

機関番号：37116

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592067

研究課題名 (和文) 緑内障の発症機序に関する分子生物学的研究

研究課題名 (英文) MOLECULAR BIOLOGICAL STUDIES IN DEVELOPMENT OF GLAUCOMA

研究代表者

田原 昭彦 (TAWARA AKIHIKO)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：90117169

研究成果の概要 (和文)：緑内障は現在日本における中途失明の第一位の原因疾患であるが、発症病態は不明である。今回、手術時の摘出標本や培養線維柱帯細胞を分子生物学的、免疫組織学的、生化学的に調べ、緑内障の発症機序などについて検討した。

その結果、緑内障で細胞外マトリックスの産生を促す物質が増加しており、また、線維柱帯に細胞外マトリックスが多量に蓄積していて、そのことが緑内障発症に関係すると考えられた。また、線維柱帯細胞には酸化ストレスから自分を守る物質が存在していて、一部の抗酸化物質や緑内障点眼薬がその防御作用を増強させることが分かった。

研究成果の概要 (英文)：In japan, glaucoma is the most common cause of acquired blindness, the etiology of disease, however, still unknown. To clarify the etiology, we examined trabecular tissues and cultured trabecular meshwork cells using molecular biological, immunohistochemical and biochemical methods.

We found the increase in substances stimulating extracellular matrix production in the aqueous humor, and accumulations of extracellular matrix in the trabecular meshwork in glaucomatous eyes, which must be associated with development of glaucoma. We also found one of the antioxidant enzymes in the trabecular meshwork cells, and found that an antioxidative compound or a kind of anti-glaucomatous eye drops could increase activity of the enzyme.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：緑内障、線維柱帯、酸化ストレス、ステロイド緑内障、細胞外マトリックス視神経乳頭ピット、抗 VEGF 抗体、ケルセチン

1. 研究開始当初の背景

緑内障は日本における中途失明原因の第1位であるが、発症機序の詳細は不明で確実な治療法もない。

(1) 緑内障の原因遺伝子が明らかにされてきており、その中には線維柱帯の細胞外マトリックスに関係したものもあるが、その緑内障発症との関係

- は不明である。
- (2) 緑内障の線維柱帯で、細胞外マトリックスが増加しているとの報告や、細胞外マトリックスの産生および代謝に関係する物質に異常があるとの報告があるが、詳細は不明である。
- ## 2. 研究の目的
- 各種緑内障の発症機序について、前房隅角の線維柱帯組織を対象に、分子生物学的手法で明らかにする。
- ## 3. 研究の方法
- (1) 実験動物あるいは培養線維柱帯細胞を用いて、緑内障における細胞外マトリックスおよび細胞外マトリックスの産生や代謝に影響する物質を調べる。
 - (2) 各種緑内障患者の遺伝子変異を調べ、線維柱帯の組織変化との関連を調べる。
 - (3) 培養線維柱帯細胞を用いて、酸化ストレスが線維柱帯細胞に及ぼす影響や線維柱帯細胞の反応、抗酸化ストレス物質の影響を調べる。
 - (4) 細胞外マトリックスの産生に関する TGF- β の房水中の濃度、線維柱帯での分布を、各種緑内障眼で調べる。
- ## 4. 研究成果
- (1) 培養ヒト線維柱帯細胞を用いて、線維柱帯細胞の細胞外マトリックス分解能を調べた。その結果、緑内障由来の線維柱帯細胞の方が、正常眼由来の線維柱帯細胞よりも細胞外マトリックスの分解能が高く、MMP-9 の活性も高いことが分かった。また、膜結合型 MMP インヒビターである Reck の発現が、緑内障由来細胞の方が低かった。現在、さらに研究を進めている。
 - (2) 発達緑内障7例について原因遺伝子解析を行い、7例中1例で PITX2 の異常が明らかになった。本症例は Axenfeld-Rieger 症候群で、線維柱帯切開術を行い眼圧がコントロールされた。遺伝子異常を有する緑内障の線維柱帯を形態学的に調べることはできなかった。
 - (3) ステロイド緑内障の線維柱帯を免疫組織学的に調べ、ステロイド緑内障では正常及び原発開放隅角緑内障に比較して線維柱帯の IV 型コラーゲン、ヘパラン硫酸系プロテオグリカンが多量に分布していることが分かった。
 - (4) 培養正常ヒト線維柱帯細胞を用いて、副腎皮質ステロイド薬と線維柱帯細胞の骨格変化および ROCK との関係について調べた。その結果、副腎皮質ステロイド薬による F-アクチンを主体にした線維柱帯細胞の細胞骨格の変化は、ROCK1 を介していることが分かった。
 - (5) 培養ヒト線維柱帯細胞を用いて、線維柱帯細胞が抗酸化酵素である peroxiredoxin

