

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592621

研究課題名(和文) Estrogen-受容体による眼圧制御、眼圧上昇メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanisms of intraocular pressure regulation (elevation) by estrogen-receptor

研究代表者

間瀬 文彦 (MABUCHI, Fumihiko)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号：20322125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまで我々は、estrogen receptor beta (ESR2) 遺伝子多型の頻度が女性原発開放隅角緑内障 (POAG) で高く、眼圧上昇に関与していることをみだし報告した。estrogen-受容体による眼圧制御、眼圧上昇のメカニズムを分子生物学的レベルでより明らかにし、POAGモデルとしての可能性について検討するため、ESR2ノックアウトマウスの眼圧測定を行ったところ、対照コントロール(野生型マウス)と比べ、統計的有意な眼圧上昇は認められなかった ($P>0.05$)。また、視神経障害評価のため網膜厚の計測を行っており、網膜神経節細胞数の計測も行っていく予定である。

研究成果の概要(英文)：We previously investigated whether the estrogen receptor beta (ESR2) gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) were associated with primary open-angle glaucoma (POAG), and our findings demonstrated a higher frequency of the ESR2 gene SNPs in female patients with POAG in comparison to control subjects, and the maximum intraocular pressure (IOP) in female patients with the risk allele was significantly higher than that in female patients without the risk allele. To elucidate the molecular mechanisms of IOP regulation (elevation) and evaluate the possibility of ESR2 knockout mice as a POAG model, the IOP and optic nerve damage of ESR2 knockout mice were investigated. There was no statistically significant IOP difference ($P>0.05$) between ESR2 knockout and control (wild type) mice. The retinal thickness and retinal ganglion cells of ESR2 knockout and control mice has been measured and will be counted to evaluate the optic nerve damage.

研究分野：緑内障 人類遺伝学

キーワード：エストロゲン受容体 ESR2 ESR2ノックアウトマウス 眼圧 原発開放隅角緑内障 POAG

1. 研究開始当初の背景

緑内障は、視神経の脱落により高度の視機能障害を来す疾患であり、臨床的には、特徴的な視神経乳頭の陥凹拡大と視神経線維欠損、視野検査にて視神経線維欠損部位に一致した視野狭窄を認め、末期には視力低下も伴う。我が国の失明原因の第1位に位置し、推定患者人口は400万人、有病率は40歳以上で5.0%と報告されている。緑内障の中で最も頻度が高いPOAGの発症、進行の原因としては、虚血や視神経の軸索輸送障害など、様々な要因が関与した多因子疾患と考えられているが、中でも高眼圧は最も重要な危険因子と考えられ、現在の臨床の場においては、眼圧下降が唯一確立された治療手段といっても過言ではない。しかし、眼圧上昇のメカニズムについては、未だそのほとんどが解明されていないのが現状である。POAG発症に関与する遺伝的要因の検索としては、これまで約20のPOAG原因遺伝子座位が報告されており、これら遺伝子座位のうち myocilin(*MYOC*)、optineurin(*OPTN*)、WD40-repeat 36(*WDR36*)、Neurotrophin(*NTF4*)、Ankyrin repeat and SOCS box containing 10(*ASB10*)遺伝子変異が同定されている。POAG感受性遺伝子多型については、optic atrophy 1(*OPA1*)など約40の報告があるが、これら検索は未だ不十分であり、未知の感受性遺伝子が数多く存在していると考えられる。遺伝子変異の中で、眼圧上昇への関与が明らかなものとして *MYOC* が挙げられるが、*MYOC* 遺伝子変異による緑内障発症の頻度は、POAG全体の約2-4%程度と少なく、他の遺伝子変異または多型が眼圧上昇に関与していると考えられる。眼圧上昇の原因を解明し、遺伝子治療を含む新しい治療法を確立するためにも、更なる検索が必要不可欠である。Estrogenは、受容体と複合体を形成して核内へ移動し、様々な遺伝子の転写を活性化する。これら受容体として、これまで estrogen receptor alpha(*ESR1*)と beta(*ESR2*) が知られており、全身の細胞内に存在しているが、眼内においても網膜神経節細胞や毛様体など、その存在が報告されている。また、早期に閉経した女性の方が POAG になるリスクが高いという報告や、閉経女性に estrogen を投与すると眼圧が下降したという報告があり、estrogen が POAG 発症、眼圧上昇に関与している可能性が示唆される。これまで我々は、POAG と遺伝子変異、遺伝子多型との関係を明らかにするため、日本人対象症例から血液サンプルを収集して検索を行ってきた。そして我々は、*ESR2* 遺伝子の2つの多型(rs1256031, rs4986938)の頻度が女性 POAG 症例で高いことをみだし報告した。さらに、本遺伝子多型の POAG 発症への関与、また表現型(眼圧)との関連をより明確にするため、本遺伝子全領域からタグ SNP を5つ選定し1次スクリーニングを、さらに2次スクリーニングとして3 SNP を追加して検索した結果、rs1256031に加え、rs1256059, rs928554

