

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592648

研究課題名(和文) 光障害に対するアンジオテンシン 1型受容体阻害剤の網膜保護効果の解析

研究課題名(英文) Angiotensin II type 1 receptor blockade suppresses light-induced neural damage in the mouse retina.

研究代表者

厚東 隆志 (Koto, Takashi)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60464814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：光暴露による網膜細胞死のメカニズムには酸化ストレスが含まれることは報告されているが、その分子メカニズムには未だ不明の点が多い。そこで、光障害による視細胞死のメカニズムを分子レベルで解析した。その結果、レニン・アンジオテンシン系抑制剤の投与がそれを抑制することを示した。すなわち、レニン・アンジオテンシン系抑制剤の投与が網膜内の酸化ストレスを抑制すると共に、アポトーシスシグナルを抑制し、c-fos等の鍵となる分子の発現抑制を示した。

研究成果の概要(英文)：We examined the role of angiotensin II type 1 receptor (AT1R) signaling, which is part of the renin-angiotensin system, in light-induced retinal damage. Light-exposed Balb/c mice that were treated with the AT1R blockers (ARBs) before and after the light exposure exhibited attenuated visual function impairment, compared to vehicle-treated mice. Further evaluation of an ARB, valsartan, showed that it suppressed a number of light-induced retinal effects, including thinning of the photoreceptor cell layer caused by apoptosis, shortening of the photoreceptor cell outer segment, and increased levels of reactive oxygen species (ROS). The ARB suppressed the induction of c-fos and the upregulation of fasl after light exposure. Our results suggest that AT1R signaling mediates light-induced apoptosis, by increasing the levels of ROS and proapoptotic molecules in the retina. Thus, AT1R blockade may represent a new therapeutic approach for preventing light-induced retinal neural damage.

研究分野：眼科

キーワード：網膜 光障害 神経変性

1. 研究開始当初の背景

現代社会は、日中・夜間を問わず、光に暴露にされている。一方で、一部の失明疾患である網膜疾患では、光暴露により病態が増悪することが知られている。光障害に対する防御としてはサングラス等による遮光があるが、視覚のためにはある程度の光は必要であり、遮光だけに頼るわけにはいかない。他の網膜神経保護療法も必要である。そこで、網膜光障害の予防法を開発することは、網膜障害の進行予防につながることであり重要である。光障害による視細胞死のメカニズムを分子レベルで解析し、将来的には臨床応用可能な薬剤を用いた、光障害に対する網膜神経保護治療法の開発につなげることをとする。

当研究室では、これまで様々な網膜疾患モデルマウスを用いて、その病態解明を行ってきた。その中で、網膜光障害モデルでは網膜視細胞層が菲薄化し、そのメカニズムに酸化ストレスが含まれることを示した (Sasaki et al. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2011)。視細胞は過度の光を受容するとロドプシンの代謝サイクル (視サイクル) が過剰に回転すること (Grimm et al. *Nat Genet.* 2000) で酸化ストレスの増強が生じると考えられている。視細胞外節に存在する視物質ロドプシンは光を吸収するとオプシンと all-trans レチナールに分解され、網膜色素上皮細胞がこれを貪食し、ロドプシンの構成成分である 11-cis-レチナールを再生する過程で all-trans-レチナールとリン脂質が反応することで A2E が生合成される (Parish et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998)。この A2E が多量の活性酸素を発生させる (Sparrow et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000)。

一方で、当研究室では酸化ストレスとアンジオテンシン II シグナルについて研究し

てきた。元来、アンジオテンシン II 1 型受容体 (AT1R) と酸化ストレスにはクロストークがあることが知られている (Cabello-Verrugio et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011)。NADPH oxidase は細胞膜において電子伝達反応を促進する役割を持ち、AT1R の下流で発現が亢進し活性酸素を誘導することが筋細胞などにおいて示されている。NADPH oxidase は網膜にも存在することが報告されている (Li et al. *Diabetes* 2010)。また、アンジオテンシン II はストレス刺激により発現が亢進すると考えられており、細胞内で生じる酸化ストレスも発現を誘導する可能性がある。

当研究室では、糖尿病網膜症では上述のクロストークが AT1R 下流の細胞内シグナルである MAPK の活性化を介して網膜内層障害を引き起こす可能性を報告した (Kurihara et al. *Diabetes* 2008, Sasaki et al. *Diabetologia* 2010, Ozawa et al. *Experimental Diabetes Research*, Review article 2011)。

