

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792008

研究課題名(和文) 緑内障に対する新しい免疫学的・遺伝子学的診断、治療、経過観察法の開発

研究課題名(英文) Immunological analysis of glaucoma patients

研究代表者

丸山 勝彦 (MARUYAMA, KATSUHIKO)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：60385002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：手術既往のない原発開放隅角緑内障症例を対象として、初回手術として行った線維柱帯切除術時に前房水を採取してサイトカイン、ケモカイン、増殖因子の濃度を網羅的に解析し、術前術後の臨床因子との相関を検討した。

その結果、術前の前房水中MCP-1濃度と術後の後嚢化白内障の発生に有意な相関を認め、線維柱帯切除術後の後嚢化白内障の発生に術前の前房水中MCP-1が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Undiluted aqueous humor samples of primary open-angle glaucoma (POAG) patients were collected at the start of trabeculectomy, and cytometric beads array kits were used to determine the concentrations of immune mediators. The correlation of aqueous humor concentration of each immune mediator with pre and post-operative clinical factors were analyzed.

A significant relationship between incidence of posterior capsular cataract and MCP-1 level was detected. Our study suggests that elevated MCP-1 level in aqueous humor in patients with POAG undergoing trabeculectomy affects the incidence of postoperative posterior capsular cataract.

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：液性因子 サイトカイン ケモカイン 増殖因子 MCP-1 線維柱帯切除術 後嚢化白内障 緑内障

## 1. 研究開始当初の背景

従来、緑内障の診断、治療、経過観察は、眼底所見、眼圧、視野検査結果などの臨床所見を元に行われてきた。しかし近年、眼内液中のサイトカインやケモカイン、増殖因子（液性因子）と臨床所見との関連性が報告され、緑内障の診断、治療、経過観察への応用が期待されている。

緑内障症例の液性因子と臨床因子の関係に関するこれまでの報告では、IL-8が視野異常の重症度や眼圧、眼圧下降薬の投薬数と相関することや、MCP-1が高齢者や白内障手術既往眼で上昇し、緑内障手術の成績を悪化させることなどが示されている。しかし、これらは落屑緑内障など高眼圧を呈する病型を中心とした検討であり、わが国で多い正常眼圧緑内障に対する研究は不十分で、手術既往のない症例に対象を限定した報告も少なかった。

## 2. 研究の目的

本研究は手術既往のない正常眼圧緑内障を含む広義原発開放隅角緑内障を対象に、初回の線維柱帯切除術時に前房水を採取し、液性因子の発現を網羅的に検索し、術前術後の臨床像との関係を解析して、将来的に今までは全く異なったアプローチによる治療戦略として応用することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究対象

線維柱帯切除術を行った広義原発開放隅角緑内障症例 27 例 32 眼を対象とした。対象の条件は、レーザー治療を含む手術既往がない初回手術症例で、手術時に緑内障以外の眼疾患がなく、術後 6 か月以上経過観察した症例とし、全身性の炎症性疾患、自己免疫疾患、免疫不全のないこととした。

手術時における対象の背景は、狭義原発開放隅角緑内障：正常眼圧緑内障 7:25、年齢  $53.1 \pm 7.1$  歳（レンジ 37～62 歳）等価球面度数  $-7.26 \pm 3.40D$ （ $-20.00 \sim -2.50D$ ）、眼圧  $16.1 \pm 2.9\text{mmHg}$ （ $11 \sim 21\text{mmHg}$ ）、眼圧下降薬の投薬数  $2.5 \pm 0.8$  剤（ $0 \sim 4$  剤）、投薬期間  $8.2 \pm 6.3$  年（ $1 \sim 34$  年）ハンフリー自動視野計中心 30-2 プログラムによる Mean deviation (MD)  $-16.75 \pm 6.20\text{dB}$ （ $-27.98 \sim -2.97\text{dB}$ ）であった。

