

令和5年度 水俣病研究報告書

研究課題名：末梢血単核球を用いた脳内神経再生

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：

末梢血単核球を低酸素低糖（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。また、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（OGD-PBMC）を脳梗塞ラットに投与すると運動感覚機能が回復することを報告している^{1,2)}。しかし、この細胞が脳内の神経細胞再生にどのように作用するかの機序はわかっていない。臨床応用を目指し OGD-PBMC が、どのように作用するかを明らかにすることを目的とした。

方法：

1. 塞栓系による脳梗塞ラットを作成した。さらに、脳梗塞 7 日後に頸動脈から OGD-PBMC を投与した。投与 3 日後（脳梗塞 10 日後）と 21 日後（脳梗塞 28 日後）に、4%パラホルムアルデヒドにて再灌流したのち脳サンプルを取得した。パラフィンブロックを作成し、抗 VEGF 抗体と各種細胞マーカーの免疫組織学的染色による蛍光二重染色を行った。
2. OGD-PBMC 投与で VEGF 発現が変化した細胞の初代培養を行った。OGD-PBMC と初代細胞の共培養を行い、初代培養で VEGF が発現するかを検証した。VEGF が増加した際には、培地中のエクソソーム中の miRNA を RNA-sequencing 解析にて検討した。
3. VEGF の系に作用する候補となる miRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを添加して、VEGF 発現が変化することをウエスタンブロットで検討した。

結果：

1. OGD-PBMC 投与で脳内ミクログリアの VEGF 発現が増加する
脳梗塞ラットに OGD-PBMC 投与すると、VEGF が脳内で発現が増加することを示していた¹⁾。どの細胞で VEGF を発現が増加するかを示すため、抗 TMEM119

抗体で染色した。TMEM119 はミクログリアは発現するが、単球-マクロファージ、PBMC には発現していないマーカーである。つまり、投与した細胞ではなく、内在性ミクログリアを標識する。VEGF 陽性ミクログリアは OGD-PBMC 投与 3 日後は、通常培養の PBMC 投与群と OGD-PBMC 投与群で変わりなく、増加していなかった。しかし、投与 21 日後は、OGD-PBMC 投与群で約 4 倍増加した ($P < 0.05$)。一方、血管内皮細胞やアストロサイトでは明らかな変化を認めなかった。

2. OGD-PBMC とミクログリアの共培養

通常状態では、ミクログリアは VEGF の発現を認めなかった。しかし、OGD-PBMC と共培養すると 18 時間後、ウエスタンブロットで VEGF が明らかに発現していた。

OGD-PBMC と通常培養 PBMC のエクソソームから、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。その後、HIF-1 α 、VEGF の発現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、OGD-PBMC 投与群と通常培養 PBMC 投与群の比較で、唯一 miR-155-5p 低下に有意差を認めた。

3. miR-155-5p 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、脳梗塞ラットに投与することで血管新生や神経軸索進展を誘導すること、さらに運動感覚機能を回復させることを報告してきた^{1,2)}。しかし、この細胞が脳内の神経細胞再生にどのように作用するかの機序はわかっていなかった。

今回、脳梗塞後脳内ミクログリアで VEGF 発現が増加することを明らかにした。さらに、OGD-PBMC とミクログリアの共培養にて、脳内の現象を再現することに成功し、その VEGF 誘導に miR-155-5p が作用することを示した。

虚血後、HIF-1 α が発現し、VEGFが誘導されることが示されている。しかし、HIF-1 α 増加は一過性で、速やかに分解される^{3,4)}。その発現をmiR-155-5pがネガティブフィードバックで抑えることが示されていた⁵⁾。OGD-PBMC自体からVEGFが分泌され、さらにパラクライン作用でミクログリアや単球/マクロファージからVEGFが分泌される系もある⁶⁾。しかし、通常のPBMCはmiR-155-5pが多く、通常はHIF-1 α /VEGFの系は抑制されてしまう。今回の結果から、OGD-PBMCからミクログリアに情報が伝達され、それによりHIF-1 α -VEGFの系がミクログリアで継続することが、OGD-PBMC療法の作用機序の一つと考えた⁷⁾。

今回の研究は、OGD-PBMC由来のエクソソームがミクログリアに作用して、作用する可能性を支持する。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り、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.

