

令和3年度 水俣病研究報告書

研究課題名：神経再生を誘導する末梢血単核球保護極性獲得の機序

報告者：

新潟大学脳研究所臨床神経科学部門脳神経内科学分野 金澤雅人

目的：

末梢血単核球は、低酸素低糖（OGD）刺激を与えることで、血管新生や神経軸索進展を誘導する VEGF が分泌されることを培養細胞系で示し、刺激細胞を投与することで脳梗塞に対する機能回復促進を誘導することを報告している^{1,2)}。しかし、この細胞の性質変換の機序はわかっていない。細胞の性質変換に細胞外に放出されるエクソソームが関与していることが近年注目されている。エクソソームにより細胞性質変換が生じると仮説し、臨床応用を目指しこれを検証することを目的とする。また、より直接的な神経機能回復を目指し、低分子化合物を用いて末梢血単核球が神経細胞に分化できるかも検討する。

方法：

1. 末梢血単核球からエクソソームを ExoQuick®試薬を用い、分離した。そのエクソソームの RNAseq 解析を行った。OGD 刺激前後で変化する miRNA の候補を決定し、その阻害配列を添加することで、培地中の VEGF 分泌量の変化を検証した。
2. 単核球から Dynabeads FlowComp Human CD14 Kit (Invitrogen)を用い単球を分離した。さらに、0.5 mM バルプロ酸 (Wako)を含む低分子化合物を培地に加え、2日間培養した。培養後、細胞から RNA を回収し、神経細胞と単球の発現している遺伝子を解析した。

結果：

1. 末梢血単核球から分泌されるエクソソーム

正常状態と OGD 状態の比較で、3倍以上に増加する miRNA として、miR-4491 と miR-4653 ($P < 0.001$)、0.1倍に減少する miRNA として、miR-12113 ($P < 0.001$)を見出した。ある miRNA 配列に対する阻害配列を作成し、培地に添加し、培地中の VEGF の ELISA を行った。阻害配列を添加した群は、対照配列を添加した群と比べて、VEGF 分泌は 30%増加した ($P < 0.05$)。

2. 低分子化合物を用いた末梢血の神経細胞への分化

末梢血単核球に含まれる T 細胞に低分子化合物を添加すると神経細胞に分化することが示されている³⁾。既報で用いられているバルプロ酸を含む低分子化合物を単核球に含まれる単球に添加することで、培養 3 日後には発現遺伝子群は単球のものから神経細胞のものに変化することを確認した (図 1)。

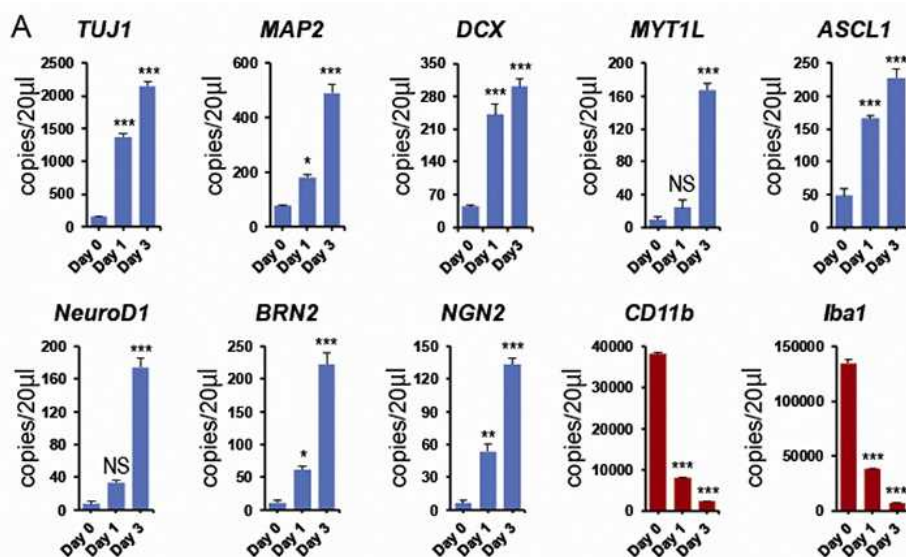


図 1 低分子化合物を添加後の遺伝子発現変化

(青バー：神経細胞で発現する遺伝子群、赤バー：単球で発現する遺伝子群)

考察とまとめ：

これまでに、OGD 刺激で組織末梢血単核球が保護的に作用する VEGF を分泌すること、細胞極性に関与するエクソソームを分離できていることを示していた。今回の検討で、エクソソームに含まれる miRNA が細胞の性質を変換することを証明した。これまで様々な細胞療法が神経疾患に対して治療効果を示すことの報告がされているが、その作用する機序の一つとして miRNA による細胞修飾を明らかにした。miRNA は静脈投与でも脳内に移行し、治療効果を示す可能性も報告されており⁴⁾、miRNA 自体も治療応用につながるかもしれない。

