Evaluation of Ocular Surface Glycocalyx Using m-Lectin-Conjugated Fluorescein. *Clin Ophthalmol.* 2010;4:925-930 (査読有)
10. Nickerson ML, Kostihina BN, Brandt W, Fredericks W, Xu KP, Yu FS, Gold B, Chodosh J, Goldberg M, Lu da W, Yamada M, Tervo TM, Grutzmacher R, Croasdale C, Hoeltzenbein M, Sutphin J, Malkowicz SB, Wessjohann L, Kruth HS, Dean M, Weiss JS. mUBIAD1 mutation alters mitochondrial prenyltransferase activity to cause Schnyder corneal dystrophy. *PLoS One.* 2010;5:e10760. (査読有)
11. 窪野裕久、水野嘉信、重安千花、山田昌和. 難治性とされたフリクテン性角結膜炎、カタル性角膜潰瘍の要因. *あたらしい眼科* 27:809-813, 2010 (査読有)
12. 谷井啓一、羽藤晋、横井匡、東範行、山田昌和. 角膜輪部デルモイドの屈折異常と弱視に関する検討. *あたらしい眼科* 27:1149-1152, 2010 (査読有)
13. 山田昌和. 結膜弛緩症へのアプローチ. *Nano Ophthalmology* 38:17-20, 2010 (査読無)
14. 山田昌和. 臨床研究に関する倫理指針の要点. *IOL&RS* 24:147-150, 2010 (査読無)
15. 望月弘嗣、山田昌和. 人工涙液、角膜治療薬. *眼科* 51:165-171, 2010 (査読無)
16. 天野史郎, 有田玲子, 木下茂, 横井則彦, 外園千恵, 小室青, 鈴木智, 島崎潤, 田聖花, 前田直之, 高静花, 堀裕一, 西田幸二, 久保田久世, 後藤英樹, 山口昌彦, 小幡博人, 山田昌和, 村戸ドール, 小川葉子, 松本幸裕, 坪田一男, マイボーム腺機能不全ワーキンググループ. マイボーム腺機能不全の定義と診断基準. *あたらしい眼科* 27:627-631, 2010. (査読有)
17. 重安千花, 山田昌和. 経口抗癌剤による角膜上皮障害. *日本の眼科* 81:877-878, 2010 (査読無)
18. 山田昌和. 眼科領域の Value-Based Medicine と効用分析. *眼科* 52:1683-1688, 2010 (査読無)
19. Yamada M, Hatou S, Mochizuki H. Conjunctival Fixation Sutures for Refractory Superior Limbic Keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmol.* 2009;93:1570-1571. (査読有)
20. Hatou S, Yamada M, Mochizuki H, Shiraishi A, Joko A, Nishida T. The effects of dexamethasone on the Na⁺,K⁺-ATPase activity and pump function of corneal endothelial cells. *Curr Eye Res* 2009;34:347-354 (査読有)
21. Hatou S, Yamada M, Mochizuki H, Nishida T. Role of protein kinase C in regulation

of Na⁺- and K⁺-Dependent ATPase activity and pump function in corneal endothelial cells. Jpn J Ophthalmol 2009;53:235-242 (査読有)

22. Mochizuki H, Yamada M, Hatou S, Tsubota K. Turnover rate of tear film lipid layer determined by Fluorophotometry. Br J Ophthalmol 2009;93:1535-1538 (査読有)

23. Araki-Sasaki K, Osakabe Y, Miyata K, Amano S, Yamada M, Kitagawa K, Hirano K, Kinoshita S. What is this thing called amyloidosis? Cornea 2009;28(suppl1):S80-S83. (査読有)

24. Sugioka K, Fukuda M, Kohmoto S, Itahashi M, Yamada M, Shimomura Y. Intraocular penetration of sequentially instilled topical moxifloxacin, gatifloxacin and levofloxacin. Clin Ophthalmol 3:7757, 2009 (査読有)

25. 福井正樹, 羽藤晋, 谷井啓一, 望月弘嗣, 山田昌和. Multipurpose Solution が眼表面ムチンに及ぼす影響. 日コレ誌 51:245-250, 2009 (査読有)

26. 山田昌和. 先天性遺伝性角膜内皮ジストロフィ. あたらしい眼科 26:163-166, 2009 (査読無)

27. 山田昌和. ドライアイ:新しい定義に基づいた疾患概念と病態、治療. 日眼会誌 113:541-552, 2009 (査読有)

28. Mochizuki H, Yamada M, Hatou S, Nishida T. Fluorophotometric Measurement of the Precorneal Residence Time of Topically Applied Hyaluronic Acid. Br J Ophthalmol 2008;92:108-111. (査読有)

29. Yamada M, Hatou S, Yoshida J. In Vitro Susceptibilities of Bacterial Isolates from Conjunctival Flora to Gatifloxacin, Levofloxacin, Tosufloxacin, and Moxifloxacin. Eye Contact Lens 2008;34:109-112. (査読有)

