

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16953

研究課題名(和文) 正常眼圧緑内障モデルマウスにおける熱ショック蛋白質を介した網膜神経保護

研究課題名(英文) Heat shock protein-mediated retinal neuroprotection in normal-tension glaucoma model mice

研究代表者

木嶋 理紀 (Riki, Kijima)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：20443947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：熱ショック蛋白質(HSP)は熱などのストレスによって発現が誘導される分子シャペロンであり、構造変化を来した異常蛋白質の形状を元に戻し、その凝集を阻害するのみならず、プロテアソームにおける変異蛋白質の分解を促進することで、抗アポトーシス効果を示すと考えられている。我々は、HSP70を誘導し、胃粘膜に対する防御作用を増強する薬剤として開発されたゲラニルゲラニルアセトン(geranyl-geranyl-acetone)を正常眼圧緑内障モデルマウスに経口投与することで、網膜神経節細胞死を抑制した。さらに虚血再灌流モデルマウスに筋萎縮性側索硬化症の治療薬として臨床応用が進んでいるRiluzoleを投与し、網膜神経節細胞死の抑制を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障の病態としては、網膜神経節細胞がアポトーシスを起こすことで、徐々に視野が欠損してやがては失明へ至ると考えられているが、その詳しいメカニズムは不明である。現在の臨床治療は、眼圧を低下させることで緑内障の進行を抑制することを目的としているが、正常眼圧緑内障の中には、眼圧が充分低いにもかかわらず、症状が進行していくものも含まれる。そのため今後は直接的に網膜神経節細胞のアポトーシスを抑制する治療が期待されている。経口投与できる薬剤による熱ショック蛋白質を介した神経保護は、日本人に多い正常眼圧緑内障の治療に役立ち、多くの患者を失明から救うことができるかも知れない。

研究成果の概要(英文)：Heat shock proteins (HSPs) functioning as molecular chaperones are the key components responsible for protein folding, assembly, translocation, and degradation under stress conditions and in many normal cellular processes. It is also thought to have an anti-apoptotic effect by promoting the degradation of mutant proteins in the proteasome.

We succeeded to inhibit retinal ganglion cell death by orally administering HSP70-inducing geranyl-geranyl-acetone, a drug developed as a drug that enhances the protective effect on gastric mucosa, to normal tension glaucoma model mice. Furthermore, Riluzole, which has been clinically applied as a therapeutic agent for amyotrophic lateral sclerosis, was administered to retinal ischemia/reperfusion model to investigate the suppression of retinal ganglion cell death.

研究分野：緑内障

キーワード：神経保護 緑内障 アポトーシス 抗酸化 熱ショック蛋白質 網膜細胞生物学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 緑内障と疫学的背景

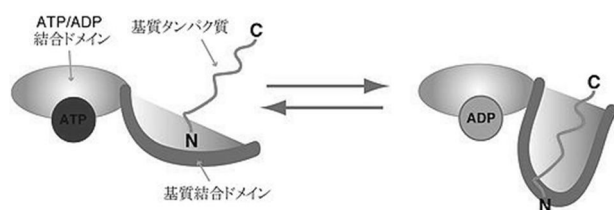
緑内障とは眼圧の上昇や網膜循環障害などを背景に視神経障害が進行していく慢性疾患である。初期には自覚症状なく進行し、やがて視野が次第に欠損してきて、ついには失明に至る。緑内障はわが国では第1位、世界でも第2位の中途失明原因であり、最近の調査では40歳以上の約5%に発症し、70歳以上ではその有病率が10%を超えることが分かった。現在、日本の潜在患者数は500万人とも推定され、今後さらなる高齢化社会の到来と共に、患者数の増加が予想される。本症には眼圧が高値を示すものと、眼圧が正常範囲内にある正常眼圧緑内障があるが、わが国では約70%が正常眼圧緑内障で占められている(Iwasie A et al. Ophthalmology. 2004)。

(2) 緑内障と網膜神経節細胞死

緑内障の病態としては、網膜神経節細胞がアポトーシスを起こすことで、徐々に視野が欠損してやがては失明へ至ると考えられているが、その詳しいメカニズムは不明である。現在の臨床治療は、眼圧を低下させることで緑内障の進行を抑制することを目的としているが、正常眼圧緑内障の中には、眼圧が充分低いにもかかわらず、症状が進行していくものが含まれる。そのため今後は直接的に網膜神経節細胞のアポトーシスを抑制する治療が期待されている。

