

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22591927  
 研究課題名（和文）新たな網羅的糖鎖解析グライコブロットティング法によるぶどう膜炎の病態  
 解明  
 研究課題名（英文）Elucidation of pathological condition in uveitis using newly  
 developed carbohydrate structural analysis: Glycoblottting  
 研究代表者  
 南場 研一（NAMBA KENICHI）  
 北海道大学・北海道大学病院・講師  
 研究者番号：70333599

研究成果の概要（和文）：新しい網羅的糖鎖構造解析グライコブロットティング法を用いてぶどう膜炎の患者での糖鎖解析をおこなった。ぶどう膜炎患者では血清中の糖鎖量が増えていること、また、活動期に変動する糖鎖が3種類見られた。ベーチェット病ではHLA-B51との関連、眼外症状との関連性を示す糖鎖がみられたが、眼炎発作との関連はみられなかった。マウス実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎モデルでの糖鎖変動を調べたところ、免疫により変動する糖鎖はみられたが、ぶどう膜炎特異的に変動していると思われる糖鎖はみられなかった。

研究成果の概要（英文）：Glycoblottting which was newly developed carbohydrate structural analysis was performed in uveitis patients. In the serum of uveitis patients, total amount of carbohydrate was increased in uveitis patients, and 3 carbohydrate chains that amount were changed in the active stage were found. In Behçet's disease, carbohydrate chains that were associated with HLA-B51 or extraocular manifestations were found, however carbohydrate chains that were associated with ocular inflammatory attacks were not found. In mouse model experimental autoimmune uveoretinitis, carbohydrate chains that were changed with immunization were found, but they were not specific changes associated with induced uveitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：グライコミクス・ぶどう膜炎・糖鎖・グライコブロットティング・EAU・実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎・ベーチェット病

## 1. 研究開始当初の背景

生命科学は遺伝子、蛋白について解明されてきたが、次世代の研究として糖鎖が注目され

各種疾患ですでに臨床応用されている。糖鎖解析の研究は、癌、免疫、感染症、再生医療、生活習慣病などにおける病態の解明、そして早期

診断、予後判定、治療指針の判断、新薬ターゲットの同定などに繋がっていきと考えられている。ぶどう膜炎での糖鎖の研究はほとんどされておらず、その病態との関連について解明が急務である。

## 2. 研究の目的

我々は短期間で大量の検体を一度に解析が可能となった新しい糖鎖構造解析グライコプロッティング法によるぶどう膜炎の病態解明をおこなう。

## 3. 研究の方法

### (1) 白血球を対象としたグライコミクス

これまでの糖鎖研究は主に血清タンパクに結合している糖鎖の研究が中心であった。ぶどう膜炎がリンパ球、マクロファージなどの白血球を中心とした細胞によって発症する疾患であることから、白血球表面の膜タンパクに結合している糖鎖を対象とした糖鎖解析をおこなう。白血球を対象としたグライコミクスはこれまでどの疾患でもほとんどおこなわれておらず、初めての試みとなる。

### (2) マウス実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎 (EAU) における糖鎖解析

C57BL/6 マウスを視細胞間レチノイド結合蛋白由来ペプチドにて免疫することにより、約7日後にEAUが発症し、約21日後に炎症のピークに達する。

#### ① マウスEAUにおける血清グライコミクス

EAU発症経過における血清の網羅的糖鎖解析をグライコプロッティング法にて行い、EAU発症に関与する糖鎖を同定する。

#### ② マウスEAUにおける白血球グライコミクス

EAU発症経過における白血球の抽出を行い、そこから網羅的糖鎖解析をグライコプロッティング法にて行い、EAU発症に関与する糖鎖を同定する。

## 4. 研究成果

ぶどう膜炎患者の血清について糖鎖解析をおこなった。ぶどう膜炎の原因疾患は、ベーチェット病、サルコイドーシス、フォークト・小柳・原田病であり、その患者背景として年齢、性別、罹病期間、投薬内容、およびぶどう膜炎の活動性について調査し、糖鎖解析の結果との関連性について検討を行った。サルコイドーシス、フォークト・小柳・原田病では有意な変化をしめす糖鎖はみられなかったが、ベーチェット病では、検出された糖鎖27種類中3種類の糖鎖において活動期と非活動期とで糖鎖発現量に差がみられた。

また、さらにベーチェット病について検体量を増やして解析した結果、抗核抗体との相関が見られる糖鎖はなかったが、CRPの上昇と関連して増える傾向にある糖鎖が見つかった。さらにHLA-B51陽性者では糖鎖分岐部にGlcNAcが結合する糖鎖が増えていることがわかった。また、眼外症状（関節症状、神経症状など）に関連を示唆する糖鎖があることが示された。

