

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592633

研究課題名(和文)内眼炎発症に関連する遺伝子多型の解析と個別化医療への応用

研究課題名(英文) Analysis of gene polymorphism associated with intraocular inflammation and its application to personalized medicine

研究代表者

中尾 久美子(Nakao, Kumiko)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：30217658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：内眼炎の発症に関連する遺伝子多型をPCR-制限酵素断片長多型解析によって検索した結果、生体内抗酸化機構で働く酵素や、炎症に関与する接着分子やサイトカインの遺伝子多型で有意なものは検出できなかった。内眼炎発症に関わる因子を制御する遺伝子を選択的に眼内に送達することを目的として、極性網膜色素上皮細胞に対して遺伝子導入を試みた結果、超音波にバブルリポソームを併用する方法を用いることで、効率的に遺伝子導入できることが確認された。

研究成果の概要(英文)：Genotyping of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for the development of intraocular inflammation such as cytokines, adhesion molecules, and antioxidant enzymes genes was performed using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. There was no significant association between any of the single-nucleotide polymorphisms analyzed and intraocular inflammation. For the purpose of delivering genes controlling the factors involved in the development of intraocular inflammation selectively into the eye, we performed gene transfer to polarized retinal pigment epithelium cells by ultrasound irradiation with combination of a bubble liposome, and confirmed gene delivery to the polarized retinal pigment epithelium cells with high efficiency.

研究分野：眼科学

キーワード：内眼炎 HTLV-1 遺伝子多型 超音波 バブルリポソーム 極性網膜色素上皮 脈絡膜

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 内眼炎は難治で視機能を低下させる眼疾患の1つで、多くは原因が解明されていない。我々は1989年に原因不明の内眼炎の中にレトロウイルス human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) 感染が関連して発症しているものを発見し、HTLV-1-associated uveitis (HAU) と名付けた。しかし、HAUの発症にはHTLV-1感染という外的因子だけでなく、他の要因として宿主側の要因が強く関連していると考えられる。またHAUだけでなく、その他の内眼炎でも宿主側の要因として外来性物質や刺激に対する遺伝的個体差が発症に関連していると推測されており、内眼炎と遺伝子多型との関わりについて解明が待たれている。内眼炎における分子遺伝学的アプローチは内眼炎の病態を考える上で重要であり、内眼炎を引き起こす原因となる遺伝子やタンパク質を標的にした新しい診断法の確立や、発病リスク・予後の推定に貢献することが期待される。また、多くの内眼炎では画期的な治療の展開に乏しい状況であるが、内眼炎発症に関連するサイトカインの遺伝子多型が検出できれば、現在ベッチェット病の内眼炎に適用されている抗TNF療法のような抗サイトカイン療法などの新しい治療の展開に貢献する可能性がある。

(2) 新たな治療薬の開発において、薬物開発とその効率的なデリバリーとが並行して開発することが望ましい。我々は眼球への超音波と、バブルリポソーム(ポリエチレングリコール修飾リポソーム内部にガスが封入されたもの)を併用した新しい薬物・遺伝子送達システムの開発を行っている。現在までに、眼表面からの超音波照射とバブルリポソームの併用によって結膜、角膜、虹彩、網膜への薬物・遺伝子導入が可能となっている。この新しい送達法では、超音波照射によってバブルリポソームに内包されたガスが破裂する際に発生するmicro-jet流により細胞膜に小さな孔が形成される。その孔を通して、バブルリポソームに付加した薬物や遺伝子を細胞内に導入する事が可能である。本法は、低エネルギーの超音波を使用するため、組織に与えるダメージが少ないことから有望な送達法として注目されている。またバブルリポソームは外壁がポリエチレングリコール修飾リポソームの構造をとっており、標的とする細胞を特異的に認識させるなどの修飾が容易で、バブルリポソームと超音波を併用することで、組織特異的に薬物を送達することが可能である。前述の、薬物・遺伝子送達法の評価を行う上で、*in vitro*での評価系の存在が重要であると考えられる。我々は独自にTranswell™を用いた網膜色素上皮細胞(RPE)の極性細胞培養システムを開発した。極性RPEはより生体に近い形態的・機能的特徴を有している。そのため、この細胞を使って超