- (PRDX)を有することが明らかになった。また、PDDX の発現は正常眼由来よりも緑内障由来の線維柱帯細胞の方が強かった。さらに、緑内障点眼液であるニプラジロールが培養線維柱帯細胞の抗酸化作用を増強させることが分かった。
- (6) フラボノイドの一種であるケルセチンの線維柱帯細胞に及ぼす影響を、培養細胞を用いて調べた。その結果、ケルセチンは転写因子 NRF1 を誘導することで抗酸化酵素 PRDX の発現を上昇させ、線維柱帯細胞を酸化ストレスから保護する作用があることが分かった。
 - (7) 培養ヒト線維柱帯細胞を用いて、DNA 修復や寿命、老化に関与するヒストン脱アセチル化酵素 sirt1 と線維柱帯細胞の抗酸化作用との関係を分子生物学的に調べた。その結果、①sirt1 は、転写因子である c-myc によって発現が制御されていること。②sirt1 が、酸化ストレス作用を増強することで、線維柱帯細胞を酸化ストレスから防御する作用を有することが分かった。
 - (8) 隅角発育異常緑内障、原発開放隅角緑内障、落屑緑内障眼の手術時に得られた線維柱帯組織の TGF- β 2 および細胞外マトリックスの分布を免疫組織学的に調べた。また、房水中の TGF- β 2 の量を ELISA 法で調べた。その結果、緑内障の線維柱帯組織には TGF- β 2 が分布していること、IV 型コラーゲンの量が多そうなることが分かった。また房水中の TGF- β 2 の量は、コントロールの白内障眼に比較して緑内障眼で増加していた。
 - (9) 抗 VEGF 抗体である Bevacizumab を硝子体内注入した血管新生緑内障眼の手術時に摘出された線維柱帯標本を形態学的、免疫組織学的に検索して、注入群では新生血管の窓構造が減少していることが分かった。
 - (10) Bevacizumab を硝子体内注入した血管新生緑内障眼で、注入前後に前眼部蛍光造影を行い、Beverizumab の前眼部新生血管に及ぼす影響を調べた。その結果、Beverizumab 注入で虹彩や線維柱帯の新生血管の透過性が減少するが、新生血管の構築には変化を及ぼさないことが分かった。
 - (11) 現在スタンダードに使用されている Goldmann 圧平式眼圧計 (GAT)、および角膜の状態に影響されないとされる Dynamic Contour Tonometer で、小切開白内障手術前後の眼圧を測定し、白内障手術が眼圧に与える影響を検討

した。その結果、①小切開白内障手術後3日で角膜浮腫のためGATでは眼圧が過小評価されるが、術後7日以降では眼圧測定に影響を与えるような角膜の物理的変化はないこと。②小切開白内障手術後は眼圧が有意に下降することが分かった。