- 5) Bruning U, Cerone L, Neufeld Z, et al. MicroRNA-155 promotes resolution of hypoxia-inducible factor 1alpha activity during prolonged hypoxia. *Mol Cell Biol.* 2011; 31: 4087-4096.
- 6) Kloepper J, Riedemann L, Amoozgar Z, et al. Ang-2/VEGF bispecific antibody reprograms macrophages and resident microglia to anti-tumor phenotype and prolongs glioblastoma survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016; 113: 4476-4481.
- 7) Otsu Y, Hatakeyama M, Kanayama T, et al. Oxygen-Glucose Deprived Peripheral Blood Mononuclear Cells Protect Against Ischemic Stroke. *Neurotherapeutics.* 2023; 20: 1369-1387.

AIによる水俣病、緑内障患者の quality of vision(QOV)スコア予測モデルの検討

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>

2020年に新潟大学に医学部メディカル AI センターが設立されたことを機に、視覚の質 (quality of vision : QOV) と人工知能 (artificial intelligence : AI) に関する共同研究を行っている。QOVをどのように評価するかに関しては、様々な試みがあるが、いまだに明確な方法はなく日常診療に使える情報としては普及していないのが現状である。

<目的>

本研究では臨床データ (視野や視力等) から NEI VFQ-25 (The 25-item National Eye Institute Visual Function Questionnaire) アンケートを用いた QOV スコアの予測モデルを構築し、最適な予測方法、予測精度を高める視野や視力といった臨床データの組み合わせを検討する。これまでの評価対象であった視野や視力以外の QOV という観点から患者の状態を評価できる方法を考案する。

<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・POAG患者210名 (男性108名、女性102名) を対象とした。平均年齢は 59.1 ± 11.5 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 better eye が -8.7 ± 7.2 dB、worse eye が -15.3 ± 7.4 dB、10-2 の MD は better eye が -7.4 ± 6.6 、worse eye が -14.9 ± 8.2 dB であった。眼軸が 28mm を超えるような強度近視や緑内障以外の視力、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>

予測に使用したデータは HFA24-2 及び 10-2 の実測感度、パターン偏差、トータル偏差、片眼データとして MD、パターン標準偏差 (PSD)、visual field index (VFI)、中心窩閾値、視力、球面度数、円柱度数、等価球面度数、眼軸、角膜厚、両眼データとして better eye/worse eye で分けた MD・VFI・視力・中心窩閾値、両眼重ね合わせ視野、臨床データとして性別・年齢・病型である。予測をする際には実測感度、パターン偏差、トータル偏差のいずれかを用い、さらに片眼データか両眼データのいずれかを用いて、臨床データを含むかどうかという組み合わせで検討した (図1)。モデリングには線形重回帰分析法、線形回帰に基づく次元減少法、次元圧縮法の7種類の方法を用いて検討した (図2)。

	実測感度	TD	PD	1 side・2 sides	臨床データ
1.sens	○				
2.sens_1side 2.sens_2sides	○			○	
3.sens_1side_clin 3.sens_2sides_clin	○			○	○
4.td		○			
5.td_1side 5.td_2sides		○		○	
6.td_1side_clin 6.td_2sides_clin		○		○	○
7.pd			○		
8.pd_1side 8.pd_2sides			○	○	
9.pd_1side_clin 9.pd_2sides_clin			○	○	○
10.1side 10.2sides				○	
11.1side_clin 11.2sides_clin				○	○

図1 説明変数の構成

Linear model selection & regulation分類	モデリング方法
Multiple Linear Model 線形重回帰のsubset selection法	ステップワイズ法で目的変数と関係する最適な説明変数の組合せを探す
	クラシック方法
Shrinkage method 線形回帰に基づく次元減少法	LASSO (Least Absolute Shrinkage and Selection Operator)
	RR (Ridge Regression)
Dimension reduction method 次元圧縮法	PCR (Principle Components analysis + MLR)
	PLSR (Partial Least Squares Regression)

図2 モデリング方法



図3

どのモデリング方法と説明変数の組み合わせが良いかということで図3のように複数の組み合わせで検討を行った。HFA24-2と10-2どちらのモードを用いるか、片眼のみか両眼

のデータを用いるか、先述の 11 通りの説明変数の組み合わせごとにそれぞれの予測手法の比較を行った。どの予測手法が優れているかを評価する指標として、適合性は決定係数、予測精度は AIC（赤池情報量基準）を用いた。

