

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592652

研究課題名(和文)アトピー緑内障の病態解析

研究課題名(英文)Pathophysiological Analysis of Atopic Glaucoma

研究代表者

松田 彰(Matsuda, Akira)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00312348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：重症のアトピー性皮膚炎に合併する開放隅角緑内障が重症化しやすく、既存の緑内障治療(薬物療法並びに手術療法)に対して抵抗性を示す症例が多いことから、我々はアトピー緑内障の疾患概念を提唱するに至った。本研究の成果として、アトピー緑内障症例には、アトピー白内障およびアトピー網膜剥離の合併症例が多いこと、また観血的治療を要する重症緑内障症例が多いこと、濾過胞感染のリスクが高いことも判明した。アトピー緑内障症例の線維柱帯組織を用い、超微形態の観察・解析を施行したところ、特徴的な超微構造がアトピー緑内障の線維柱帯組織に確認された。

研究成果の概要(英文)：Open-angle glaucoma associated with severe atopic dermatitis (atopic glaucoma) tends to be severe and difficult to treat because of ocular surface/eye lid inflammation. Atopic glaucoma was often associated with atopic cataracts and retinal detachments. Surgical interventions are common because of advanced visual field defects and/or high intraocular pressures. Bleb-associated post-surgical infections were observed in 7 eyes. Ultrastructural analysis of trabecular meshwork tissues obtained from atopic glaucoma patients showed abnormal accumulation of 10 to 30nm fibers in the corneoscleral meshwork.

研究分野：眼科学

キーワード：アトピー 緑内障 ステロイド

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでにアトピー疾患における遺伝要因の研究ならびにアトピー眼合併症（アトピー白内障、アトピー角結膜炎）の遺伝要因と病態生理の研究に従事してきた。また眼科臨床医としてアトピーを背景にもつ難治性の眼合併症の治療にあたり、重症のアトピー性皮膚炎に合併する開放隅角緑内障が重症化しやすく、既存の緑内障治療（薬物療法並びに手術療法）に対して抵抗性を示す症例が多いことから、アトピー緑内障の疾患概念を提唱するに至った。アトピー性皮膚炎の治療にはグルココルチコイド軟膏の局所投与が頻用されるため、ステロイド緑内障との鑑別が問題になるが、我々の検討ではステロイドを忌避するアトピー性皮膚炎症例の中にも緑内障を呈する症例があり、オーバーラップはあるもののアトピー緑内障は独立した疾患概念であると考えられる。アトピー眼合併症の病態の根底には組織のリモデリングに伴う線維化があり、我々はアトピー眼合併症の一形態であるアトピー白内障において線維化を促進する Plasminogen Activator Inhibitor-1(PAI-1)がその病態に重要な役割を果たしていることを発表してきた。

2. 研究の目的

重症アトピー性皮膚炎に伴う緑内障は、その疾患概念、病態や治療法が確立していない。ステロイド緑内障との鑑別が問題になるが、ステロイドの使用を忌避していた重症アトピー性皮膚炎患者にも緑内障は発症しており、また、線維柱帯切開術(TLO)の奏効率が低いこと、結膜炎や組織癒着化が強く、白内障や網膜剥離の合併、重篤な視野変化を呈する例が多い等、独立した疾患概念としてとらえてゆく必要があると考えられる。本研究では(1)アトピー緑内障の疾患概念の確立、(2)アトピー緑内障の病態生理研究、(3)アトピー緑内障の効果的な治療法の創出のための基礎研究を推進し、アトピー緑内障の発症予防および効果的な治療法の創出を目標に研究を進める。

3. 研究の方法

(1) **アトピー緑内障の疾患概念の確立のために多施設におけるレトロスペクティブ解析。**アトピー緑内障の病態を明らかにするため) 年齢及び性別、アトピー疾患の程度とステロイドの使用状況、) アトピー白内障、角結膜炎、網膜剥離、円錐角膜の合併の有無、) 緑内障の臨床経過と治療成績を多数例で検討する。
(2) **アトピー緑内障の TLE 手術時に採取した線維柱帯組織、結膜下組織を用いて、免疫組織学的に組織の癒着化のマーカー分子の発現と炎症細胞の浸潤程度を評価。**リンパ球、好酸球、マクロファージ、マスト細胞といった炎症細胞の浸潤程度と組織

の癒着化の指標の一つである alpha smooth muscle actin の発現をアトピー緑内障から得られた組織と POAG から得られた組織を用いて解析する。また組織癒着化に重要な働きをしている Fibrocytes の浸潤状態を検証する。