遺伝子多型においてもリスクアリルを持っている症例の眼圧が高く、また、これら3 SNP はハプロブロックを形成していた。これは本遺伝子多型が眼圧上昇に関与していることを強く示唆するものである。本研究を進展させ、estrogen-受容体による眼圧制御、眼圧上昇のメカニズムを明らかにするため、*ESR1*、*ESR2* ノックアウトマウスを用いた機能解析を試みた。

2. 研究の目的

estrogen receptor alpha(*ESR1*)、*ESR2* ノックアウトマウスを用いた機能解析を行い、Estrogen-*ESR1*、*ESR2* 受容体による眼圧制御、POAG 発症メカニズムを明らかにするとともに、眼圧上昇、POAG モデルマウスとしての可能性について検討すること。

3. 研究の方法

(繁殖実験)

ESR1、*ESR2* ノックアウトマウスを Jackson Laboratory より購入し、*ESR1* はヘテロ遺伝子変異マウス同士の交配により、*ESR2* はヘテロ×ホモ遺伝子変異マウスの交配により繁殖実験を行う。対照コントロールとして野生型マウスの繁殖も同時に行う。また、視神経障害評価のため、RGC の特異的蛋白である Thy1 蛋白遺伝子に green fluorescent protein 遺伝子をトランスジェニックすることにより、生体下にて RGC が自発蛍光を発するマウス(RGC 自発蛍光マウス)と、これらノックアウトマウスを交配させることにより RGC 自発蛍光ノックアウトマウスを作成し繁殖実験を行う。

(眼圧測定)

各遺伝子型(+/, +/-, -/-)の眼圧を生後2ヶ月、4ヶ月、6ヶ月、8ヶ月に計測する。眼圧測定は、マウスやラットなど小動物において精度の高い眼圧測定が可能な microneedle 法にて行い、ガラス管を熱しながら牽引し50-75 μm 程度に細くしたガラス管の先を研磨機にて刺入できるよう鋭に加工して microneedle として使用する。麻酔により眼圧は変動するため腹腔内麻酔後一定の時間に、圧トランスデューサーに接続された microneedle をマウス角膜に刺入し、眼内の眼圧を直接計測する。ノックアウトマウスの眼圧を野生型マウスと比較し、眼圧上昇が認められないか雄雌分けて解析を行う。また、estrogen を野生型マウス、*ESR1*、*ESR2* ノックアウトマウスに腹腔内投与し、眼圧下降度を計測。estrogen に

よる眼圧下降作用を検証するとともに、estrogen による眼圧下降がどちらの受容体を介しているのか検討を行う。

(視神経障害評価)

マウス視神経障害評価には主に視神経線維または RGC 数を計測する方法があるが、本研究は RGC による評価を行う。RGC 自発蛍光がみられる *ESR1*、*ESR2* ノックアウトマウスを作成し、還流固定後、眼球を摘出。網膜切片を作成し、網膜厚を各遺伝子型間で比較する。また、網膜を剥離して whole mount スライドを作成、RGC を蛍光顕微鏡にて撮影し、RGC 密度を計測。各遺伝子型間で RGC 密度を比較し、RGC 減少の有無、程度を評価する。また、RGC を単離培養し、低酸素下など負荷をかけた条件下にて、RGC 生存率を各遺伝子型間で比較する。

