

令和 6 年 4 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09736

研究課題名(和文) 網膜グリア細胞をターゲットとした神経保護治療への発展

研究課題名(英文) Development of neuroprotective therapy targeting retinal glial cells

研究代表者

檜森 紀子(Himori, Noriko)

東北大学・医工学研究科・准教授

研究者番号：20705230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアComplex I阻害剤ロテノンを使用し、酸化ストレスに脆弱なNrf2ノックアウト(KO)マウス網膜への影響を調べた。RT-PCRではロテノンを投与したNrf2 KOマウス群において、野生型と比較してGfap、Vimentinの発現上昇を認め、免疫染色ではGFAPのシグナル増強を認めた。野生型と比較し、Nrf2 KOマウスのミュラー細胞の生存率はロテノン存在下で有意に低く、ロテノン30、100 μM下のミュラー細胞内ROSは有意に増加した。また、ロテノン投与6、24時間後のNrf2 KOマウスのミュラー細胞において神経栄養因子(Bdnf、Fgf2)の有意な発現上昇を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化ストレスに脆弱なNrf2 ノックアウト(KO)マウスを用い、ミトコンドリア電子伝達系Complex I阻害剤ロテノンによる酸化ストレスの網膜への影響を検討した。ロテノン存在下、Nrf2 KOマウスのミュラー細胞では神経栄養因子の発現が増加し、神経保護に寄与することが示唆された。酸化ストレス下のマウス網膜において、野生型ではKeap1-Nrf2を介した抗酸化機構が働き、一方Nrf2 KOマウスではグリア細胞において神経栄養因子の発現が増加して神経保護に影響すると考えられ、緑内障患者における病態解明に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：We used the mitochondrial Complex I inhibitor rotenone to examine its effects in Nrf2 knockout (KO) mice, which are vulnerable to oxidative stress. RT-PCR showed increased expression of Gfap and Vimentin in the rotenone-administered Nrf2 KO mouse group compared to the wild-type(WT) mice. Immunostaining showed increased GFAP in Nrf2 KO mice than WT mice. The survival rate of Muller cells in Nrf2 KO mice was significantly lower under rotenone. ROS level in Muller cells of Nrf2 KO mice increased significantly under rotenone 30 and 100μM. Furthermore, there is a significant increase in the expression of neurotrophic factors (Bdnf, Fgf2) was in 6 and 24 hours after rotenone administration.

研究分野：緑内障

キーワード：酸化ストレス ミトコンドリア障害 グリア細胞 Nrf2

## 1. 研究開始当初の背景

現在緑内障に対してエビデンスのある治療は眼圧下降である。実臨床では視野の保持に有用とされる 30%の眼圧下降を呈していながら視野進行を認める症例が多く、眼圧下降治療は限界を迎えている。緑内障の基本病態である網膜神経節細胞死に関わる障害因子として軸索障害、慢性虚血（グルタミン酸障害）、血流障害、一酸化窒素、ミトコンドリア障害、酸化ストレスがあげられる。私は中でも酸化ストレスをターゲットに研究を進めている。

ミトコンドリアは ATP を産生する際に副産物である活性酸素が亢進するとミトコンドリア機能不全を来すと考えられる。ミトコンドリア機能障害によって ATP 合成が低下すると、エネルギー産生が不十分となり、チトクロム C や apoptosis inducing factor が放出され網膜神経節細胞死が誘導される。またミトコンドリア障害による活性酸素の増加は蛋白などの変性を生じグリア活性化、グリアタンパク酸化等により網膜神経節細胞への神経栄養因子のサポートが減少すると、網膜神経節細胞死が生じると考えられる。多因子疾患と捉えられている緑内障に対して酸化ストレス発生の主体と考えられるミトコンドリア障害が緑内障治療のターゲットとなりうるか検証することは緑内障病態解明につながる可能性が高いことが予測されている。

緑内障における眼圧非依存的な危険因子として、上記に挙げたもの以外に、女性ホルモンの影響が報告されている。閉経後の女性は閉経前の女性と比較して緑内障の罹患率が 2.6 倍高いことが明らかになり、女性ホルモンの減少が緑内障の発症リスクとなる可能性が指摘されている。過去の報告において、株化ヒトミユラー細胞に対して過酸化水素水で誘導される細胞死をエストラジール(E<sub>2</sub>)が抑制を示すことが報告されており、このことから、E<sub>2</sub>が網膜神経節細胞死を抑制するメカニズムとして、ミユラー細胞を介した経路が存在する可能性も考えられる。IL-6 は代表的な炎症性サイトカインの一つであり、正常眼圧緑内障患者において血清 IL-6 が増加していること、IL-6 欠損マウスでは軸索切断による網膜神経節細胞死が抑制されることなどから、IL-6 が緑内障病態に関与していることが示唆されている。