(3) 熱ショック蛋白質と網膜神経節細胞死抑制

熱ショック蛋白質(HSP)は熱などのストレスによって発現が誘導される分子シャペロンであり、構造変化を来した異常蛋白の形状を元に戻し、その凝集を阻害するのみならず、プロテアソームにおける変異蛋白の分解を促進することで、抗アポトーシス効果を示すと考えられている。神経細胞にアミロイドを過剰発現すると神経細胞死が引き起こされるが、HSP70を神経細胞に強制発現させると、神経毒性を軽減することができる(Magrané J et al. J Neurosci. 2004.)。



HSP70の分子構造と基質タンパク質結合

2. 研究の目的

熱ショック蛋白質の発現を既存の薬剤を使用して誘導し、網膜神経節細胞がアポトーシスを起こすことを抑制し、緑内障に対する新たな神経保護治療の可能性を検討する。すでに他疾患で安全性が確認されている薬剤を利用することで、低コストで眼圧に依存しない新規緑内障治療の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 薬剤の投与

ゲラニルゲラニルアセトン投与

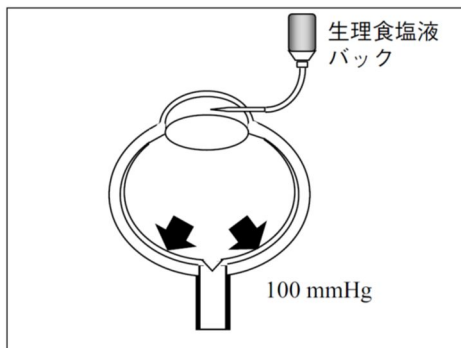
ゲラニルゲラニルアセトン (GGA) は胃潰瘍治療の薬物として、幅広く使用されている薬物であるが、その胃粘膜保護作用は HSP の発現を上昇させることで生じていることが知られている。(Murakami M, et al. Arzneimittelforschung. 1981) 4 週齢マウスに GGA (100 mg, 300mg, 600mg/kg/day) をあらかじめ腹腔内投与した。

ライソゾール投与

ライソゾール (LS) 投与は筋萎縮性側索硬化症の治療薬として臨床応用が進んでいるが、この薬剤には熱ショック因子 1 (HSF1) を介して HSP を上昇させる作用があり、さらにグルタミントランスポーター 1 を増加させることで神経細胞を保護する作用があることが知られている (Liu AY et al. J Biol Chem. 2011)

4 週齢マウスに GGA (4mg/kg/day) をあらかじめ腹腔内投与した。

(2) 網膜虚血再灌流



マウスを麻酔下に保温マット上で体温を 37 に維持し、トロピカミド点眼液にて散瞳させた後、抗生剤を点眼する。生理食塩液の入った点滴バッグをマウスの眼より 135.5cm (100mmHg) の高さになるようにつり上げておき、33G の注射針を前房内に刺入し固定する。45 分後に注射針を抜き、眼圧

を低下させることにより網膜を再灌流させる。24 時間後に眼球を摘出した。

(3) 組織学的検討

安楽死したマウスの眼球を摘出し、パラフィン切片に固定する。HE 染色を行い、前述の方法で網膜神経節細胞数をカウントする。さらに抗 HSP70 抗体、抗 HSF-1 抗体を用い、網膜組織を免疫染色して、両者の発現を調べた。

(4) リアルタイム PCR による HSP70 の mRNA 発現の測定

(5) 網膜神経節細胞の逆行性染色

全身麻酔下でマウスの頭蓋骨に穴をあけ、上丘に Dil 色素 (4%Fluoro-Gold 2 μ l) を注入する。7 日後にマウスを安楽死させ、網膜フラットマウントを作製して、網膜神経節細胞の密度を調べた。