ぶどう膜炎の糖鎖変動についてさらなる解析を行うため、マウスの実験系で研究を行った。B10.BRマウスをEAU惹起ペプチドであるIRBPペプチドで免疫し誘導されるEAUでは炎症が惹起されるとともに増える糖鎖、逆に減る糖鎖がみられた。

この糖鎖変動が単に免疫により誘導される反応なのか、あるいはぶどう膜炎特異的にみられる反応なのかを確認するために、EAU惹起ペプチドとコンプリートフロイントアジュバント (CFA) とで免疫したEAU群と、コントロール群としてCFAのみを免疫したCFA群とで比較をおこなった。EAU群では眼内にぶどう膜炎の誘導が確認され、EAU群、CFA群ともに増加する糖鎖、減少する糖鎖がみられたが、EAU群とCFA群との間に有意差が見られる糖鎖は見つからなかった。

## 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19件)

1. 宇野友絵、南場研一、加瀬 諭、齋藤 航、北市伸義、大野重昭、石田 晋. 健康成人の片眼に発症した内因性真菌性眼内炎. あたらしい眼科. 29: 135-138, 2012 (査読有)
2. 大野重昭、蕪城俊克、北市伸義 (4番目)、後藤 浩、南場研一 (8番目)、(他7名). Behçet 病 (ベーチェット病) 眼病変診療ガイドライン. 日眼会誌. 116:394-426, 2012 (査読有)
3. Sakuyama K, Meguro A, Ota M, Ishihara M, Uemoto R, Ito H, Okada E, Namba K (4番目), Kitaichi N (5番目), (他8名). Lack of association between IL10 polymorphisms and sarcoidosis in Japanese patients. Mol Vis. 2012; 18: 512-518 (査読有)
4. Okada AA, Goto H, Ohno S, Mochizuki M, Kitaichi N (1番目), Namba K (2番目), (他12名). Multicenter study of infliximab for refractory

- uveoretinitis in Behcet disease. Arch Ophthalmol. 2012; 130: 592-598 (査読有)
5. Lennikov A, Kitaichi N (2番目), Noda K, Ando R, Dong Z, Fukuhara J, Kinoshita S, Namba K (8番目), (他5名). Amelioration of endotoxin-induced uveitis treated with an I $\kappa$ B kinase  $\beta$  inhibitor in rats. Mol Vis. 2012; 18: 2586-2597 (査読有)
  6. Kase S, Namba K, Jin XH, Kubota K, Ishida S. Spontaneous regression of intraocular lymphoma. Ophthalmology. 2012; 119: 1083-1084 (査読有)
  7. Iwata D, Namba K, Mizuuchi K, Kitaichi N, Kase S, Takemoto Y, Ohno S, Ishida S. Correlation between elevation of serum antinuclear antibody titre and decreased therapeutic efficacy in the treatment of Behcet's disease with infliximab. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2012; 250: 1081-1087 (査読有)
  8. Ishijima K, Namba K, Ohno S, Mochizuki K, Ishida S. Intravitreal injection of bevacizumab in a case of occlusive retinal vasculitis accompanied with syphilitic intraocular inflammation. Case Report Ophthalmol. 2012; 3: 434-437 (査読有)
  9. Horie Y, Meguro A, Kitaichi N (3番目), Lee E B, Kanda A, Noda K, Song Y W, Park K S, Namba K (9番目), (他5名). Replication of a microsatellite genome-wide association study of Behcet disease in a Korean population. Rheumatology. 2012; 51: 983-986 (査読有)
  10. Sato M, Kawagoe T, Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Ishihara M, Namba K (7番目), Kitaichi N (8番目), (他7名). Toll-like receptor2 (TLR2) gene polymorphisms are not associated with sarcoidosis in the Japanese population. Mol Vis. 2011; 17: 731-736 (査読有)
  11. Ito R, Ota M, Kitaichi N (8番目), Horie Y, Namba K (10番目), (他8名). Investigation of association between TLR9 gene polymorphisms and VKH in Japanese patients. Ocul Immunol Inflamm. 2011; 19: 202-205 (査読有)
  12. Mizuki N, Meguro A, Kitaichi N (13番目), Namba K (14番目), (他17名). Genome-wide association studies identify *IL23R/IL12RB2* and *IL10* as Behcet's disease susceptibility loci. Nat Genet. 2010; 42: 703-706 (査読有)
  13. Kitaichi N, Kitamura M, Namba K, Ishida S, Ohno S. Elevation of surfactant protein D, a pulmonary disease biomarker, in the sera of uveitis patients with sarcoidosis. Jpn J Ophthalmol. 2010; 54: 81-84 (査読有)
  14. Iwata D, Kitamura M, Kitaichi N (3番目), Saito Y, Kon S, Namba K (6番目), (他9名). Prevention of experimental autoimmune uveoretinitis by blockade of osteopontin with small interfering RNA. Exp Eye Res. 2010; 90: 41-48 (査読有)
  15. Iwata D, Kitaichi N (2番目), Ebihara A, Iwabuchi K, Yoshida K, Namba K (6番目), (他7名). Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis with nuclear factor- $\kappa$ B inhibitor dehydroxy methyl epoxyquinomicin in mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010; 51: 2077-2084 (査読有)
- [学会発表] (計 44 件)
1. 竹本裕子、南場研一、水内一臣、橋本勇希、宇野友絵、北市伸義、大野重昭、石田 晋. Vogt-小柳-原田病の前眼部炎症再発時における脈絡膜循環障害 第66回日本臨床眼科学会、国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都府)、2012/10/25-28
  2. 水内一臣、南場研一、齋藤 航、堀内一宏、加納崇裕、竹本裕子、北市伸義、大野重昭、石田 晋. 多発性脳神経炎の治療中に急性網膜壊死を発症した1例 第66回日本臨床眼科学会、国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都府)、2012/10/25-28
  3. Kitaichi N, Lennikov A, Namba K, (他8名). Amelioration of endotoxin-induced uveitis treated with an I $\kappa$ B kinase beta inhibitor, 8th International Symposium on Uveitis: Sani Beach Resort (Greece); 2012/10/19-22
  4. Namba K, Kaburaki T, Sonoda KH, Ohno S, Ocular Behcet's Disease Research Group

