

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09739

研究課題名(和文) 眼圧日内変動に対するメラトニン系の役割の解明

研究課題名(英文) The role of endogenous melatonin in the diurnal variation of intraocular pressure

研究代表者

東出 朋巳 (Higashide, Tomomi)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：20291370

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)：眼圧日内変動に対するメラトニン系の役割を臨床と基礎の両面から検討した。無治療原発開放隅角緑内障患者の24時間眼圧日内変動をコンタクトレンズセンサーにて測定し、メラトニン関連遺伝子などの遺伝子多型との関連を調べた。メラトニン合成酵素の1つであるAANATのrs3760138の遺伝子多型とCLS頂点相には有意な関連があった。一方、コンジェニックな内因性メラトニン産生マウス(Aanat(+/+);Hiomt(+/+))とメラトニン欠損マウス(Aanat(-/-);Hiomt(-/-))を作成し、眼圧日内変動を測定した。内因性メラトニン産生によって明期と暗期との眼圧差の縮小が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メラトニン合成酵素の1つであるAANATの遺伝子多型と眼圧日内変動との関連を初めて明らかにした。概日リズムの出力系であるメラトニン産生が眼圧日内変動の関連因子の一つである可能性が示唆された。実験動物用マウスの多くはメラトニン合成能が欠如しているため、眼圧日内変動に対する内因性メラトニンの影響は不明であった。本研究によって内因性メラトニン産生の有無の影響についてコンジェニックなマウスでの検討が可能となった。内因性メラトニン産生は眼圧日内変動を抑えることが初めて明らかとなった。今後、内因性メラトニンの緑内障に対する影響やメラトニンおよび関連物質の緑内障治療薬としての可能性の解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the role of the melatonin system in the diurnal variation of intraocular pressure, from both clinical and basic perspectives. We investigated the circadian variation in 24-hour intraocular pressure in patients with untreated primary open-angle glaucoma using a contact lens sensor (CLS) and examined its association with genetic polymorphisms in various genes including melatonin-related genes. There was a significant association between the rs3760138 gene polymorphism of AANAT, one of the enzymes responsible for melatonin synthesis, and the acrophase of CLS measurements. By crossing both B6J.MSM-Aanat and B6J.MSM-Hiomt mice, congenic mice with endogenous melatonin production (Aanat(+/+);Hiomt(+/+)) and without melatonin production (Aanat(-/-);Hiomt(-/-)) were created. As a result of measuring 24-hour intraocular pressure fluctuations in both mice, endogenous melatonin production reduces the intraocular pressure variation between the light and dark periods.

研究分野：眼科学

キーワード：メラトニン Annat Hiomt マウス 眼圧 松果体 網膜

## 1. 研究開始当初の背景

眼圧日内変動は概日リズムを呈する生体現象であるため、概日リズムの機序が眼圧日内変動に及ぼす影響が長年研究されてきた。申請者らは概日リズムを発振する時計遺伝子群のコア遺伝子である **Cryptochrome** 遺伝子 (**Cry1**, **Cry2**) のダブルノックアウトマウスにおいて眼圧日内変動が消失することを発見し、眼圧日内変動には時計遺伝子が必須であることを初めて明らかにした { **Maeda, Higashide (3 番目/8 人), et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006** }。

中枢 (視交叉上核) の概日リズムはグルココルチコイド、交感神経系、メラトニンなどを介して眼を含めた末梢臓器のリズムに反映される。本研究の研究協力者はグルココルチコイドがマウスの眼圧日内変動形成に重要であることを明らかにした ( **Tsuchiya et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2018** )。一方、メラトニンは暗期に哺乳類の松果体から分泌され、昼夜の区別を末梢に伝達する。メラトニンとその受容体作動薬は全身または局所投与によって眼圧下降を引き起こすことが報告されている。また、メラトニン受容体欠損マウスでは夜間の眼圧上昇と網膜神経節細胞数の減少がみられ、夜間の高眼圧緑内障モデルとみなされる。さらに、緑内障患者では夜間のメラトニン産生が減少していること、メラトニン受容体 (**MT2**) 遺伝子 (**MTNR1B**) 多型が原発開放隅角緑内障と有意に関連することが報告された。以上から、概日リズムの出力系の中でもメラトニンは緑内障の病態と密接に関連していることが推測され、緑内障眼でのメラトニン投与による夜間の眼圧下降の可能性が示唆される。しかし、遺伝子改変マウスとして頻用される **C57BL/6J** マウスを含め多くのマウスの系統は、メラトニン産生酵素の遺伝子変異によりメラトニン産生が障害されている (メラトニン欠損マウス)。そのため、メラトニン産生マウスでの眼圧日内変動に関する知見は極めて限られ、概日リズムとしての眼圧日内変動に対する内因性メラトニンの役割の詳細は不明である。