- (12) 硝子体手術を行った劇症型未熟児網膜症の緑内障発症の危険性について検討した。その結果、①劇症型未熟児網膜症では硝子体手術後に緑内障を発症しやすいこと。②出生後早期に硝子体手術を行うほど、緑内障発症の危険性が有意に増加することが分かった。
- (13) 先天性視神経乳頭ピットを有する眼の眼底、光干渉断層計、視野所見を3年にわたって観察した。その結果、先天性視神経乳頭ピットは視野障害を合併した視神経線維層欠損を伴うこと、さらにその視野障害、視神経線維層欠損は進行性であることが分かった。
- (14) アフリカツメガエルの卵細胞を使用して、緑内障点眼治療薬のアポトーシス抑制作用を調べた。その結果、チモロール、ベタキサロールは NMDA 受容体を介したアポトーシス抑制作用を有するが、ラタノプロストは有しないことが分かった。

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)

[雑誌論文] (計 20 件)

1. Ito K, Tawara A, IOP Measured by Dynamic Contour Tonometry Correlates with IOP Measured by Goldmann Applanation Tonometry and Non-contact Tonometry in Japanese subjects、Journal of Glaucoma、査読有、In press
2. Miyamoto N, Tawara A, Quercetin induces the expression of peroxiredoxin 3 and 5 through Nrf2/NRF1 transcription pathway、Investigative Ophthalmology & Visual Science、査読有、Vol. 52, No. 2, 2011, pp. 1055-1063
3. Okada H, Tawara A, Amniotic membrane transplantation for repair of leaking glaucoma filtering blebs with scleral perforation、Ophthalmic Surgery Lasers & Imaging、査読有、Vol. 41, 2010、Online Only
4. 田原昭彦、緑内障と抗コリン作用薬、日本医事新報、査読無、4500号、2010、95-96

5. 新田憲和、田原昭彦、線維柱帯切除術後の脈絡膜剥離に関する臨床経過の検討、あたらしい眼科、査読有、27巻、12号、2010、1731-1735
6. Ishibashi S、Tawara A、Angiographic changes in iris and iridocorneal angle neovascularization after intravitreal bevacizumab injection、Archives of Ophthalmology、査読有、Vol. 128, No. 12, 2010, pp. 1539-1545
7. 田原昭彦、緑内障と前房隅角、あたらしい眼科、査読無、27巻、8号、2010、1067-1076
8. 田原昭彦、緑内障と前房隅角、Frontiers in Glaucoma、査読無、Vol. 11, No. 1, 2010, pp. 23-24
9. 田原昭彦、血管新生緑内障の治療戦略、臨床眼科、査読無、63巻、臨時増刊号、2009、351-355
10. 久保田敏昭、田原昭彦、発達緑内障の隅角所見、臨床眼科、査読無、63巻、11号、2009、48-51
11. 渡部晃久、藤紀彦、那須貴臣、久保田敏昭、田原昭彦、40歳以下に発症した緑内障の臨床的特徴に関する検討、発達緑内障、臨床眼科、査読有、63巻、7号、2009、1075-1079
12. Miyamoto N, Izumi H, Miyamoto R, Kubota T、Tawara A、Kohno K, Sasaguri Y, Nipradilol and Timolol Induce Foxo3a and Peroxiredoxin 2 Expression and Protect Trabecular Meshwork Cells from Oxidative Stress、IOVS、査読有、Vol. 50, No. 6, 2009, pp. 2777-2784
13. 田原昭彦、【眼科における先天異常】緑内障、眼科、査読無、51巻、6号、2009、765-772
14. Kubota T、Aoki R, Harada Y, Tou N, Kohno Y, Tawara A、Sato H, Shimajiri S、Trabecular meshwork in neovascular glaucoma eyes after the intravitreal injection of bevacizumab、Br J Ophthalmol、査読有、Vol. 93, No. 4, 2009, pp. 557-558