## 2. 研究の目的

緑内障剖検眼により網膜グリア細胞の活性化が認められ、また酸化ストレスによる緑内障モデル動物において、神経障害がまだ認められない早期の段階で網膜グリア細胞の活性化を認めることから、酸化ストレスの網膜グリア細胞に与える影響が緑内障病態に中心的な役割をはたしている可能性がある。我々は酸化ストレス応答の鍵となる Keap1-Nrf2 システムに注目した。

ミトコンドリア障害は酸化ストレスの発生源として知られていることから、電子伝達系 Complex I 阻害によるミトコンドリア障害について酸化ストレス暴露時に Nrf2 ノックアウト (KO) マウスと野生型マウスにおける神経保護因子・抗酸化酵素分泌メカニズムの違いなどの視点から、酸化ストレスとグリア細胞の分子基盤を明らかにする。

ミユラー細胞は炎症性サイトカインのソースでもあり、IL-1 刺激で多量の IL-6 を分泌する。そこで、E<sub>2</sub>によるミユラー細胞における IL-1β 誘導性 IL-6 抑制効果につい

て Nrf2 の関連についてマウス動物モデルを用いて検討し、網膜グリア細胞をターゲットとした神経保護治療への発展を目指す。

### 3. 研究の方法

8 週齢の野生型マウスと Nrf2 KO マウスにロテノン (30 mg/kg) または 0.5 % carboxymethyl cellulose(コントロール)を 30 日間経口投与し、網膜神経節細胞(RGC) 数計測、網膜 RT-PCR、グリア細胞の免疫染色を施行した。生後 5-8 日の野生型及び Nrf2 KO マウスからミユラー細胞を調製しロテノン (3-100  $\mu$ M) 投与下の細胞生存率と活性酸素分子種 (ROS) 量を alamarBlue assay、CellROX Green 染色で調べた。ロテノン 30  $\mu$ M 下の神経栄養因子の遺伝子発現を時間毎にリアルタイム PCR で検討した。

また、ミユラー細胞を初代培養し、IL-1 で刺激 24 時間後、培養上清中の IL-6 濃度を ELISA 法で測定した。神経保護効果を持つと報告されている 17  $\beta$ -エストラジオール ( $E_2$ )と ERB-041 (ER アゴニスト)の IL-6 抑制効果を野生型と Nrf2KO ミユラー細胞において比較した。

### 4. 研究成果

野生型・Nrf2 KO マウスともロテノン投与群でコントロールと比べ RGC 数では有意差を認めなかったが、網膜グリア細胞マーカー検討において RT-PCR ではロテノンを投与した Nrf2 KO マウス群において、野生型と比較して Gfap、Vimentin の発現上昇を認め ( $P=0.02$ 、 $P < 0.01$ )、免疫染色では GFAP のシグナル増強を認めた。野生型と比較し Nrf2 KO マウスのミユラー細胞の生存率はロテノン存在下で有意に低く ( $P < 0.05$ )、ロテノン 30、100  $\mu$ M 下のミユラー細胞内 ROS は有意に増加した ( $P < 0.05$ )。また、ロテノン投与 6、24 時間後の Nrf2 KO マウスのミユラー細胞において神経栄養因子(Bdnf、Fgf2) の有意な発現上昇を認めた ( $P < 0.05$ )。

$E_2$  0  $\mu$ M に対する  $E_2$  50  $\mu$ M の IL-1 刺激による IL-6 分泌抑制率は、Nrf2KO ミユラー細胞の方が野生型よりも有意に高かった ( $7.8 \pm 4.7\%$  vs  $27.0 \pm 3.8\%$ 、 $P < 0.001$ )。Nrf2KO のミユラー細胞の方が野生型と比べエストロゲン受容体 (ER) の発現は  $8.4 \pm 3.5$  倍と有意に高値であった ( $P < 0.05$ )。10  $\mu$ M ERB-041 下での IL-1 刺激による IL-6 分泌抑制率は、野生型と比較し Nrf2KO のミユラー細胞では有意に高値であった ( $4.9 \pm 7.1\%$  vs  $15.8 \pm 6.4\%$ 、 $P < 0.05$ )。

