

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670751

研究課題名(和文) 眼内抗酸化物質の解析と新規眼内灌流液の開発

研究課題名(英文) Analysis of intracocular antioxidant and development of intraocular irrigating solution

研究代表者

中澤 徹 (Nakazawa, Toru)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30361075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：網膜疾患(黄斑前膜、黄斑円孔：コントロール群)、糖尿病網膜症(糖尿病群)において、各サンプル(末梢血・前房水・硝子体)に含まれる抗酸化活性を有する活性イオウ分子を定量したところ、活性イオウ分子(ポリスルフィド)を中心に15種類以上の抗酸化物質眼内濃度を世界で初めて測定をすることができた。さらに、活性イオウ分子種の生成量を疾患別、サンプル別にも比較し相関関係を検討し、糖尿病群とコントロール間での差異、サンプル種別の差異、さらに前房水と硝子体間の関係も明らかにすることが出来た。

研究成果の概要(英文)：We found that there were reactive persulfides and polysulfides in blood, aqueous humor and vitreous in diabetic eyes as well as controls. Furthermore, the concentration of some persulfides was different between diabetic eyes and controls, and there were some correlations between the persulfides in aqueous humor and vitreous.

研究分野：眼科学

キーワード：抗酸化物質 活性イオウ分子種 糖尿病網膜症

1. 研究開始当初の背景

眼科手術後に視力低下をきたす症例が多数存在するが、その原因として、手術侵襲による角膜混濁、水晶体混濁、網膜細胞死が挙げられる。眼科手術ではその性質上、術中に手術用眼内液を常に多量に循環させており、これが各眼組織に直接触れる続けるため手術侵襲となると考えられている。現在の手術用眼内液はヒト房水組成に近く、グルタチオンの抗酸化働きにより術中の眼組織機能低下を軽減し、角膜内皮保護も期待できるとされている。しかしながら、実際は、術後に角膜内皮疲弊が進行し水疱性角膜症に至る症例、水晶体温存硝子体手術後に水晶体核硬化が進行し白内障に至る症例、さらに網膜手術で視細胞死が進行し術後視機能不良に至る症例が多数存在し問題となっている。これらは手術介入が無くても病態により発生するが、その原因も明らかになっていない。近年、連携研究者の赤池らは活性酸素の特異的なシグナル活性を担うケミカルセンサーを同定し、レドックスシグナルのセカンドメッセンジャーである 8-ニトロ-cGMP の代謝制御に、硫化水素産生経路を発見した (Nature Chem. Biol. 2012)。眼科疾患病態にもこの経路が深く関わっていると推測され、生体内抗酸化物質を測定することで眼科疾患病態解明に寄与すると考えられる。

病態として自然に眼内組織が変性してしまう症例、また手術侵襲により眼内組織が変性してしまう症例がある。術後白内障進行に関しては黄斑上膜手術 (DeBustros S, et al. Am J Ophthalmol 1988)、黄斑円孔手術 (Thompson JT, et al. Am J Ophthalmol 1995) や網膜剥離手術 (Heimann H. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1996) でも高率に発症することが示されてきた。これらの原因は年齢 (Melberg NS, et al. Ophthalmology

1995)のみならず酸化 (Ogura Y, et al. Am J Ophthalmol 1991) が原因であるとされる。さらに網膜視細胞のアポトーシスも酸化ストレスにより引き起こされることが証明されつつある (Krishnamoorthy RR, et al. J Biol Chem. 1999)。

眼科学分野において抗酸化活性を有するポリスルフィド体の眼球内濃度の報告はこれまで皆無である。よって、今回、抗酸化物質の眼内局在を明らかにすることは極めて意義深いと考えられる。本研究により眼球内の抗酸化物質の詳細な局在が世界で初めて見出される。また眼疾患病態の重症度とも比較し (クロスセクショナル) これにより各眼疾患の病態に抗酸化物質に関する新たな知見が得られる。さらに、進行・治療効果との関係も調べるため (ロングitudinal) 治療方針決定や予後予測に有用なバイオマーカーを発見できる可能性が高い。

2. 研究の目的

抗酸化物質に関して前房水・硝子体サンプルを用いて解析し眼科疾患でのそれらの濃度分布を明らかにすることを目的とする。取得データを基盤に、新しい抗酸化物質の有効性を検証する。本研究では 1) 臨床サンプル解析定量評価と 2) 動物生体モデル (*in Vivo*) に対する新しい抗酸化物質の効果の検証を行う。白内障手術は本邦で年間 100 万人以上に行われ、かつ近年増加傾向の硝子体手術では網膜保護効果も期待でき、本研究は極めて大きな社会還元が期待される萌芽研究である。

