

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16970

研究課題名（和文）メラトニンレセプター制御による緑内障性視神経障害に対する神経保護に関する検討

研究課題名（英文）Investigation of the neuroprotective effect of melatonin receptor in glaucomatous optic neuropathy

研究代表者

田片 将士（Takata, Masashi）

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：60617984

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,500,000円

研究成果の概要（和文）：緑内障は眼圧下降が唯一の治療方法であるが、十分な眼圧下降でも視野障害が進行する例もみられる。中枢神経領域でメラトニンレセプターを介し細胞死抑制、神経保護に働くという報告がみられる。

本検討は緑内障モデルで、メラトニンレセプター制御による神経保護の可能性を検討した。コントロールと比べ生存網膜神経節細胞はメラトニンレセプターのagonist投与でやや多く、antagonist投与でやや少ない傾向にあったが、有意差が出るには至らなかった。Bcl-2はagonist投与で投与早期に増加がみられ、メラトニンレセプター刺激により抗アポトーシス因子が増加し網膜神経節細胞の生存につながる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障は本邦の中途失明原因の第1位を占める疾患であり、エビデンスのある唯一の治療方法は眼圧下降治療である。しかし、十分な眼圧下降でも視機能障害を抑制できないケースもみられ、眼圧以外の病態が関与している可能性が示唆されている。中枢神経におけるメラトニンレセプターを介した神経保護や内因性神経再生に関する報告が近年みられ、本研究では緑内障モデルを用いてメラトニンレセプターに着目した研究を行った。メラトニンレセプター制御により網膜神経節細胞死を抑制すると断定するには不十分な結果となったが、今後さらに検討を進めることでメラトニンレセプターと緑内障の関連性に関する新たな知見が得られるものと思われる。

研究成果の概要（英文）：Although lowering of intraocular pressure is the only treatment for glaucoma, there are cases in which visual field impairment progresses even with sufficient lowering of intraocular pressure. It has been reported that it acts on cell death suppression and neuroprotection via melatonin receptors in the central nervous system. This study was examined the possibility of neuroprotection by melatonin receptor regulation using NTG model rat. Compared with the control, the number of surviving retinal ganglion cells tended to be slightly higher with the administration of the melatonin receptor agonist and slightly lower with the administration of the melatonin receptor antagonist, but no significant difference was found between 3 groups. Bcl-2 was increased in the early stage by agonist administration, suggesting that melatonin receptor stimulation may increase anti-apoptotic factors and lead to survival of retinal ganglion cells.

研究分野：眼科学

キーワード：神経保護 メラトニン 緑内障

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

緑内障は、視神経が障害され、さらに網膜神経節細胞の消失により視野障害が生じることが知られており眼圧下降が唯一のエビデンスのある治療である。緑内障は近年本邦における視覚障害者に認定される原因疾患の第一位であり40歳以上の日本人の有病率は約5%と高率である。本邦における緑内障患者数は推定400~500万人とされている。本邦における緑内障病型である正常眼圧緑内障は眼圧が正常範囲にあるものの視神経が障害され、しばしば十分な眼圧下降でも進行を抑えきれないことも臨床現場ではよく経験され、眼圧以外の多面的因子の関与が推測されている。現在眼圧以外の緑内障に関与する候補因子はさまざまと推測されているものの一定の見解が得られていない。眼圧による篩状板部における機械障害や乳頭循環障害、BDNFなどの神経栄養因子の欠乏、グルタミン酸毒性、酸化ストレス、自己免疫機序などが代表的な仮説である。眼圧下降でも視野障害が十分に抑制できないケースにも対応する必要があり、眼圧下降以外にも眼圧非依存性の神経保護療法の開発が急務と言える。

メラトニンは松果体より分泌されるホルモンであり、催眠作用・鎮静作用・体温降下作用などによりサーカディアンリズムを調整し、睡眠リズムを司ることが知られている。メラトニンレセプターはサブタイプとしてMT1とMT2が存在し、生体内のさまざまな組織に発現しており、内網状層・内顆粒層・網膜神経節細胞、網膜色素上皮、虹彩、毛様体にも発現していることが知られている。メラトニンが眼圧の日内変動に影響しているという報告¹(Tosini G, et al. J Glaucoma. 2013)やメラトニンアナログが眼圧下降効果を有するという報告²(Martínez-Águila A, et al. Eur J Pharmacol. 2013)はみられるものの、正常眼圧緑内障モデルを用いてメラトニンレセプターを制御することによる神経保護効果を具体的に検討した報告はみられない。

申請者はラットを用いて正常眼圧緑内障モデルを作製し、メラトニンレセプターに対するアゴニスト、アンタゴニストを投与することでメラトニンレセプターの制御による神経保護効果の検討を行うことで、メラトニンレセプター制御による眼圧非依存性の緑内障治療の可能性があるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

近年中枢神経領域でMT1、MT2といったメラトニンレセプターを介した細胞死抑制を目指す神経保護効果、さらに内因性神経再生の報告もあり、メラトニンレセプターが着目されているため、本研究はラットの正常眼圧緑内障モデル動物を作製し、メラトニンレセプターに対するアゴニストであるAgomelatine、アンタゴニストであるLuzindoleをモデル動物に投与することでメラトニンレセプターを制御し、その結果、緑内障性視神経障害に対する神経保護の可能性を検討することを目的とした。本研究により眼圧非依存性の治療法を開発することで、十分な眼圧下降でも視野障害が進む症例や本邦で最も多い正常眼圧緑内障における有効な治療法の発見が最終目標である。

3. 研究の方法

まず正常眼圧緑内障モデルを作製する。参考論文を参照し、6週齢Sprague-Dawleyラット(雄)へ吸入麻酔薬イソフルランを約4~5%の濃度にて導入し、さらに疼痛緩和のため塩酸メドミジン0.15mg/kg+ミダゾラム2mg/kg+酒石酸ブトルファノール2.5mg/kgとなるように生理食塩水で希釈し作製した3種混合麻酔を腹腔内投与することで十分な疼痛消失を行った上で研究を行った。麻酔下にて40nM NMDA(N-methyl-D-aspartate)を1 μ l 32ゲージ針付きハミルトンシリンジを用いて硝子体投与を行い、正常眼圧緑内障モデルを作製する。³(Lam TT, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999)

硝子体内投与後にMT1/MT2レセプターのアゴニストであるAgomelatine投与群、MT1/MT2レセプターのアゴニストであるLuzindole投与群、コントロールとしての溶媒のみの投与群を術当日に腹腔内投与の投与方法でモデルを作製する。投与後12時間、1日、3日、7日のtime courseにて作製したモデルラットをバルビツレート過量投与により安楽死させて後に眼球摘出を行う。分子生物学的検討のため摘出した網膜を-80 $^{\circ}$ にて保存する。また、免疫組織学的検討のために4%パラホルムアルデヒドにて組織固定を行い、網膜ホルマウント切片を作製する。

網膜ホルマウント切片を利用してMT1およびMT2 receptorに関して正常眼圧緑内障モデルと正常コントロール群での差について検討を行う。また、NMDA投与+Agomelatine投与群、Luzindole投与群、コントロール群の3群間で生存している網膜神経節細胞数に関して検討を行う。

網膜を採取しホモジネート、RNAを抽出、抽出したRNAを利用して各々の群にてCaspase3/7, Caspase8, Caspase9, Bcl-2, Baxなど細胞死に関連する分子の変動についてreal time PCRにて解析する。

なお、本研究は動物を対象とした研究であるため、動物実験については兵庫医科大学動物実験規程」を遵守して、兵庫医科大学の共同利用研究施設、動物実験施設において行う。研究遂行に関しては実験に供する動物数を最小限にとどめると共に、外科的手術などに際して実験動物に苦痛を与えないなど、施設使用や実験について実験計画書を提出し認可を得て実施した。

4. 研究成果

最初に正常眼圧緑内障モデルラットの作製に注力した。既報を参考として 6 週齢 Sprague-Dawley ラット(雄)の硝子体内へ NMDA を投与することで網膜神経節細胞への apoptosis を誘導することでモデルを確立した。正常眼と NMDA 投与眼で網膜神経節細胞数に差があるか検討を行う必要があった。当初の研究計画ではモデル作製時に上丘への蛍光色素フルオロゴールドを注入し逆行性染色を行い、網膜ホルマウント切片を作製して網膜神経節細胞数を計測する計画であったが、実験手技に問題があるのか、結果的には大幅に時間をとられることとなった。当初の計画を変更し、既報⁴(García-Ayuso D, et al. Exp Eye Res. 2017) を参考として生存網膜神経節細胞の確認に網膜ホルマウント切片を作製して網膜神経節細胞のマーカーである Brn-3a 抗体による免疫染色を行い検討する手法へと変更した。NMDA を硝子体内へ注射投与したラットとコントロールとして非投与のラットを比較したところ生存網膜神経節細胞の数は約半数となることを確認し、モデルとして使用可能と判断した。また、正常群と正常眼圧緑内障モデルラット群でメラトニンレセプターの発現数には差はみられなかった。

次に作製した正常眼圧緑内障モデルラットに MT1/MT2 レセプターのアゴニストである Agomelatine 投与群、MT1/MT2 レセプターのアнтаゴニストである Luzindole 投与群、コントロールとしての溶媒のみの投与群の 3 群を作製しようとしたが、入手した Agomelatine 粉末、Luzindole 粉末に関して既報の通り PBS や生理食塩水などを溶媒として溶解を試みたものの粉末が固まり状に残存する、溶解しきれないなどといった問題が浮上した。試行錯誤の結果、DMSO、TWEEN、生理食塩水を溶媒として sonicator にて sonication し溶解した。作製した Agomelatine、Luzindole、溶媒(DMSO+TWEEN+生理食塩水)を正常眼圧緑内障モデルラットに腹腔内注射にて投与した。投与後に摘出した眼球より網膜ホルマウント切片を作製し、Brn-3a 抗体にて免疫染色を行い、各々の群での生存網膜神経節細胞数を算出した。Agomelatine 投与群、Luzindole 投与群、コントロール(溶媒投与)群では Agomelatine 投与群でコントロール群と比べて生存網膜神経節細胞数は多い傾向にあり、Luzindole 投与群ではコントロール群と比べて生存網膜神経節細胞数は少ない傾向にあったものの統計学的有意差がみられるほどではなかった。(Figure1)

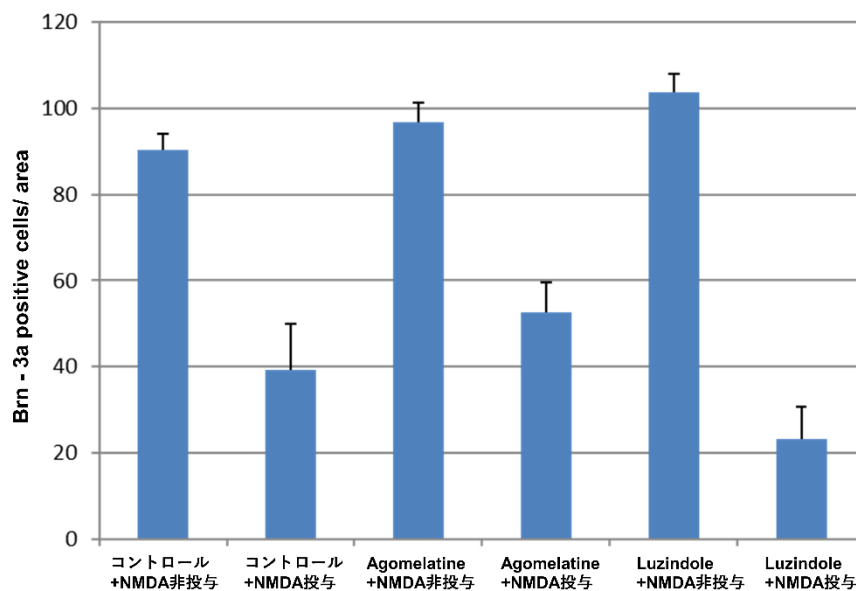


Figure1

次に Agomelatine 投与群、Luzindole 投与群、コントロール(溶媒投与)群で NMDA 硝子体注射を行った眼球を摘出し網膜を採取し、RNA を抽出した。Caspase3/7, Caspase8, Caspase9, Bcl-2, Bax など apoptosis 関連分子に関して real time PCR で変動を検討した。当初投与後 1 日、3 日、7 日の time point にて Caspase3/7, Caspase8, Caspase9, Bcl-2, Bax の動きを検討したが、時間経過とともに減少する結果となったため、投与 1 日よりも早期での検討の追加が必要と判断した。NMDA 投与後 12 時間の time point を従来のプロトコールに追加して検討を行った。NMDA 投与後 12 時間、1 日で Caspase3/7, Caspase8, Caspase9, Bax は上昇していたが、コントロール群と Agomelatine、Luzindole 投与群との間で有意差を検出することは出来なかった。また、Bcl-2 は 12 時間では Agomelatine 群で増加、コントロール群、Luzindole 群では Agomelatine 群と比べ減少していたが、1 日、3 日、7 日では差は見られなかった。(Figure2)

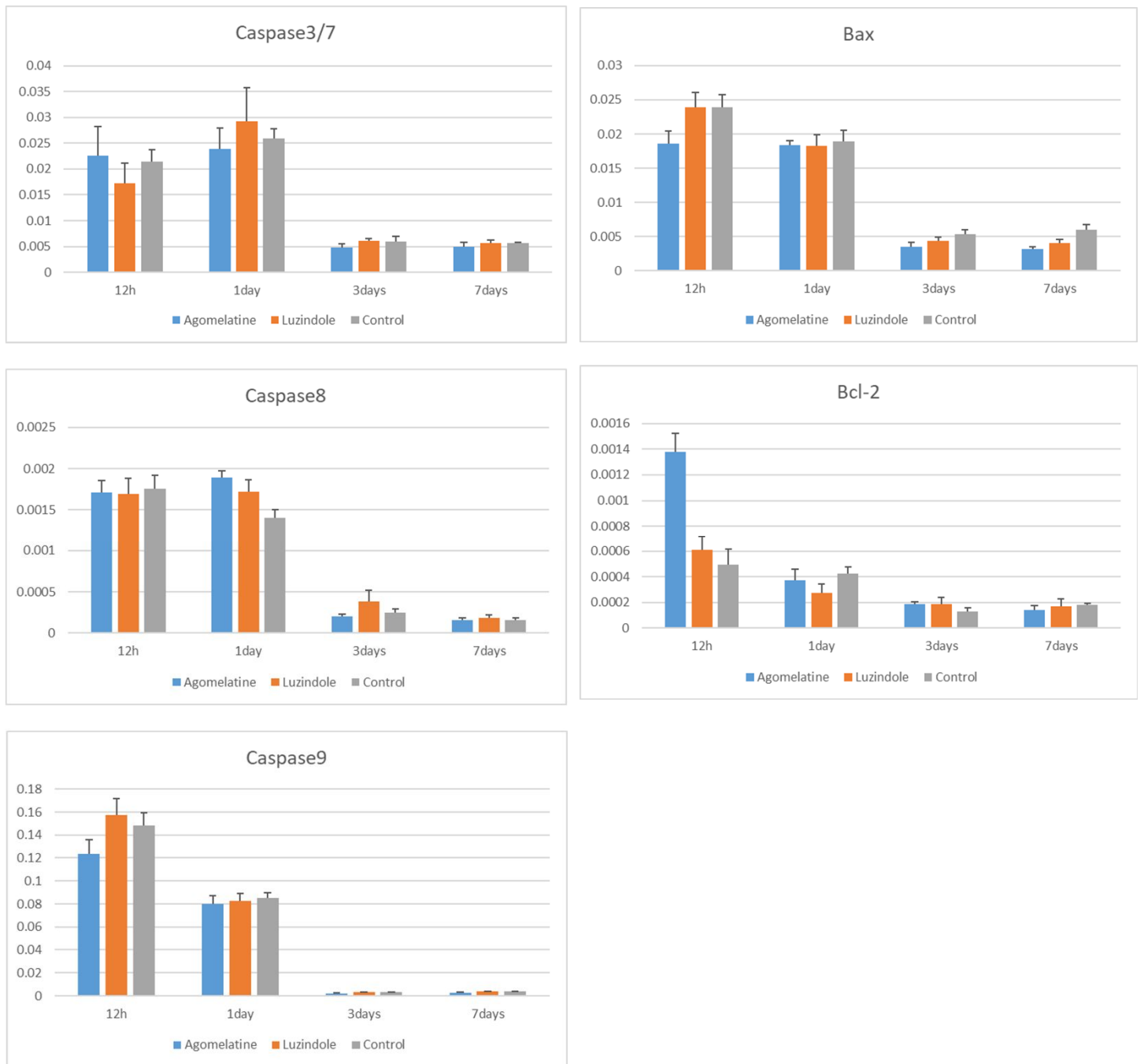


Figure2

本研究ではメルトニンレセプターに対するアゴニスト作用を有する薬剤、あるいはアンタゴニスト作用を有する薬剤に対して網膜神経節細胞死を誘発する正常眼圧緑内障モデルを使用し検討したが、メルトニンレセプターを抑制することにより網膜神経節細胞数が減少する傾向、メルトニンレセプターを刺激することにより網膜神経節細胞数は増加する傾向にはあったが、統計的な有意差を得ることはできなかった。また、NMDA を硝子体注射したモデルラットの網膜の apoptosis 関連分子の変動を検討したが、メルトニンレセプター刺激、メルトニンレセプター抑制、コントロール(溶媒のみ)の群間比較を行ったが、Caspase3/7, Caspase8, Caspase9, Bax はいずれも投与早期の段階では上昇がみられたものの、3 群間では有意差はみられなかった。抗アポトーシス因子である Bcl-2 のみメルトニンレセプターに対するアゴニスト作用を有する Agomelatine 投与群で投与早期の時点で Luzindole 投与群、コントロール群よりも高値を示した。本研究では Agomelatine, Luzindole ともに腹腔内投与という方法を採用したが、そのことが結果に影響を与えた可能性も考えられる。薬剤が直接作用しやすく滞留性が高いと思われる硝子体内への投与や点眼での頻回の投与により絶えず薬効が持続する状態とした時には本研究とは異なり、群間比較でも有意な差がみられた結果となった可能性もあるのではないかとと思われる。また、NMDA 投与による緑内障モデルラットを使用した報告は数多くみられるが、実際の人体での病態とは網膜神経節細胞にアポトーシスが生じるメカニズムが異なる可能性もある。また、NTG モデルとして知られている EAAC1(excitatory amino acid carrier1)や

GLAST(glutamate/aspartate transporter)遺伝子欠損マウス、視神経軸索挫滅による緑内障モデル、眼循環障害に着目した Endothelin-1(ET-1)による緑内障モデルや高眼圧緑内障モデルなどの異なる緑内障モデルを使用して検討すると、本研究とは違った結果となる可能性もある。

既報⁵(Martínez-Águila A, et al. Mol Vis. 2020)ではメラトニンレセプターの発現は緑内障の進行とともに減少するという報告がみられる。つまり、メラトニンレセプターの発現が減少することによりレセプターを介したシグナル伝達が減少し網膜神経節細胞へのNMDAによるダメージを軽減できなくなる可能性がある。このことは慢性的に進行した緑内障ではメラトニンレセプターの発現が少なくなり、内因性メラトニンによるシグナル伝達が減少、網膜神経節細胞の生存がおぼつかなくなるという可能性が予想される。また、メラトニンレセプターの発現に変化がない状態であっても、内因性メラトニンの減少により同様の状態が生じることもあると考えられる。逆にメラトニンレセプターの発現が多い、もしくは内因性メラトニンが多い状態ではレセプターを介したシグナル伝達が増加し、抗アポトーシス因子である Bcl-2 が増加する結果、ミトコンドリアを介してアポトーシスを阻害することで神経保護的に作用し網膜神経節細胞へのダメージを軽減できるのではないかと推測される。メラトニンがミトコンドリアレベルでの apoptosis の内因性経路を阻害するという報告⁶(Radogna F, et al. J Pineal Res. 2008)、ミトコンドリアがメラトニンによるアポトーシスを阻害するメラトニンの作用部位という報告⁷(Luchetti F, et al. J Pineal Res. 2006)やメラトニンによる Bcl-2 の up regulation がみられるという報告⁸(Ling X, et al. Zhongguo Yao Li Xue Bao. 1999)とも一致する。また、緑内障患者でメラトニン代謝産物である尿中 6-スルファトキシメラトニンを測定した結果、尿中 6-スルファトキシメラトニンレベルが正常群と比べて有意に低いという報告⁹(Yoshikawa T, et al. J Pineal Res. 2020)からもメラトニンと緑内障が密接に関係していることが推測される。メラトニンおよびメラトニンレセプターをターゲットとした非眼圧依存性緑内障治療に関する研究は今後多面的に解析することにより、さらに深めていく必要があると考えられた。