30. Yamada M, Yoshida J, Hatou S, Yoshida T, Minagawa Y. Mutations in the quinolone resistance determining region in Staphylococcus epidermidis recovered from conjunctiva and their association with

susceptibility to various fluoroquinolones. Br J Ophthalmol. 2008;92:848-851. (査読有)

31. 永井正子, 羽藤晋, 大野建治, 望月弘嗣, 山田昌和. 結膜弛緩症に対する結膜縫着術. あたらしい眼科 25:1557-1560, 2008 (査読有)

32. 山田昌和. 加齢と眼表面疾患. 眼科 50:426-434, 2008 (査読有)

33. 羽藤晋, 山田昌和. 結膜リンパ腫. あたらしい眼科 25:497-498, 2008 (査読無)

34. 吉田絢子, 山田昌和. 抗癌剤 TS-1 による角膜上皮障害. あたらしい眼科 25:655-656, 2008 (査読無)

35. 山田昌和. 眼科領域の臨床疫学、効用研究. 医療 62:695-700, 2008 (査読有)

36. 羽藤晋, 山田昌和. 角膜内皮機能不全の治療. 医療 62: 451-457, 2008 (査読有)

37. 山上聡, 新家真, 天野史郎, 白井智彦, 三村達哉, 横尾誠一, 青山佳世, 大沢稔也, 上羽悟史, 松島綱治, 林孝彦, 田中香純, 水木信久, 海老原伸行, 村上晶, 諸星計, 宮崎大, 井上幸次, HamrahP, LiuY, DanaMR, 中野英樹, 羽藤晋, 山田昌和, 羽室淳爾, 山田潤, 後藤晋, 小杉正明, 鈴木洋, 北川全. 拒絶反応のない理想的な角膜移植手術を目指して 全層角膜移植から内皮細胞移植へ. 日眼会誌 112: 266-278, 2008 (査読有)

[学会発表] (計 38 件)

1. 山田昌和. シンポジウム、角結膜疾患の薬物療法:何をどう用いるか. 第 35 回日本角膜学会、東京、2011.2

2. 重安千花, 阿久根陽子, 水野嘉信, 望月弘嗣, 井之川宗右, 田聖花, 島崎潤, 山田昌和. TS-1 による角膜障害の発症要因:涙液分析による検討. 第 35 回日本角膜学会、東京、2011.2

3. 山田昌和, 水野嘉信, 重安千花, 望月弘嗣. 涙液浸透圧測定によるドライアイ検査の意義. 第 64 回日本臨床眼科学会、神戸 2010.11

4. 水野嘉信, 山田昌和, 重安千花, 三宅養三, NHO 感覚器ネットワークドライアイ研究グループ. ドライアイの 3 年間前向きコホート多施設共同研究:眼所見、QOL、治療費用

の推移. 第 64 回日本臨床眼科学会、神戸 2010. 11

5. 重安千花、水野嘉信、山田昌和、東範行、大橋裕一、東城博雅、西田輝夫. 先天性角膜混濁の全国的症例調査. 第 64 回日本臨床眼科学会、神戸 2010. 11

6. 山田昌和. SCL 素材とドライアイ. シンポジウム、第 64 回日本臨床眼科学会、神戸 2010. 11

7. 水野嘉信、山田昌和. ドライアイと QOL. シンポジウム、第 64 回日本臨床眼科学会、神戸 2010. 11

8. 福井正樹、阿久根陽子、谷井啓一、重安千花、水野嘉信、望月弘嗣、山田昌和. コンタクトレンズ装用に伴う涙液蛋白・サイトカインの変化. 第 53 回日本コンタクトレンズ学会、東京、2010. 7

9. 山田昌和. ドライアイの診断のポイント. 教育セミナー. 第 114 回日本眼科学会総会、名古屋、2010. 4

10. 山田昌和. 角結膜疾患のみかた. 教育セミナー. 第 114 回日本眼科学会総会、名古屋、2010. 4

11. 山田昌和. 薬剤性上皮障害. ドライアイクオリティアップセミナー、東京、2010. 3

12. 田中宏樹、重安千花、水野嘉信、山田昌和. 白内障術前患者を対象とした角膜内皮異常例の検討. 第 34 回角膜カンファレンス、仙台、2010. 2

13. 山田昌和、阿久根陽子、望月弘嗣、東城博雅. シュナイダー角膜ジストロフィの沈着脂質の網羅的解析. 第 34 回角膜カンファレンス、仙台、2010. 2

14. 重安千花、水野嘉信、横井匡、仁科幸子、東範行、山田昌和. 角膜混濁を伴う前眼部形成不全 139 例 220 眼の臨床像. 第 34 回角膜カンファレンス、仙台、2010. 2

15. 水谷健人、重安千花、水野嘉信、山田昌和. 難治性ブドウ球菌性眼瞼炎に対する clarithromycin の効果. 第 34 回角膜カンファレンス、仙台、2010. 2

