

研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
（総合）研究報告書

エピジェネティクス解析に基づいた網膜硝子体疾患に対する病態解明と 発症予防および治療法の開発

研究代表者 三村達哉 東京女子医科大学東医療センター眼科学教室 講師

研究要旨

エピジェネティクスとは、DNA の塩基配列の変化なしに、遺伝的しかも可逆的に遺伝子機能の発現が変化する現象で、DNA メチル化やヒストン修飾が関与する。癌をはじめあらゆる疾患におけるエピジェネティクス異常が、病態に関与し、診断や治療の標的となることが明らかになりつつあるが、感覚器疾患との関わりについてはまったく知られていない。本研究では、眼感覚器疾患の中で視機能に直接に影響を与える網膜硝子体疾患とエピジェネティクス異常の関係に焦点をあてて研究を行う。眼内での DNA、ヒストン、クロマチンのメチル化異常を調べることにより、原因不明であった眼疾患の病態を明らかにすることを目標とする。

A . 研究目的 :

本研究では、眼内組織の老化のメカニズムを明らかにするために、近年 DNA の塩基配列に変化なしに遺伝的しかも可逆的に遺伝子機能に変化を及ぼすことが明らかになったエピジェネティクスの観点から、網膜硝子体疾患とエピジェネティクス異常の関係を調べることを目的とする。

B . 研究方法 :

研究デザインは症例対照研究および前向きコホート研究である。研究の対象は糖尿病網膜症、網膜静脈閉塞症、加齢性黄斑変性症を有する患者である。手術時などに、前房水、硝子体液、尿サンプルを採取する。検討項目は以下の6点である。

術前術後の視力、網膜電位、網膜感度、蛍光眼底造影、黄斑部血流速度、光干渉断層計による評価。

サンプル中の VEGF、IL-6 などのサイトカイン濃度の ELISA 法による測定。

次世代シーケンサーによる眼内全遺伝子のエピジェネティクス変化解析。

抗老化に関与するサーチュイン遺伝子の加齢黄斑変性患者の眼内液（前房水）中の濃度測定。

加齢黄斑変性における解糖系代謝を調べるために、解糖系による糖の酸化で生成する乳酸塩とピルビン酸塩の尿中濃度の測定。

メチル化抑制剤の点眼液の開発と、動物眼における抗加齢効果の評価。

（倫理面への配慮）

すべての研究は虎の門病院、東京大学、東京女子医科大学の倫理委員会の承認を得て行う。治療開発を前提とした研究であり、動物実験、臨床試験を行う予定のため、倫理委員会の指針、動物実験の対する指針、および研究に関与するあらゆる倫理指針を遵守する。動物の取り扱い、苦痛を伴うものは必ず全身麻酔下に行い、両眼が失われる可能性のある場合は片眼のみに処置を行う。

全ての実験において動物は [the Association for Research in Vision and Ophthalmology の規約](#)および、[実験動物の飼養及び保管等に関する基準（総理府）](#)に従って扱う。人を扱う研究では、[ヘルシンキ宣言（世界医師会総会 World Medical Assembly）](#)の勧告に従って行う。また遺伝子解析は[ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（文部科学省、厚生労働省、経済産業省）](#)を遵守する。具体的には以下のように行う。患者を対象とする臨床試験においては十分な説明をした後、文書による同意を得てから行う（[インフォームド・コンセント](#)）。

C . 研究結果 :

(1) 網膜分枝静脈閉塞症の眼内 PEDF が黄斑血流量と相関した。

(2) 網膜中心静脈閉塞症の眼内の sICAM-1、IL6、VEGF 1、MCP-1、PTX3 と黄斑浮腫程度が相関した。

(3) 網膜中心静脈閉塞症に対するトリアムシロンの注射により IL6 濃度が低下している症例程、黄斑浮腫が軽減した。

(4) トリアムシロン硝子体注射により網膜中心静脈閉塞症の網膜感度が上昇した。

(5) 黄斑部機能と網膜感度が通常の網膜静脈閉塞よりも黄斑型でより低下した。

(6) 硝子体サンプル中の CPG island 部位 21,693 遺伝子とプロモーター部位 16,735 遺伝子の全遺伝子のメチル化解析を行った結果、メチル化率は網膜症 + > > 網膜症 - であった。

(7) 全遺伝子のうち、メチル化率の高い遺伝子上位 5 種は血管新生/血管内皮増殖の転写因子と低酸素誘導性の転写因子であった。

(8) 眼内（前房水）中の抗老化遺伝子であるサーチュイン濃度は加齢黄斑変性のある患者では黄斑変性のない患者よりも低下していた。

C. 研究結果の続き

(9) 加齢黄斑変性患者の尿中乳酸塩濃度は基準値に対し平均 872.9%増加し、尿中ビルビン酸塩濃度は基準値に対し平均 223.9%増加していた。

(10) 加齢黄斑変性症ではミトコンドリア機能を反映する乳酸塩 / ビルビン酸塩比は基準値に対して 418.3%増加していた。

(11) メチル化抑制剤の動物眼への点眼により老化の指標となる白内障予防効果が得られた。

D. 考察:

(1) 眼内液のサイトカイン濃度の測定は網膜硝子体疾患の予後予測に役立つと考えられる。

(2) メチル化解析により眼内遺伝子のメチル化が網膜症の病態に関与していると考えられる。

(3) 血管維持に必要な転写因子のメチル化が、網膜血管障害発症に関与している可能性がある。

(4) 加齢黄斑変性患者で、解糖系と TCA サイクルの中間体であるビルビン酸の増加と、ビルビン酸の還元で産生する乳酸塩が尿中に増加しており、乳酸塩 / ビルビン酸塩比が高いことは解糖系における ATP 産生の低下が加齢に影響していると考えられる。

