

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791993

研究課題名（和文） トランスサイレチンに着目した緑内障の病態解明と濾過手術合併症の克服に関する研究

研究課題名（英文） The investigation for pathogenesis of glaucoma and the overcome of complications of filtering surgery via focusing on transthyretin

研究代表者

川路 隆博（KAWAJI TAKAHIRO）

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30423677

研究成果の概要（和文）：

トランスサイレチン（TTR）の遺伝子変異による家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）に合併する続発緑内障は非常に難治である。緑内障手術後に生じる濾過胞の encapsulation のメカニズム解明のため、TTR アミロイドを培養系に添加したが、生理的 TTR 濃度では有意な所見を認めなかった。そこで、ラット結膜下に Poly-HEMA で包埋した TTR アミロイドを留置したところ、軽度な炎症を惹起する可能性が示唆された。今後、詳細なメカニズムを検討していく。

また、原発開放隅角緑内障の多数の臨床サンプルを解析したところ、緑内障眼では TTR 濃度は有意に高く、有意に酸化を受けていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Secondary glaucoma is the most serious ocular manifestation of transthyretin (TTR)-related familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). We investigated the mechanism of bleb encapsulation, which is a complication of filtering surgery. TTR-aggregated amyloid did not cause any change for fibroblast *in vitro* in physiological condition. Subconjunctival TTR-aggregated amyloid embedded in Poly-HEMA in rat might cause mild inflammation. Also, TTR concentration in aqueous humor is significantly higher and TTR is significantly oxidized in glaucomatous eyes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：家族性アミロイドポリニューロパチー；緑内障；トランスサイレチン；トラベクトミー

1. 研究開始当初の背景

トランスサイレチン（TTR）は、サイロキシンおよびレチノール結合蛋白を介し、ビタミンAの担体としての機能する蛋白質として古くから知られてきたが、最近、様々な側面を持つことが明らかになってきている。

家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）は、TTR の点変異や欠損が原因となって起こる遺伝性アミロイドーシスであり、異

型 TTR が全身組織に沈着することで発症する。近年、TTR の主たる産生臓器である肝臓の移植が臨床応用された結果、血中の異型 TTR が消失することで FAP の神経症状の進行が抑制され、生命予後が劇的に改善されるようになった（Lancet 345:195, 1995）。しかしながら、その一方で、眼症状の進行は抑制されないことも明らかになった（Ann Intern Med 135:931, 2001）。FAP の世界的な集積地

の一つは日本であり、日本における二大集積地の一つが、我々の位置する熊本である。

我々は、熊本地域医療への責任を果たすべく、FAP における眼症状の病態解明と治療法の開発をスタートした。まず、FAP における眼合併症の特徴として、緑内障や硝子体混濁が高頻度に生じることを、詳細な臨床調査で解明し、硝子体混濁への硝子体手術の有効性を証明した (Br J Ophthalmol 81:295, 1997; Arch Ophthalmol 121:351, 2003; Am J Ophthalmol 135:188, 2003)。続いて、肝移植後患者の眼症状が抑制されず、房水中に異型 TTR が存在し続けることを明らかにし (Transplantation 77:345, 2004)、房水中の異型 TTR の由来が、それまで指摘されていた網膜色素上皮のみならず、毛様体上皮からも産生されることを証明した (Exp Eye Res 81:306, 2005)。さらに、アミロイド由来の特有の網脈絡膜血管症 ocular amyloid angiopathy と呼称しうる疾患概念の存在を世界で初めて発見し、その概念を提唱し、国際的にも認知された (Ophthalmology 112:2212, 2005)。最近、肝移植後の眼症状の長期経過観察の結果、すべての眼症状の発症頻度と重症度が経過とともに増すことを報告し (Arch Ophthalmol 128:206, 2010)、さらに網膜光凝固術が硝子体混濁に対し顕著な予防効果を示すことを世界で初めて証明し、新たな治療法として確立させた (Ophthalmology 117:552, 2010)。これら一連の臨床研究と基礎研究を融合させた研究手法は、従来の概念を一変させ、国際的にも高く評価されており、トランスレーショナルリサーチの観点からもユニークで画期的な発見を重ねている。