音波やバブルリポソームの効果を評価することは、通常の培養細胞を使用した場合と比べ、より臨床に近い形での評価を行えると考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 種々の内眼炎患者の炎症性サイトカインや接着分子および抗酸化機構に關与する各種酵素などの候補遺伝子を検索して、内眼炎発症に關連する遺伝子多型(SNP)を検出し、細胞内でSNPの遺伝子産物自体が量的・質的变化を起こしていないか、またSNPの下流に位置する因子への相互作用について検討することを目的とした。

(2) さらに、個々の患者の遺伝的な違いを考慮に入れた薬の使い分けなど、治療におけるオーダーメイド化についても視野にいれ、この研究で得られた内眼炎発症に關わる因子を制御する薬物や遺伝子を、超音波とバブルリポソームを併用して選択的に眼内に送達することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 内眼炎患者試料の収集

2012~2014年に鹿児島大学病院眼科外来を受診したHAUやその他の内眼炎患者、および対照となる無症候性HTLV-1キャリアや健康人から、文書による同意を得た上で末梢血液を採取し、血漿を分離した後DNAを抽出した。

### (2) 内眼炎患者の臨床所見の集積・検討

内眼炎の臨床所見を把握するため、HAUを含む内眼炎患者の臨床所見をデータベース化し、各種内眼炎の臨床像について解析した。

### (3) 内眼炎発症と關連するSNPの検索

(1)で得られたDNAを用い、PCR-制限酵素断片長多型解析によって主に生体内抗酸化機構で働く各種酵素や、炎症に關与する接着分子や種々のサイトカイン、それらの受容体のSNPを解析し、内眼炎と対照群におけるSNPの遺伝子型頻度やアレル頻度を比較検討した。得られた結果と臨床資料とを総合的に考察し、単独あるいはハプロタイプブロックとして内眼炎発症のリスク遺伝子に該当するものがあるかどうかを検討した。

### (4) 機能付加型バブルリポソームの開発と極性RPEへの遺伝子導入

超音波およびバブルリポソームの種々の組み合わせを変えて、極性RPEへ緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子の細胞内への導入効果の判定を行った。また、極性RPEにTNF- $\alpha$ 刺激(炎症刺激)を行い、マイクロアレイ解析の手法を用いて、刺激時にRPEに特異的に発現する分子の検索を行った。これらの特異的分子をバブルリポソームのポリエチレングリコール終末に付加することで組織指向性の高いバブルリポソームの開発を目指した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 内眼炎発症に関連する遺伝子多型

研究期間内に HAU41 例、および対照 39 例から、同意を得た上で末梢血液を採取し、DNA を抽出した。収集した DNA を用い、生体抗酸化機構で働く各種酵素や、炎症に関与する種々のサイトカインの SNP を解析した。HAU と対照群における SNP 頻度を比較した結果、細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 遺伝子 (CTLA-4) の遺伝子多型のうち -1722C/C 遺伝子型頻度と C アレル頻度が高い傾向がみられたが、有意差はなかった。その他検索した各種酵素やサイトカインの SNP の遺伝子型頻度に有意差は認められず、アレル頻度も有意差はなかった (表 1)。症例数が少ないため有意差がでなかった可能性があり、今後、さらに症例数を増やして検討する予定である。

表 1. HTLV-1 関連ぶどう膜炎と遺伝子多型

遺伝子多型	遺伝子型	HAU	対照
eNOS VNTR in intron4	4b/b	77.4%	79.5%
	4a/b	22.6%	18.2%
	4a/a	0%	2.3%
MnSOD Ala16Val	T/T	79.0%	73.6%
	T/C	14.5%	25.5%
	C/C	6.5%	0.9%
EC-SOD Arg213Gly	C/C	87.1%	87.8%
	C/G	12.9%	12.2%
	G/G	0%	0%
TNF-alpha -1031	T/T	75.8%	71.7%
	T/C	21.0%	27.4%
	C/C	3.2%	0.9%
TNF-alpha -863	C/C	79.0%	73.6%
	C/A	14.5%	20.8%
	A/A	6.5%	5.7%
TNF-alpha -857	C/C	60.0%	66.4%
	C/T	33.3%	28.0%
	T/T	6.7%	5.6%
TNF-alpha -308	G/G	96.8%	97.2%
	G/A	3.2%	2.8%
	A/A	0%	0%
TNF-alpha -238	G/G	96.8%	99.1%
	G/A	3.2%	0.9%
	A/A	0%	0%
TNFR2 codon 198	T/T	80.6%	72.0%
	T/G	17.7%	26.2%
	G/G	1.6%	1.9%
LT-alpha	A/A	48.4%	37.4%
	A/G	36.7%	51.4%
	G/G	12.9%	11.2%
CTLA-4 -1722	T/T	37.0%	48.1%
	T/C	40.7%	48.1%
	C/C	22.2%	3.7%
CTLA-4 -1661	A/A	88.0%	77.8%
	A/G	8.0%	22.2%
	G/G	4.0%	0%
CTLA-4 49	G/G	34.1%	28.2%
	G/A	53.7%	61.5%
	A/A	12.2%	10.3%
CTLA-4 60	G/G	39.0%	42.1%
	G/A	53.7%	55.3%
	A/A	7.3%	2.6%