以上により本研究において、眼圧非依存性緑内障患者、特にミトコンドリア障害や酸化ストレスに脆弱な緑内障症例に対する病態解明につながる結果、ER を介した緑内障の新たな治療薬につながる結果を得られたと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 19件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 16件）

1. 著者名 Himori N, Kunikata H, Nakazawa T.	4. 巻 43
2. 論文標題 Preliminary evidence of the effects of a novel antioxidant supplement in reducing oxidative stress in patients with senile cataract.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 3031-3034
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10792-023-02728-9.	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 Himori Noriko, Kunikata Hiroshi, Nakazawa Toru	4. 巻 43
2. 論文標題 Preliminary evidence of the effects of a novel antioxidant supplement in reducing oxidative stress in patients with senile cataract	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 3031 ~ 3034
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10792-023-02728-9	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 Inoue-Yanagimachi Maki, Himori Noriko, Uchida Keiko, Tawarayama Hiroshi, Sato Kota, Yamamoto Masayuki, Namekata Kazuhiko, Harada Takayuki, Nakazawa Toru	4. 巻 226
2. 論文標題 Changes in glial cells and neurotrophic factors due to rotenone-induced oxidative stress in Nrf2 knockout mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 109314 ~ 109314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exer.2022.109314	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 Yoshida Masaaki, Yokoyama Yu, Kokubun Taiki, Tsuda Satoru, Himori Noriko, Maekawa Shigeto, Yokokura Shunji, Hariya Takehiro, Kobayashi Wataru, Hashimoto Kazuki, Nakazawa Toru	4. 巻 -
2. 論文標題 Long-Term Surgical Outcomes and Possible Postoperative Complication with Severe Corneal Endothelial Cell Loss After Trabeculectomy for Cytomegalovirus-Associated Anterior Uveitis with Secondary Glaucoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Ocular Immunology and Inflammation	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09273948.2023.2197497	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 Sato Kota, Takada Naoko, Fujioka Amane, Himori Noriko, Yokoyama Yu, Tsuda Satoru, Omodaka Kazuko, Kiriwara Tomoko, Ishikawa Makoto, Kunikata Hiroshi, Nakazawa Toru	4. 巻 32
2. 論文標題 Reduced Plasma BDNF Levels in Normal Tension Glaucoma Compared to Open Angle Glaucoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Glaucoma	6. 最初と最後の頁 734 ~ 737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IJG.0000000000002257	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 Tawarayama Hiroshi, Umeki Kota, Inoue-Yanagimachi Maki, Takahashi Naoki, Hasegawa Hirokazu, Himori Noriko, Tsuda Satoru, Kunikata Hiroshi, Akaike Takaaki, Nakazawa Toru	4. 巻 13
2. 論文標題 Glutathione trisulfide prevents lipopolysaccharide-induced retinal inflammation via inhibition of proinflammatory cytokine production in glial cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11513-11513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-38696-4	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 Yoshida Masaaki, Kokubun Taiki, Sato Kota, Tsuda Satoru, Yokoyama Yu, Himori Noriko, Nakazawa Toru	4. 巻 64
2. 論文標題 DPP-4 Inhibitors Attenuate Fibrosis After Glaucoma Filtering Surgery by Suppressing the TGF- /Smad Signaling Pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 2 ~ 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.64.10.2	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 Takahashi Naoki, Omodaka Kazuko, Kikawa Tsutomu, Ninomiya Takahiro, Kiyota Naoki, Tsuda Satoru, Himori Noriko, Nakazawa Toru	4. 巻 12
2. 論文標題 Factors Associated With Visual Acuity Decline in Glaucoma Patients With Loss of Ganglion Cell Complex Thickness	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Translational Vision Science & Technology	6. 最初と最後の頁 2 ~ 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/tvst.12.7.2	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 Sato Masataka, Yasuda Masayuki, Takahashi Nana, Hashimoto Kazuki, Himori Noriko, Nakazawa Toru	4. 巻 18
2. 論文標題 Sex differences in the association between systemic oxidative stress status and optic nerve head blood flow in normal-tension glaucoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0282047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0282047	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 Tawarayama Hiroshi, Hirata Yoshiyuki, Uchida Keiko, Himori Noriko, Uesato Shinichi, Nakazawa Toru	4. 巻 793
2. 論文標題 Isozyme-specific histone deacetylase 1/2 inhibitor K560 attenuates oxidative stress-induced retinal cell death	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 136978 ~ 136978
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2022.136978	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 Sato Masataka, Kiyota Naoki, Yabana Takeshi, Maekawa Shigeto, Tsuda Satoru, Omodaka Kazuko, Himori Noriko, yokoyama Yu, Nakazawa Toru	4. 巻 262
2. 論文標題 The association between intraocular pressure dynamics during dark-room prone testing and intraocular pressure over a relatively long-term follow-up period in primary open-glaucoma patients	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 949 ~ 956
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-023-06257-0	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 Inoue-Yanagimachi M, Himori N, Uchida K, Tawarayama H, Sato K, Yamamoto M, Namekata K, Harada T, Nakazawa T.	4. 巻 226
2. 論文標題 Changes in glial cells and neurotrophic factors due to rotenone-induced oxidative stress in Nrf2 knockout mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research.	6. 最初と最後の頁 109314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2022.109314.	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 -