4. 研究成果

ESR1、*ESR2* ノックアウトマウス、RGC 自発蛍光マウスの繁殖実験を行い、*ESR2* ノックアウトマウス、RGC 自発蛍光マウスの繁殖が確認できた。生後 2 ヶ月、4 ヶ月、6 ヶ月、8 ヶ月の *ESR2* ノックアウトマウス、対照コントロール(野生型マウス)について、腹腔内麻酔の後、両眼の夜間眼圧(21:00~23:00)を測定したところ、両眼の平均眼圧は、*ESR2* ノックアウトマウス、対照コントロールでそれぞれ、オスは 2 ヶ月後 13.0mmHg、12.4mmHg、4 ヶ月後 11.8mmHg、13.1mmHg、6 ヶ月後 11.7mmHg、11.7mmHg、8 ヶ月後 11.2mmHg、11.6mmHg、メスは 2 ヶ月後 13.0mmHg、12.2mmHg、4 ヶ月後 12.1mmHg、11.5mmHg、6 ヶ月後 11.2mmHg、11.7mmHg、8 ヶ月後 11.0mmHg、11.1mmHg であり、統計的有意差 ($P>0.05$) は認められなかった。(図 1, 2) 視神経障害評価については、網膜厚の計測を行うため標本作製を、また、RGC 数の計測を行うため、*ESR2* ノックアウトマウスと RGC 自発蛍光マウスを交配中である。

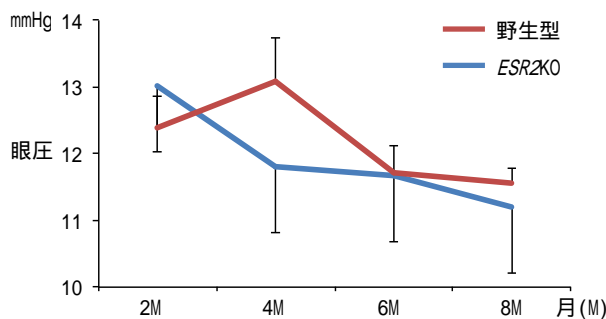


図1 *ESR2*KOマウスの眼圧(オス)

*ESR2*KOマウスと野生型マウスのオスの眼圧を比較したが統計的有意差 ($P>0.05$) は認められなかった。Error barは標準誤差。*ESR2*KO: estrogen receptor beta knockout.

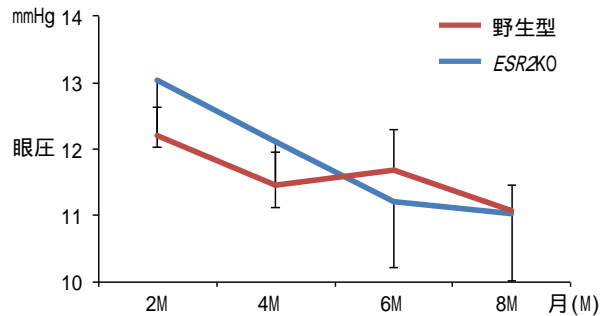


図2 *ESR2*KOマウスの眼圧(メス)

*ESR2*KOマウスと野生型マウスのメスの眼圧を比較したが統計的有意差 ($P>0.05$) は認められなかった。Error barは標準誤差。*ESR2*KO: estrogen receptor beta knockout.