現在、FAP の眼合併症の中で解決すべき最重要課題と我々が注目しているのは、FAP 続発緑内障に対する線維柱帯切除術 (濾過手術) の術後成績が非常に不良なことであり、結果として、肝移植により長期生存が可能となった患者の quality of life を大きく脅かしている。主な原因は、創傷治癒機転の制御不良により濾過胞の encapsulation が高頻度に生じ、短期間の内に眼圧再上昇をきたすことによる (論文投稿中)。手術時に採取した結膜組織の免疫組織染色により、濾過胞壁への異型 TTR 沈着が ERK カスケードを活性化させていることを示唆する予備データを得ており、今後のより詳細な解析によって、FAP 続発緑内障の場合に限らず、すべての緑内障病型における濾過胞の形成メカニズムの本質につながる重要な知見が得られる可能性を秘めている。

また、我々は、最近 SELDI-TOF-MS を用いて、原発緑内障患者の房水中のプロテオーム解析を行い、遺伝子変異のない正常 TTR が有意な酸化修飾を受けていることを発見した

(論文準備中)。酸化ストレスが緑内障の病態に深く関わっているのは、過去の多くの研究により示唆されているが、我々の知る限り TTR に関する研究は行われていない。また、網膜の免疫組織染色にて、TTR が網膜神経節細胞層に染色されることも知られているが、その役割は全く不明である。さらに、最近、正常 TTR が酸化修飾を受けると、構造が不安定となり、細胞毒性を示すことが示唆されていることより (Biochim Biophys Acta 1804:1449, 2010; Biochem Biophys Res Commun 377:1072, 2008)、本研究は、緑内障の病態における正常 TTR または酸化型 TTR の役割の解明を試みるものである。

2. 研究の目的

本研究期間 (2 年間) においては、遺伝子変異による異型 TTR と、正常 TTR の酸化修飾型である Cys 結合型 (酸化型) TTR、という TTR の二つの側面に着目し、従来の臨床と基礎研究の成果を踏まえて、これらを融合させることで、一挙に新たな病態の解明および治療概念の創出に迫りたい。

第一に、FAP 続発緑内障においては、薬物による眼圧のコントロールが困難なため、ほとんどの場合、線維柱帯切除術 (濾過手術) が必要となる。しかしながら、その手術成績は、他の緑内障病型に比べるとときわめて不良であり、主な原因は、濾過胞の創傷治癒機転が適切に制御できず、高頻度に encapsulation を生じるためである。そこで、本研究では、encapsulation が生じるメカニズムを明らかにすることを目的とする。これまでの臨床調査により、結膜への異型 TTR 沈着が encapsulation の危険因子であることは明らかであり、手術で得られた結膜組織の解析で、異型 TTR 沈着に一致して ERK シグナルの活性化が生じていることを予備実験で確認している。これらの予備データから発展させ、ヒト培養結膜線維芽細胞に異型 TTR を添加し、細胞形態・性質の変化やシグナルの解析を行い、詳細なメカニズムの解明を試みる。これらの知見は、一般的な濾過胞の形成メカニズムの本質につながる重要な知見でもあり、新たな治療概念の創出につながると考えられる。

第二に、原発緑内障患者の房水中に存在する酸化型 TTR が、緑内障の病態に果たす役割を解明する。予備データで得られた、原発開放隅角緑内障患者の房水中の酸化型 TTR が特異的に上昇していることを踏まえ、酸化型 TTR が、房水流出路へ与える影響をヒト培養線維柱帯細胞を用いて検討し、網膜神経節細胞へ与える影響をヒト培養網膜神経節細胞を用いて検討し、酸化型 TTR が眼圧上昇のメカニズムに関与するのか、神経障害メカニズムに関与するのか、またはその両方に関与す

るのか、を解明する。さらに、正常 TTR の網膜神経節細胞への保護効果についても検討する。これらの結果から得られる知見は、緑内障の新たな病態の発見となるものであり、新たな治療概念の創出につながると考えられる。

3. 研究の方法

(1)FAP 続発緑内障に対する線維柱帯切除術後に高頻度に生じる濾過胞の encapsulation のメカニズムの解明

濾過胞は強い炎症にさらされると完全な癒着化をきたしてしまうため、encapsulation は比較のおだやかな刺激による fibroblast の活性化によると示唆されているが、詳細なメカニズムは不明である。最近、FAP 患者の末梢神経組織を用いた検討にて、異型 TTR の集積が ERK シグナルを継続的に活性化させ、その結果神経変性に至る可能性が報告された (J Neurochem 97:151, 2006)。我々は予備実験として、手術時に採取した結膜サンプルの免疫組織学的検討を行い、結膜下の異型 TTR 沈着部位の周囲で、MKP-1 の発現低下、および ERK カスケードの活性化を確認した。

