

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791882

研究課題名(和文) 緑内障と酸化ストレス

研究課題名(英文) Glaucoma and oxidative stress

研究代表者

宮本 直哉 (MIYAMOTO, Naoya)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：30620570

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)：正常患者由来と緑内障患者由来の患者から培養した線維柱帯細胞を使用し、sirt1の発現量を比較すると緑内障患者由来の細胞で発現量が高かった。またsirt1遺伝子は線維柱帯細胞で酸化ストレスに対して耐性に働くことをWST8 assayやsiRNAを用いた研究で確認した。また抗緑内障点眼薬であるタフルプロストは、PG受容体を介してc-myc/sirt1転写システムを活性化して、線維柱帯細胞を保護することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Glaucomatous TM cells highly express sirt1 when compared with normal TM cells. Tafluprost induces the expression of sirt1 through the activation of the c-myc transcription factor. TM cells showed reduced sensitivity to H2O2 when cells were treated with tafluprost. In addition, both transcription factor c-myc and sirt1 expression was enhanced by drug induced signal transduction through its receptor. These results indicate that tafluprost possesses a novel mechanism of action and function as potent protective agents against oxidative stress.

研究分野：緑内障

キーワード：緑内障 酸化ストレス 線維柱帯細胞 緑内障点眼薬 分子生物学 転写

1. 研究開始当初の背景

緑内障は不可逆性の視機能障害をきたす疾患であり、今のところ日本における中途失明原因の第一位である。これまで、緑内障の発症機序の詳細は不明とされてきたが、近年、酸化ストレスが緑内障の発症・病態に重要な役割を果たしているという報告が増加している。そこで、酸化ストレスが線維柱帯に及ぼすメカニズムを明らかにすることを目的とする。

現在のところ、緑内障の発症、進行に関与する因子で evidence があるものは眼圧だけであり、緑内障の進行を阻止しうるものは眼圧下降だけである。

眼圧は房水の産生とその流出抵抗によって規定される。房水は眼内から眼外へ主に2つのルートで排出されており、主ルートとしては隅角線維柱帯-シュレム管経路があり、副ルートとしてぶどう膜-強膜路がある。ヒトではこの主ルートでの房水の流出は全体の房水流出の80%以上を占める。

正常眼では隅角線維柱帯は線維柱帯ビームの間に十分な間隙があり、またこのビームの周囲は単層の線維柱帯細胞にとり囲まれている。また、傍シュレム管結合組織は疎で、シュレム管内皮細胞への房水流出はスムーズに行われている。一方、緑内障眼では線維柱帯間隙が狭小化、さらには消失し線維柱帯細胞は減少している。線維柱帯細胞の病的な減少が線維柱帯間隙の狭小化、癒合を促し、また残された線維柱帯細胞は活性化し異常な細胞外マトリックスを産生し、さらに線維柱帯間隙の減少を誘発し、房水の流出抵抗の増加をきたす¹⁾。一般にこれらの変化は加齢により起こるとされる^{2,3)}が、緑内障ではいっそう早く、強く出現する。

また、酸化ストレスが緑内障の発症に関与し、その視野の進行との間にも相関があるといわれている⁴⁻⁷⁾。酸化ストレスはコラーゲンを含めた細胞外マトリックスのリモデリン

グを誘導し、ミトコンドリアに依存しない線維柱帯細胞のアポトーシスを起こすとされる。したがって、その損失は最終的に細胞外マトリックスの増加を招き、線維柱帯間隙の狭小化を誘発する。線維柱帯細胞は培養中では増殖することができるが、生体内では細胞の複製にも限界がある。また、線維柱帯細胞の損失や機能の変性は酸化ストレスが増加した結果起こったものであると考えられている。流出抵抗は酸化ストレスの増加とともに増強し、さらに抗酸化酵素として知られるスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の活性は年齢に依存して下降する^{8,9)}。酸化ストレスは線維柱帯細胞と細胞外マトリックスの接着にも影響し、細胞骨格の再構成を誘発し、線維柱帯の機能の破綻を導くことになる¹⁰⁾。また、酸化ストレスは線維柱帯細胞の生物学的反応にも影響¹¹⁾し、老化や開放隅角緑内障で観察される trabecular thickening や trabecular fusion のような変化を引き起こす^{12,13)}。このように、近年、緑内障と酸化ストレスは密接に関係しているという報告が数多くされてきている。

しかし、酸化ストレスに暴露されたときの線維柱帯細胞の防御機構についてのメカニズムは解明されていない。したがって、そのメカニズムを転写因子を中心に明らかにすることで、緑内障の発症機序を解明したい。本研究では、ヒト線維柱帯培養細胞を使用し、酸化ストレスを負荷して、分子生物学的手法を用いて、酸化ストレス防御機構がどのように働いているのかを調べる。酸化ストレス防御因子として、過酸化水素消去酵素であるペルオキシレドキシシン(PROX)を中心に研究をすすめ、その制御機構についても解明を行う。日常の臨床でよく使用される緑内障点眼薬であるチモロール(a nonselective -adrenoceptor antagonist)、ラタノプロスト(a selective FP prostanoid receptor agonist)を使い、酸化ストレス防御機構に影

響を及ぼすかの検討を加え、各種点眼剤の眼圧下降効果だけでなく、他のメカニズムで酸化ストレス抵抗因子の制御に關与する可能性を検討し、今後の点眼剤の発展と、臨床への応用が期待できる。