### (2) 検体の採取

線維柱帯切除術時に消毒、ドレーピングの後、全ての手術操作に先立って輪部より 30G 注射針を前房内に刺入し、血管や虹彩への接

触を避けながら 50  $\mu\text{L}$  以上の前房水を採取して、直ちに  $-80$  度で凍結保存した。

### (3) 前房水中液性因子濃度の測定

Cytometric Beads array Flex Immunoassay System (BD Biosciences, San Jose, CA) を用いて 35 種のサイトカイン、ケモカイン、増殖因子 (angiogenin, bFbF, eotaxin, Fas ligand, fractalkine, G-CSF, GM-CSF, granzyme A, granzyme B, INF- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12p70, IL-17A, IL-21, IP-10, ITAC, LT- $\alpha$ , MCP-1, Mig, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, TNF- $\alpha$ , VEGF) の濃度を測定した。

### (4) 検討項目

各液性因子の濃度を測定し、全症例中 20 眼以上で検出された液性因子に関しては、各液性因子の濃度と術前術後の臨床因子との相関の有無を検討した (Spearman の相関係数)。なお、術前の臨床因子として、年齢、等価球面度数、眼圧、眼圧下降薬の投薬数、投薬期間、MD を検討した。また、術後の臨床因子は診療録を参照して 6 か月目までの臨床経過を調査し、6 か月目の眼圧、ニードリング施行の有無、5mmHg 以下の低眼圧の有無、後囊下白内障発生の有無を検討した。後囊下白内障の評価は細隙灯顕微鏡所見を元に行い、WHO 分類 Grade1 以上の場合、すなわち混濁の垂直方向の直径が 1mm 以上の症例は発生あり、1mm 未満の場合は発生なしと判定した。

## 4. 研究成果

35 種の液性因子のうち、16 種の液性因子が検出された (表 1)。

表 1. 前房水中の各液性因子の濃度

液性因子	眼数	平均 (レンジ) pg/mL
Angiogenin	32	8605.2 (870.5-35795.3)
bFbF	1	0.8 (0-25.2)
Fas ligand	3	2.3 (0-28.5)
Fractalkine	1	0.3 (0-9.6)
Granzyme A	3	0.0 (0-0.8)
IL-6	5	0.6 (0-14.7)
IL-7	3	0.7 (0-4.3)
IL-8	26	4.3 (0-22.1)
IL-10	2	0.6 (0-10.4)
IP-10	29	61.9 (0-269.4)
MCP-1	32	284.8 (136.8-806.3)
Mig	23	25.4 (0-157.1)
MIP-1 $\alpha$	1	0.2 (0-6.9)
MIP-1 $\beta$	11	5.8 (0-43.1)
RANTES	4	23.7 (0-356.8)
VEGF	12	6.0 (0-45.6)

術後 6 か月目の眼圧は  $8.0 \pm 3.3$  mmHg (レンジ: 2-16 mmHg) で、ニードリングは 5 眼で施行されていた。また、5 mmHg 以下の低眼圧は 16 眼で、後嚢下白内障も 16 眼で認めた。

全症例中 20 眼以上で検出された angiogenin, IL-8, IP-10, MCP-1, Mig の濃度と術前術後の臨床因子との相関を表 2, 3 に示す。MCP-1 濃度と術後の後嚢下白内障発生のみが有意な相関を認めた (相関係数 0.44,  $p=0.01$ )。

表 2. 液性因子濃度と術前臨床因子との相関

	年齢	SE	眼圧	投薬数	投薬期間	MD
Angiogenin						
	-0.08	-0.23	0.08	0.16	0.20	0.10
	0.67	0.02	0.67	0.37	0.27	0.58
IL-8						
	0.08	0.01	0.09	0.12	0.33	-0.02
	0.67	1.00	0.61	0.49	0.06	0.91
IP-10						
	0.16	0.06	-0.13	0.20	0.32	-0.11
	0.38	0.72	0.49	0.28	0.07	0.55
MCP-1						
	0.17	-0.04	0.12	0.25	0.21	-0.02
	0.36	0.82	0.53	0.16	0.26	0.90
Mig						
	0.27	0.13	-0.14	0.03	0.25	-0.27
	0.13	0.49	0.45	0.85	0.16	0.14

SE: 等価球面度数

MD: Mean deviation

上段: 相関係数、下段: p 値

表 3. 液性因子濃度と術後臨床因子との相関

	眼圧	ニードリング; /-	低眼圧+/-	PSC
Angiogenin				
	-0.02	0.21	0.01	0.11
	0.90	0.25	0.99	0.55
IL-8				
	-0.01	0.05	-0.19	0.23
	0.96	0.79	0.30	0.20
IP-10				
	-0.14	0.25	-0.03	0.11
	0.45	0.17	0.87	0.53
MCP-1				
	-0.12	0.10	0.06	0.44
	0.52	0.57	0.75	0.01
Mig				
	-0.24	-0.01	-0.13	0.21
	0.19	1.00	0.49	0.26

