

令和 5 年 4 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09827

研究課題名(和文) アルドステロンによって誘発される網膜神経節細胞死と神経保護療法の開発

研究課題名(英文) The loss of retinal ganglion cells after administration of aldosterone and development of neuroprotective therapy

研究代表者

廣岡 一行 (Hirooka, Kazuyuki)

広島大学・病院(医)・准教授

研究者番号：10325350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ラットに生理食塩水(生食)を飲水させることで、高血圧モデルを作製した。アルドステロンを浸透圧ポンプに入れ、皮下に埋め込み全身投与した。エプレノンとヒドララジンをを用いて降圧薬の効果を調べた。アルドステロン投与6週後に網膜神経節細胞数(RGC)をカウントした。生食投与の有無に関わらず、アルドステロン投与でRGCは有意に減少した。エプレノンあるいはヒドララジンを投与することで血圧の低下を認めたが、RGC(/mm²)はエプレノン投与でのみ保護された。アルドステロンによる網膜神経節細胞死は血圧による影響を受けず、エプレノンの神経保護効果は降圧によらないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血漿アルドステロン濃度が高いと血圧や眼圧に依存せずに、網膜神経節細胞死をもたらすことが明らかとなった。またこの結果を支持する結果として、血管拡張薬で血圧を下げて網膜神経節細胞死には影響を及ぼさないが、アルドステロンのミネラルコルチコイド受容体に対する作用を抑える薬剤であるミネラルコルチコイド受容体拮抗薬で血圧を下げると網膜神経節細胞死は抑制された。

研究成果の概要(英文)：Aldosterone was administered systemically in Sprague-Dawley rats. The rats were free access to saline (0.9% NaCl) or water. Eplerenone, mineralocorticoid receptor (MR) antagonist, and hydralazine, vasodilator, were used to determine the effect of antihypertensive drugs on retinal ganglion cell (RGC) loss. Blood pressure was significantly increased in saline intake with or without aldosterone. RGC was significantly decreased in aldosterone treated rats. However, blood pressure did not affect the RGC loss. Administration of eplerenone or hydralazine in aldosterone treated rat with water instead saline significantly reduced blood pressure. The number of RGC (cells/mm²) was 1868±177 and 1554±34 with eplerenone and hydralazine treated rats, respectively.

The RGC loss observed in experimental aldosterone hypertension rat was blood pressure independent loss. Furthermore, MR antagonist has neuroprotective effects independent of IOP or blood pressure.

研究分野：緑内障

キーワード：緑内障 アルドステロン ミネラルコルチコイド受容体 神経保護

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 原発性アルドステロン症は高血圧の 4-10%の原因となると報告されており、日本における高血圧の患者数は 4000 万人とされていることから、その有病率は決して少なくはない。疫学調査では緑内障の発症の危険因子に高血圧が挙げられているが、この高血圧はアルドステロン症によるものなのか本態性高血圧なのか分類されていない。そのため単に血圧が高いことが緑内障と関連しているのか、それとも血漿中のアルドステロン濃度が高いことが関連しているのか不明である。

(2) ラットにアルドステロンを全身投与すると乳頭周囲の網膜血流速度が低下することを明らかにした。¹⁾ 動物実験の結果とヒトとの結果ではしばしば乖離が生じることを経験する。ラットにアルドステロンを投与するモデルはヒトでは原発性アルドステロン症と同じような状態になる。原発性アルドステロン患者では乳頭周囲の網膜血流速度がどのようになっているのかは不明である。

2. 研究の目的

アルドステロンによる網膜神経節細胞死のメカニズムを解明していくために、研究期間内に血圧と網膜神経節細胞障害の関係、原発性アルドステロン症患者における乳頭周囲の網膜血流速度、の 2 つに大別して研究を進めていく。