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9件)

1. Mabuchi, F., Y. Sakurada, K. Kashiwagi, Z. Yamagata, H. Iijima and S. Tsukahara. "Involvement of Genetic Variants Associated with Primary Open-Angle Glaucoma in Pathogenic Mechanisms and Family History of Glaucoma." *Am J Ophthalmol.* 査読有, 159, 2015, 437-444 e2
2. Sakurada, Y., Y. Nakamura, S. Yoneyama, F. Mabuchi, T. Gotoh, Y. Tateno, A. Sugiyama, T. Kubota and H. Iijima. "Aqueous Humor Cytokine Levels in Patients with Polypoidal Choroidal Vasculopathy and Neovascular Age-Related Macular Degeneration." *Ophthalmic Res.* 査読有, 53, 2015, 2-7.
3. Yoneyama, S., Y. Sakurada, F. Mabuchi, A. Sugiyama, T. Kubota and H. Iijima. "Genetic Variants in the Skiv2l Gene in Exudative Age-Related Macular Degeneration in the Japanese Population." *Ophthalmic Genet.* 査読有, 35, 2014, 151-5.
4. Kato, T., A. Meguro, E. Nomura, R. Uemoto, N. Nomura, M. Ota, K. Kashiwagi, F. Mabuchi, H. Iijima, K. Kawase, T. Yamamoto, M. Nakamura, A. Negi, T. Sagara, T. Nishida, M. Inatani, H. Tanihara, M. Aihara, M. Araie, T. Fukuchi, H. Abe, T. Higashide, K. Sugiyama, T. Kanamoto, Y. Kiuchi, A. Iwase, S. Chin, S. Ohno, H. Inoko and N. Mizuki. "Association Study of Genetic Variants on Chromosome 7q31 with Susceptibility to Normal Tension Glaucoma in a Japanese Population." *Eye (Lond).* 査読有, 27, 2013, 979-83.
5. Kashiwagi, K., N. Tanabe, K. Go, M. Imasawa, F. Mabuchi, T. Chiba, A. Sugiyama and K. Abe. "Comparison of a Remote Operating Slit-Lamp Microscope System with a Conventional Slit-Lamp Microscope System for Examination of