単核球の中の単球から神経細胞への分化も遺伝子マーカーレベルでは可能であることを示した。正常な機能を有する神経細胞への分化が可能となれば、水俣病の治療としても、障害神経細胞を再生させる可能性がある。

本研究の結果は、今後の水俣病の治療の開発に貢献するものと考えられる。

文献

- 1) Hatakeyama M, Kanazawa M, Ninomiya I, et al. A novel therapeutic approach using peripheral blood mononuclear cells preconditioned by oxygen-glucose deprivation. *Sci Rep* 2019; 9: 16819.
- 2) Hatakeyama M, Ninomiya I, Otsu Y, et al. Cell Therapies under Clinical Trials and Polarized Cell Therapies in Pre-Clinical Studies to Treat Ischemic Stroke and Neurological Diseases: A Literature Review. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 6194.
- 3) Tanabe K, Ang CE, Chanda S, et al. Transdifferentiation of human adult peripheral blood T cells into neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018; 115: 6470-6475.
- 4) Zhang ZG, Buller B, Chopp M. Exosomes - beyond stem cells for restorative therapy in stroke and neurological injury. *Nat Rev Neurol.* 2019; 15: 193-203.

水俣病、緑内障におけるコントラスト感度と視覚の質 (QOV) の関係

新潟大学大学院医歯学総合研究科眼科学分野

福地健郎

はじめに

水俣病や緑内障患者では、病期の進行により、コントラスト感度 (CS) の低下をきたす。本研究では QOV を評価する自己記入式アンケートを用いて患者の QOV とコントラスト感度の相関を明らかにすることを目的とする。

対象

新潟大学医歯学総合病院眼科通院中で、研究への同意が得られた水俣病または広義・原発開放隅角緑内障 (POAG) 患者 31 名 (男性 17 名、女性 14 名) を対象とした。平均年齢は 50.1 ± 8.14 歳であった。ハンフリー視野計、測定モード 24-2 (HFA24-2) の平均偏差 (MD) は症例全体で -10.9 ± 7.58 dB、10-2 (HFA10-2) の平均偏差 (MD) が -9.6 ± 8.63 dB であった。60 歳以上は白内障の影響を考慮して除外した。水俣病、緑内障以外の視力、視野に影響する可能性のある疾患を有する患者は除外した。

方法

CGT-2000 によりコントラスト感度の測定を行い、視覚に関連した健康関連 QOL を測定する尺度である National Eye Institute Visual Function Questionnaire-25 (NEI VFQ-25) を用いて自己記入式アンケートを実施した。アンケート結果をラッシュスコア化し、そのスコアと、コントラスト感度の相関を HFA24-2・HFA10-2 の平均偏差 (MD)、中心窩閾値の better eye (BE)、worse eye (WE) 別に検討した。統計にはスピアマンの順位相関係数の検定を用いた。

結果

図 1 に HFA24-2、図 2 に HFA10-2 の重症度別のコントラスト感度を示す。明所条件、薄暮条件ともに病期の進行によりコントラスト感度の低下が認められた。表 1 にコントラスト感度とラッシュスコアの相関を示す。ラッシュスコアは、BE と比較して WE との相関が強かった。HFA24-2、中心窩閾値と比較し、HFA10-2 の WE で特に相関が強く認められた。測定環境は、薄暮条件下でコントラスト感度とラッシュスコアの相関が強く認められた。