##### (2) 内眼炎の臨床所見

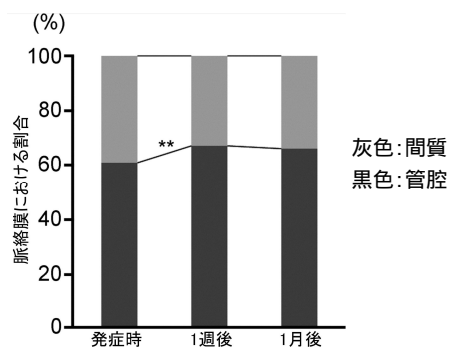
鹿児島大学病院眼科外来を受診した内眼炎患者の臨床所見をデータベース化し、このデータベースをもとに、内眼炎の臨床像について検討した結果、以下の内眼炎の臨床所見が明らかになった。

HTLV-1 関連ぶどう膜炎の臨床所見を検討した結果、血清抗 HTLV-1 抗体陽性の原因不明ぶどう膜炎のうち、HAU である可能性が高いと考えられる甲状腺機能亢進症を合併した症例では、顆粒状硝子体混濁、網膜血管や網膜表面への顆粒附着が有意に多く、これらの所見は HAU の特徴的眼所見である可能性が示唆された。

若年発症サルコイドーシス 5 例の臨床像を検討した結果、若年発症サルコイドーシスの眼所見は、発症初期から成人のサルコイドーシスと同様の両眼性の慢性肉芽腫性ぶどう膜炎を呈し、本症の早期診断に役立つことが明らかになった。また、若年発症サルコイドーシスのぶどう膜炎は難治性で、視力予後不良と報告されてきたが、ステロイド内服やインフリキシマブで適切に治療することにより炎症はコントロール可能で、視力予後は必ずしも不良ではないことが示された。

Vogt-小柳-原田病患者の急性期の脈絡膜変化に注目し、光干渉断層計の画像を image J 画像処理ソフトを使って脈絡膜の 2 階調化を行うことで、脈絡膜の変化を間質と管腔に分けて解析した。Vogt-小柳-原田病では急性期に脈絡膜が肥厚しており、ステロイド治療によって脈絡膜厚が正常化するが、脈絡膜の肥厚は間質領域の割合が増加していること、ステロイド治療により 1 週間でほぼ正常化することが解明できた (図 1)。

図 1. Vogt-小柳-原田病の脈絡膜における間質と管腔の割合



##### (3) 機能付加型 バブルリポソームの開発

蛍光標識したバブルリポソームをラットの尾静脈から注射して、蛍光眼底造影で動態を確認した結果、投与直後から眼内への流入を確認し、5 分程度まで蛍光を確認することができた。また同じモデルで、バブルリポソーム投与後、経角膜で超音波照射を行うことにより、眼血管でバブルリポソームが破裂することが確認できた。組織標的型のバブルリポソームを開発するため、極性 RPE のマイクロ

アレイ解析の手法を用いて、炎症刺激時に RPE に特異的に発現する分子の検索を行ったが、現時点では明らかな候補となる分子の同定には至っていない。

極性を持った RPE を作成するためには、Transwell™上で2週間以上培養する必要がある。本研究の経過で、極性を獲得する前の RPE(非極性 RPE)と極性 RPE を用いて、TNF 刺激を行った結果、極性の有無によって、細胞間の接着分子の発現やサイトカインの分泌パターンなどの反応性が異なる事を見いだした。内眼炎などの病態進行に伴って、RPE 等の細胞が萎縮すること(極性を持っていた細胞が病態進行に伴って極性を失うこと)は知られているが、本研究でそれらの臨床で観察される現象の解明につながるきっかけをあたえてくれる結果を見いだす事ができた。今後この分野での研究を進めてゆく方針である。