(3) **アトピー緑内障およびステロイド緑内障の線維柱帯組織を用いた透過電子顕微鏡観察。**ステロイド緑内障に特徴的とされる指紋様物質の沈着がアトピー緑内障でも見られるか否かを検討する。

(4) **培養ヒト線維柱帯(TM)細胞に対する Th2 サイトカイン添加時の網羅的遺伝子発現解析。**正常人および緑内障患者由来の培養 TM 細胞に IL-13 を添加した際の網羅的遺伝子発現変化を検討する。

(5) **アトピー緑内障モデル動物の作成と線維柱帯切除術マウスモデル。**Nc/Nga マウスを用いて i-care により、経時的にマウス眼圧を測定するとともに、網膜神経節細胞およびグリア細胞の変化を免疫組織学的手法により評価する。また Nc/Nga マウスに加え、アトピー環境下で組織の線維化に働くことが報告されている ペリオスチン (POSTN)、IL-33 のノックアウトマウスを用いて上述のシャントモデルを作成し、対照マウスとのシャントの開存度の違いを組織学的に検討する。この際の検討項目は上述の IL-13 刺激 TM 細胞の遺伝子発現解析の結果を参考にする。またマウスに ragweed 誘発結膜炎を発症させ、炎症性の変化が組織の癒着化に与える影響を評価すると共に、将来の臨床応用にむけて、Th2 サイトカイン (IL-13/IL-33) 抗体の腹腔内投与がシャントの開存に与える影響も同時に検討する。
(6) **アトピー緑内障の治療法の検討。**アトピー緑内障の臨床像の調査をもとにアトピー緑内障の治療法に関する研究をおこなう。すなわち緑内障手術の術式(TLO, TLE, 緑内障インプラント手術)の選択、アトピー性皮膚炎の管理方法、アトピー性角結膜炎並びにアトピー白内障の治療方法が眼圧のコントロールや視野変化に与える影響について検討する。

(7) **結膜組織の癒着化に対する Fibrocyte の役割と TSLP による活性化。**24 年度の研究成果から、結膜組織の癒着化に Fibrocyte が関連していることが示された場合、Fibrocyte の活性化因子として報告がある Th2 型サイトカインである TSLP の役割 12 を検証する。具体的には連携研究者である中江が保有する TSLP 受容体(TSLPR)ノックアウトマウスを使用して、前述のシャントモデルを作成し fibrocyte の組織内流入および活性化の状態、シャントの開存度について評価する。

(8) **網膜神経節細胞およびグリア細胞に対する酸化ストレスの影響。**アトピー性疾患においては組織内の酸化ストレスや炎症性サイトカインの増加が報告されており、網

膜神経節細胞変性、グリア細胞の活性化の一因になっている可能性がある。アトピー緑内障患者の手術時に採取した前房水を用いて酸化ストレスマーカーおよび炎症性サイトカイン濃度を測定し、眼圧以外に網膜神経節細胞の細胞死を誘導するメカニズムを推察し、原因物質のマウス眼球内投与の影響を検証する。

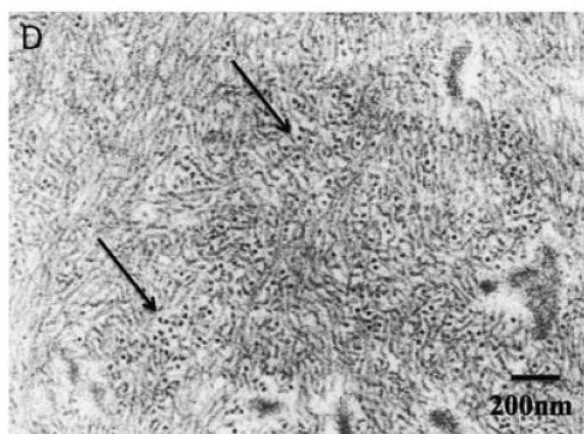
4. 研究成果

(1) **アトピー緑内障の疾患概念の確立のために多施設におけるレトロスペクティブ解析**を施行した。アトピー緑内障の病態を明らかにするため、年齢及び性別、アトピー疾患の程度とステロイドの使用状況、()アトピー白内障、角結膜炎、網膜剥離の合併の有無、()緑内障の臨床経過と治療成績を45症例例62眼で検討し、学術誌(J Glaucoma)に報告した。(順天堂大学、京都府立医科大学、日赤医療センター、北海道大学が参加)。検討の結果、アトピー緑内障症例には、アトピー白内障(62眼中43眼)およびアトピー網膜剥離(62眼中19眼)の合併症例が多いこと、62眼中50眼が重症緑内障で、観血的治療を要したことが判明した。また、7眼で術後濾過胞感染を認め、濾過胞感染のリスクが高いことも同時に判明した。この報告は世界ではじめてのアトピー緑内障の病態報告であり、今後の学術的評価が待たれるものである。