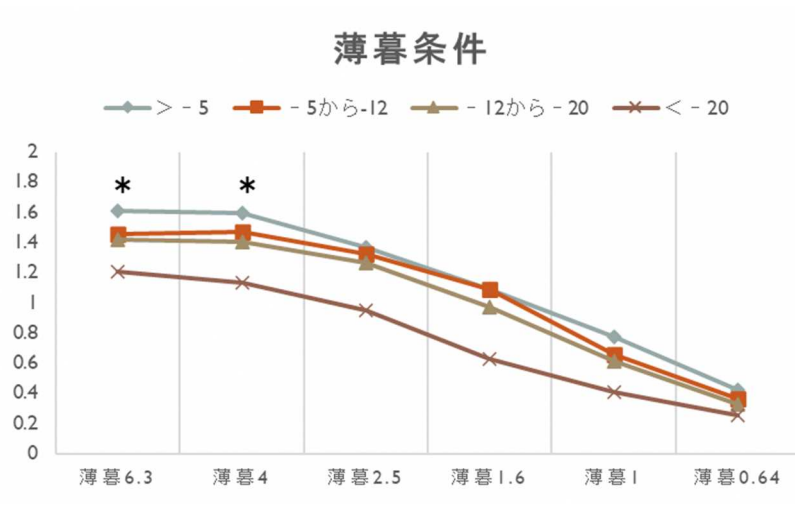
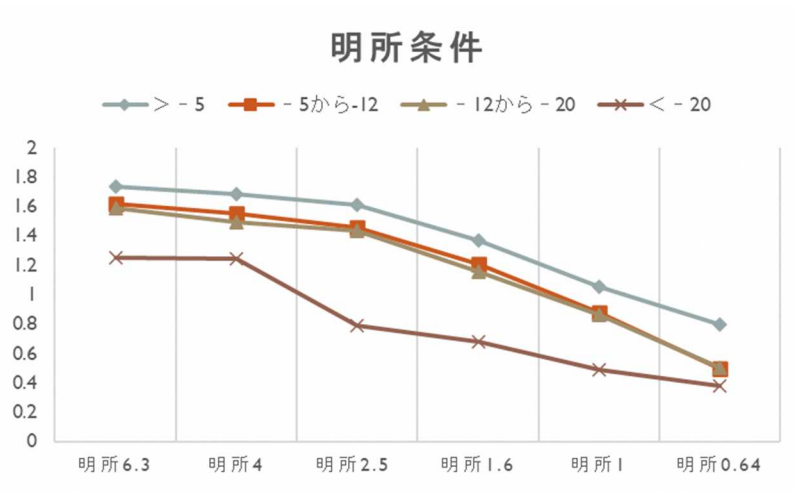


図1 HFA24-2の重症度別のコントラスト感度

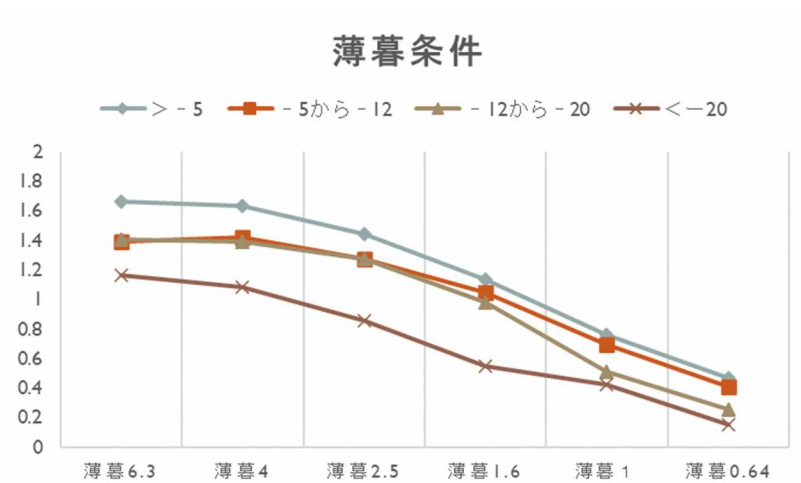
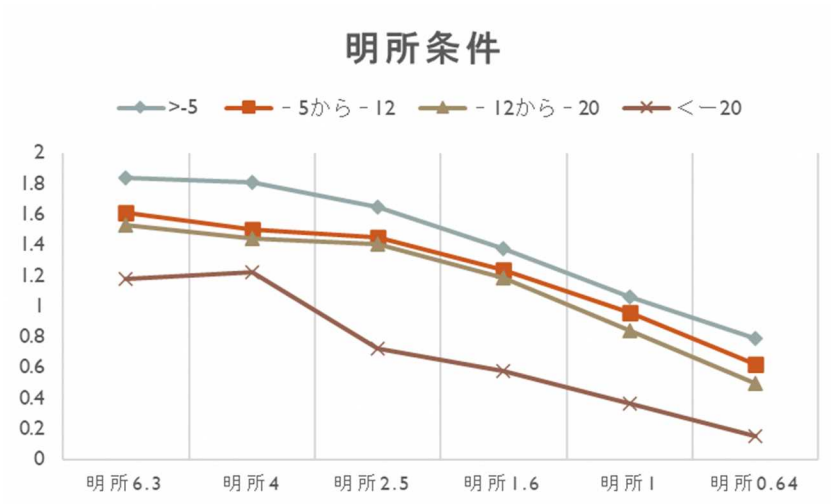


図2 HFA10-2の重症度別のコントラスト感度

	Visual angle	Better eye				Worse eye				
		Photopic		Mesopic		Photopic		Mesopic		
		R	p=	R	p=	R	p=	R	p=	
HFA24-2 MD value	CS	6.3	-0.249	0.177	-0.171	0.349	-0.382	0.036	-0.380	0.037
		4	-0.222	0.224	-0.198	0.278	-0.432	0.018	-0.427	0.019
		2.5	-0.006	0.974	-0.138	0.449	-0.350	0.056	-0.307	0.009
		1.6	0.058	0.752	0.007	0.969	-0.297	0.104	-0.334	0.007
		1	0.071	0.699	0.011	0.951	-0.288	0.115	-0.284	0.119
	0.64	0.084	0.645	0.0002	0.999	-0.236	0.197	-0.304	0.009	
HFA10-2 MD value	CS	6.3	-0.186	0.308	-0.120	0.513	-0.455	0.013	-0.436	0.017
		4	-0.202	0.268	-0.114	0.532	-0.423	0.002	-0.472	0.009
		2.5	-0.008	0.963	0.023	0.898	-0.351	0.055	-0.402	0.027
		1.6	0.066	0.717	0.155	0.396	-0.306	0.093	-0.466	0.011
		1	0.117	0.521	0.082	0.652	-0.332	0.069	-0.352	0.054
	0.64	0.122	0.505	0.105	0.563	-0.247	0.176	-0.403	0.027	
Fovea sensitivity threshold	CS	6.3	-0.193	0.298	-0.247	0.181	-0.453	0.011	-0.316	0.083
		4	-0.274	0.136	-0.209	0.260	-0.368	0.042	-0.400	0.026
		2.5	-0.127	0.496	-0.032	0.864	-0.240	0.193	-0.341	0.060
		1.6	-0.037	0.842	0.103	0.581	-0.202	0.276	-0.384	0.033
		1	0.030	0.872	0.004	0.985	-0.251	0.174	-0.278	0.129
	0.64	0.020	0.916	0.024	0.900	-0.174	0.350	-0.346	0.056	

表1 コントラスト感度とラッシュスコアの相関

考察

緑内障、水俣病患者において、コントラスト感度と QOV の相関を認めた。Waisbourd ら¹⁾ はコントラスト感度は HFA24-2 よりも中心視野である HFA10-2 の方が VFQ-25 との相関が強く認められたと報告している。本研究と同様の結果であるが、測定環境により結果に違いが出ており、更なる検討が必要と考えられる。VFQ-25 は、特に WE のコントラスト感度、MD 値との相関が強く認められたが、BE との相関が強いとの報告もあり^{2) 3)}、症例選択によるバイアスがかかりやすいものと考えられた。本研究からは WE のコントラスト感度の低下は VFQ-25 との相関があり、治療の強化を検討する際に有用な検査である可能性が示唆された。

本研究内容は第 125 回日本眼科学会総会の一般公演で発表した。

国内学会への参加、発表に加え、海外学会にもオンラインで参加し、本研究内容を発展させるべく、情報の収集を行っている。今後、症例数を増やして検討を行い、さらに研究を進めていきたい。

参考文献

- 1) Michael Waisbourd, Carina T. Sanvicente, Haley M.coleman et al. Vision-related Performance and Quality of Life of Patients With Rapid Glaucoma Progression
- 2) Feyzahan Ekici , Rebecca Loh , Michael Waisbourd et al . Relationships Between Measures of the Ability to Perform Vision-related Activities, Vision-Related Quality of Life,and Clinical Findings in Patients With Glaucoma
- 3) Li Yang , Xuefeng Shi , Xin Tang :Associations of subjective and objective clinical outcomes of visual functions with quality of life in Chinese glaucoma patients: a cross-sectional study

令和3年度水俣病研究事業

研究者 堀井 新（新潟大学大学院医歯学総合研究科耳鼻咽喉科頭頸部外科学分野教授）

研究協力者 高橋 邦行（新潟大学大学院医歯学総合研究科耳鼻咽喉科分野准教授）

研究要旨

聴覚伝導路を用いた感覚代行システムの開発と平衡リハビリトレーニングプログラムの作成

A) 研究目的：

感覚代行とは、最新の医工連携技術により、失われた感覚機能を他の残された感覚受容体や感覚伝達系で代替する画期的な技術である。主に視覚系や聴覚系で進められ、視覚障害者では視覚の役割を健常な触覚や聴覚で代行させている。慢性めまい疾患に対する現在の治療には限界がある。われわれは、ジャイロセンサー、ヘッドホン音響システムを用いた感覚代行システム機器を実用化し、新たな平衡リハビリテーションプログラムを構築したい。