そこで、本計画では、さらに多くの手術サンプルを用いて、より詳細な検討を行う。まず、①結膜の組織学的形態や炎症細胞の浸潤などと異型 TTR の分布状況との間に相関があるかを確認する。また、②予備実験と同様の免疫組織学的検討を行い、上記の結果の再現性を確認する。

次に、培養ヒト結膜線維芽細胞を用いて in vitro 実験を行う。まずは、③結膜線維芽細胞自体が TTR を産生している可能性も考え、発現の有無を確認する。次に、④遺伝子変異の組み込まれた TTR (FAP で最も一般的な V30M を用いる) を培養系に添加し、ヒト結膜線維芽細胞の生存率、形態の変化、増殖能、接着能、遊走能などについて検討し、異型 TTR による影響を明らかにする。以上の結果をもとに、V30M 変異を導入した異型 TTR を培養ヒト結膜線維芽細胞に添加し、ERK カスケードを中心に、詳細なシグナル伝達機構の解明を試みる。

(2)原発緑内障の病態における酸化型 (Cys 結合型) TTR の意義の解明

最近、我々は surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) を用いて、原発開放隅角緑内障患者の房水のプロテオーム解析を行い、房水中の TTR がコントロール (白内障患者) 群に比べ有意に上昇しており、さらに TTR の修飾に関して調べたところ、

酸化型である Cys 結合型 TTR のみ有意に上昇していることを確認した。酸化型 TTR の生理学的活性には不明な点が多いが、最近、構造が不安定となり、細胞毒性を示す、との報告もある。そこで、本研究では、酸化型 TTR が緑内障の病態に及ぼす影響を解明することを目的として、房水流出路へ与える影響を検討するため次の実験を行う。

①TTR とシステインを室温下で反応させ、酸化型 TTR を生成する。反応時間の違いによる酸化程度の変化を確認する。次に、②酸化型 TTR をヒト培養線維柱帯細胞に添加し、ヒト結膜線維芽細胞の生存率、形態の変化、増殖能、接着能、遊走能などについて検討する。

4. 研究成果

本研究計画では、TTR の遺伝子変異または酸化修飾という二つの側面に着目し、緑内障の二つの病型、FAP 続発緑内障および原発緑内障のそれぞれにおける TTR の役割の解明に取り組んだ。

FAP 続発緑内障に対する線維柱帯切除術後に高頻度に生じる濾過胞の encapsulation のメカニズムを解明するため、培養ヒト結膜線維芽細胞を用いて in vitro 実験を行った。まず、結膜ヒト線維芽細胞自体が TTR を産生していないことを確認した。次に、TTR を様々な程度にアミロイド化させ、アミロイド化した TTR を培養系に添加し、ヒト結膜線維芽細胞の生存率、形態の変化について検討したが、生理的な TTR 濃度では特に有意な所見を認めなかった。そこで、ラットの結膜下に Poly-HEMA で包埋した TTR アミロイドを長期間留置したところ、軽度な炎症を惹起する可能性が示唆された。今後、詳細なメカニズムを検討していく予定である。

また、原発緑内障の病態における酸化型 (Cys 結合型) TTR の意義の解明に関しては、さらに臨床サンプルを集め検討を行ったところ、やはり原発開放隅角緑内障眼では m TTR 濃度は有意に高く、有意に酸化を受けていることが明らかになり、現在論文準備中である。

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 2 件)

① Inoue T, Kawaji T, Inatani M, Kameda T, Yoshimura N, Tanihara H. Simultaneous Increases in Multiple Proinflammatory Cytokines in the Aqueous Humor of Pseudophakic Glaucomatous Eyes. J Cataract Refract Surg, 38(8):1389-97, 2012. 査読有
DOI: 10.1016/j.jcrs.2012.04.028.

② 川路隆博，平成 23 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説：家族性トランスサイレチン眼アミロイドーシスへの網膜光凝固術. 日本眼科学会雑誌、116 巻 1046-51、2012、査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

① 川路隆博，家族性トランスサイレチン眼アミロイドーシスにおける網膜光凝固術の効果. 第 116 回日本眼科学会、2012 年 04 月 05 日～2012 年 04 月 08 日、東京国際フォーラム、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川路 隆博 (KAWAJI TAKAHIRO)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30423677