1. 著者名 Tawarayama H, Hirata Y, Keiko U, Himori N, Uesato S, Nakazawa T.	4. 巻 793
2. 論文標題 Isozyme-specific histone deacetylase 1/2 inhibitor K560 attenuates oxidative stress-induced retinal cell death.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Letter	6. 最初と最後の頁 106978
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2022.136978.	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 -

1. 著者名 Tawarayama H, Inoue-Yanagimachi M, Himori N, Nakazawa T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Glial cells modulate retinal cell survival in rotenone-induced neural degeneration.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 11159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-90604-w.	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 Akaishi T, Himori N, Takeshita T, Misu T, Takahashi T, Takai Y, Nishiyama S, Fujimori J, Ishii T, Aoki M, Fujihara K, Nakazawa T, Nakashima I.	4. 巻 56
2. 論文標題 Five-year visual outcomes after optic neuritis in anti-MOG antibody-associated disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mult Scler Relat Disord.	6. 最初と最後の頁 103222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.msard.2021.103222.	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 -

1. 著者名 Himori N, Inoue Yanagimachi M, Omodaka K, Shiga Y, Tsuda S, Kunikata H, Nakazawa T.	4. 巻 15
2. 論文標題 The Effect of Dietary Antioxidant Supplementation in Patients with Glaucoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 2293-2300.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/OPHTH.S314288.	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 Akaishi T, Himori N, Takeshita T, Fujihara K, Misu T, Takahashi T, Fujimori J, Ishii T, Aoki M, Nakazawa T, Nakashima I.	4. 巻 11
2. 論文標題 Optic neuritis after ocular trauma in anti-aquaporin-4 antibody-positive neuromyelitis optica spectrum disorder.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Behav.	6. 最初と最後の頁 e02083.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/brb3.2083.	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 Sato K, Sato T, Ohno-Oishi M, Ozawa M, Maekawa S, Shiga Y, Yabana T, Yasuda M, Himori N, Omodaka K, Fujita K, Nishiguchi KM, Ge S, Nakazawa T.	4. 巻 213
2. 論文標題 CHOP deletion and anti-neuroinflammation treatment with hesperidin synergistically attenuate NMDA retinal injury in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp Eye Res	6. 最初と最後の頁 108826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2021.108826	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 Himori N, Nakazawa T.	4. 巻 259
2. 論文標題 Response to the letter re "CPAP therapy reduces oxidative stress in patients with glaucoma and OSAS and improves the visual field".	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 1081-1082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-020-04824-3.	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4件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 檜森 紀子
2. 発表標題 目磨き文化の醸成として緑内障発活動の試み
3. 学会等名 第34回日本緑内障学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 檜森紀子
2. 発表標題 全身循環系における細胞間ネットワーク
3. 学会等名 日本緑内障学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 檜森紀子
2. 発表標題 今後の高齢者診療におけるAI・科学技術の活用
3. 学会等名 第63回日本老年医学会学術集会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 檜森紀子
2. 発表標題 Normal tension glaucoma: causes and treatments “Oxidative stress”
3. 学会等名 第32回日本緑内障学会（招待講演）
4. 発表年 2021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
研究 分担者	中澤 徹  (Nakazawa Toru)  (30361075)	東北大学・医学系研究科・教授   (11301)	

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