一方、眼圧変動は緑内障進行の重要な危険因子である。そのため、眼圧日内変動の把握が望まれるが、通常の診療では測定困難である。夜間の眼圧を把握するためには入院施設あるいは眼圧の自己測定が必要であり、さらに睡眠中の眼圧は通常の眼圧計では測定不可能である。申請者らは、近年開発されたコンタクトレンズセンサー (**CLS, Triggerfish, Sensimed 社**) は **24** 時間の持続的 eye pressure 日内変動の評価に有用であることを報告した { **Shioya, Higashide (2 番目/8 人), et al. Acta Ophthalmol. 2020** }。さらに、申請者は **CLS** によって緑内障患者の眼圧日内変動パターンの同定を試み、時計遺伝子群の遺伝子多型との関係を検討し、**PER2** の遺伝子多型 (**rs2304672**) が眼圧日内変動パターンに影響することを発見した (基盤研究 C、課題番号 **16K11262**)。

以上のように、概日リズム中枢からの代表的出力系であるメラトニンが緑内障の病態に深く関与している可能性は高いものの、マウスを用いた分子機構の解明やヒトでの臨床研究は乏しく、眼圧日内変動の分子機序や緑内障の病態に対してメラトニン系の及ぼす影響は依然として不明である。そこで、コンタクトレンズセンサーを利用した臨床研究とマウスを利用した基礎実験との両面から概日リズムとしての眼圧日内変動に対するメラトニン系の役割を明らかにする本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、概日リズムとしての眼圧日内変動に対するメラトニン系の役割を臨床と基礎の両面から解明することを目的とする。そのために、以下の検討を行う。

緑内障患者の眼圧日内変動パターンの **CLS** による同定とメラトニン関連遺伝子等の遺伝子多型との関係

内因性メラトニン産生が正常なマウスの確立

内因性メラトニン産生が眼圧日内変動に及ぼす影響の検討

## 3. 研究の方法

緑内障患者の眼圧日内変動パターンの **CLS** による同定とメラトニン関連遺伝子等の遺伝子多型との関係

研究に同意の得られた無治療広義原発開放隅角緑内障患者に対して **CLS** によって **24** 時間持続的に眼圧変動を測定する。片眼に **CLS** を装着し (原則として視野障害の進行側を選択) **24** 時間の **CLS** 測定データ (5 分毎の計測値) から眼圧日内変動パターンを決定する。遺伝子多型解析対象はメラトニン合成酵素 { **arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT)** }、メラトニン受容体遺伝子 (**MTNR1A**, **MTNR1B**)、メラノプシン、概日リズム関連遺伝子 (**TIMELESS**, **RORA**) とする。**CLS** による眼圧日内変動パターンと各遺伝子多型との関連を検討する。

内因性メラトニン産生が正常なマウスの確立

理化学研究所の実験動物開発室より **B6J.MSM-Aanat**、**B6J.MSM-Hiomt** (日本産野生由来マウス **MSM/Ms** の **Aanat** および **Hiomt** を **C57BL/6J** マウスに導入したコンジェニックマウス) の凍結精子を入手して生体復元後に両マウスを交配し、コンジェニックな内因性メラトニン産生マウス (**Aanat(+/+);Hiomt(+/+)**) とメラトニン欠損マウス (**Aanat(-/-);Hiomt(-/-)**) を作成する。メラトニン産生マウスの網膜に異常がないかどうかを組織学的および **in vivo** (光干

渉断層計)で検討する。メラトニン産生マウスにおけるメラトニン産生(網膜、松果体など)を **LC-MS/MS** および **ELISA** で定量する。

内因性メラトニン産生が眼圧日内変動に及ぼす影響の検討

**10** 週齢以上のメラトニン産生マウスとメラトニン欠損マウスにおいて眼圧日内変動を測定しメラトニン産生の有無による眼圧日内変動への影響を検討する。眼圧測定は、**isoflurane** 麻酔下にて **4** 時間毎に **6** 回 (**ZT = 2, 6, 10, 14, 18, 22**) 行う。各時間につき異なる日に **2** 回測定を行う。暗期 (**ZT12 ~ 24**) の眼圧測定は暗赤色光下で行う。