参考文献：

- 1) Alvarado JA., et al. Trabecular meshwork cellularity in primary open angle glaucoma and nonglaucomatous normals. *Ophthalmology*. 1984; 91:564-79.
- 2) Grierson I., et al. Age-related depletion of the cell population in the human trabecular meshwork. *Eye* 1 (Pt 2). 1987:204-10
- 3) Grierson L., et al. The effects of age and antiglaucoma drugs on the meshwork cell population. *Res. Clin. Forums* 4;69.
- 4) Gordon MO., et al. The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 2002; 120:714-20; discussion 829-30.
- 5) The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators. *Am J Ophthalmol*. 2000; 130:429-40.
- 6) Leske MC., et al. Factors for glaucoma progression and effect of treatment: the early manifest glaucoma trial. *Arch Ophthalmol*. 2003; 121:48-56.
- 7) Feiner L, Piltz-Seymour JR, Collaborative Initial Glaucoma treatment Study. Collaborative Initial Glaucoma Study: a summary of results to data. *Curr Opin Ophthalmol*. 2003; 14:106-11.
- 8) De La Paz MA, Epstein DL., Effect of age on superoxide dismutase activity of human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996; 37:1849-53.
- 9) Kahn MG., et al. Glutathione in calf trabecular meshwork and its relation to aqueous movement in human and non-human primates. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1983; 24:1283-87.
- 10) Zhou L., et al. Oxidative stress affects cytoskeletal structure and cell-matrix interactions in cells from an ocular tissue: the trabecular meshwork. *J. Cell. Physiol*. 1999; 180:182-89.
- 11) Barksdale Sbhuyan K., Podos S. Oxidative stress in cultured human trabecular meshwork cells suppression of prostaglandin production. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996; 27(Suppl.):210-14.
- 12) Tamm ER., et al. Human and monkey trabecular meshwork accumulate alpha B-crystallin in response to heat shock and oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996; 37:2402-13.
- 13) Hogg P., et al. Aqueous humor stimulates the migration of human trabecular meshwork cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41:1091-98.

2 . 研究の目的

酸化ストレスに暴露されたときの線維柱帯細胞の防御機構についてのメカニズムは解明されていない。したがって、そのメカニズムを転写因子を中心に明らかにすることで、緑内障の発症機序を解明し、抗緑内障点眼薬に關しての抗酸化酵素群に及ぼす影響に關しても検討することを目的とする。

3 . 研究の方法

ヒト線維柱帯培養細胞（正常および緑内障患者由来）を使用し、酸化ストレスとして過酸

化水素を反応させ、酸化ストレス消去酵素のひとつであるペルオキシレドキシシン(PRDX)の発現量を調べ、その制御機構について解明した。

ヒト正常および緑内障患者由来の線維柱帯培養細胞を用い、ペルオキシレドキシシンと酸化ストレスの関係について研究を進めた。それぞれのペルオキシレドキシシンファミリーの発現量を Western blot analysis を用いて定量し、その酸化ストレス制御機構について reporter assay, small interference RNA (siRNA)法、Western blot analysis を用いて解析を行った。また、酸化ストレスに対する感受性を WST8 assay で定量し、さらに、各種緑内障点眼薬を付加し、酸化ストレス関連遺伝子の発現量を解析し、また酸化ストレスに対する感受性変化についても検討を行った。

4. 研究成果

(1) 正常患者由来と緑内障患者由来の線維柱帯細胞を使用し、sirt1 の発現を比較すると、緑内障患者由来の線維柱帯細胞で発現が多かった。

(2) sirt1 遺伝子は抗酸化ストレス作用があると知られているが、線維柱帯細胞で siRNA にて sirt1 の発現を抑制すると、細胞内の ROS の濃度が増加し、WST8 assay で酸化ストレスに対する感受性を調べると、酸化ストレスに対して感受性が増すことがわかり、sirt1 が線維柱帯細胞で酸化ストレス耐性に関与することがわかった。

(3) sirt1 遺伝子の発現メカニズムを探るためにプロモーター領域をコンピュータ解析すると E-box 結合サイトがあることがわかった。そこで E-box 結合タンパクとして知られる twist、c-myc/max、Clock/Bmal1、USF1 を siRNA で抑制すると c-myc/max のみで sirt1 の発現が抑制された。さらに、sirt1 プロモータープラスミドを作成し、c-myc 発現プラスミドを co-transfection すると sirt1 の転写活性が上昇することがわかり、これらのことから sirt1 の発現は c-myc によって制御されていることが示唆された。

(4) 抗緑内障点眼薬として知られる PG 製剤のひとつであるタフルプロストを線維柱帯細胞に添加すると、c-myc/sirt1 転写システムが活性化し、WST8 assay を行って酸化ストレスに対する感受性を調べると、酸化ストレスに対して耐性に働くことがわかった。さらに、PG 受容体に対するアンタゴニストを使

用して同様の実験を行うと、c-myc/sirt1 転写システムの活性化は認められず、このことから上記のメカニズムは PG 受容体を介する作用であることがわかった。

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)

[学会発表](計3件)

宮本直哉、他、タフルプロストは、c-myc/sirt1 を活性化し、線維柱帯細胞を酸化ストレスから保護する、第 116 回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム(東京)、2012、4月5日~8日

Miyamoto Naoya、他、Tafluprost protects human trabecular meshwork cells from oxidative stress through the activation of c-myc/sirt1 transcription pathway、ARVO、Florida(アメリカ)、2012、5月6日~10日

宮本直哉、他、タフルプロストは、PG 受容体を介して c-myc/sirt1 転写システムを活性化する、第 117 回日本眼科学会、東京国際フォーラム(東京)、2013、4月4日~7日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 直哉 (MIYAMOTO, Naoya)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：30620570