引用文献

1. Tosini G, Iuvone M, Boatright JH : Is the melatonin receptor type 1 involved in the pathogenesis of glaucoma? J Glaucoma. 2013;22 Suppl 5:S49-50.
2. Martínez-Águila A, Fonseca B, Bergua A, Pintor J : Melatonin analogue agomelatine reduces rabbit's intraocular pressure in normotensive and hypertensive conditions. Eur J Pharmacol. 2013;213-7.
3. Lam TT, Ablner AS, Kwong JM, Tso MO : N-methyl-D-aspartate (NMDA)--induced apoptosis in rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999;2391-7.
4. García-Ayuso D, Galindo-Romero C, Di Pierdomenico J, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M, Villegas Pérez MP : Light-induced retinal degeneration causes a transient downregulation of melanopsin in the rat retina. Exp Eye Res. 2017;10-16.
5. Martínez-Águila A, Fonseca B, Pérez de Lara MJ, Miras-Portugal MT, Gómez-Villafuertes R, Carracedo G, Pintor J. : Changes in melatonin receptor expression in a murine model of glaucoma. Mol Vis. 2020;530-539.
6. Radogna F, Cristofanon S, Paternoster L, D'Alessio M, De Nicola M, Cerella C, Dicato M, Diederich M, Ghibelli L. : Melatonin antagonizes the intrinsic pathway of apoptosis via mitochondrial targeting of Bcl-2. J Pineal Res. 2008;316-25.
7. Luchetti F, Canonico B, Curci R, Battistelli M, Mannello F, Papa S, Tarzia G, Falcieri E : Melatonin prevents apoptosis induced by UV-B treatment in U937 cell line. J Pineal Res. 2006;158-67.
8. Ling X, Zhang LM, Lu SD, Li XJ, Sun FY : Protective effect of melatonin on injured cerebral neurons is associated with bcl 2 protein over expression. Zhongguo Yao Li Xue Bao 1999;409-414.
9. Yoshikawa T, Yoshikawa T, Obayashi K, Miyata K, Saeki K, Ogata N. Decreased melatonin secretion in patients with glaucoma: Quantitative association with glaucoma severity in the LIGHT study. J Pineal Res. 2020:e12662

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 山名美樹、田片将士、前田裕宇樹、横山弘、五味文	4. 巻 63
2. 論文標題 ICE症候群に対する線維柱帯切除術後にocular decompression retinopathyが生じた1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 眼科	6. 最初と最後の頁 259-265
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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masashi Takata, Tomohiro Sekiya, Atsuya Ide, Kou Kakusho, Takeshi Okadome, Fumi Gomi
2. 発表標題 Assessment of vascularity on the bleb surface following trabeculectomy
3. 学会等名 The 2nd International Ocular Circulation Society and The 37th Annual Meeting of Japanese Meeting of Japanese Society for Ocular Circulation (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横山弘、田片将士、五味文
2. 発表標題 マイクロフックトラベクトミーとスーチャートラベクトミー眼内法の短期術後成績の比較
3. 学会等名 第31回 日本緑内障学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横山弘、田片将士、五味文
2. 発表標題 当院でのニードリングの成績と施行前要因の検討
3. 学会等名 第123回 日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山 弘, 田片 将士, 五味 文
2. 発表標題 スーチャートラベクロトミー眼内法の短期術後成績
3. 学会等名 第72回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関谷 友宏, 田片 将士, 横山 弘, 神野 早苗, 五味 文
2. 発表標題 スーチャートラベクロトミー眼内法術後に膨隆虹彩が生じた1例
3. 学会等名 第29回日本緑内障学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田片 将士
2. 発表標題 臨床上の緑内障について
3. 学会等名 尼崎市薬剤師会研修会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川 裕人, 田片 将士, 曾谷 拓之, 伊賀 俊行, 山縣 祥隆, 五味 文
2. 発表標題 お薬手帳への緑内障シール貼付による病診薬連携の試み
3. 学会等名 第74回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 米田 貴博, 田片 将士, 横山 弘, 五味 文
2. 発表標題 マイクロフックトラベクトミー眼内法の術後成績
3. 学会等名 第1回兵庫県眼科医会・2大学合同オープンカンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松浦 信太郎, 田片 将士, 横山 弘, 五味 文
2. 発表標題 Radius-Maumenee syndrome (Idiopathic elevated episcleral venous pressure)による続発開放隅角緑内障の一例
3. 学会等名 第2回兵庫県眼科医会・2大学合同オープンカンファレンス
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関谷 友宏, 田片 将士, 横山 弘, 五味 文
2. 発表標題 水晶体再建術併用線維柱帯切除術の術後眼内レンズ屈折誤差に関する検討
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 片山 一朗, 阪上 雅史, 五味 文, 岸本 裕充, 田片 将士	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 392
3. 書名 病態・治療論 [11] 皮膚 / 耳鼻咽喉 / 眼 / 歯・口腔疾患	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------