(2) **アトピー緑内障のTLE手術時に採取した線維柱帯組織、結膜下組織を用いて、免疫組織学的に組織の癒痕化のマーカー分子の発現と炎症細胞の浸潤程度を評価**。リンパ球、好酸球、マクロファージ、マスト細胞がアトピー緑内障由来のサンプルに多数浸潤している知見を得た。また、組織の線維化に関わるalpha smooth muscle actinの発現も確認した。

(3) **アトピー緑内障およびステロイド緑内障の線維柱帯組織を用いた透過電子顕微鏡観察**。アトピー緑内障症例のうち、線維柱帯切除術を施行した3例3眼の線維柱帯組織を用い、超微形態の観察・解析を施行した。既報にあるステロイド緑内障に特徴的とされる指紋様物質の沈着はアトピー緑内障ではみられず、13nmファイバーといままで眼科領域では報告のない超微構造がアトピー緑内障の線維柱帯組織に確認された(図1)。現在この13nmファイバーがどのような分子で構成されているのか、免疫電顕法を用いた解析を準備中である。この結果は(1)の成果とあわせてJ. Glaucoma誌に発表された。

図1 アトピー緑内障患者に見られた13nmファイバーの電顕像



(4) **培養ヒト線維柱帯(TM)細胞に対するTh2サイトカイン添加時の網羅的遺伝子発現解析**。正常人および緑内障患者由来の培養TM細胞にIL-13を添加した際の網羅的遺伝子発現変化を検討した。緑内障患者由来の培養TM細胞に20ng/mlのIL-13を24時間反応させた際の遺伝子発現変化をアジレントのDNAチップを用いて解析したところ、炎症細胞誘導に関わるeotaxin-3の産生亢進、組織線維化を防ぐMMP-1遺伝子の発現低下といった結果を得た。

(5) **アトピー緑内障モデル動物の作成と線維柱帯切除術マウスモデル**。

ブタクサ花粉を用いたマウス実験的アレルギー性結膜炎モデルを作成し、既報に準じてマウス角膜輪部に30G針で濾過胞を作成し、緑内障手術のモデルを作成した。アレルギー性結膜炎誘発群と対照群において、濾過胞の維持に差があるか、現在統計的な解析をするとともに、炎症関連遺伝子および組織線維化関連遺伝子の発現を比較検討中である。

(6) **アトピー緑内障の治療法の検討**。アトピー緑内障患者5例5眼に対して、バルベルト緑内障インプラントを使用した緑内障治療を試みて良好な治療成績を得ている。その結果は第7回国際緑内障手術学会で発表した。しかし、アトピー緑内障に対するバルベルトインプラント治療の長期予後は不明であり、今後も臨床的観察が必要である。

また、アトピー緑内障とステロイド緑内障の鑑別のために、培養線維柱帯細胞を用いたバイオマーカーの探索を施行し、FKBP5遺伝子プロモーター領域のゲノムDNAの脱メチル化がステロイド投与と関連することを発見し報告した。純粋なアトピー緑内障ではFKBP5遺伝子のゲノムDNAの脱メチル化程度が低い可能性が考えられ、今後臨床サンプルを用いて検証してゆく。

(7) **結膜組織の癒痕化に対するFibrocyteの役割とTSLPによる活性化**。

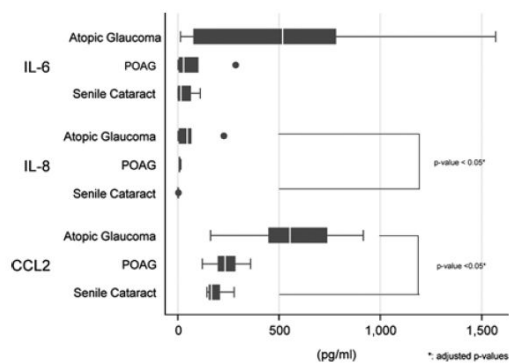
結膜組織の癒痕化の研究に関しては、

Fibrocyte の同定がうまく行かなかったため、マウスを使っての研究には至らず、結膜線維芽細胞を使用した *in vitro* の実験を試行した。すなわち、培養結膜線維芽細胞に TGFβ1 刺激をして線維芽細胞の癒痕化を誘導するモデルを用い、各種の薬剤で癒痕化を抑制する実験を試みた。その結果、ヒストン脱アセチル化阻害剤 TSA が、TGFβ1 刺激による結膜線維芽細胞の癒痕化 (α smooth muscle actin 発現) を抑制することを発見した。現在発表に向けて準備中である。

