

令和4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のエクソソーム

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：

末梢血単核球に、低酸素低糖（OGD）刺激すると、血管新生や神経軸索進展を誘導する VEGF が分泌されることやエクソソームが放出されることを培養細胞系で示している。さらに、この OGD 刺激末梢血単核球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。OGD 刺激による末梢血単核球の性質変換にエクソソームが介在すると仮説し、臨床応用を目指しこれを検証することを目的とした。

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 の候補を決定した。
2. 候補となる miRNA のアンチセンスオリゴを作成し、阻害実験で、VEGF 分泌量を変化させる転写因子 hypoxia-inducible factor 1alpha(HIF-1 α)の発現をウエスタンブロットティングで検証した。
3. 細胞培養培地中の VEGF タンパク発現量をヒト Cytokine Premixed Kit A (funakoshi FCSTM03-06) を使用し、Luminex® 100/200™ システムを用いて測定した。

結果：

1. 末梢血単核球から分泌されるエクソソーム

OGD 刺激, 非刺激細胞由来のエクソソームから, 200bp 以下の RNA を濃縮し, ヒト由来 miRNA を 2632 個検出可能な 3D-Gene® Human miRNA Oligo chip 25k ver2.2.0 (Toray Industries, Inc.)にて定量した。両者の比較では, OGD 刺激下で 7.0%が有意に増加, 7.4%が有意に減少していた。

2. HIF-1 α 発現を変化せる miRNA

HIF-1 α 、VEGF の発現増加に関わるとして単離されている miRNA に注目し³⁾, その挙動を検討した。その結果, 唯一 miR-X の低下低下に有意差を認めた。

3. miR-X のアンチセンスオリゴによる HIF-1 α 発現と VEGF 分泌

アンチセンスオリゴの添加で、HIF-1 α 発現をウエスタンブロッティングで検証したところ、有意な発現上昇を認めた。さらに、培地中の VEGF 分泌は 30% 増加した (P<0.05)。

考察とまとめ :

これまでに、OGD 刺激で末梢血単核球が組織保護的に作用する 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 が転写因子 HIF-1 α 発現を調節し、細胞の性質を変換することを証明した。

細胞療法が神経疾患に対して治療効果を示すことが報告されている。今回、その作用する機序の一つとして miRNA による HIF-1 α 介在性細胞修飾の可能性を明らかにした。HIF-1 α は、海馬における Wnt/カテニン経路を介した神経幹細胞の維持増殖、分化に関与することが報告されている⁴⁾。今回、直接の神経細胞に及ぼす影響は検討できていないが、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) Dong P, Li Q, Han H. HIF-1 α in cerebral ischemia (Review). Mol Med Rep. 2022; 25: 41.
- 4) Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. Cell. 2012; 148: 399-408.

水俣病、緑内障における各種角膜パラメータの視機能に与える影響の検討

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、病期の進行により視野障害の悪化を生じる。中心角膜厚および角膜ヒステレシスを含めた角膜パラメータは緑内障の危険因子として知られるが、同一患者における角膜パラメータの左右眼の差がどのように緑内障重症度に関連しているのかは不明な点が多い¹⁻³。本研究では同一患者における角膜パラメータの左右眼の差と視野障害の左右眼の差との関係性を検討した。

対象と方法

新潟大学医歯学総合病院眼科通院中で、Ocular Response Analyzer (ORA; Reichert, Inc., Depew, NY, USA)による角膜パラメータを取得できた水俣病または広義・原発開放隅角緑内障 (POAG) 患者を対象とした。角膜パラメータとして角膜ヒステレシス (CH)、中心角膜厚 (CCT)、角膜抵抗因子 (CRF)、角膜代償眼圧 (IOP_{cc}) を取得し、視野障害の指標としてハンフリー視野計 24-2 の平均偏差 (MD) を用いた。同一患者における左右眼の差として DIF_{RL} (右眼-左眼) と DIF_{CH} (CH の大きい眼-CH の小さい眼) を使用した。