16. 山田昌和. 高齢者のための斜視手術、QOL と効用分析による評価. 第 33 回日本眼科手

術学会、東京、2010. 1

17. 水野嘉信、山田昌和、重安千花、三宅養三、NHO 感覚器ネットワークドライアイ研究グループ. 直接的経済負担から見たドライアイ患者の疾病負担. 第 63 回日本臨床眼科学会、福岡、2009. 10

18. 福井正樹、重安千花、谷井啓一、水野嘉信、望月弘嗣、山田昌和. 眼瞼痙攣、片側顔面痙攣とドライアイのオーバーラップ. 第 63 回日本臨床眼科学会、福岡、2009. 10

19. 山田昌和. 成人斜視手術の効用分析. シンポジウム、第 63 回日本臨床眼科学会、福岡、2009. 10

20. 山田昌和. 患者の視点からみた眼科医療の評価. シンポジウム、第 63 回日本臨床眼科学会、福岡、2009. 10

21. 窪野裕久、水野嘉信、重安千花、山田昌和. 治療抵抗性を示したフリクテン性角結膜炎、カタル性角膜潰瘍の要因. 第 46 回日本眼感染症学会、大阪、2009. 7

22. 山田昌和. 増殖型アレルギー性結膜疾患への対応. シンポジウム. 第 52 回日本コンタクトレンズ学会、大阪、2009. 7

23. 福井正樹、阿久根陽子、望月弘嗣、重安千花、谷井啓一、水野嘉信、山田昌和. リン脂質ポリマー含有レンズの装用感と涙液蛋白成分の変化. 第 52 回日本コンタクトレンズ学会、大阪、2009. 7

24. 山田昌和. ドライアイ最前線. 第 57 回日本眼科医会生涯教育講座、東京、2009. 2

25. 平塚義宗、山田昌和、Chris Roberts, Lynne Pezzullo, Katie Yates, 高野繁、三宅謙作、Hugh Taylor. 日本における視覚障害の経済コスト. 第 113 回日本眼科学会総会、東京、2009. 4

26. 山田昌和、平塚義宗、Chris Roberts, Lynne Pezzullo, Katie Yates, 高野繁、三宅謙作、Hugh Taylor. 本邦の視覚障害の有病率：現況と将来予測. 第 113 回日本眼科学会総会、東京、2009. 4

27. 福井正樹、望月弘嗣、重安千花、水野嘉信、山田昌和. 塩化ベンザルコニウムが眼表面ムチンに及ぼす影響. 第 23 回角膜カンファレンス、

大阪、2009.2

28. 重安千花、阿久根陽子、水野嘉信、望月弘嗣、山田昌和、田聖花、島崎潤. TS-1 による角膜障害の発症要因・涙液分析による検討. 第 23 回角膜カンファレンス、大阪、2009.2

29. 山田昌和. 成人斜視手術の価値. 教育セミナー、第 31 回日本眼科手術学会、横浜、2009.1

30. 山田昌和. 視覚障害の疫学、医療経済学. 第 62 回国立病院総合医学会、東京、2008.11

31. 羽藤 晋、望月 弘嗣、山田 昌和. インスリンの角膜内皮 Na-K ATPase 活性、ポンプ機能に及ぼす影響. 第 62 回日本臨床眼科学会、東京、2008.10

32. 羽藤 晋、望月 弘嗣、水野 嘉信、山田 昌和. 上輪部角結膜炎に対する結膜縫着術. 第 62 回日本臨床眼科学会、東京、2008.10

33. 水野嘉信、山田昌和、三宅養三、NHO 感覚器ネットワーク ドライアイ研究グループ. ドライアイの自覚症状と眼表面検査所見との関連. 第 62 回日本臨床眼科学会、東京、2008.10

34. 谷井啓一、福井正樹、羽藤晋、望月弘嗣、山田昌和、林康司、秦誠一郎. シリコーンハイドロゲルレンズに沈着するタンパク質、脂質の解析. 第 51 回日本コンタクトレンズ学会、福岡、2008.7

35. 福井正樹、谷井啓一、羽藤晋、望月弘嗣、山田昌和. Multi-Purpose Solution が眼表面ムチンに及ぼす影響. 第 51 回日本コンタクトレンズ学会、福岡、2008.7

36. 山田昌和. ドライアイに CL を処方してはいけない. シンポジウム. 第 51 回日本コンタクトレンズ学会、福岡、2008.7

37. 山田昌和. 前眼部の先天異常. 専門医制度第 48 回講習会、目の発生と先天異常、横浜、2008.4

38. 山田昌和. ドライアイの結膜手術. 第 112 回日本眼科学会総会、教育セミナー. 横浜、2008.4

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kankakuki.go.jp/lab_b.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 昌和 (やまだ まさかず)

国立病院機構東京医療センター臨床研究センター視覚研究部・部長

研究者番号: 50210480

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし