

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592009

研究課題名（和文） 時計遺伝子と眼圧の中枢性制御機構の解明

研究課題名（英文） Clock gene and intraocular pressure control by central nervous system.

研究代表者

杉山 和久（SUGIYAMA KAZUHISA）

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：80179168

研究成果の概要：眼圧は、緑内障の最も大きなリスクファクターとされており、日内変動をすることが知られている。眼圧日内変動には交感神経系の関与が指摘されていること、交感神経受容体が房水産生に関与することから、アドレナリン受容体遺伝子のノックアウトにより眼圧の日内変動が消失するかどうかを検討した。1、2アドレナリン受容体遺伝子ダブルノックアウトマウスの眼圧には、正常マウスと同様の有意な眼圧日内変動が見られた。このことから、眼圧の日内変動は1、2アドレナリン受容体を介さずに生じているか、あるいはノックアウトにより交感神経の他の受容体が代償している可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |
| 2008年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：緑内障、眼圧、時計遺伝子

1. 研究開始当初の背景

眼圧は、緑内障の最も大きなリスクファクターとされており、日内変動をすることが知られている。ウサギにおいて交感神経が眼圧の日内変動に関与していること（Curr Eye Res. 4:1273-9, 1985）、緑内障治療薬である遮断薬が房水産生を抑制すること（IOVS. 16:

623-4, 1977）、ウサギ前房水中のノルエピネフリンの濃度が眼圧と同期していること（IOVS. 32:2178-83, 1991）などから眼圧の日内変動制御に交感神経系が関わっていることが推察されている。

Aiharaらはマイクロニードル法により、マウスについても眼圧が明期に低く、暗期に高

くなる二相性の変動をしていることを報告した(Experimental Eye Res. 77:681-6, 2003)。我々は、マイクロニードル法により時計遺伝子である *Cry1*, *Cry2* 遺伝子ダブルノックアウトマウスの眼圧日内変動を測定した。その結果、*Cry1*, *Cry2* 遺伝子ダブルノックアウトマウスについては有意な眼圧変動が認められないことを発見し、眼圧の日内変動が時計遺伝子による中枢時計の支配を受けていることを報告した(IOVS. 47:2006: 4050-2)。

2. 研究の目的

眼圧の日内変動が中枢時計により支配されていることが解明されたが、具体的な制御機構は明らかではない。本研究では、中枢性の眼圧制御機構の解明を行うために、交感神経アドレナリン 1 および 2 受容体のダブルノックアウトマウスについて、眼圧の日内変動の測定を行い、眼圧の日内変動が消失するかどうかを検討した。

3. 研究の方法

実験動物

アドレナリン 1 および 2 受容体ダブルノックアウトマウス(1 2DK0)を米国の Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) より購入した。このマウスは、1 受容体遺伝子ノックアウトマウス(1 受容体遺伝子のアミノ酸翻訳開始点を含むコード領域の大部分がネオマイシン選択カセットに置き換えられている。PNAS. 93:7375-80, 1996)と、2 受容体遺伝子ノックアウトマウス(第4膜貫通領域にネオマイシン選択カセットが挿入され、機能する受容体ができない。JBC. 274: 16694-700, 1999)を交配して得られたダブルノックアウトマウスである(JBC. 274: 16701-8, 1999)。遺伝的背景には、C57BL/6J, DBA/2, FVB/N, CD-1, 129 マウスが含まれており、今回の研究では C57BL/6J をコントロールマウスとして用いた。当大学の動物研究施設で繁殖させ、8 週齢以降、30g 以上の雄を実験に用いた。

飼育室はタイマーで照明を切り替え、12 時間毎の明暗条件(明期 6:00~18:00)または 24 時間恒暗条件とした。室温は 22℃、食餌・飲水は自由とした。それぞれの照明条件には 2 週間以上順応させた。

ノックアウトマウス遺伝子の PCR

マウスの尾部先端を 2mm 切り取り、細かく裁断し、1XSSC, 1mM EDTA, 20mM Tris-HCl (pH8.0)、1%SDS 溶液 500 µl に入れ、56℃ で 2 時間インキュベートした。その後、プロテナーゼ K を 0.1mg/ml になるように加え 56

で一晩保温し、DNA を抽出した。50 µl の TE に融解し、これを鋳型として、

1 遺伝子については mADRB1F、mADRB1R、bGHF(ネオマイシン選択カセットに含まれているウシ成長ホルモン遺伝子)の 3 本のプライマーを用い(表 1)、KOD-plus- (東洋紡、大阪)により 1mM MgSO₄ 存在下で、94℃ 2 分、に続いて、98℃ 15 秒、68℃ 1 分の反応を 35 サイクル行った。2 遺伝子については、0.8mM

表 1 使用したプライマーの配列

| プライマー | 塩基配列 |
|---------|-----------------------|
| mADRB1F | ACTCGGCCTTCAACCCCATC |
| mADRB1R | TCCAGGGCTCCAGCAGGCGC |
| mADRB2F | GACCCTGTGCGTGATTGCAG |
| mADRB2R | GAAGAAGTCACAGCAAGTCTC |
| bGHF | GCATGCTGGGGATGCGGTG |

MgSO₄ 存在下で、mADRB2F、mADRB2R、bGHF を用い同様に 94℃ 2 分に続いて、98℃ 15 秒、63℃ 30 秒、68℃ 30 秒の反応を 35 サイクル行った。反応終了後、1.5%アガロース電気泳動、エチジウムブロマイドにより染色し、UV トランスイルミネーターで増幅された断片を確認した。

眼圧測定

麻酔はケタミン(100 mg/kg)とキシラジン(9 mg/kg)混合液の腹腔内投与にて行った。眼圧測定は Aihara らが報告したマイクロニードル法を用いた。中空のガラスキャピラリーから電熱プレーを用いて針状の先端を作り、研磨することによってベベルを作成しマイクロニードルとした。生理食塩水で内部を満たしたマイクロニードルをマウスの前房内に刺入し、圧トランスデューサーを介して PC でリアルタイムに波形を記録した。波形は PowerLab® System (ADI Instruments, NSW, Australia)により解析した。

組織学的解析

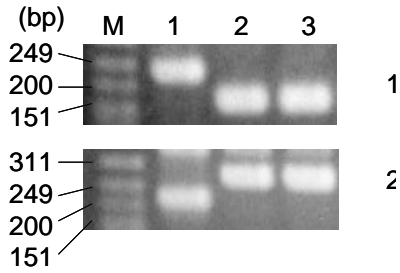
遺伝子改変により隅角、毛様体の構造変化が起きていないかを、光学顕微鏡と電子顕微鏡にて組織学的に検討した。光学顕微鏡用の標本は 4%パラホルムアルデヒド、0.5%グルタルアルデヒドで灌流固定し、ヘマトキシリンエオジン染色とトリイズンブルー染色を行い作成した。電子顕微鏡用の標本は 2.5%グルタルアルデヒドで灌流固定し、超薄切片を作成した。

4. 研究成果

ノックアウトマウスの遺伝子の確認

マウスの DNA の PCR により、1 に関しては、コントロールマウスで 237bp の遺伝子の増幅が見られたが(図 1 1、レーン 1)、1

図1 1、2遺伝子、ウシ成長ホルモンのプライマーによる遺伝子のPCR
 レーン1: C57BL/6J DNA
 レーン2、3: 1 2DKO マウス DNA



2DKO マウスではこの断片は見られず、171bpの断片が検出された(図1 1、レーン2、3)。2 に関して、コントロールマウスで217bpの断片が検出され(図1 2、レーン1)、1 2DKO マウスでは281bpの断片が検出された(図1 2、レーン2、3)。ダイレクトシーケンシングにより237bpの断片には1、217bpの断片には2、171bpと281bpの断片にはウシ成長ホルモン遺伝子と1、2のキメラの配列がそれぞれ検出され、購入したマウスが確かに1と2遺伝子の翻訳領域にネオマイシン選択カセットが挿入されたダブルノックアウトマウスであることが確認された。

1 2DKO マウスの眼圧日内変動

12時間毎の明暗条件下にノックアウトマウスの眼圧を9時から24時まで3時間毎に測定した(グループ1, n=11)。ノックアウトマウスで最も眼圧が低かったのは、15時で13.5 ± 1.5 mmHg (平均 ± 標準偏差)。最も高かったのは24時で18.7 ± 1.4 mmHgであり、明条件下で低く、暗条件下で高い有意な二相性の眼圧日内変動が見られた(Friedman rank sum test, $P < 0.001$) (図2)。変動幅は5.2 ± 1.3 mmHgを示した。それぞれのマウスについて最高眼圧・最低眼圧を示す時刻の分布をみると、最高眼圧は11眼中9眼が暗期の24:00に、最低眼圧は11眼中5眼が明期の15:00に認められ、両者の重複はなかった。(図3)。

日内変動で最高眼圧、最低眼圧を示した15時と24時の2点につき、12時間毎の明暗条件下の眼圧を測定した後、同じマウスを24時間恒暗条件下に移行させ、再び2週間以上順応させた後、同時刻に眼圧を測定した(グループ2, n=12)。12時間毎の明暗条件の眼圧は、15時で14.1 ± 1.4 mmHg、24時で17.6 ± 1.3だった。24時間恒暗条件に順応下では、15時で13.3 ± 1.2 mmHg、24時で18.1 ± 1.5 mmHgであり、24時間恒暗条件下でも、24時の眼圧は有意に高かった(Wilcoxon signed rank test, $P < 0.001$)。15時と24時の眼圧は、12時間毎

図2 12時間毎の明暗条件下における眼圧日内変動(グループ1, n=11)

A: 各マウスの眼圧日内変動(Friedman rank sum test, $P < 0.01$)
 B: 1 2DKO および C57BL/6J の眼圧日内変動(平均 ± 標準偏差)

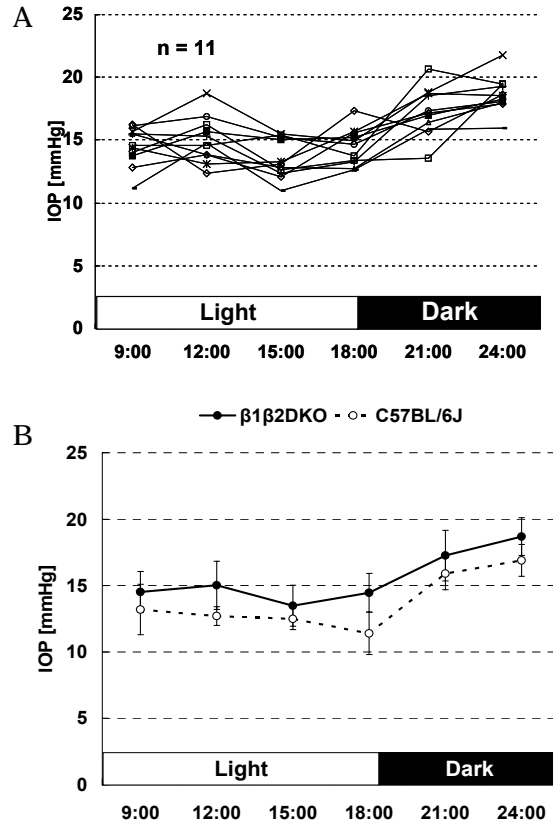
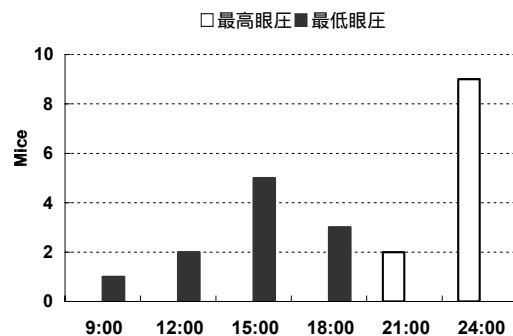


図3 12時間毎の明暗条件下における最高眼圧・最低眼圧を示す時刻の分布(グループ1, n=11)



の明暗条件下と24時間恒暗条件下の間で有意差を認めなかった(Mann-Whitney U-test)。前眼部の組織学的解析

ノックアウトマウスとコントロールマウスの前眼部の組織を光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察した。光学顕微鏡では隅角、毛様体の構造に大きな変化は見られなかった(図4)。電子顕微鏡でも上皮の二層構造、色素上皮内の色素顆粒に差は認めず、組織学的にはノック

図4 隅角・毛様体の光学顕微鏡像(×400) C57BL/6J(A, B) ダブルノックアウトマウス(C, D)

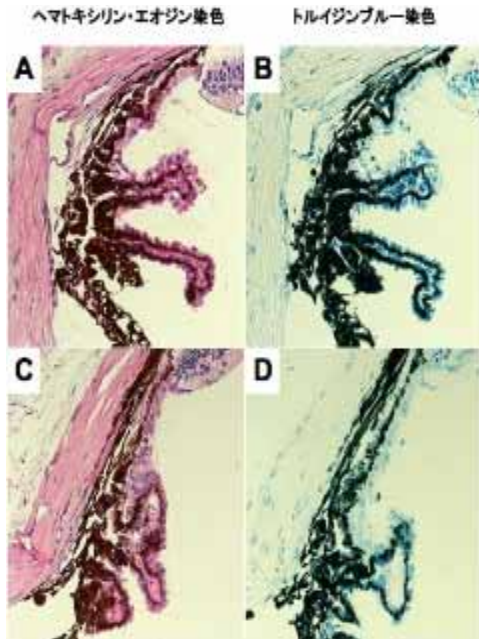
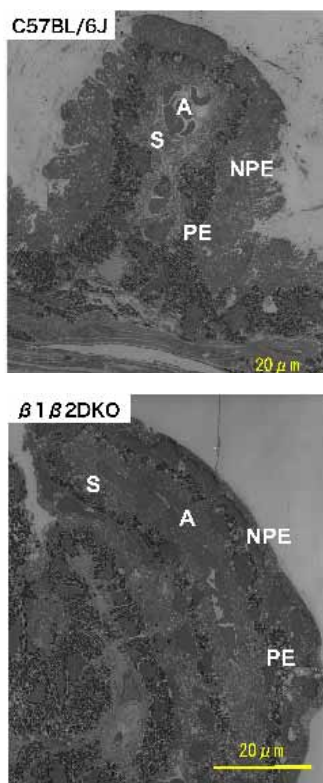


図5 毛様体突起の電子顕微鏡像
NPE: 無色素上皮、PE: 色素上皮、S: 間質、A: 毛細血管



アウトマウスとコントロールマウスに明らかな差は認められなかった(図5)。

以上の結果から、眼圧の日内変動は 1、

2 アドレナリン受容体を介さずに生じているか、あるいは、ノックアウトにより交感神経の他の受容体が代償している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10件)

- 1: Miyashita H, Tagawa S, Takeda H, Higashide T, Sugiyama K. Comparison between stereo angiographic findings and histopathologic findings in endotoxin-induced uveitis. *Current Eye Research*. 2009 (in press)、査読有
- 2: 高田祥平、新田耕治、棚橋俊郎、杉山和久、Superior segmental optic hypoplasia (SSOH) を含む神経低形成の2家系、*日眼会誌*、2009 (in press)、査読有
- 3: In vivo quantitative evaluation of rat retinal nerve fiber layer using optical coherence tomography. Nagata A, Higashide T, Ohkubo S, Takeda H, Sugiyama K. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 (in press)、査読有
- 4: Takayasu disease on the centenary of its discovery. Sugiyama K, Ijiri S, Tagawa S, Shimizu K. *Jpn J Ophthalmol*. 2009 53(2):81-91. 査読有
- 5: A thin honeycomb-patterned film as an adhesion barrier in an animal model of glaucoma filtration surgery. Okuda T, Higashide T, Fukuhira Y, Sumi Y, Shimomura M, Sugiyama K. *J Glaucoma*. 2009 18(3):220-6. 査読有
- 6: Association of Toll-like receptor 4 gene polymorphisms with normal tension glaucoma. Shibuya E, Meguro A, Ota M, Kashiwagi K, Mabuchi F, Higashide T, Sugiyama K (他19名19、20番目) *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 49(10):4453-7. 査読有
- 7: Discrepancy of the intraocular pressure response between fellow eyes in one-eye trials versus bilateral treatment: verification with normal subjects. Takahashi M, Higashide T, Sakurai M, Sugiyama K. *J Glaucoma*. 2008 17(3):169-74. 査読有
- 8: Phorbol 12-myristate 13-acetate-activated protein kinase C increased migratory activity of

subconjunctival fibroblasts via stress-activated protein kinase pathways. Nomura N, Nomura M, Takahira M, Sugiyama K. Mol Vis. 2007 21;13:2320-7. 査読有
9: A pilot study to detect glaucoma with confocal scanning laser ophthalmoscopy compared with nonmydriatic stereoscopic photography in a community health screening. Ohkubo S, Takeda H, Higashide T, Sasaki T, Sugiyama K. J Glaucoma. 2007 16(6):531-8. 査読有
10: Association between genetic polymorphisms of the prostaglandin F2alpha receptor gene and response to latanoprost. Sakurai M, Higashide T, Takahashi M, Sugiyama K. Ophthalmology. 2007 114(6):1039-45. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

1: Sugiyama K, SLT as adjunctive therapy for open-angle glaucoma, WOC 2008 annual meeting in Hong Kong, July 1, 2008, Grand Hyatt hotel Hong Kong
2: Nagata A, Higashide T, Ohkubo S, Takeda H, Sugiyama K. (他 3 名、2 番目、8 番目) In vivo quantitative evaluation of rat retinal nerve fiber layer using optical coherence tomography, ARVO annual meeting 2008, May 1, 2008, Fort Lauderdale, Florida
3: 長田敦、東出朋巳、大久保真司、武田久、中川亨、長谷川倫郎、杉山和久、光干渉断層計によるラット網膜神経線維層の生体内定量的評価の試み、第 112 回日本眼科学会総会、パシフィコ横浜、2008 年 4 月 18 日
4: Sugiyama K, Glaucoma Screening, Asian Oceanic Glaucoma Society 2007 Bangkok, Dec 2, 2007, The central world convention center Bankok
5: 杉山和久、時計遺伝子と眼圧概日リズム、日本睡眠学会第 32 回定期学術集会・第 14 回日本時間生物学会学術大会合同大会、2007 年 11 月 7 日、京王プラザホテル
6: 杉山和久、PG 関連薬の現状と未来-臨床-第 18 回日本緑内障学会・第 27 回日本眼薬理学会合同シンポジウム、2007 年 9 月 16 日、長良川国際会議場
7: Ohkubo S, Takeda H, Higashide T, Sasaki T, Sugiyama K, A pilot study to detect glaucoma with confocal scanning laser ophthalmoscopy compared to nonmydriatic stereoscopic photography in a community health screening, ARVO annual meeting 2007, May 8, 2007, Fort Lauderdale,

Florida
8: Okuda T, Higashide T, Fukuhira Y, Sumi Y, Sugiyama K. The effectiveness of a honeycomb-patterned film as membrane adhesion barriers in animal model of glaucoma filtration surgery, ARVO annual meeting 2007, May 6, 2007, Fort Lauderdale, Florida
9: 桜井真由美、川瀬和秀、高橋真美、高延琳、東出朋巳、杉山和久、健常人における眼圧と
-アドレナリンレセプター遺伝子多型の解析、第 111 回日本眼科学会総会、2007 年 4 月 20 日、大阪国際会議場
10: 奥田徹彦、東出朋巳、福平由佳子、鷺見芳彦、杉山和久、honeycomb-patterned film を使用した実験的濾過手術の有用性、第 111 回日本眼科学会総会、2007 年 4 月 19 日、大阪国際会議場

6 . 研究組織

(1)研究代表者

杉山 和久 (Sugiyama Kazuhisa)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号 : 80179168

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

樋田 一徳 (Toida Kazunori)
川崎医科大学・解剖学・教授
研究者番号 : 40253405
東出 朋巳 (Higashide Tomomi)
金沢大学・附属病院・講師
研究者番号 : 20291370
桜井 真由美 (Sakurai Mayumi)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号 : 50303269