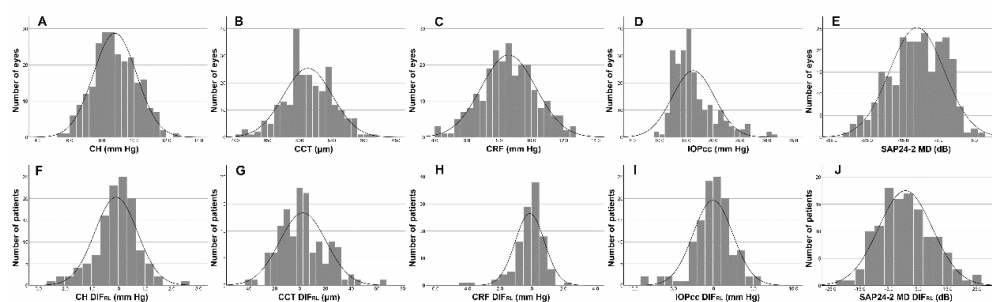
$$DIF_{RL} = Value (right eye) - Value (left eye)$$

$$DIF_{CH} = Value (eye with higher CH) - Value (eye with lower CH)$$

結果

対象は 121 名 (男性 70 名、女性 51 名) で平均年齢は 60.1 ± 11.6 歳であった。平均 CH は 8.81 ± 1.34 mmHg、CCT は 512.9 ± 38.0 μ m、CRF は 8.59 ± 1.70 mmHg、IOP_{cc} は 16.4 ± 3.9 mmHg であり、ハンフリー視野 24-2 MD 値は -11.12 ± 7.64 dB であった (図 1)。

図 1 各パラメータの分布



HFA24-2 MD の重症度に有意に相関したのは、高い年齢($P<0.001$)、低い CH ($P=0.001$)、低い CRF ($P=0.007$)であった。HFA24-2 MD の左右差 (DIF_{RL}) と有意に相関したのは、眼軸長の DIF_{RL}($P=0.003$)、IOP_{cc} の DIF_{RL} ($P=0.028$)、CH の DIF_{RL} ($P=0.001$)であった。

CH の左右差に注目し、CH の DIF_{CH} の中央値を基準に CH の左右差が小さい群(small CH DIF_{CH})と大きい群(large CH DIF_{CH})に分けて比較を行った(表 1)。CRF、IOP_{cc}、CCT、24-2 MD、10-2 MD における DIF_{CH} は両群間で有意な差を認めた。このことから左右眼で CH の差が大きい症例では、CH の低いほうの眼で CRF と CCT が小さく、IOP_{cc} が大きく、視野障害が重症である傾向が明らかとなった。

表 1 CH の左右差の大きさによる比較

	Small CH DIF _{CH} (≤median) (N=61)	Large CH DIF _{CH} (>median) (N=60)	
	Median (25 th percentile, 75 th percentile)	Median (25 th percentile, 75 th percentile)	<i>P value*</i>
Age (yrs)	62 (51, 66)	63 (54,68)	0.20
Sex (male/female)	36/25	34/26	0.79
CH DIF _{CH} (mmHg)	0.19 (0.06, 0.30)	0.78 (0.59, 1.21)	-
CRF DIF _{CH} (mmHg)	0.18 (-0.14, 0.47)	0.54 (0.19, 1.09)	<0.001
GAT DIF _{CH} (mmHg)	0 (0, 1)	0 (-1, 0)	0.075
IOP _{cc} DIF _{CH} (mmHg)	-0.18 (-1.04, 0.69)	-1.53 (-3.14, -0.55)	<0.001
Axial length DIF _{CH} (mm)	0.00 (-0.16, 0.14)	0.01 (-0.12, 0.12)	0.86
CCT DIF _{CH} (μm)	0.0 (-10.0, 6.0)	8.5 (-5.0, 22.5)	0.004
SAP 24-2MD DIF _{CH} (dB)	-0.46 (-7.65, 3.74)	4.77 (-0.08, 9.56)	<0.001
SAP 10-2MD DIF _{CH} (dB)	-2.64 (-6.64, 3.31)	3.15 (-3.14, 8.57)	0.010