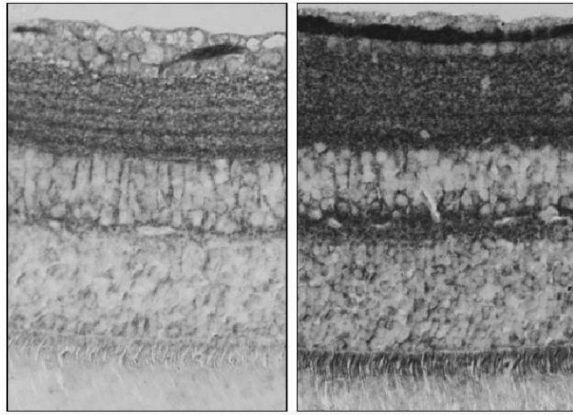
(6) カスパーゼ 9、3 活性の測定

摘出した網膜のカスパーゼ 9、3 活性を、プロテアーゼアッセイキット (MBL 社) を用いて測定した。

4. 研究成果

ゲラニルゲラニルアセトンは容量依存性に網膜神経節細胞死を抑制し、ライソゾールはゲ

網膜のHSP70免疫染色

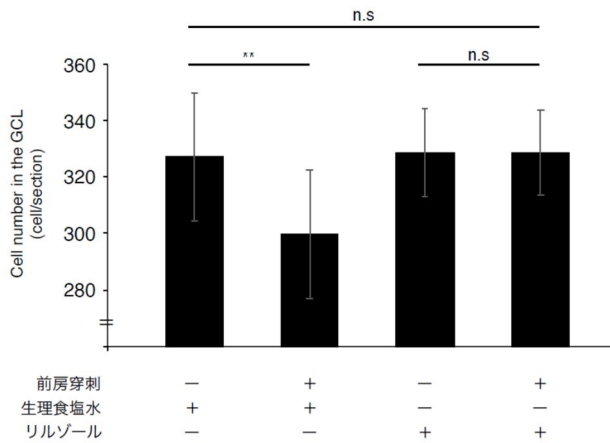


GGA (-) (left) and GGA (+) (right)

ラニルゲラニルアセトンと同様に、マウス虚血再灌流モデルで網膜神経節細胞死を抑制することが、HE染色による網膜神経節細胞数のカウント、上丘からの逆行性染色により、ともに確認された。両者は網膜内で、HSP70の発現を増加させ、カスパーゼ9、3活性の抑制を示し、抗アポトーシス効果を示した。

ライソゾールは HSF1 を介して HSP70 の発現を増やし、網膜神経節細胞を保護する。ゲラニルゲラニルアセトンでは急性障害モデルである虚血再灌流のみならず、正常眼圧緑内障モデルのグルタミン酸トランスポーターノックアウトマウスにおいても網膜神経節細胞の保護効果を示すことが明らかとなったが、今後ライソゾール

リソゾール投与による網膜神経節細胞死抑制



に関して同様に研究を進めて、緑内障患者への新しい治療法へと繋げていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kase Satoru, Chin Shiki, Hamanaka Teruhiko, Shinmei Yasuhiro, Ohguchi Takeshi, Kijima Riki, Matsuda Akira, Ishida Susumu	4. 巻 11
2. 論文標題 Histological Findings in the Trabecular Meshwork of a Patient with Atopic Glaucoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Open Ophthalmol J	6. 最初と最後の頁 103 ~ 106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.2174/1874364101711010103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 菊地香澄、木嶋理紀、新明康弘、大口剛司、陳 進輝、南場研一、齋藤 航、石田 晋.	4. 巻 30
2. 論文標題 Rosai-Dorfman病に合併した続発緑内障に対し360° suture trabeculotomy変法が奏効した1例	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 眼科手術	6. 最初と最後の頁 514-517
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 秋元亨介、新明康弘、新田卓也、大口剛司、木嶋理紀、陳 進輝、宇野友絵、勝田佳世、辻野奈緒子、南場研一、石田 晋
2. 発表標題 原発開放隅角緑内障 (POAG) として紹介されたぶどう膜炎続発緑内障の臨床像
3. 学会等名 第71回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木嶋理紀、新明康弘、大口剛司、宇野友絵、青柳麻衣子、辻野奈緒子、新田卓也、陳 進輝、石田 晋
2. 発表標題 視野進行がみられた緑内障患者の眼圧日内変動パターンの検討
3. 学会等名 第28回日本緑内障学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福津佳苗、新明康弘、陳 進輝、大口剛司、木嶋理紀、宇野友絵、 新田卓也、西堀宗樹、廣瀬茂樹、南場研一、石田 晋
2. 発表標題 乳頭発赤を伴い浅前房をきたし片眼性のぶどう膜炎が疑われた1例
3. 学会等名 第28回日本緑内障学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 秋元亨介、新明康弘、新田卓也、大口剛司、木嶋理紀、陳 進輝、宇野友絵、勝田佳世、辻野奈緒子、南場研一、石田 晋
2. 発表標題 原発開放隅角緑内障（POAG）として紹介されたぶどう膜炎続発緑内障の臨床像
3. 学会等名 第164回北海道眼科集談会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木嶋理紀
2. 発表標題 眼圧日内変動パターンと緑内障の視野進行
3. 学会等名 北海道緑内障フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----