#### (4)極性 RPE への遺伝子導入

通常、極性を持った RPE は細胞周期においては G0 期にあるといわれ、遺伝子導入は従来のリポフェクション法などでは難しい。極性 RPE に対して超音波を用いて GFP プラスミドの導入を試みた結果、超音波のみでは従来の方法と同様 GFP 陽性細胞は数個であったが、超音波にバブルリポソームを併用することで GFP 陽性細胞を約 30%認めた。超音波とバブルリポソームを併用することで、極性 RPE への遺伝子導入が可能となることが分かった。また、この手法により、目的とする遺伝子やタンパクをノックダウンし、反応を確認することが可能となると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Sonoda S, Sakamoto T, Yamashita T, Uchino E, Kawano H, Yoshihara N, Terasaki H, Shirasawa M, Tomita M, Ishibashi T. Luminal and Stromal Areas of Choroid Determined by Binarization Method of Optical Coherence Tomographic Images. Am J Ophthalmol. 査読有, 2015, 159: 1123-1131.e1. DOI:10.1016/j.ajo.2015.03.005

Sonoda S, Sakamoto T, Yamashita T, Shirasawa M, Uchino E, Terasaki H, Tomita M. Choroidal structure in normal eyes and after photodynamic therapy determined by binarization of optical coherence tomographic images. Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読有, 2014, 55:3893-3899. DOI: 10.1167/iovs.14-14447.

園田祥三、山下敏史、鈴木亮、丸山一雄、坂本泰二. 眼組織における低照射エネルギー超音波の利用. 薬学雑誌, 査読有, 2013,

133:1269-1276, [https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/133/12/133\\_13-00222-2/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/133/12/133_13-00222-2/_pdf)

Sonoda S, Tachibana K, Yamashita T, Shirasawa M, Terasaki H, Uchino E, Suzuki R, Maruyama K, Sakamoto T. Selective gene transfer to the retina using intravitreal ultrasound irradiation. J Ophthalmol, 査読有, 2012, 2012:412752. DOI:10.1155/2012/412752

Nakao K, Abematsu N, Mizushima Y, Sakamoto T. Optic disc swelling in Vogt-Koyanagi-Harada disease. Invest Ophthalmol Vis Sci, 査読有, 2012, 53: 1917-1922. DOI:10.1167/iovs.11-8984

〔学会発表〕(計 13 件)

園田祥三、山下高明、内野英輔、黒岩宣宏、白澤誠、寺崎寛人、芳原直也、川野浩輝、坂本泰二、光干渉断層計における正常人の網脈絡膜血管構造の解析 第 53 回日本網膜硝子体学会総会・第 31 回日本眼循環学会合同学会 2014.11.29-30 大阪国際会議場(大阪府・大阪市北区中之島)

川野浩輝、園田祥三、白澤和歌子、中尾久美子、迫口智紀、富田将利、岩田一大、坂本泰二、丸子一朗、飯田知弘、原田病における OCT 画像 2 値化によるステロイド大量療法前後の脈絡膜血管腔像の変化 第 53 回日本網膜硝子体学会総会・第 31 回日本眼循環学会合同学会 2014.11.29-30 大阪国際会議場(大阪府・大阪市北区中之島)

中尾久美子、若年発症サルコイドーシス/Blau 症候群 第 48 回に本眼炎症学会 2014.7.4-5 東京国際フォーラム(東京都・千代田区丸の内)

園田祥三、山下敏史、鈴木亮、丸山一雄、立花克郎、坂本泰二、ナノテクノロジーを駆使した革新的診断・治療システムの構築に向けて眼科における低照射エネルギー超音波の利用 日本薬理学会年会 2013.3.21-23, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市博多区石城町)

中尾久美子、精松徳子、水島由香、坂本泰二、眼内悪性リンパ腫のスクリーニングとしての前房水インターロイキン-10 第 66 回日本臨床眼科学会 2012.10.25-28 国立京都国際会館(京都府・京都市左京区宝ヶ池)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾久美子 (NAKAO Kumiko)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：30217658

(2) 研究分担者

園田 祥三 (SONODA Shozo)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：20325806

(3) 連携研究者

なし