3. 研究の方法

平成 26 年度には、まず種々の抗酸化物質に関して前房水・硝子体サンプルを用いて濃度解析を行い、疾患別に比較し傾向を捉

える。それら傾向をふまえ、動物モデル *in vivo* 評価系を構築し、各種抗酸化物質の有用性を検討する。平成 27 年度は、前年度の実験結果を踏まえ、最適な新規抗酸化物質の検討・選定を行うとともに、*in vivo* 評価を継続し、角膜・水晶体・網膜への保護効果が可能な最適な抗酸化物質濃度条件を明らかにする。生体内の酸化還元物質の測定は極めて難しいが、そのコア技術は既に東北大学環境保健医学分野において世界で初めて樹立し確立されている。更に、レギュラトリーサイエンスの見地からも検討を重ねる。

[平成 26 年度]

初年度は様々な眼科疾患において、採血時に血液サンプル、手術時に前房水と硝子体サンプルを採取し、抗酸化物質の濃度測定を行う。

様々な眼疾患での抗酸化物質測定

白内障、黄斑前膜、黄斑円孔、裂孔原性網膜剥離、糖尿病網膜症、網膜静脈閉塞症、硝子体出血において、末梢血、前房水と硝子体サンプル内の 15 種類の抗酸化物質の濃度測定を行う。得られたデータを解析し、疾患別の傾向を捉え、さらにサンプル別(末梢血・前房水・硝子体)での相関を調べる。性別、年齢との相関、さらには糖尿病、喫煙歴の有無にも着目し解析を行う。術前所見や術後所見や視機能予後との臨床サンプルとの相関も調べる。

東北大学病院眼科外来において以下の検査を施行する。

- 血圧測定
- 視力・眼圧・屈折、検眼鏡的検査
- 眼底写真・蛍光眼底造影検査・光干渉断層計(OCT)
- レーザースペックルフローグラフィ(LSF)

定期(初回・4 週後・12 週後・24 週後)に上

記検査を施行し、眼疾患進行の評価に用いる。

前房水は白内障手術時や、糖尿病黄斑浮腫・増殖糖尿病網膜症などへの硝子体手術時に前房穿刺をする際に採取する。前房水・硝子体は回収後、-80 に保存する。

抗酸化物質の生体への影響

生体動物において全身麻酔下で新規抗酸化物質の眼球への影響の検証を行う。既存の手術用眼内液である balanced salt solution (右眼) と新規抗酸化物質 (左眼) を 15 分間、前房と硝子体腔に暴露し、その後、安楽死させた後、眼球摘出の後、組織学的評価を行い、正常であるか否か確認する。視細胞のアポトーシスを定量評価するため、採取網膜を固定し網膜切片組織にて TUNEL 染色も行う。その各地点における遊走白血球の評価を CD11 b 抗体による免疫染色法で測定し、網膜細胞の活性化をリン酸化マップカインース抗体を用いて検出し、2 重染色にて細胞種を同定する。ミューラー細胞には GS 抗体、アストロサイトは GFAP 抗体を用いる。障害がもっとも強く起きた地点の網膜と眼内液を採取しサイトカイン抗体アレイを用いて、有意に上昇するサイトカインを同定し、そのサイトカインがどの細胞から産生され、どの細胞に刺激をして視細胞変性が引き起こされるのかを明らかにする。さらに、網膜細胞死の評価にはカスパーゼ等のプローブと顕微鏡を用いるなど、網膜を多角的に評価する。

[平成 27 年度]

次年度以降も最適な新規抗酸化物質の検討・選定を行うとともに、*in vivo* 評価を継続し、角膜、水晶体、網膜神経に関して、の諸因子の両立が可能な条件を明らかにする。

4. 研究成果

今回、網膜疾患（黄斑前膜、黄斑円孔：コントロール群）、糖尿病網膜症（糖尿病群）において、各サンプル（末梢血・前房水・硝子体）に含まれる抗酸化活性を有する抗酸化物質を定量したところ、活性イオウ分子（ポリスルフィド）を中心に15種類以上の抗酸化物質眼内濃度を世界で初めて測定することができた。さらに、活性イオウ分子種の生成量を疾患別、サンプル別にも比較し相関関係を検討し、糖尿病群とコントロール間での差異、サンプル種別の差異、さらに前房水と硝子体間の関係も明らかにすることが出来た。