(1) 血圧と網膜神経節細胞障害の関係

アルドステロンを全身投与することにより眼圧上昇を伴うことなく網膜神経節細胞のみが障害を受け、正常眼圧緑内障と同じような病態になることを明らかにしたが、²⁾ 本動物モデルでは食塩を投与していないため、血圧の上昇は認めなかった。しかし、原発性アルドステロン症は高血圧を伴うため、よりヒトの原発性アルドステロン症に近い病態にするためには、食塩水を投与することによりラットの血圧を上昇させる必要がある。そしてアルドステロンのみでなく血圧が上昇することにより網膜神経節細胞がどのように影響を受けるのかを明らかにする必要がある。

(2) 原発性アルドステロン症患者における乳頭周囲網膜血流速度

緑内障の病態の 1 つに乳頭周囲の網膜血流速度の低下が考えられている。ラットにアルドステロンを全身投与すると眼圧非依存性に網膜神経節細胞死が生じるが、本モデルでは乳頭周囲の網膜血流速度が低下した。原発性アルドステロン患者では乳頭周囲の網膜血流速度がどのようになっているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 血圧と網膜神経節細胞障害の関係

アルドステロンを全身投与する群と基剤を全身投与する群にわけ、さらにそれぞれ飲水として蒸留水を投与する群と生理食塩水(生食)を投与する群の計 4 群にわけた。80 µg/kg/day アルドステロン及び基剤を浸透圧ポンプに注入し、皮下に埋め込むことにより全身投与した。投与前と投与後 6 週まで 1 週間毎に血圧と眼圧を測定した。眼圧はトノラボ手持ち眼圧計を用い、血圧はラット・マウス用非観血式自動血圧測定装置を用いて tail-cuff 法で測定した。6 週後に血中アルドステロン濃度の測定と網膜神経節細胞数をカウントした。上丘に FluoroGold を注入することにより逆行性に網膜神経節細胞を染色し、網膜伸展標本を作製し、網膜神経節細胞数をカウントした。また高血圧の治療薬であるエプレノン(ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬)とヒドララジン(血管拡張薬)を用いて降圧薬の効果を調べた。

(2) 原発性アルドステロン症患者における乳頭周囲網膜血流速度

内分泌内科で原発性アルドステロン症と診断のついた患者を対象とする。Laser Speckle Flowgraphy (LSFG)を用いて眼血流速度を測定する。スペckルパターン時間速度変化を算出することで、血流速度を反映する mean blur rate (MBR) というパラメータを得ることができる。MBR は血流速度の相対値と考えられており、視神経乳頭組織 MBR (MBR-T) は、絶対値として個人間比較に使用できる可能性があり、視神経乳頭深部血流速度を反映していることから、今回は MBR-T を用いた。LSFG Micro による眼底血流測定を同一測定時間で連続 3 回測定する。その後 LSFG Micro で撮影されたスペckル画像を LSFG 解析ソフト、LSFG Analyzer を用いて視神経乳頭微小循環の解析を行う。解析範囲は撮影から作成された血流マップから視神経乳頭中央を中心とした円形指定領域(ラバーバンド) 直径 230 ピクセルの範囲とする。次に LSFG Analyzer に備わっている血管抽出解析機能を用い、乳頭内の大血管 MBR を自動的に除外する。対象は緑内障を含む眼疾患のない眼とした。更にコントロール眼は高血圧の既往のない眼とした。LSFG 測定時に眼圧と血圧を測定した。また眼底写真を撮影し、乳頭面積・陥凹面積・β-PPA 面積を算出した。眼軸長が 27mm 以上、眼圧が 21 mmHg を超える眼は除外した。

4. 研究成果

(1) 血圧と網膜神経節細胞障害の関係

血圧は生食を飲水させることにより上昇したが、アルドステロン投与のみでは上昇しなかった。網膜神経節細胞数 (/mm²) はアルドステロン(-) /生食(-)、アルドステロン(-) /生食(+), アルドステロン(+)/生食(-)、アルドステロン(+)/生食(+)でそれぞれ 1981 ± 109、2008 ± 185、1581 ± 56、1555 ± 46 であり、生食投与の有無に関わらず、アルドステロン投与で有意に減少し