- of Japan. Novel scoring system of ocular lesions in Behcet's disease. 8th International Symposium on Uveitis: Sani Beach Resort ( Greece ) ; 2012/10/19-22
5. 田川義晃、南場研一、水内一臣、竹本裕子、北市伸義、大野重昭、石田 晋. 網膜色素上皮裂孔および漿液性網膜剥離を伴ったぶどう膜炎 第46回眼炎症学会、パシフィコ横浜(横浜市)、2012/7/14-16
  6. 竹本裕子、南場研一、齋藤 航、水内一臣、北市伸義、大野重昭、石田 晋. Relentless placoid chorioretinitis の1例 第46回眼炎症学会、パシフィコ横浜(横浜市)、2012/7/14-16
  7. 長谷敬太郎、南場研一、竹本裕子、齋藤 航、中村佳代子、今野 哲、網島 優、大野重昭、石田 晋. 肺粟粒結核に伴う結核性眼内炎の1例 第46回眼炎症学会、パシフィコ横浜(横浜市)、2012/7/14-16
  8. 目黒 明、石原麻美、南場研一、蕪城俊克、高瀬 博、後藤 浩、望月 学、大野重昭、水木信久. サルコイドーシスのゲノムワイド関連解析 第46回眼炎症学会、パシフィコ横浜(横浜市)、2012/7/14-16
  9. Kitaichi N, Dong Z, Iwata D, Takeuchi M, Namba K, (他6名). Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis by inhibition of Glyceraldehyde-derived AGEs formation 15th International Conference on Behcet's Disease : PACIFICO YOKOHAMA (Yokohama) ; 2012/7/ 13-15
  10. Lennikov A, Kitaichi N, Noda K, Ando R, Dong Z, Namba K, Ohno S, Ishida S. Amelioration of endotoxin-induced uveitis treated with IMD-0354, an IkappaB inhibitor 15th International Conference on Behcet's Disease : PACIFICO YOKOHAMA ( Yokohama ) ; 2012/7/13-15
  11. Namba K, Iwata D, Mizuuchi K, Kitaichi N, Kase S, Takemoto Y, Ohno S, Ishida S. Correlation between development of antinuclear antibody titre and decreased therapeutic efficacy in the treatment of Behcet's disease with infliximab 15th International Conference on Behcet's Disease : PACIFICO YOKOHAMA ( Yokohama ) ; 2012/7/13-15
  12. Takemoto Y, Namba K, Kitaichi N, Mizuuchi K, Ohno S, Ishida S. Effects of Infliximab Therapy in Behcet's disease 15th International Conference on Behcet's Disease : Y PACIFICO YOKOHAMA ( Yokohama ) ; 2012/7/13-15
  13. Lennikov A, Kitaichi N, Noda K, Ando R, Dong Z, Namba K, Ohno S, Ishida S. Amelioration of endotoxin-induced uveitis treated with an IKB kinase inhibitor, IMD-0354 in rats ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting: Broward County convention Center (USA) ; 2012/5/6-10
  14. Namba K. Vitrectomy for non-infectious uveitis. Symposium: Surgical interventions in the diagnosis and management of recalcitrant uveitis. 27th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO): B E X C O (Korea) ; 2012/4/15
  15. 水内一臣、南場研一、北市伸義、堀江幸弘、岩田大樹、石田 晋、大野重昭. Vogt-小柳-原田病における隅角色素脱失(大野徴候)の検討 第116回日本眼科学会、東京国際フォーラム(東京都)、2012/4/5-8
  16. 水内一臣、南場研一、北市伸義、堀江幸弘、岩田大樹、石田 晋、大野重昭. Vogt-小柳-原田病における隅角色素脱失(大野徴候)の検討 第116回日本眼科学会、東京国際フォーラム(東京都)、2012/4/5-8
  17. Ohno S, Namba K, Kitaichi N, Mizuki N. Treatment of Behcet's disease with infliximab. 3rd Japan-Korea Symposium on Behcet's Disease, Behcet's Disease Study Group, Ministry of Health, Labour and Welfare, 横浜市立大学、パシフィコ横浜(Yokohama) ; 2011/12/16
  18. Ohno S, Namba K, Kitaichi N, Mizuki N. Infliximab therapy of Behcet's disease. 3rd International Uveitis Symposium. 中国・重慶カールトンホテル(China) ; 2011/12/2
  19. Ohno S, Kitaichi N, Namba K. Clinical features of uveitis. Morning Seminar, LV Prasad Eye Institute, Taj Exotica Hotel (India) ; 2011/11/18
  20. Ohno S, Namba K. Corticosteroid therapy of uveitis and intraocular inflammation. International Symposium