#### 4. 研究成果

緑内障患者の眼圧日内変動パターンの **CLS** による同定とメラトニン関連遺伝子等の遺伝子多型との関係

無治療広義原発開放隅角緑内障 **87** 例 **87** 眼に対して **CLS** による **24** 時間眼圧変動測定を施行した。コサイン近似した **CLS** 変動パターンが低振幅であった症例を除いた **76** 例 **76** 眼について、**CLS** 変動パターンの頂点相と遺伝子多型との関連を検討した。**6** 遺伝子の **7** 遺伝子多型 (**AANAT** の **rs3760138, rs28936679**; **RORA** の **rs782931**; **TIMELESS** の **rs774045**; **MTNR1B** の **rs10830963**; **MTNR1A** の **rs12506228**; **melanopsin** の **rs1079610**) について遺伝子型をタイピングした結果、**rs3760138** の遺伝子多型と **CLS** 頂点相には有意な関連があった (**minor allele carrier** のほうが有意に遅い、年齢と **24** 時間の **CLS** 測定値のドリフト減少を補正して **p=0.045**)。

この結果から、メラトニン合成酵素 (**AANAT**) の遺伝子多型が眼圧日内変動パターンに関連する可能性が初めて示された。

内因性メラトニン産生が正常なマウスの確立

**Aanat(+/-)**マウスと **Hiomt(+/-)**マウスによる交配を進めたが、妊娠と出産の効率が極めて悪く、**Aanat(+/+);Hiomt(+/+)**マウスが得られる確率が予想よりもかなり低かった。そのため、実験に使用可能なメラトニン産生およびメラトニン欠損マウスの個体数が得られるまで **2** 年以上を要した。メラトニン産生および欠損マウスにおける網膜と松果体の組織学的検討において異常はみられなかった。さらに、**in vivo** での検討(光干渉断層計)において網膜層厚の顕著な差異や網膜構造異常はみられなかった。**LC-MS/MS** による網膜および松果体のメラトニンの質量分析を行ったが、十分な検出感度を得られなかったため、メラトニン産生マウスと欠損マウスとの間でのメラトニン含有量の差異を検出できなかった。しかし、**ELISA** による松果体のメラトニン含有量の検討では、明期 (**ZT8**) と暗期 (**ZT20**) においてメラトニン産生マウスではそれぞれ **32.7** および **139.8pg/ml**、メラトニン欠損マウスではそれぞれ **0.2** および **2.5 pg/ml** であり、メラトニン産生マウスにおいて暗期優位のメラトニン産生が確認された。

内因性メラトニン産生が眼圧日内変動に及ぼす影響の検討

メラトニン産生マウス(オス **7** 匹、メス **8** 匹)、メラトニン欠損マウス(オス **7** 匹、メス **8** 匹)において眼圧日内変動を測定した。混合効果モデルによる検討の結果、明期より暗期のほうが有意に眼圧が高い(差 **6.3mmHg**, **p<0.001**)、メラトニンの有無は **24** 時間全体として眼圧レベルに影響なし (**p=0.79**)、メラトニン産生マウスの方が明暗での眼圧差が有意に小さい (**-2.7mmHg**, **p<0.001**)、オスの方が **24** 時間全体として有意に眼圧が高い (**+3.8mmHg**, **p<0.001**)、明暗の眼圧差に対して性差は有意な影響なし (**p=0.05**) という知見が得られた。