た ($P < 0.001$: ANOVA)。アルドステロン (+) /生食 (+) にエプレノンあるいはヒドララジンを投与することで血圧の低下を認めたが、網膜神経節細胞数 (/mm²) はヒドララジン投与で 1554 ± 34 、エプレノン投与で 1868 ± 177 であった ($P=0.01$: t 検定)。全てのモデルで眼圧の上昇は認めなかった。

以上の結果からアルドステロンによる網膜神経節細胞死は血圧による影響を受けず、エプレノンの神経保護効果は降圧によるものでなく、ミネラルコルチコイド受容体を阻害することによる可能性が示唆された。

(2) 原発性アルドステロン症患者における乳頭周囲網膜血流速度

正常: 61 例 61 眼、原発性アルドステロン症: 17 例 29 眼が対象となった (表 1)

表 1

	正常	原発性アルドステロン症	P 値
眼数/症例	61/61	29/17	
年齢 (歳)	51.1 ± 1.5	53.3 ± 2.1	0.40
性別(男/女)	13/49	7/10	0.10
収縮期血圧 (mmHg)	107.0 ± 2.2	134.1 ± 4.0	<0.001
拡張期血圧 (mmHg)	62.9 ± 1.6	84.8 ± 2.8	<0.001
平均血圧 (mmHg)	77.6 ± 1.8	101.0 ± 2.5	<0.001
眼圧 (mmHg)	12.0 ± 0.4	14.2 ± 0.5	0.001
眼軸長 (mm)	24.6 ± 0.2	24.5 ± 0.3	0.84
乳頭面積 (mm ²)	1.96 ± 0.06	2.36 ± 0.08	<0.001
陥凹面積 (mm ²)	0.70 ± 0.05	0.95 ± 0.07	0.003
β -PPA 面積 (mm ²)	0.35 ± 0.06	0.30 ± 0.09	0.64

MBR-T の測定値に平均血圧、乳頭面積、 β -PPA 面積を考慮したところ、原発性アルドステロン症で 12.3 ± 0.3 、正常で 10.8 ± 0.4 であった ($P=0.046$)。また MBR-T に影響を及ぼす因子について多変量解析したところ原発性アルドステロン症と β -PPA 面積であった。また原発性アルドステロン症患者のみでみた場合、血漿中アルドステロン濃度と乳頭周囲の網膜血流速度には相関を認めなかった。

今回の研究結果から原発性アルドステロン症患者では、乳頭周囲の網膜血流速度が低下していることが明らかになった。

< 引用文献 >

- 1) Wada Y, Higashide T, Sakaguchi K, Nagata A, Hirooka K, Sugiyama K. Compromised blood flow in the optic nerve head after systemic administration of aldosterone in rats: A possible rat model of retinal ganglion cell loss. *Curr Eye Res* 47:777-785, 2022
- 2) Nitta E, Hirooka K, Tenkumo K, et al. Aldosterone: a mediator of retinal ganglion cell death and the potential role in the pathogenesis in normal-tension glaucoma. *Cell Death Dis* 4;4:e711, 2013.

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 2件）

1. 著者名 Kazuyuki Hirooka, Yoshiaki Kiuchi	4. 巻 11
2. 論文標題 The retinal renin-angiotensin-aldosterone system: implications for glaucoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox11040610	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 Yasuyoshi Wada, Tomomi Higashide, Kimikazu Sakaguchi, Atsushi Nagata, Kazuyuki Hirooka, Kazuhisa Sugiyama	4. 巻 -
2. 論文標題 Compromised Blood Flow in the Optic Nerve Head after Systemic Administration of Aldosterone in Rats: A Possible Rat Model of Retinal Ganglion Cell Loss	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Eye Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/02713683.2022.2029907	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 -

〔学会発表〕 計0件

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

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
---------	---------