結論

本研究から、同一患者の左右眼における CH の違いが緑内障重症度の左右差と深く関係していることが示唆された。重症度に左右差を認める緑内障患者において、CH は注目すべきパラメータの一つである。水俣病患者における CH の左右差と重症度の関連性については、症例数の問題から今回十分な検討はできなかった。CH の左右差が大きい緑内障患者では、CH が小さい眼はより積極的な治療介入が望ましい可能性がある。

参考文献

- 1) Leske MC, Heijl A, Hyman L, Bengtsson B, Dong L, Yang Z. Predictors of long-term progression in the early manifest glaucoma trial. *Ophthalmology*. 2007;114: 1965-

1972.

- 2) Kim JW, Chen PP. Central corneal pachymetry and visual field progression in patients with open-angle glaucoma. *Ophthalmology*. 2004;111: 2126-2132.
- 3) Medeiros FA, Meira-Freitas D, Lisboa R, Kuang TM, Zangwill LM, Weinreb RN. Corneal hysteresis as a risk factor for glaucoma progression: a prospective longitudinal study. *Ophthalmology*. 2013;120: 1533-1540.

令和4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。慢性めまい疾患に対する現在の治療には限界があり、われわれは、聴覚刺激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と考えている。

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継続している。

昨年度まで9軸加速度センサーを用いた自作機を試作していたが、bluetooth接続や患者さんにとってより使いやすいインターフェースを目指して、角速度センサーを内蔵した市販のワイヤレスイヤホン(airpods pro (apple))を用いたシステムに変更した。

この新しいシステムを用いて、めまい症状のない健常者11名に対して、音刺激なし、無音領域 2° 、 1.5° 、 1.0° 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、外周面積を比較検討して、前年度までと同様の実験を行った。ラバーロンベルグ率、閉眼ラバー比ともに感覚代行の有無、無音領域の角度閾値の相違による視覚依存性、体性感覚依存性に有意差を認めなかった。

D) 考察・まとめ

健常者では、感覚代行の有無により視覚、体性感覚の依存性に変化を認めなかった。通常

の重心動揺検査（開眼固視、閉眼）では、感覚代行の有無により視覚依存性、体性感覚依存性、外周面積に有意差を認めなかったが、感覚代行の効果、体平衡ストラテジーの状態を評価するために、静的平衡機能の新たな指標が必要と考え、視覚刺激により静的平衡維持が難しい状態で評価することことを検討している。

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4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視線追跡検査の意義

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か月以上ふらつきが持続する慢性めまいに対しては、他覚的な検査の種類がまだ限られており、不十分である。視線の動きを捉える視線追跡検査は、視線の動揺を定量化することでめまい症状の他覚化を実現できる可能性があり、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、外来受診時に視線追跡検査を行う。具体的には、めまい症状を誘発する動画を視覚刺激として提示し、その前後で視線追跡検査を施行する。検査前後に、めまい症状の程度を評価する自記式問診票を記載してもらい、視線追跡結果とめまい症状の程度との関係性を評価する。

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 27 名、一側前庭機能障害後代償不全 12 名、および対照群として健常者 14 名に対して、視線追跡検査を行った。PPPDにおいて、視覚刺激前と比較し刺激後にめまい症状の増悪がみられると共に、視線の動揺も有意に刺激後で大きくなった。視覚刺激によるめまい症状の増悪を認めなかった一側前庭機能障害後代償不全群および健常群では、刺激前後で視線の動揺に有意な変化はみられなかった。めまい症状が強くなるほど、視線の動揺は大きくなる傾向がみられ、本検査がめまい症状を他覚的に評価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

めまいは自己内部の平衡感覚に基づく症状であり、これまで症状を他覚化する方法が少なく、重症度の評価を数値化して行うことが難しかった。今回、慢性めまいの代表疾患である PPPD、一側前庭機能障害後代償不全に対して視線追跡検査を行うことで、めまいの程度を他覚的に評価することが可能となった。これは、めまい症状の正確な重症度評価につながり、

水俣病患者においてもその症状を把握するための有用なツールになり得るため、水俣病健診において有用な知見が得られるものとする。