PSC: 後嚢下白内障

上段: 相関係数、下段: p 値

今回、手術既往のない正常眼圧緑内障を含む広義原発開放隅角緑内障を対象に前房水中の液性因子の濃度を網羅的に解析した結果、術後の後嚢下白内障の発生と MCP-1 濃度が有意に相関することがわかった。

これまで前房水中 MCP-1 濃度は線維柱帯切除術の眼圧調整成績を悪化させる因子であ

るとする報告があるが、同報告と比べ本研究で検出された MCP-1 濃度は低い。MCP-1 は高濃度では線維柱帯切除術後の創傷治癒機転、濾過胞癒着、そして眼圧上昇に関与し、低濃度では後嚢下白内障の発生に関与している可能性がある。いずれにしても術前の MCP-1 は術後の眼内炎症反応を反映することが示唆され、術前の MCP-1 濃度によっては術後の消炎治療を積極的に行うことで手術成績を高め、患者のクオリティオブライフを向上できる可能性が示された。

今回の手術既往のない原発開放隅角緑内障を対象とした解析でも、ここまで液性因子が検出されるのは特筆すべきである。特に本研究では過半数の症例が正常眼圧緑内障であり、高眼圧により前房内のバリアーが破綻していることは考えにくい。今後、手術既往のない正常眼圧緑内障症例の前房内に炎症性サイトカイン、ケモカインが発現する機序を解明することで、将来的に従来とは異なる治療戦略として応用できる可能性が示された。

## 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 2 件)

Katsuhiko Maruyama, et al. Incidence of deepening of the upper eyelid sulcus after topical use of travoprost ophthalmic solution in Japanese. J Glaucoma, 査読有, 23, 2014, 160-163. doi: 10.1097/IJG.0b013e31826a7e09.

Katsuhiko Maruyama, et al. Incidence of deepening of upper eyelid sulcus after topical use of tafluprost ophthalmic solution in Japanese patients. Clin Ophthalmology, 査読有, 7, 2013, 1441-1446. doi: 10.2147/OPHT.S47783.

[学会発表](計 8 件)

Katsuhiko Maruyama, et al. Relationship between incidence of post-trabeculectomy posterior capsular cataract and aqueous humor levels of immune mediators. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2014.5.8, オランダ (米国)

丸山勝彦、他、線維柱帯切除術後の後嚢下白内障の発生と前房水中液性因子との関係、第 118 回日本眼科学会総会、2014 年 4 月 5 日、東京

Katsuhiko Maruyama, et al. Comparison

of the diagnostic abilities of retinal nerve fiber layer thickness and macula inner retina measurements by spectral-domain OCT in early normal-tension glaucoma patients. 5<sup>th</sup> World Glaucoma Congress, 2011.7.17-20, バンクーバー (カナダ)

丸山勝彦、他、白内障手術と線維柱帯切除術の同時手術後の屈折誤差に影響する因子の検討、第 28 回日本眼内レンズ屈折矯正手術学会学術学会、2013 年 6 月 29 日、浦安

丸山勝彦、他、線維柱帯切除術と死亡ヘルニア切除術の同時手術、第 66 回日本臨床眼科学会、2012 年 10 月 25 日-28 日、京都

丸山勝彦、他、プレブナイフあるいは Vannas 剪刀を用いた濾過胞再建術の比較、第 35 回日本眼科手術学会総会、2012 年 1 月 26 日、名古屋

丸山勝彦、他、トラボプロストによる上眼瞼溝変化の発生頻度、第 115 回日本眼科学会総会、2011 年 5 月 12 日-15 日、東京

Katsuhiko Maruyama, et al. Incidence of deepening of upper eyelid sulcus after topical use of travoprost in Japanese. 4<sup>th</sup> World Glaucoma Congress, 2011.6.29-7.2, パリ (フランス)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丸山 勝彦 (MARUYAMA, Katsuhiko)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：60385022