- Trabeculectomy Eyes." *J Glaucoma*. 査読有, 22, 2013, 278-83.
6. Kashiwagi, K., T. Chiba, F. Mabuchi, T. Furuya and S. Tsukahara. "Five-Year Incidence of Angle Closure among Glaucoma Health Examination Participants." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 査読有, 251, 2013, 1219-28.
 7. Takamoto, M., T. Kaburaki, A. Mabuchi, M. Araie, S. Amano, M. Aihara, A. Tomidokoro, A. Iwase, F. Mabuchi, K. Kashiwagi, S. Shirato, N. Yasuda, H. Kawashima, F. Nakajima, J. Numaga, Y. Kawamura, T. Sasaki and K. Tokunaga. "Common Variants on Chromosome 9p21 Are Associated with Normal Tension Glaucoma." *PLoS One*. 7, 2012, e40107.
 8. Mabuchi, F., K. Yoshimura, K. Kashiwagi, Z. Yamagata, S. Kanba, H. Iijima and S. Tsukahara. "Risk Factors for Anxiety and Depression in Patients with Glaucoma." *Br J Ophthalmol*. 査読有, 96, 2012, 821-5.
 9. Mabuchi, F., Y. Sakurada, K. Kashiwagi, Z. Yamagata, H. Iijima and S. Tsukahara. "Association between Genetic Variants Associated with Vertical Cup-to-Disc Ratio and Phenotypic Features of Primary Open-Angle Glaucoma." *Ophthalmology*. 査読有, 119, 2012, 1819-25.
- [学会発表](計 15 件)
1. 間淵文彦, 櫻田庸一, 米山征吾, 柏木賢治, 山縣然太郎, 飯島裕幸. *CAV1/CAV2*遺伝子多型と原発開放隅角緑内障の表現型との関連について. 第68回日本臨床眼科学会 2014.11.13-16 神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)
 2. Mabuchi F, Sakurada Y, Yoneyama S, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H. Association between common variant near *CAV1* and *CAV2* genes and phenotypic features of primary open-angle glaucoma. Annual Meeting of American Society of Human Genetics 2014.10.18-22 San Diego (USA)
 3. Mabuchi F, Sakurada Y, Yoneyama S, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H. Association between *GAS7* genetic variant and primary open-angle glaucoma in the Japanese population. 11th European Glaucoma Society Congress 2014.6.7-11 Nice (France)
 4. Mabuchi F, Sakurada Y, Yoneyama S, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H. Association between *GAS7* genetic variant and primary open-angle glaucoma in the Japanese population. Association for Research in Vision and Ophthalmology 2014.5.4-8 Orlando (USA)
 5. 間淵文彦, 櫻田庸一, 米山征吾, 柏木賢治, 山縣然太郎, 飯島裕幸. *GAS7*遺伝子多型と日本人原発開放隅角緑内障の関連について. 第118回日本眼科学会 2014.4.2-6 東京国際フォーラム(東京都・千代田区丸の内)
 6. 間淵文彦, 櫻田庸一, 柏木賢治, 山縣然太郎, 飯島裕幸, 塚原重雄. 正常眼圧緑内障感受性遺伝子多型多型と原発開放隅角緑内障発症表現型との関連について. 第67回日本臨床眼科学会 2013.11.2 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
 7. Mabuchi F, Yamagishi R, Kashiwagi K, Aihara M. Association between estrogen receptor and intraocular pressure in mice. Annual Meeting of American Society of Human Genetics 2013.10.22 Boston (USA)
 8. Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S. Association between primary open-angle glaucoma and genetic variants associated with optic nerve vulnerability. World Glaucoma Congress 2013.7.17 Vancouver (Canada)
 9. Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S. Association between primary open-angle glaucoma and genetic variants associated with normal tension glaucoma. Association for Research in Vision and Ophthalmology 2013.5.7 Seattle (USA)
 10. 間淵文彦, 櫻田庸一, 柏木賢治, 山縣然太郎, 飯島裕幸, 塚原重雄. 正常眼圧緑内障感受性遺伝子と緑内障家族歴の関連について. 第117回日本眼科学会 2013.4.4 東京国際フォーラム(東京都・千代田区丸の内)
 11. Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S. Estrogen receptor beta genetic variants are associated with intraocular pressure elevation in women. Annual Meeting of American Society of Human Genetics 2012.11.7 San Francisco (USA)
 12. 間淵文彦, 櫻田庸一, 柏木賢治, 山縣然太郎, 飯島裕幸, 塚原重雄. Estrogen receptor beta遺伝子多型多型と眼圧の関連について. 第66回日本臨床眼科学会 2012.10.26 京都国際会議場(京都市・京都市)
 13. Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S. Association between glaucoma heritability and genetic variants associated with normal tension glaucoma. 10th European Glaucoma

Society Congress 2012.6.18 Copenhagen
(Denmark)

14. Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K,
Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S.
Association between estrogen receptor
beta gene polymorphisms and
intraocular pressure elevation in
women. Association for Research in
Vision and Ophthalmology 2012.5.9
Fort Lauderdale (USA)
15. 間淵文彦, 櫻田庸一, 柏木賢治, 山縣
然太郎, 飯島裕幸, 塚原重雄. Estrogen
receptor beta遺伝子多型と眼圧の関連
について. 第116回日本眼科学会
2012.4.6東京国際フォーラム(東京都・
千代田区丸の内)

〔図書〕(計1件)

1. Mabuchi F. Elsevier, Glaucoma 2nd
Edition, Genetics of Glaucoma,
Spotlight: Japanese Perspective 2014.
298

〔その他〕

ホームページ等

http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_Display.Scholar?ID=11CB59E63296DFFE

<http://sangaku.yamanashi.ac.jp/SearchResearcher/contents/11CB59E63296DFFE.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

間淵 文彦 (MABUCHI, Fumihiko)
山梨大学・総合研究部・講師
研究者番号: 20322125

(2) 研究分担者

相原 一 (AIHARA, Makoto)
東京医科歯科大学・その他部局等・教授
研究者番号: 80222462

櫻田 庸一 (SAKURADA, Yoichi)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号: 90456476

柏木 賢治 (KASHIWAGI, Kenji)
山梨大学・総合研究部・准教授
研究者番号: 30194723

飯島 裕幸 (IIJIMA, Hiroyuki)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号: 80114362