(8) 網膜神経節細胞およびグリア細胞に対する酸化ストレスの影響。

アトピー緑内障患者の前房水を 5 例 5 眼、原発開放隅角緑内障患者の前房水を 6 例 6 眼、加齢性白内障患者の前房水を 9 例 9 眼、採取して、バイオプレックス 200 サスペンションアレイを用いて、サイトカイン発現の解析を施行した。その結果、アトピー緑内障患者では IL-6, IL-8, CCL2 分子の有意な発現亢進を認めた (図 2)。この結果は (1) および (3) の内容とともに J. Glaucoma 誌に発表された。この結果はアトピー緑内障の病態の一端を明らかにするものであり、今後症例を増やして検討を継続する。また、これらのサイトカインが網膜神経節細胞およびグリア細胞に与える影響を動物モデルを使って現在検討中である。

図 2 アトピー緑内障患者の前房水解析



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 6 件)

Iwamoto S, Ebihara N, Hori K, Funaki T, Asada Y, Yokoi N, Inatomi T, Kawasaki S, Murakami A, Matsuda A. Filaggrin mutations are not associated with chronic allergic keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmol.* 96:1272-1273, 2012 (査読あり) doi: 10.1136/bjophthalmol-2012-301990

Kamijo S, Takeda H, Tokura T, Suzuki I M, Inui K, Hara M, Matsuda H, Matsuda A, Oboki

K, Ohno T, Saito H, Nakae S, Sudo K, Suto H, Ichikawa S, Ogawa H, Okumura K, and Takai T. IL-33-mediated innate response and adaptive immune cells contribute to maximum responses of protease allergen-induced allergic airway inflammation. *J Immunol* 2013;190:4489-4499. (査読あり) doi: 10.4049/jimmunol.1201212

Iwamoto S, Asada Y, Ebihara N, Hori K, Okayama Y, Kashiwakura JI, Watanabe Y, Kawasaki S, Yokoi N, Inatomi T, Shinomiya K, Murakami A, Matsuda A. Interaction between conjunctival epithelial cells and mast cells induces CCL2 expression and piecemeal degranulation in mast cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54:2465-2473. (査読あり) doi: 10.1167/iovs.12-10664.

Takakuwa K, Hamanaka T, Mori K, Chin S, Shinmei Y, Funaki T, Ebihara N, Ono K, Murakami A, Matsuda A. Atopic glaucoma—clinical and pathophysiological analysis. *J Glaucoma* (in press) (査読あり) DOI: 10.1097/IJG.0000000000000069

Asada Y, Ebihara N, Funaki T, Yokoi N, Murakami A, Matsuda A. Vernal keratoconjunctivitis with giant papillae on the inferior tarsal conjunctiva. *Cornea* 2014; 33:32-34. (査読あり) doi: 10.1097/ICO.0000000000000009.

Matsuda A, Asada Y, Takakuwa K, Sugita J, Murakami A, Ebihara N. DNA methylation analysis of human trabecular meshwork cells during dexamethasone stimulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (in press) (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

松田 彰 硝子体手術後の緑内障およびアトピー緑内障。第 37 回日本眼科手術学会。京都国際会館、京都市。2014 年 1 月 17 日

Akira Matsuda. *Cornea and Glaucoma Surgery.* In 7th International congress of Glaucoma Surgery. 20th Feb 2014, Singapore.

松田 彰、高桑加苗、谷内修太郎、舟木俊成、本田理峰。ステロイドレスポンダーではないアトピー緑内障の 1 例。第 25 回日本緑内障学会。大阪国際会議場、大阪。2014 年 9 月 19 日。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] 出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 彰 (MATSUDA, Akira)
順天堂大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：00312348

(2) 研究分担者

小野 浩一 (ONO, Kouichi)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：10317399

森 和彦 (MORI, Kazuhiko)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：40252001

(3) 連携研究者

中江 進 (NAKAE, Susumu)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：60450409