前述のように光暴露による網膜障害には酸化ストレスが関与することから、申請者は、光暴露による網膜障害にも AT1R シグナルが関係する可能性があるとして仮説をたてた。AT1R 阻害剤にはバルサルタン等があり、既に降圧剤としても利用されているものであり、効用が示されれば、臨床応用に向けた可能性があるといえた。また、AT1R は網膜視細胞に発現していることは、当研究室で既に報告した (Kurihara et al. *IOVS* 2006)。このことは、本仮説を裏付ける重要な情報となった。

2. 研究の目的

失明疾患のうち網膜疾患は約半数を占める

が、その増悪因子として光暴露による細胞障害の関与が知られている。光暴露による網膜細胞死のメカニズムには酸化ストレスが含まれることは報告されているが、その分子メカニズムには未だ不明の点が多く、この光障害という疾患増悪因子に対処するための予防治療法にも画期的なものは未だ無い。そこで、光障害による視細胞死のメカニズムを分子レベルで解析し、光障害に対する網膜神経保護治療法の開発につなげることを目的とした。

3 . 研究の方法

方法の概要は次のようである。

光障害モデルマウスを作成し、AT1R 阻害剤による網膜視細胞の保護効果を解析する。まず、光照射後の網膜内アンジオテンシン II 発現を解析し、視細胞アポトーシスに対する AT1R 阻害剤の効果を、TUNEL 染色等を用いて組織学的に解析する。さらに、視機能に対する効果を電気生理学的に解析する。その上で、その分子メカニズムを、光照射後の網膜内酸化ストレスおよび AT1R 下流の細胞内シグナル伝達分子に着目して、解析する。

具体的には下記のとおりである。

1 . 光障害モデルを作成した。

マウスを暗順応直後に一定の照度の光源に一定時間、暴露することで、視細胞のアポトーシスを誘導する。この系はすでに申請者の所属する研究室で確立され論文発表も行った方法であった(図1 Kurihara, Ozawa et al. *Mol. Vis.* 2009)。今回は特に光暴露の影響が顕著に表れる白色マウスである BALB/c マウスを用いて研究した。



図1 光照射ケージ
全面金属反射材張り。空調設備有。

2 . 光障害モデルにおける網膜内アンジオテンシン II の発現を解析した。

光障害モデルの網膜を摘出し、アンジオテンシン II およびその関連のシグナル分子として AT1R や ACE 等の発現量をイムノブロット法でタンパクを、リアルタイム RT-PCR で mRNA を解析した。サンプル採取は、光暴露後数時間後から数日後まで、経時的に行ってその変化の推移についても解析した。

3 . 光障害モデルにおける視細胞死を確認し、AT1R 阻害剤投与の効果を解析した。

光障害モデルでは、網膜視細胞死が誘導される。その解析法も、申請者らの実験室ですでに確立して論文発表に用いた (Sasaki et al. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2011, Kurihara et al. *Mol. Vis.* 2009, Kubota, Ozawa, et al. *Am. J. Pathol.* 2010)。同様の方法を用いて、凍結切片を作成し、TUNEL 染色することによりアポトーシス細胞を検出するとともに、ヘマトキシリンエオジン染色を用いて視細胞層の厚みを計測した。サンプル採取は、光暴露後2日後と4日後で行ってその変化の推移についても解析した。

AT1R 阻害剤 (バルサルタン 5mg/Kg 体重) もしくはコントロール溶剤を光暴露前後に投与したマウスを準備し、これらに光照射を行った2つの群と、光暴露なしの群の合計3群で比較検討した。

4 . 光障害モデルにおける視機能障害を網膜電図 (ERG) を用いて評価し、AT1R 阻害剤投与の効果を解析した。

光障害モデルにおいては、暗順応化における ERG の a 波、b 波ともに減弱することが知られている。そこで、3 で用いた3群に

おける ERG による視機能評価を行い、AT1R 阻害剤投与が視機能低下を抑制するかを解析した。既に当研究室では、マウス ERG 測定システムが確立されており同様の方法を用いた (Sasaki, Ozawa, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009)。