- on Recent Trends in Uveitis. LV Prasad Eye Institute, Taj Exotica Hotel (India) ; 2011/11/18
21. Ohno S, Namba K, Iwata D, Kitaichi N, Mizuki N. Update of anti-TNF alpha therapy in Behcet's disease. Session; The Role of Anti-TNF Alpha in Ocular Inflammatory Diseases. Italian Society of Uveitis and Inflammatory Ocular Diseases (SIUMIO) / 11th International Ocular Inflammation Society (IOIS) Congress and International Assembly of Ocular Inflammation Societies: Taj Exotica Goa (India) ; 2011/11/15
  22. Namba K. Syphitic uveitis. Asia Pacific Intraocular Inflammation Study Group (APIISG) Symposium: Infectious Granulomatous Uveitis in Asia Pacific Region. 11th International Ocular Inflammation Society (IOIS) Congress and International Assembly of Ocular Inflammation Societies: Taj Exotica Goa (India) ; 2011/11/14
  23. Ohno S, Mizuuchi K, Namba K, Kitaichi N, Horie Y. Trabecular depigmentation in convalescent stage of VKH disease. The 7th International Workshop of Vogt-Koyanagi-Harada Disease and Sympathetic Ophthalmia / 11th International Ocular Inflammation Society (IOIS) Congress and International Assembly of Ocular Inflammation Societies: Taj Exotica Goa (India) ; 2011/11/14
  24. Ohno S, Namba K, Kitaichi N. Classification and diagnostic criteria for Behcet's disease. Session; Scoring and Classification of Uveitis. International Ocular Inflammation Society, 11th International Ocular Inflammation Society (IOIS) Congress and International Assembly of Ocular Inflammation Societies: Taj Exotica Goa (India) ; 2011/11/14
  25. Ohno S, Namba K, Kitaichi N. Managing ocular manifestations of systemic diseases with local therapy: Is it possible? Santen Lunch Symposium; Management of posterior uveitis: Where are we and where are we going? . 11th International Ocular Inflammation Society (IOIS) Congress and International Assembly of Ocular Inflammation Societies: Taj Exotica Goa (India) 2011/11/13
  26. 金 学海、南場研一、岩田大樹、齋藤 航、加瀬 諭、田中祥恵、大野重昭、石田 晋. 睫毛の迷入が原因と考えられた非外傷性眼内炎の1例 第48回 眼感染症学会、国立京都国際会館(京都府)、2011/7/8-10
  27. 岩田大樹、南場研一、北市伸義、大友耕太郎、渥美達也、大野重昭、石田 晋. インフリキシマブ治療が奏功した再発性多発軟骨炎に伴う難治性強膜ぶどう膜炎の1例 第45回 眼炎症学会、国立京都国際会館(京都府)、2011/7/8-10
  28. 加瀬 諭、南場研一、金 学海、富山浩志、石田 晋. 自然寛解したと考えられた眼内悪性リンパ腫の1例 第45回 眼炎症学会、国立京都国際会館(京都府)、2011/7/8-10
  29. 齋藤理幸、齋藤 航、南場研一、水内一臣、岩田大樹、北市伸義、大野重昭、石田 晋. 急性網膜壊死に対する網膜硝子体手術成績 第45回 眼炎症学会、国立京都国際会館(京都府)、2011/7/8-10
  30. Ohno S, Namba K, Kitaichi N, Horie Y, Ishida S. Prevalence and diagnosis of retinal vasculitis in Japan. Symposium401; Behcet's disease and other retinal vasculitis. The 26<sup>th</sup> Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO): Convention and Exhibition Centre (Australia) ; 2011/3/21
  31. Horie Y, Kitaichi N, Lee E B, Namba K, Ishida S, Ohno S. Microsatellite polymorphism of Behcet disease in Korean population that was found by genome wide association study The 26<sup>th</sup> APAO (Asia-Pacific Academy of Ophthalmology): Convention and Exhibition Centre (Australia) ; 2011/3/20-24
  32. Iwata D, Namba K, Mizuuchi K, Kitaichi N, Ohno S, Ishida S. Antinuclear antibodies associated with reduced effects of infliximab treatment in Behcet's disease The 26<sup>th</sup> APAO (Asia-Pacific Academy of Ophthalmology): Convention and Exhibition Centre (Australia) ; 2011/3/20-24
  33. Yamamoto M, Namba K, Kitaichi N, Ohno S, Ishida S. A case of ocular