以上のように、内因性メラトニン産生マウスを確立することができ、内因性メラトニン産生が眼圧日内変動に影響する可能性があるという新知見を得ることができた。しかし、メラトニン産生マウス確立までに想定以上の期間を要したため、当初予定していたメラトニン欠損の有無によるメラトニン等に対する眼圧反応性の違いやメラトニンによる眼圧下降に対する末梢時計の関与を研究期間内に行うことができなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Wada Yasushi, Higashide Tomomi, Sakaguchi Kimikazu, Nagata Atsushi, Hirooka Kazuyuki, Sugiyama Kazuhisa	4. 巻 47
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 777 ~ 785
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 -
1. 著者名 Iwase Aiko, Higashide Tomomi, Fujii Makoto, Ohno Yuko, Tanaka Yuki, Kikawa Tsutomu, Araie Makoto	4. 巻 68
2. 論文標題 Aging-associated changes of optical coherence tomography-measured ganglion cell-related retinal layer thickness and visual sensitivity in normal Japanese	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 117 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-024-01049-3	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 Takemori Hayato, Higashide Tomomi, Kobayashi Akira, Yokogawa Hideaki, Sugiyama Kazuhisa	4. 巻 32
2. 論文標題 Glaucoma-Related Risk Factors for Endothelial Cell Loss and Graft Failure After Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Glaucoma	6. 最初と最後の頁 e95 ~ e102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IJG.0000000000002221	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 Tachibana Gaku, Higashide Tomomi, Nitta Koji, Sugiyama Kazuhisa	4. 巻 12
2. 論文標題 Association between Glaucoma Progression in Macular Ganglion Cell Complex and Disc Hemorrhage: Differences between Superior and Inferior Hemiretinas	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 3996 ~ 3996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm12123996	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 Mambo Yuki, Higashide Tomomi, Ohkubo Shinji, Udagawa Sachiko, Yamashita Yoko, Tsuchiya Shunsuke, Okayama Masahiko, Wajima Ryotaro, Sugiyama Kazuhisa	4. 巻 32
2. 論文標題 Trabeculectomy Tenon Advancement Technique May Reduce Bleb-Related Infections	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Glaucoma	6. 最初と最後の頁 107 ~ 116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IJG.0000000000002126	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 Sasaki Makoto, Higashide Tomomi, Takeshima Satoshi, Takamatsu Yuki, Manbo Yoshimi, Udagawa Sachiko, Sugiyama Kazuhisa	4. 巻 12
2. 論文標題 Waveform changes of laser speckle flowgraphy in the temporal optic nerve head and peripapillary atrophy after trabeculectomy in open-angle glaucoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-13989-2	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 Okayama Masahiko, Tsuchiya Shunsuke, Higashide Tomomi, Udagawa Sachiko, Yamashita Yoko, Shioya Satomi, Takemori Hayato, Nakazawa Kazuki, Manbo Yuki, Sugiyama Kazuhisa	4. 巻 31
2. 論文標題 Diurnal Variation of Corneal Hysteresis in Patients With Untreated Primary Open Angle Glaucoma and Normal Individuals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Glaucoma	6. 最初と最後の頁 891 ~ 897
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IJG.0000000000002112	査読の有無 無
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 Nakazawa Kazuki, Higashide Tomomi, Tsuchiya Shunsuke, Shioya Satomi, Okayama Masahiko, Sugiyama Kazuhisa	4. 巻 11
2. 論文標題 Association of Ambulatory Blood Pressure and Other Factors With Intraocular Pressure-Related 24-Hour Contact Lens Sensor Profile in Untreated Glaucoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Vision Science & Technology	6. 最初と最後の頁 18 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/tvst.11.10.18	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 Takamatsu Yuki, Higashide Tomomi, Takeshima Satoshi, Sasaki Makoto, Manbo Yoshimi, Udagawa Sachiko, Ohkubo Shinji, Sonoda Shozo, Sakamoto Taiji, Sugiyama Kazuhisa	4. 巻 10
2. 論文標題 Relationship Between Changes in the Choroidal Structure and Blood Flow of the Macula After Trabeculectomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Vision Science & Technology	6. 最初と最後の頁 30 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/tvst.10.14.30	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Higashide T, Udagawa S, Nakazawa K, Yamashita Y, Tsuchiya S, Sugiyama K.
2. 発表標題 Prediction of glaucoma progression by 24-hour contact lens sensor profile in patients with normal tension glaucoma.
3. 学会等名 American Academy of Ophthalmology Annual meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Higashide T, Nakazawa K, Shioya S, Hatake S, Tsuchiya S, Simon-Zoula S, Sugiyama K.
2. 発表標題 Association between intraocular pressure-related circadian curves measured by a contact lens sensor and clock-gene polymorphisms in untreated glaucoma.
3. 学会等名 9th World Glaucoma Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東出朋巳, 宇田川さち子, 中澤和樹, 山下陽子, 土屋俊輔, 杉山和久
2. 発表標題 コンタクトレンズ型センサー測定値による緑内障性視野進行の予測: 前向きコホート研究.
3. 学会等名 第127回日本眼科学会総会
4. 発表年 2023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
研究協力者	畠 佐千代 (Hatake Sachiyo)	金沢大学・眼科・技術補佐員  (13301)	
研究協力者	土屋 俊輔 (Tsuchiya Shunsuke)	金沢大学・眼科・助教  (13301)	

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