5. 光障害モデルにおいて、網膜内酸化ストレスを測定し、AT1R 阻害剤投与により抑制されるかを解析した。

光障害モデル動物では網膜内酸化ストレスが亢進しているが (Sasaki, Ozawa, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009)、これを確認するとともに、AT1R 阻害剤投与により網膜内酸化ストレスが抑制されるかをジヒドロエチジウム (DHE) を用いて計測した。DHE は組織内スーパーオキシドアニオンと反応して赤色の蛍光を発する。3 群の組織切片と反応させることにより、網膜内酸化ストレスを解析した。

6. 光障害モデルにおける網膜機能障害および網膜細胞死の分子メカニズムを解析した。

3 群の網膜サンプルにおいて、光障害により誘導されるアポトーシスの原因として、既報にあり転写因子である AP-1 構成分子である f-fos (Farhad H, *Nature medicine*, 1997) の mRNA の発現を RT-PCR で解析した。既に研究室で用い論文発表を行った方法 (Kubota, Ozawa, *Am. J. Pathol.* 2010) と同様に行った。

4. 研究成果

今回の研究では、既報にある通りに光暴露実験が行われ、その結果視細胞死を誘導することに成功した。光暴露後の網膜内のアンジオテンシン II に関するシグナルの亢進は明らかにはされなかったが、これは用い

たサンプルが視細胞だけではなく網膜全体を含むものであったために、視細胞での変化がマスクされ検出されなかったためと考えられた。そして、AT1R 阻害剤であるバルサルタンの光暴露前後における投与は、光暴露による視細胞死とそのための網膜菲薄化、および ERG により示される視機能の低下をすべて明らかに抑制することが、示された。さらに、AT1R は光暴露後の網膜内酸化ストレスを抑制すること、および c-fos を mRNA レベルで抑制することが明らかにされた。

失明原因につながり得る網膜疾患では光暴露の影響が病態進行に関与しうることが知られていながら、有効な治療法が確立されておらず、この点に関しては放置されている場合がほとんどである。そこで、光暴露の影響を抑制することは、大きな意義を持つ。そして、有効で汎用性の高いものが望まれる。本研究で取り上げた AT1R 阻害剤は、既に臨床応用されている薬剤であり、これを光障害に対する予防治療法への拡大適応に用いるという考え方が特色であった。また、これまでには世界的にも報告が無く独創的であった。今回の研究で、少なくとも動物レベルでは AT1R 阻害剤による光障害予防が可能であることが示されたことは、多くの失明を予防する可能性を秘めた意義深い結果であると言えた。

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7件)

Yotsukura-Tsutsui E, Koto T, Tsubota K, Ozawa Y Predisposing factors for IOL dislocation treated by pars plana vitrectomy; Involvement of atopic dermatitis. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*. 査読あり 2015 Apr; 41(4):892-4. doi:

10.1016/j.jcrs.2014.12.047.

Nagai N, Izumi-Nagai K, Suzuki M, Shinoda H, Koto T, Uchida A, Mochimaru H, Tomita Y, Miyake S, Kobayashi S, Sasaki M, Tsubota K, Ozawa Y. Association of Macular Pigment Optical Density (MPOD) with serum concentration of oxidized low-density lipoprotein (oxidized LDL) in Healthy Adults. *RETINA*. 査読あり 2015 Apr; 35(4):820-6. doi: 10.1097/IAE.0000000000000382.

Uchida A, Miwa M, Shinoda H, Koto T, Nagai N, Mochimaru H, Tomita Y, Sasaki M, Ikeda K, Tsubota K, Ozawa Y. Association of Maternal Age to Development and Progression of Retinopathy of Prematurity in Infants of Gestational Age under 33 Weeks. *J Ophthalmol*. 査読あり 2014; 2014:187929. doi: 10.1155/2014/187929.

Suzuki M, Nagai N, Izumi-Nagai K, Shinoda H, Koto T, Uchida A, Mochimaru H, Yuki K, Sasaki M, Tsubota K, Ozawa Y. Predictive factors for non-responders to intravitreal ranibizumab treatment in age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 査読あり 2014 Sep; 98(9):1186-91. doi: 10.1136/bjophthalmol-2013-304670.

Narimatsu T, Ozawa Y, Miyake S, Nagai N, Tsubota K. Angiotensin II type 1 receptor blockade suppresses light-induced neural damage in the mouse retina. *Free Radical Biol Med*. 査読あり 2014 Jun; 71:176-85. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.020.