- toxocariasis confirmed by immunochromatography of vitreous fluid The 26<sup>th</sup> APAO (Asia-Pacific Academy of Ophthalmology): Convention and Exhibition Centre (Australia) ; 2011/3/20-24
34. Namba K. Molecular targeting therapy in intraocular inflammations. Symposium; Advances on molecular mechanisms in intraocular inflammation, neovascularization and neuroprotection The 26<sup>th</sup> APAO (Asia-Pacific Academy of Ophthalmology): Convention and Exhibition Centre (Australia) ; 2011/3/20-24
35. Namba K., Ohno S., Kitaichi N., Ishida S. Infliximab treatment of Behcet's disease. Asia Research in Vision and Ophthalmology (ARVO): Singapore National Eye Centre (Singapore) ; 2011/1/21
36. 岩田大樹、南場研一、水内一臣、北市伸義、大野重昭、石田 晋. ベーチェット病に対するインフリキシマブ治療中の抗核抗体価上昇と効果減弱例の検討 第64回 臨床眼科学会、神戸ポートピアホテル・神戸国際展示場・神戸国際会議場(神戸市)、2010/11/11-14
37. 水内一臣、南場研一、岩田大樹、齋藤 航、北市伸義、大野重昭、石田 晋. ぶどう膜炎にみられた脈絡膜新生血管の臨床像 第64回 臨床眼科学会、神戸ポートピアホテル・神戸国際展示場・神戸国際会議場(神戸市)、2010/11/11-14
38. Dong Z, Kitaichi N., Namba K., Ishida S., Ohno S. Ocular complications and visual prognosis of endogenous uveitis in Japan The 25<sup>th</sup> APAO (Asia-Pacific Academy of Ophthalmology): China National Convention Centre (China) ; 2010/9/16-20
39. Iwata D, Ebihara A, Kitaichi N., Namba K., Ohno S., Iwabuchi K, Onoé K, Ishida S. Effect of sufatide, a ligand for a subset of NKT cells, in experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in mice WOC (World Ophthalmology Congress): International Congress Centrum (Germany) ; 2010/6/5-9

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

南場 研一 (NANBA KENICHI)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号: 70333599

### (2) 研究分担者

西村 紳一郎 (NISHIMURA SHINICHIROU)  
北海道大学・先端生命科学研究院・教授  
研究者番号: 00183898

北市 伸義 (KITAICHI NOBUYOSHI)  
北海道大学・大学院医学研究科・客員准教授  
研究者番号: 40431366

天野 麻穂 (AMANO MAHO)  
北海道大学・先端生命科学研究科(研究院)・特任助教  
研究者番号: 80365808

### (3) 連携研究者

なし