

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16954

研究課題名（和文）緑内障におけるゲノムの酸化損傷の影響についての検討

研究課題名（英文）Oxidative DNA stress for glaucoma

研究代表者

中武 俊二（Nakatake, Shunji）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：30847091

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：緑内障は全世界において中途失明原因の上位を占め、今後も患者数の増加が予想されており、その克服は大きな社会的課題である。眼圧下降が最もエビデンスのある治療法であるが、点眼薬や手術による眼圧下降治療に限界があり、眼圧下降によらない新しいアプローチによる緑内障治療の開発が必要である。今回我々は酸化ストレスについて着目した。緑内障において病態の進行に酸化ストレスが関与している事がわかっているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。今回、緑内障における酸化ストレスの影響について研究を行い、免疫担当細胞のゲノムの酸化が病態に関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の目的は緑内障における生命の設計図にあたるゲノムの酸化ストレスの役割を明らかとし、酸化ストレスをターゲットとした治療法を検討することである。酸化ストレスが様々な疾患の病態に関わっていることは明白であるものの、酸化がどのようにして病気の発症や進展に関わっているのか、その分子機序まで詳細に検討した研究は少ない。今回、我々は緑内障において免疫担当細胞のゲノムの酸化ストレスが病態に深く関わっていることを明らかにした。これにより、ゲノムの酸化をターゲットにする治療法を開発することが緑内障の新規治療につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Glaucoma is one of the leading causes of premature blindness worldwide, and the number of patients is expected to continue to increase in the future, and overcoming it is a major social challenge. Lowering intraocular pressure is the treatment method with the most evidence, but there are limitations to treatment for lowering intraocular pressure using eye drops or surgery, and it is necessary to develop a new approach to glaucoma treatment that does not rely on lowering intraocular pressure. This time we focused on oxidative stress. Although oxidative stress is known to be involved in the progression of glaucoma, the mechanism remains largely unknown. This time, we conducted research on the effects of oxidative stress on glaucoma, and revealed that oxidation of the genome of immunocompetent cells is involved in the pathology.

研究分野：眼科

キーワード：緑内障 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

網膜神経節細胞死によって引き起こされる緑内障は全世界において中途失明原因の上位を占め、現在の本邦における失明原因の第1位となっている。大規模スタディにより緑内障患者は40歳以上の5%に占めることがわかっており、高齢化社会で罹患者が増加していることから、今後も患者数の増加が予想されており、その克服は大きな社会的課題である。現在のところ眼圧下降が最もエビデンスのある治療法であるが、点眼薬や手術による眼圧下降治療に限界があるのは明白である。従って、眼圧下降によらない新しいアプローチによる緑内障治療の開発が必要である。眼圧値以外の様々な病態が緑内障の進行に関与していることがわかってきているが、今回その中で酸化ストレスについて着目した。緑内障において病態の進行に酸化ストレスが関与している事がわかっているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。今回、緑内障における酸化ストレスの影響について、特にゲノムの酸化に着目して研究を行った。

酸化ストレスは細胞の恒常性を破綻させ、個体レベルでも神経変性疾患を含む様々な疾病に関与している。しかし、活性酸素がどのようなメカニズムで神経変性を誘導するかは十分に解明されていない。活性酸素は細胞内の様々な物質を障害するが、我々はその中でも生命活動の根幹にあるゲノムに対する酸化ストレスの蓄積とその修復機構について研究を行ってきた。アルツハイマー病やパーキンソン病の脳でグアニンの酸化体(8-oxoG)が蓄積することが知られているが、我々は網膜色素変性(Retinitis pigmentosa: RP)患者の硝子体やモデルマウスの網膜において、8-oxoGが著明に蓄積していることを明らかとした(Murakami Y, et al. Am J Pathol. 2012)。

8-oxoGがゲノムに蓄積すると、遺伝子複製の際に8-oxoG:アデニン(A)の誤対合が生じる。ゲノム酸化修復酵素の一つであるMutY homolog(MUTYH)は、この誤対合したアデニンを切り出す。MUTYHが過剰に働くとDNAの一本鎖切断(Single Strand Breaks:SSBs)が生じ、poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)が活性化される(図2)。Mutyh<sup>-/-</sup>マウスを用いた研究により、申請者は(1)RPモデル動物においてミクログリアへの8-oxoG蓄積がキーイベントであること、(2)MUTYH-SSBs-PARP経路を介してミクログリアが活性化し、網膜変性が増悪することを明らかにした(Nakatake S, et al., JCI Insight. 2016)。しかし、他の視神経/網膜変性病態におけるゲノム酸化損傷の役割はわかっていない。

## 2. 研究の目的

本研究課題の目的は緑内障におけるゲノム酸化損傷の役割を明らかとし、MUTYH-SSBs-PARP経路を標的とした治療法を検討することである。酸化ストレスが様々な疾患の病態に関わっていることは明白であるものの、酸化がどのようにして病気の発症や進展に関わっているのか、その分子機序まで詳細に検討した研究は少ない。我々は九州大学生体防御医学研究所の中別府らと共同して研究を進め、網膜疾患における8-oxoGの蓄積とそれに対する修復酵素系(MTH1, MUTYHなど)の役割を世界に先駆けて報告してきた。緑内障の分野においても、酸化ストレスの重要性は認識されているが、そのメカニズムまで踏み込んだ研究は乏しい。本研究によって、緑内障の酸化ストレス病態の理解が大きく進むことが期待される。