次に予測指標（アンケートの 12 の下位尺度、ラッシュスコア）を連続値から 2 値化した。Endpoint の 2 値化の基準は各 endpoint の中央値とした。Random forest 法という AI のアルゴリズムを用いて、中央値より「良い」か「悪い」かを予測する方法でも検討を行った。説明変数の組み合わせやモデリングの組み合わせは前出と同様のものを用いた。予測の精度を正答率（Accuracy）と AUC（Area Under the Curve）を用いて評価した。

<結果>

HFA24-2 の両眼データを用いたラッシュスコア予測において、どのモデルが優れているかを検討した結果を図 4 に示す。線形重回帰分析法（赤枠）では決定係数が 0.6-0.7 と比較的高い値を示しており、特にパターン偏差を用いた際に最も決定係数が高い結果であった。赤池情報量基準による評価の結果を図 5 に示す。パターン偏差を用いた際に予測精度が高くなるという結果であった。同様に HFA24-2 の両眼データ、実測閾値を用いた場合の結果を図 6 に示す。正答率は 0.42~0.94 と幅があり、予測指標により予測精度が大きく異なっていた。アンケート予測としては赤線で示した 0.7 くらいの値が出ているので、まずまずの予測精度と考えられた。

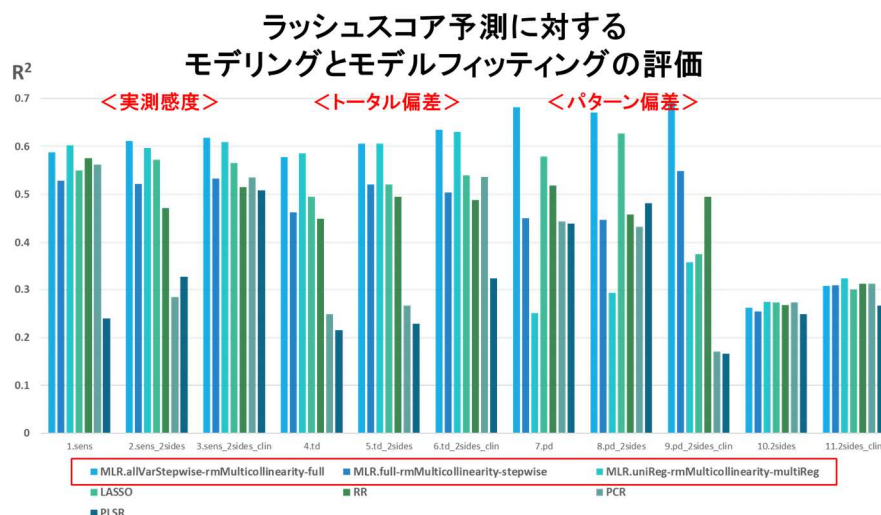


図 4

ラッシュスコア予測に対する モデリングとモデルフィッティングの評価

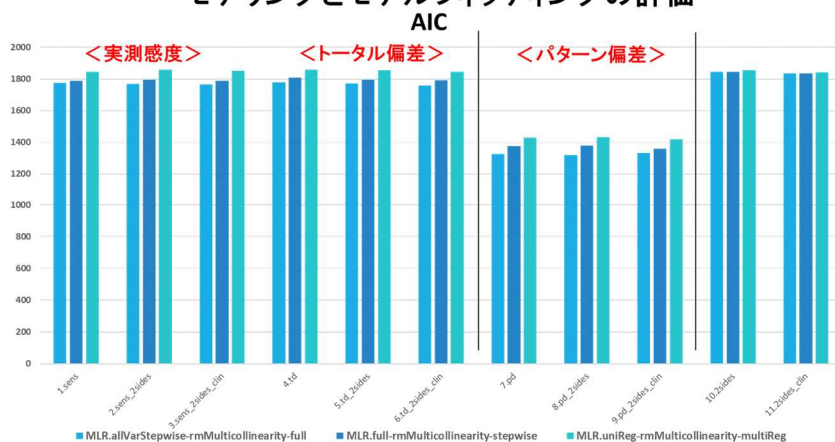


図 5

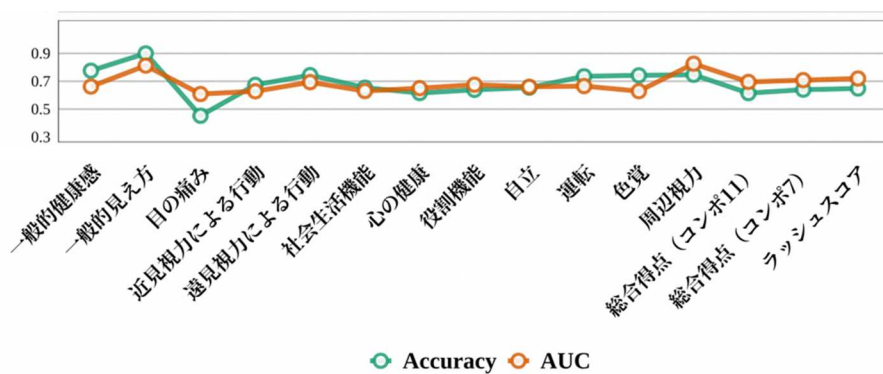


図 6

<考察と今後の課題>

当初の方法ではラッシュスコアの予測はある程度可能だが、下位尺度の予測となると精度がかなり落ちる結果であった。そこで予測するスコアの中央値を用いて 2 値化し、ランダムフォレスト法を用いて予測を行うことによって下位尺度においても 7 割近い正答率が得られた。予測モデルを用いた場合、どのような症例では一致しやすいのか、不一致となりやすいのかそれぞれの特徴を検討するのが今後の課題である。より研究を発展させ、これらが経過観察に使える指標、データの 1 つとなれば、水俣病、緑内障治療の一助となる可能性がある。

令和 5 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開発と平衡リハビリトレーニングプログラムの構築

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。聴覚伝導路を用いた感覚代行システムとは、体平衡センサーで得られた平衡情報をヘッドホンやイヤホンから音情報として出力し、前庭機能低下した患者に平衡情報を前庭神経以外の経路で伝達するシステムである。慢性めまい疾患に対する現在の薬物、リハビリ治療には限界があり、われわれは感覚代行システム機器を実用化し、それを用いた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：