さらに、レギュラトリーサイエンスの見地から特許戦略相談、承認に必要な検討を開始している。

今後、術後の炎症所見や視機能予後との解析も行い、診断、病期判定、予後予測に着目したバイオマーカーとしての可能性を検討する予定である。さらに、可能であれば、動物酸化ストレス障害モデルの *in vivo* 評価系を構築し、合成した新規抗酸化物質の有効性を検証する予定である。

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10件）

1. Tsuda S, Tanaka Y, Kunikata H, Yokoyama Y, Yasuda M, Ito A, Nakazawa T. Real-time imaging of RGC death with a cell-impermeable nucleic acid dyeing compound after optic nerve crush in a murine model. *Exp Eye Res*. 2016 Mar 21;146:179-188. 査読有

2. Inoue M, Himori N, Kunikata H, Takeshita T, Aizawa N, Shiga Y, Omodaka K, Nishiguchi KM, Takahashi H, Nakazawa T. The reduction of temporal optic nerve head microcirculation in autosomal dominant optic atrophy. *Acta Ophthalmol*. 2016 Mar 3. doi: 10.1111/aos.12999. 査読有

3. Imadome N, Kunikata H, Asano S, Nakazawa T. Retinal Pigment Epithelium Hyperplasia After Unsuccessful Surgery for Macular Hole. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*. 2016 Mar 1;47(3):284-6. doi: 10.3928/23258160-20160229-13. 査読有

4. Aizawa N, Kunikata H, Nitta F, Shiga Y, Omodaka K, Tsuda S, Nakazawa T. Age- and Sex-Dependency of Laser Speckle Flowgraphy Measurements of Optic Nerve Vessel Microcirculation. *PLoS One*. 2016 Feb 12;11(2):e0148812. doi: 10.1371/journal.pone.0148812. eCollection 2016. 査読有

5. Yui R, Kunikata H, Aizawa N, Nakazawa T. Anterior chamber aqueous flare and optic nerve microcirculation in eyes with rhegmatogenous retinal detachment. *Acta Ophthalmol*. 2016 Jan 25. doi: 10.1111/aos.12970. 査読有

6. Kunikata H, Nakazawa T. Recent Clinical Applications of Laser Speckle Flowgraphy in Eyes with Retinal Disease. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. 2016 Mar-Apr;5(2):151-8. doi: 10.1097/APO.0000000000000160. 査読有

7. Himori N, Kunikata H, Shiga Y, Omodaka K, Maruyama K, Takahashi H, Nakazawa T. The association between systemic oxidative stress and ocular blood

flow in patients with normal-tension
glaucoma. Graefes Arch Clin Exp
Ophthalmol. 2016 Feb;254(2):333-41. doi:
10.1007/s00417-015-3203-z. 査読有

8. Maruyama K, **Kunikata H**, Sugita S,
Mochizuki M, Ichinohasama R,
Nakazawa T. First case of primary
intraocular natural killer t-cell lymphoma.
BMC Ophthalmol. 2015 Nov 19;15:169.
doi: 10.1186/s12886-015-0158-0. 査読
有
9. **Kunikata H, Nakazawa T**. Intraoperative
Optical Coherence Tomography-Assisted
27-Gauge Vitrectomy in Eyes with
Vitreoretinal Diseases. Case Rep
Ophthalmol. 2015 Jul 7;6(2):216-22. doi:
10.1159/000437014. eCollection 2015
May-Aug. 査読有
10. **Kunikata H**, Aizawa N, Kudo M,
Mugikura S, Nitta F, Morimoto R,
Iwakura Y, Ono Y, Satoh F, Takahashi H,
Ito S, Takahashi S, **Nakazawa T**.
Relationship of ocular microcirculation,
measured by laser speckle flowgraphy, and
silent brain infarction in primary
aldosteronism. PLoS One. 2015 Feb
12;10(2):e0117452. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 第 69 回日本臨床眼科学会 シンポジウム
～臨床検体から網膜硝子体疾患を理解す
る～ 「硝子体の抗酸化メタボローム解
析」2015 年 10 月 24 日名古屋国際会議場
(名古屋市) **國方彦志**

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：新規抗酸化眼内灌流液
発明者：中澤徹、赤池孝章、國方彦志
権利者：国立大学法人東北大学
種類：特許
番号：特願 2015-194716
出願年月日：2015/09/30
国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

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〕
ホームページ等

6 . 研究組織
(1)研究代表者
中澤徹 (TORU, Nakazawa)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号：30361075

(2)研究分担者
國方彦志 (HIROSHI, Kunikata)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：40361092

井田智章 (TOMOAKI, Ida)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70570406

(3)連携研究者
連携研究者：赤池孝章 (TAKA AKI,
Akaike)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号： 20231798