

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18387

研究課題名（和文）難治性ぶどう膜炎疾患を対象としたサイトカインおよびケモカイン動態の網羅的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of cytokines and chemokines in refractory uveitis diseases

研究代表者

石井 麻衣（ISHII, Mai）

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：10868996

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）：本研究において、日本人集団を対象に、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび原田病におけるサイトカイン、ケモカインおよびそれらの関連因子の産生量の変動を網羅的に調査し、各々のぶどう膜炎疾患の病態に關与する複数のサイトカイン、ケモカインおよび関連因子を同定した。同定した各ぶどう膜炎疾患のサイトカイン、ケモカインおよび関連因子を対象としてパスウェイ解析を実行した結果、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび原田病それぞれの病態に關与するサイトカイン・ケモカインのネットワークおよびパスウェイ（生物学的過程・経路）の候補を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび原田病における炎症反応のメカニズム解明の一助となると考えられる。ベーチェット病、サルコイドーシス、原田病の炎症反応のメカニズムが解明されれば、特定されたサイトカインおよびケモカインまたはパスウェイを対象とした新規治療薬の開発も可能になり、その医学的意義は非常に高い。また、本研究により同定されたサイトカインおよびケモカインは、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび原田病のバイオマーカーとなる可能性があり、各々のぶどう膜炎疾患の早期診断や早期治療といった臨床医学への応用に繋がること期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we comprehensively investigated the variation in the production of cytokines, chemokines, and their related factors in Behcet's disease, sarcoidosis, and Harada's disease in a Japanese population, and identified several cytokines, chemokines, and associated factors involved in the pathogenesis of each uveitis disease. Pathway analysis using the cytokines, chemokines, and their related factors identified in each uveitis disease identified candidate cytokine/chemokine networks and pathways involved in the pathogenesis of Behcet's disease, sarcoidosis, and Harada's disease, respectively.

研究分野：眼科学

キーワード：ベーチェット病 サルコイドーシス フォークト・小柳・原田病 サイトカイン ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) ぶどう膜炎とは、眼内の虹彩、毛様体、脈絡膜およびそれらに隣接する組織に起きる炎症の総称であり、ぶどう膜炎により重度の視力障害を来す患者も少なくなく、ぶどう膜炎は我が国における失明原因の上位を占める。

(2) ぶどう膜炎は、その発症機序の違いから、「外因性ぶどう膜炎」と「内因性ぶどう膜炎」に大別分類される。ウイルスや細菌などの病原体の感染や外傷・手術に起因して起こる「外因性ぶどう膜炎」に対して、「内因性ぶどう膜炎」は、免疫系に異常をきたす全身疾患の1症状として起こる。

(3) 我が国の「三大ぶどう膜炎」であるベーチェット病、サルコイドーシス、フォークト・小柳・原田病(以下、原田病)は「内因性ぶどう膜炎」疾患であり、いずれの疾患においても免疫系の異常が発症の要因となる。これらぶどう膜炎疾患で見られる免疫系の異常には、特定の内的要因(遺伝的要因)のもとに何らかの外的要因(環境要因)が複合的に関与していると考えられているものの、これらぶどう膜炎疾患の発症メカニズムおよび病態の全容は未だ明確に特定されていない。

(4) これまでの免疫学的研究により、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび原田病では、サイトカインおよびケモカイン産生の異常(有意な変動)が各々の疾患の病態に大きく関与していることが示唆されている。さらに、近年の遺伝学的研究により、これらぶどう膜炎疾患において、複数のサイトカイン遺伝子およびケモカイン遺伝子内の一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)が疾患の発症リスクと有意な相関を示すことが徐々に明らかになってきている。

(5) 以上のように、これまでの免疫学的研究および遺伝学的研究により、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび原田病において、種々のサイトカインおよびケモカインが疾患の発症および活性化に大きく関与していることが示唆されている。しかしながら、これまでの研究では、サイトカインおよびケモカインについて断片的な解析しか行われておらず、各研究の結果を繋ぎ合わせることで、各疾患の病態における一部のサイトカインおよびケモカインの役割を推測してきた。そのため、各疾患の病態における「サイトカインおよびケモカインの個々の役割の全体像」および「サイトカインおよびケモカイン各々の間の相互作用の全体像」は未だ明確になっていない。

(6) したがって、各々のぶどう膜炎疾患を対象に、すべてのサイトカイン、ケモカインおよびそれらの関連因子を網羅した解析を実行し、各疾患におけるすべてのサイトカイン、ケモカインおよび関連因子の「個々の役割の全体像」および「各々の間の相互作用の全体像」を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、我が国の三大ぶどう膜炎であるベーチェット病、サルコイドーシスおよび原田病を対象にサイトカイン、ケモカインおよびそれらの関連因子の産生能を網羅的に調査し、各々のぶどう膜炎疾患におけるサイトカインおよびケモカインの動態・産生パターンを明らかにすることを目的とした。

(2) さらに本研究では、取得したサイトカイン、ケモカインおよび関連因子のデータを対象としたパスウェイ解析も実行し、各々のぶどう膜炎疾患の病態に関与するパスウェイ(生物学的過程・経路)の特定も行った。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、日本人ベーチェット病患者、日本人サルコイドーシス患者、日本人原田病患者および日本人健常対照者について各々100例を解析対象とした。本研究の実験試料として、各々のぶどう膜炎疾患の患者および健常対照者から採取した血液から分離した血漿サンプルを用いた。

(2) 一次スクリーニングとして、各疾患の患者50例ずつおよび健常対照者50例を対象に、Bio-Rad社のBio-Plexマルチプレックスシステム(Bio-Plex Pro ヒトサイトカイン・ケモカインアッセイキット)を用いて、サイトカイン、ケモカインおよびそれらの関連因子のアッセイを網羅