まず、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、聴覚伝導路を利用した感覚代行機器、また新たな平衡機能検査機器、めまい管理アプリなどの開発を行う。システムの開発後、当科で正常ボランティア、PPPD など慢性めまい疾患患者を対象に、感覚代行装置の装着の有無、感覚代行機器を用いたリハビリテーション治療の有無による平衡機能検査所見、めまいの自覚症状に対する治療効果を比較検討する。

C) 研究結果

フォースプレートを用いて、動的平衡を構成する平衡維持の入力、出力、剛性を分離して解析することが可能となった。正常 25 例、当科で PPPD と診断された患者 21 例を対象に比較したところ、PPPD は正常に比べ、前後方向では COM 変位の相違を認めず、COM 加速度、Grad は有意に高く、左右方向では COM 変位、加速度ともに大きく、Grad は有意差を認めなかった。PPPD の感覚代行前後で、前後左右ともに COM 変位、加速度、Grad に有意差を認めなかった。

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 5 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

慢性めまい患者における姿勢制御機構の解明

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患者は、立位時の重心動揺面積が大きいことが知られているが、具体的にどのような姿勢制御機構が働いているのかは不明である。慣性センサーを搭載した重心動揺計を用いて、姿勢制御の詳細を解明する。

B) 研究方法：

当科通院中の慢性めまい患者に対して、外来受診時に重心動揺計測を行う。具体的には、慣性センサーを搭載した新規重心動揺計の上に、開眼及び閉眼した状態で各 1 分間起立してもらい、身体質量中心の位置及び加速度を計測する。身体質量中心の位置を横軸に、加速度を縦軸にプロットしたグラフの傾きを算出し、姿勢制御の特性を評価する。

C) 研究結果

当科を受診した慢性めまい患者 40 名、および対照群として健常者 25 名に対して、新規重心動揺計による重心動揺計測を行った。慢性めまい患者では、身体質量中心のわずかな変位に対して、過剰に加速度をかけて質量中心を元の位置に戻そうとする傾向がみられ、立位の際に身体を固くした剛性の高い姿勢制御を行っている可能性が示唆された。

D) 考察・まとめ

これまで姿勢制御の戦略を他覚化する簡易な方法がなかったが、今回慣性センサーを内部に搭載した新規重心動揺計を用いることで、慢性めまい患者が剛性の高い姿勢制御戦略をとっていることが明らかとなった。今後は、剛性を緩和するための治療法を開発すべきであることが示され、難渋する慢性めまい疾患の治療において新たな道が拓けることで、水俣病患者に対しても利につながるものと考えられる。