Uchida A, Shinoda H, Koto T, Mochimaru H, Nagai N, Tsubota K, Ozawa Y. Vitrectomy for myopic foveoschisis with internal limiting membrane peeling and no gas tamponade. *Retina*. 査読あり 2014 Mar; 34(3):455-60. doi: 10.1097/IAE.0b013e3182a0e477.

Nishi Y, Shinoda H, Uchida A, Koto T, Mochimaru H, Nagai N, Tsubota K, Ozawa Y. Detection of Early Visual Impairment in Patients with Epiretinal Membrane. *Acta Ophthalmologica*. 査読あり 2013 Aug; 91(5):e353-7. doi: 10.1111/aos.12060.

〔学会発表〕(計8件)

(1) 鈴木美砂, 永井紀博, 永井香奈子, 篠田肇, 内田敦郎, 厚東隆志, 持丸博史, 富田洋平, 佐々木真理子, 坪田一男, 小沢洋子. 狭義加齢黄斑変性に対する pro re nata によるラニズマブ硝子体注射. 第67回日本臨床眼科学会 2013/10/31-11/3 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜

(2) 常吉由佳里, 篠田肇, 西恭代, 厚東隆志, 内田敦郎, 永井紀博, 坪田一男, 小沢洋子. 実用視力測定法を用いた特発性網膜上膜術後の視機能変化の評価. 第35回日本眼科手術学会 2012/1/27-29 愛知県名古屋市 名古屋国際会議場

(3) 佐々木真理子, 川崎良, 内田敦郎, 厚東隆志, 持丸博史, 篠田肇, 鈴木美砂, 永井香奈子, 永井紀博, 坪田一男, 小沢洋子. 片眼加齢黄斑変性患者における前駆病変と僚眼発症の関連 第116回日本眼科学会 2012/4/5-4/8 東京都千代田区 東京国際フォーラム

(4) 堀野武, 内田敦郎, 持丸博史, 厚東隆志, 永井紀博, 篠田肇, 篠田啓, 大出尚郎, 小沢洋子, 坪田一男. ポリコナゾール内服による視覚障害から視放線の病変が見つかった再生不良性貧血の一例. 第116回日本眼科学会 2012/4/5-4/8 東京都千代田区 東京国際フォーラム

(5) 鈴木美砂, 永井紀博, 永井 香奈子, 篠田肇, 内田敦郎, 厚東隆志, 持丸博史, 小沢洋子, 坪田一男. 加齢黄斑変性に対するラニズマブ単独治療における導入期の有効性についての検討 第66回日本臨床眼科学会 2012/10/25-10/28 京都府京都市 国立京都国際会館

(6)永井紀博, 小林文貴, 永井香奈子, 鈴木美砂, 持丸博史, 内田敦郎, 厚東隆志, 篠田肇, 三宅誠司, 小林沙織, 坪田一男, 小沢洋子. 健常者における黄斑色素密度と血清カロテノイド濃度の相関. 第66回日本臨床眼科学会 2012/10/25-10/28 京都府京都市 国立京都国際会館

(7) 厚東隆志, 林李恵, 篠田肇, 永井紀博, 内田敦郎, 持丸博史, 坪田一男, 小沢洋子. 網膜静脈分枝閉塞症に伴う黄斑浮腫に対するベバシズマブテノン嚢下注射の効果の検討. 第66回日本臨床眼科学会 2012/10/25-10/28 京都府京都市 国立京都国際会館

(8)持丸博史, 前田高宏, 厚東隆志, 内田敦郎, 永井紀博, 篠田肇, 坪田一男, 小沢洋子. 新規過活動膀胱治療薬ミラベグロン投与後早期に発症した網膜静脈分枝閉塞症の一例. 第66回日本臨床眼科学会 2012/10/25-10/28 京都府京都市 国立京都国際会館

〔図書〕(計0件)
該当なし

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
該当なし
名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)
該当なし
名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

- (1)研究代表者
厚東 隆志 (Takashi Koto)
慶應義塾大学医学部 講師(非常勤)
研究者番号: 60464814
- (2)研究分担者
小沢 洋子 (Yoko Ozawa)
慶應義塾大学医学部 眼科学教室 講師
研究者番号: 90265885