

「乳酸輸送・情報伝達病としての緑内障の病態解明と特定臨床研究による治療探索」

神戸大学大学院医学研究科外科系講座眼科学分野

中村 誠

1 研究の背景と目的

緑内障は40歳以上の5%以上が罹患する、中途失明原因トップの視神経変性疾患であり、網膜神経節細胞(RGC)が遺伝・環境因子により緩徐進行性に変性脱落する。その病態理解は進んでおらず、眼圧下降以外に有効な治療法がないため、RGCとその軸索変性を阻止する神経保護治療の開発が渴望されている。近年、グルコースのみならず、乳酸が神経細胞の重要なエネルギー基質であると同時に、特異的受容体を介して抗炎症、血管新生等を制御する情報伝達分子であることが知られるようになった。本研究の目的は、緑内障ではこの乳酸のエネルギー基質ならびに情報伝達分子としての役割が遺伝的・環境的に阻害されることを明らかにするとともに、内因性に乳酸産生を増加させることで緑内障における視神経変性を抑制できる可能性を探索することである。

2 研究方法・研究内容

日本人で最も有病率が高く、眼圧非依存性因子の関与の大きい正常眼圧緑内障(NTG)の疾患感受性遺伝子の候補として、アクアポリン9(AQP9)、モノカルボン酸輸送体(MCT)1,2,4、グルコース輸送体(GLUT)1,2,3,4、乳酸脱水素酵素(LDH)A,B,C,D,AL6A,LA6Bを対象に、まず、神戸大学と横浜市立大学において、NTG患者506人、正常対照1096人に対して、一遺伝子多型(single nucleotide polymorphism, SNP)関連解析とSNP間相互作用解析のdiscovery studyを行った。続いて、東北大学のサンプル(NTG患者522人、正常対照2082人)を用いて、validation studyを行った。さらに、両studyのサンプルを用いて、メタ解析を行った。

次に、非糖尿病の原発開放隅角緑内障患者で、直近2年間に6回以上計測したハンフリー視野検査の平均偏差変化率が-1.0dB(デシベル)/年未満の50人(100眼)を対象とし、緑内障には適応外使用となる、経口血糖降下薬メトホルミン1500mg/日を2年間投与し、視野障害の進行を抑制するかを検討する特定臨床研究を、申請者が研究代表者として開始した。2年の追跡期間内に同視野検査を9回以上実施し、線形混合効果モデルで平均偏差変化率が0.3dB/年鈍化すれば、有意水準5%、検出力約80%で有意な効果があると判定できる(Proudfoot, et al., JAMA Ophthalmol, 2021)。

基礎研究として、マウスに視神経挫滅モデルを作成後、腹腔内に乳酸ないし基材を投与し、2週後に網膜電図(ERG)を記録した。その後、網膜を摘出し、網膜伸展標本とTUBB3免疫染色により、RGC密度変化を計測した。網膜摘出し、AQP9、MCT1,2,4、GLUT1,2,3,4、Ib-1発現ならびに相互作用を、免疫沈降ならびにWestern blotを用いて定量した。これらの蛋白の発現部位を同定するために、クライオスタットによる網膜薄切切片と免疫染色を行った。一方、メトホルミンの神経保護作用の機序を調べるために、マウス前房内に磁性マイクロビーズを注入し、眼圧を慢性的に上昇させ、緑内障モデルを作成した。ついで、飲水内にメトホルミンを溶解させマウスに投与し、上記記載と同様の解析を開始した。

3 研究成果

遺伝子関連解析の結果、GLUT3のrs7976243は、discovery, validation, メタ解析のいずれのstudyにおいても、マイナーアレルが有意に相加的に発症リスクを下げる(メタ解析でのオッズ比0.87 [95%信頼区間0.81~0.92]、Bonferroni補正後P値0.0016)こと

がわかった。GLUT3は神経細胞に発現するGLUTであり、神経細胞におけるグルコース取り込み能が日本人においてNTG発症に関連することが示された。また、GLUT3のrs11610602とMCT2のrs10877334は、単独での関連解析では、discovery, validation, メタ解析のいずれも有意な関連を示さなかったにも関わらず、遺伝子遺伝子相互作用解析を行ったところ、両SNPを有すると多重性を補正しても、有意にNTGの発症を抑制した(メタ解析でのオッズ比0.46 [95%信頼区間0.31~0.69]、Bonferroni補正後P値0.028)。MCT2も神経細胞で発現するMCTである。今回の結果は、単独では疾患発現には大きな影響を及ぼさない遺伝子多型が、複数組み合わせることで、発症に有意に影響をおよぼすことを示している。すでに蛋白レベルでは動物実験において、GLUTとMCTが相互作用を示すことは知られていたが、遺伝子レベルでも相互作用が見られることを初めて証明した成果となる(論文作成中)。

メトホルミンの有効性を検討する特定臨床研究は、全国15施設が参加し、認定臨床研究審査委員会での承認も受け、jRCTに公開した(jRCTs051240159)。すでに2例の患者を登録し、投薬を開始した。現在、適格基準を満たす患者を鋭意リクルート中である。

視神経挫滅により、RGC密度ならびにERGの暗所視閾値電位は有意に減少したが、乳酸腹腔内投与により、これらは有意に改善した。また、視神経挫滅によりAQP9発現は低下し、iba-1発現は上昇したが、乳酸腹腔内投与により、これらも有意に正常化した。視神経挫滅は、ミクログリア活性亢進とAQP9発現低下、RGC機能と生存を低下させるが、乳酸投与により、これらを回復させた(論文準備中)。

高眼圧モデルでは、RGC密度が有意に減少していた。現在、メトホルミン投与により、それが改善するか、また網膜内の乳酸関連分子の発現変化があるか検討中である。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究で、緑内障において乳酸経路を介した網膜内糖代謝障害が生じる遺伝的素因があることを明らかにし、また、網膜内での分子機構の一端が明らかになった。近年の観察研究で経口血糖降下薬メトホルミン服用2型糖尿病患者は非服用患者に比し、有意に緑内障の発症率が低いことが報告されている(Vergroesen, et al. JAMA Ophthalmol, 2022)。メトホルミンは糖新生を阻害するので、結果的に内因性に乳酸産生を高める。現在、遂行されている特定臨床研究により、メトホルミンが非糖尿病の緑内障患者において視機能障害抑制効果を発揮するか否かが証明されれば、drug repositioning 戦略により、短期間かつ費用対効果の高い、緑内障の神経保護治療の道を拓き、多くの緑内障患者を失明のリスクから救済することができると期待される。