(5) メチル化抑制が眼加齢疾患予防に有用であると考えられる。

E. 結論

網膜血管閉塞性疾患において、抗炎症薬物投与により眼内炎症性サイトカインや血管新生促進因子を減らすというエビデンスが証明された。眼内の血管維持に必要な転写遺伝子のメチル化が網膜血管障害ならびに眼加齢に関与していると考えられた。また、エピソードエネティクス制御を目的とした、メチル化抑制剤（ヒストン脱アセチル化酵素）の点眼治療が眼加齢疾患の予防に有効である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表 2011年 - 2014年 3月英文発表 69編。

代表論文 5編を下記に記載する。

1. Mimura T, Noma H, Funatsu H. Epigenetic regulation of retinal stem cells. International Journal of Stem Cell Research and Transplantation (IJST) 2013;103:1-2.
2. Mimura T, Noma H, Funatsu H, Yamagami S. Next-generation sequencers: what can we learn? J Bioanal Biomed 2013;5(2):1-3
3. Mimura T, Kaji Y, Noma H, Funatsu H, Okamoto S. The role of SIRT1 in ocular aging. Exp Eye Res. 2013 Jul 26;116C:17-26.
4. Noma H, Mimura T. Aqueous soluble vascular endothelial growth factor receptor-2 in macular edema with branch retinal vein occlusion. Curr Eye Res. 2013 Aug 23.
5. Mimura T, Noma H, Funatsu H, Kondo A, Matsubara M. Retinal neuroprotective effect of Sirtuins. JSM Ophthalmol 2014;2(1):1016.

2. 学会発表・招待講演

国内発表 32回 海外発表 3回 今年度発表を以下に記載する。

1. 三村達哉、亀井裕子、五嶋摩理、近藤亜紀、松原正男、涙液中特異的 IgE 抗体価とアレルギー性結膜炎他覚的所見の関係、第 117 回日本眼科学会総会、東京 2013 年 4 月 4 日
2. 三村達哉、アレルギー性結膜炎と小麦アレルギーの関係、第 79 回東京女子医大 東医療センター眼科医局講演会 東京 2013 年 5 月 25 日
3. 齋藤勇祐、亀井裕子、三村達哉、五嶋摩理、松原正男、眼部帯状疱疹における角膜炎発症の関連因子、フォーサム 2013 第 50 回 日本眼感染症学会、大阪 2013 年 7 月 12 日
4. 五嶋摩理、近藤亜紀、亀井裕子、三村達哉、松原正男 涙点プラグ留置後 2 年で太鼓締めをきたした 1 例の臨床経過と組織学的検討、フォーサム 2013 第 2 回涙道涙液学会 大阪 2013 年 7 月 12 日
5. 三村達哉、PCR 法の臨床応用、角結膜疾患診療ナビ 学術講演会、東京 2013 年 10 月 2 日
6. 三村達哉、白内障を治そう! 荒川区医師会、東京 2013 年 10 月 5 日
7. 三村達哉、角膜内皮の老化と再生、第 80 回東京女子医大 東医療センター眼科医局講演会、東京 2013 年 10 月 12 日
8. 三村達哉、亀井裕子、五嶋摩理、松原正男、市瀬孝道、アレルギー性結膜炎患者数と大気中 PM2.5 の関係、第 67 回日本臨床眼科学会 横浜 2013 年 10 月 31 日
9. 深山杏里、三村達哉、五嶋摩理、亀井裕子、近藤亜紀、松原正男アレルギー性結膜炎患者におけるネコ特異的 IgG 第 67 回日本臨床眼科学会 横浜 2013 年 10 月 31 日
10. 横佐古加奈子、三村達哉、五嶋摩理、亀井裕子、松原正男、加齢黄斑変性における解糖系代謝、第 67 回日本臨床眼科学会 横浜 2013 年 10 月 31 日
11. 五嶋摩理、太刀川貴子、大熊博子、亀井裕子、三村達哉、近藤亜紀、松原正男、手術に至った視神経髄膜腫の小児例、第 67 回日本臨床眼科学会 横浜 2013 年 10 月 31 日
12. 上順子、三村達哉、中静隆之、岸本修一、佐藤新兵、竇一博、福原紀章、山田正三、森樹郎、下垂体腫瘍患者における網膜神経線維層の解析、第 67 回日本臨床眼科学会、横浜 2013 年 10 月 31 日
13. 近藤亜紀、三村達哉、松原正男、翼状片術後 50 年で角膜穿孔に至り、新鮮角膜輪部強膜移植にて治癒した一例 角膜カンファランス 2014 第 38 回日本角膜学会総会 第 30 回日本角膜移植学会、沖縄 2014 年 1 月 30 日
14. 三村達哉、アレルギー性結膜炎の診断法 ARABO Seminar、東京 2014 年 3 月 7 日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他・賞罰
平成 23 年 8 月 三村達哉:財団法人東京医学会 医学研究助成
平成 23 年 10 月 三村達哉:第 1 回ジョンソン・エンド・ジョンソン コンタクトレンズ リサーチ アワード
平成 24 年 4 月 三村達哉:第 17 回 ROHTO AWARD
平成 25 年 9 月 三村達哉:第 28 回基礎医学医療研究助成