B) 研究方法：

聴覚伝導路を利用した感覚代行技術に注目し、平衡機能患者にジャイロセンサーを組み込んだステレオヘッドホンを装着し、ジャイロセンサーでとらえた平衡感覚をヘッドホンから左右方向のピッチとボリュームの程度で聴覚情報として入力し、それに合わせて体平衡を維持するトレーニングの有効性を検討する。

C) 研究結果

長岡技術科学大学工学部助教、和田森 直先生と医工連携を図り、デバイス開発やリハビリメニュー、治療評価について、具体的な共同研究の役割として、和田森先生が感覚代行システムと新規平衡状態評価のデバイス、患者の治療コンプライアンス向上目的にスマートフォンアプリ「iめまい日記」の開発を行い、当科では適応症例の選定、リハビリ指導、感覚代行デバイスの性能や感覚代行リハビリの治療評価を行う。

今年度は試作機を用いて、頭部偏位が少ないときは無音、大きくなると傾きに応じて音が出るように設定して、被検者は音に反応して頭部偏位を戻して無音領域を保つように平衡

維持させて、同時に重心動揺計の計測を行った。めまい症状のない健常者6名に対して、無音領域 3° 、 1.5° の違いによる、重心動揺計のラバーロンベルグ率、閉眼ラバー比を比較検討した。ラバーロンベルグ率、閉眼ラバー比ともに 3° 、 1.5° の間に有意差を認めなかったが、無音領域を狭くして聴覚刺激がより多くなると、視覚依存性、体性感覚依存性が減少する傾向にあった。

現在、デバイスのブラッシュアップを図り、同時に適応症例を選定しながら治療前の平衡状態を評価する準備を進めている。

D) 考察・まとめ

本研究により、これまで難治とされてきた慢性めまいに対する新規治療開発の礎となるとともに、慢性めまいのメカニズム解明に寄与し、水俣病あるいは水俣病の鑑別診断や治療に資する知見に繋がり、高齢化の進む水俣病患者の健康対策に資すると考えている。

令和3年度水俣病研究事業

研究者 堀井 新（新潟大学大学院医歯学総合研究科耳鼻咽喉科頭頸部外科学分野教授）

研究協力者 高橋 邦行（新潟大学大学院医歯学総合研究科耳鼻咽喉科分野准教授）

研究要旨②

慢性めまい診断における自覚的垂直位検査の意義

A) 研究目的：

メチル水銀中毒による平衡障害は慢性のふらつきを訴える。一般に3か月以上めまい、ふらつきを訴える慢性めまいでは、有意な検査結果が得られないことが多く、診断が困難である。重力感受性検査である頭部傾斜自覚的視性垂直位検査(HT-SVV検査)は、慢性めまい診断を容易にする可能性があり、その有用性について検討する。

B) 研究方法：

当科通院中の慢性めまい患者に対して、外来受診時にHT-SVV検査を行う。得られた結果について、疾患ごとに数値をまとめ、鑑別診断を行うにあたっての検査の有用性を示すROC曲線及び検査の感度・特異度を算出する。他覚的に診断が可能な頭部傾斜自覚的視性垂直位検査により、慢性的なふらつきを訴える水俣病の診断に際して、より簡便に他疾患を除外できようになると考えられる。

C) 研究結果

当科を受診した持続性知覚性姿勢誘発めまい(PPPD)患者75名、一側前庭機能障害後代償不全21名、心因性めまい37名に対して、HT-SVV検査を行った。3疾患中PPPDにおいて、重力感受性の指標である頭部傾斜感覚ゲイン(HTPG)が有意に高値であった。HTPG値を用いて、PPPDとその他の慢性めまい疾患とを鑑別するためのROC曲線を作成したところ、鑑別の性能を示す曲線下面積は0.764と中程度の有用性を示した。また、HTPG値1.202をカットオフ値とした場合、感度は44.3%と低い値であったが、特異度は95.2%と非常に高い値を示し、PPPDを特異的に診断するツールとして有用であることが示された。

D) 考察・まとめ

いままで検査所見が少なく、適切な診断ひいては治療を行うことが難しかった慢性めまい疾患において、他覚的な評価が可能な検査ツールが見出された。今後はさらに症例を蓄積し、その他のめまい疾患についても検討を重ねていく。今回、慢性めまいの代表疾患である

PPPD、前庭代償不全、心因性めまいを他覚的に診断することによって、慢性めまいをより的確に診断することが可能となった。正確な診断により、疾患ごとに適切な治療戦略を構築する手がかりとなりうる。鑑別診断として重要なこれらの診断を容易に診断できるようになり、水俣病健診にとって有用な知見が得られた。