また様々な疾患に対して抗酸化サプリメントの臨床試験が実施されているものの、臨床的に十

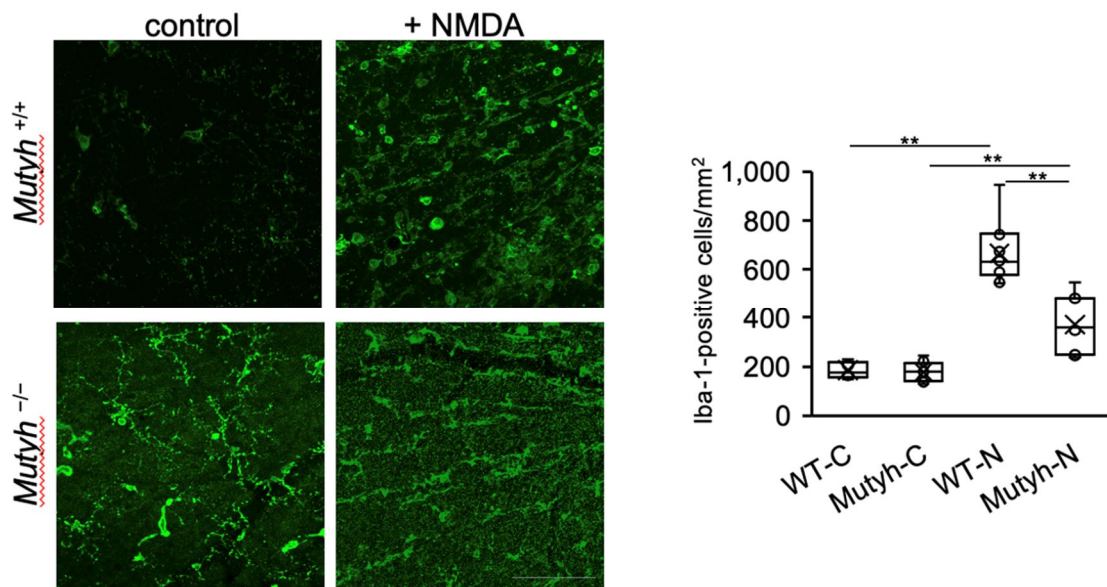
分な治療効果が示されていないのが現状である (Murakami Y, et al. Int J Mol Sci. 2020)。その原因として、酸化ストレスは細胞の生存 / 死に両面的な役割を持つため、非特異的な抑制は必ずしも生体にとって好ましくないこと、また内服薬の局所への移行性の問題などが考えられる。我々の考える理想的な抗酸化治療は、局所の特定の細胞群を標的として酸化ストレスの負の側面のみを制御できる薬剤であり、本研究からミクログリアのゲノム酸化応答が治療標的として確立されれば、全く新しいコンセプトの抗酸化薬の開発に繋がる可能性がある。

### 3. 研究の方法

本研究は全て *in vivo* で行った。緑内障モデル動物は NMDA (N-methyl-D-aspartate) 硝子体投与マウスを用いた。Mutyh<sup>-/-</sup>マウスは既に作成済みであり、Mutyh<sup>-/-</sup>マウスに対し NMDA の投与を行い、緑内障モデルマウスにおける MUTYH の役割を検討した。評価項目は、ミクログリアについては抗 Iba-1 抗体陽性細胞密度を、ゲノムの酸化については 8-oxoG の免疫染色を施行した。評価するタイミングについて、NMDA 投与後 24 時間、7 日目で評価を行った。それぞれのマウスの眼球摘出を行い、片眼を flatmount で網膜全体の評価を行い、もう片眼をパラフィン切片にして評価を行った。

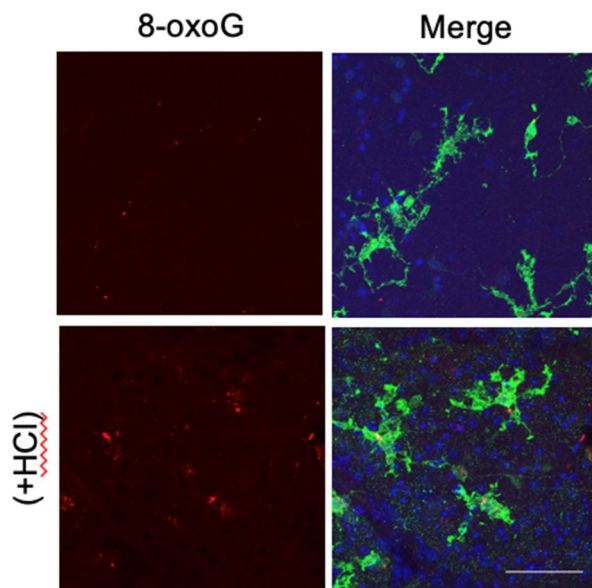
### 4. 研究成果

図 1 Mutyh を欠損させることにより、NMDA 投与による引き起こされるミクログリアの活性が有意に抑制された



Mutyh<sup>+/+</sup> マウスと Mutyh<sup>-/-</sup> マウスに対し NMDA を投与することにより、Mutyh<sup>+/+</sup> マウスで見られたミクログリアの活性化が抑制された。これにより、MUTYH が酸化ストレスによるミクログリアの活性に関与していることが示唆された。

図 2 NMDA 投与により活性化したミクログリアにおいて核のゲノムが酸化していた



Iba-1 でミクログリアの染色を行い、8-oxoG で DNA のゲノムの酸化の評価を行った。塩酸処理 (HCL) を加えることで、核の DNA の酸化障害が評価できるが、塩酸処理下で Iba-1 と 8-oxoG の二つが共染色されることを確認した。これにより、ミクログリアの核のゲノムが酸化されることが確認された。

以上、二つの結果により、緑内障において酸化ストレスによってミクログリアが活性化し、神経細胞死を誘導していることが確認された。また、酸化ストレスはミクログリアの核の DNA に作用することでミクログリアを活性化していることが示唆された。これにより、ミクログリアの DNA の酸化をターゲットに酸化・活性を抑制することが緑内障の治療につながる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------