的に実行した。血漿中の各種サイトカイン、ケモカインおよびそれらの関連因子の定量には Bio-Plex 200 (バイオ・ラッド社) を使用した。本解析はバイオ・ラッド社のプロトコールを準拠して行った。

(3) (2) で取得した各種サイトカイン、ケモカインおよびそれらの関連因子のアッセイデータを、各々のぶどう膜炎疾患の炎症活動期患者群、非活動期患者群および健常対照者群の 3 群間で比較し、各々のぶどう膜炎疾患の炎症活動期の患者群または非活動期の患者群において統計学的に有意な産生能の変動を示すサイトカイン、ケモカインおよび関連因子の網羅的なスクリーニングを実行した。

(4) 一次スクリーニングで網羅的に同定したサイトカイン、ケモカインおよび関連因子を対象に、新規の検体 (各疾患の患者 50 例ずつおよび健常対照者 50 例) を用いて追認試験を実行した。追認試験では ELISA 法を用いて血漿中の各種サイトカイン、ケモカインおよびそれらの関連因子の定量を行った。取得したアッセイデータを、各々の疾患の炎症活動期患者群、非活動期患者群および健常対照者群の 3 群間で比較し、各々の疾患の炎症活動期の患者群または非活動期の患者群において有意な産生能の変動を示すサイトカイン、ケモカインおよび関連因子の絞り込み・同定を行った。

(5) (4) で絞り込んだ各々のぶどう膜炎疾患の病態に関与を示すサイトカイン、ケモカインおよび関連因子を対象にパスウェイ解析を実行し、各々のぶどう膜炎疾患の病態に有意に関与するパスウェイ (生物学的過程・経路) の特定を行った。私達のグループは、日本人集団を対象に、各々のぶどう膜炎疾患におけるゲノム全域を高密度に網羅する SNP 情報 (ゲノムワイド関連解析 [genome-wide association study: GWAS] データ) を既に取得しているため (ベーチェット病: Mizuki N, et al. Nat Genet. 2010;42(8):703-706.; サルコイドーシス: Meguro A, et al. Commun Biol. 2020;3(1):465.; 原田病: 論文準備中)、ゲノム全域の SNP 情報も加味して本パスウェイ解析を実行した。

(6) 本パスウェイ解析では、KEGG や Reactome、WikiPathways などを含む 31 種類の公開データベースの情報を統合した「ConsensusPathDB」オンラインデータベース (Kamburov A, et al. Nucleic Acids Res. 2013;41(Database issue):D793-800. <http://cpdb.molgen.mpg.de/>) を用いて実行した。

(7) 本研究では、すべての血液検体提供者 (ぶどう膜炎患者、健常対照者) に対して、研究の目的、研究の期間と方法、研究参加により予測される効果および危険性、研究に協力しない場合であっても不利益を受けないこと、研究への参加に同意した場合であっても、随時これを撤回できること等を十分に説明し、書面でインフォームドコンセントを得た上で研究に参加していただいた。すべての血液検体提供者の個人情報には連結匿名化の上、本研究に関わらない個人情報管理者によって厳重に管理されている。

(8) 本研究に参加するすべての検体提供施設は、各々の施設の倫理委員会より本遺伝子研究への参加を承認されている。

4. 研究成果

(1) 日本人のベーチェット病患者、サルコイドーシス患者、原田病患者および健常対照者を用いて、サイトカイン、ケモカインおよびそれらの関連因子を対象とした網羅的なアッセイ (一次スクリーニング) を実行し、各々のぶどう膜炎疾患の炎症活動期の患者群または非活動期の患者群において統計学的に有意な産生能の変動 (上昇または減少) を示すサイトカイン、ケモカインおよび関連因子を網羅的に同定した (一次スクリーニング)。

(2) 一次スクリーニングで網羅的に同定したサイトカイン、ケモカインおよび関連因子を対象に、各々のぶどう膜炎疾患および健常者の追加検体を用いて追認試験を行った結果、一次スクリーニングで認められた実験結果の再現性を示す (すなわち、各々のぶどう膜炎疾患の炎症活動期の患者群または非活動期の患者群において有意な産生能の変動を示す) 複数のサイトカイン、ケモカインおよび関連因子を同定し、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび原田病におけるサイトカインとケモカインの動態・産生パターンを見出した。

(3) (2) で同定した各ぶどう膜炎疾患におけるサイトカイン、ケモカインおよび関連因子のアッセイデータ (本研究で取得したデータ) と GWAS データ (既に取得していたゲノムデータ) を用いてパスウェイ解析を実行し、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび原田病それぞれの病態に関与するサイトカイン・ケモカインのネットワークおよびパスウェイ (生物学的過程・経路) の候補を同定した。

(4) 本研究で同定した情報は、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび原田病における炎症反応のメカニズム解明の一助となると考えられる。

(5) ベーチェット病、サルコイドーシス、原田病の炎症反応のメカニズムが解明されれば、特定されたサイトカインおよびケモカインまたはパスウェイを対象とした新規治療薬（モノクローナル抗体、標的分子結合ペプチド、酵素阻害剤など）の開発も可能になり、その医学的意義は非常に高い。

(6) また、本研究により同定されたサイトカインおよびケモカインは、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび原田病のバイオマーカーとなる可能性があり、各々のぶどう膜炎疾患の早期診断や早期治療といった臨床医学への応用に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	水木 信久 (MIZUKI Nobuhisa)		
研究協力者	目黒 明 (MEGURO Akira)		

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