15. 小島亜有子、久保田敏昭、森田啓文、田原昭彦、ステロイドレスポnderの臨床的特徴、臨床眼科、査読有、62巻、9号、2008、1519-1522
16. Harada Y、 Hirose N、 Kubota T、 Tawara A、 The Influence of central corneal thickness and corneal curvature radius on the intraocular pressure as measured by different tonometers: non contact and Goldmann、 J Glaucoma、 査読有、 Vol. 17、 No. 8、 2008、 pp. 619-625
17. Tawara A、 Tou N、 Kubota T、 Harada Y、 Yokota K、 Immunohistochemical evaluation of the extracellular matrix in trabecular meshwork in steroid-induced glaucoma、 Graefes Arch. Clin Exp Ophthalmol、 査読有、 Vol. 246、 No. 7、 2008、 pp. 1021-1028
18. Kubota T、 Nagata T、 Tawara A、 Okada H、 Yamashita M、 Harada Y、 Yanase M、 Influence of IOP measurement through the eyepiece of the slit lamp on Goldmann applanation tonometry、 Eur J Ophthalmol、 査読有、 Vol. 18、 No. 6、 2008、 pp. 910-914
19. Kubota T、 Aoki R、 Harada Y、 Tou N and Tawara A、 Intravitreal injection of bevacizumab to treat neovascular glaucoma、 Jpn J Ophthalmol (letter)、 査読有、 Vol. 52、 No. 5、 2008、 pp. 407-425
20. Nagata T、 Ueno H、 Kubota T、 Toshihira Y、 Tsutui M、 Tawara A、 Yanagihara N、 Direct Inhibition of N-methyl-D-aspartate function by antiglaucomatous B-antagonists、 J Pharmacol Sci、 査読有、 Vol. 106、 No. 3、 2008、 pp. 423-434

[学会発表] (計 26 件)

1. 田原昭彦、一般医家のための眼科学 — 緑内障編 —、田川医師会学術講演会、2010年12月10日、田川医師会(福岡県)
2. Ito K、 Tawara A、 Effects of cataract surgery on intraocular pressure evaluated with dynamic contour tonometry、 APJGC2010、 2010年12月4・5日、 Taipei International Convention Center (台湾・台北)
3. 田原昭彦、特別講演 緑内障の治療 — 手術療法、2010年10月30日、わかやま

館(和歌山県)

4. 田原昭彦、酸化ストレスと緑内障、熊本眼科疾患フォーラム、2010年10月23日、ホテル日航(熊本県)
5. 宮本理恵、田原昭彦、視神経障害と視野障害が進行したOptic disc pitの1例、第21回 日本緑内障学会、2010年9月25日、アクロス福岡(福岡県)
6. 小島亜有子、田原昭彦、他のプロスタグランジン関連薬からビマトプロストへの変更による眼圧変化、第21回 日本緑内障学会、2010年9月25日、アクロス福岡(福岡県)
7. 石橋真吾、田原昭彦、網膜光凝固術の前眼部新生血管への影響—蛍光前眼部造影による検討—、第21回 日本緑内障学会、2010年9月24日、アクロス福岡(福岡県)
8. 田原昭彦、特別講演 緑内障の手術療法 — 合併症とその対策を中心に —、第102回 南大阪眼科勉強会、2010年9月11日、近畿大学医学部附属病院(大阪府)
9. 石橋真吾、田原昭彦、網膜光凝固術の前眼部新生血管への影響—蛍光前眼部造影による検討—、第48回 六大学合同眼科研究会、2010年9月4日、九州大学 百年講堂大ホール(福岡県)
10. 宮本理恵、田原昭彦、視神経障害と視野障害が進行したOptic disc pitの1例、第48回 六大学合同眼科研究会、2010年9月4日、九州大学 百年講堂大ホール(福岡県)
11. 小島亜有子、田原昭彦、他のプロスタグランジン関連薬からビマトプロストへの変更による眼圧変化、第48回 六大学合同眼科研究会、2010年9月4日、九州大学 百年講堂大ホール(福岡県)
12. 宮本直哉、田原昭彦、Quercetin(ケルセチン)は酸化酵素ペルオキシレドキシシン3、5の発現を誘導することで、ヒト線維柱帯細胞を酸化ストレスから防御する、第21回 眼科酸化ストレス研究会、2010年7月30日、東京慈恵会医科大学(東京都)

13. Tawara A, Ishibashi S, Intravitreal injection of bevacizumab reduces permeability of newly formed vessels but not changes their distribution in neovascular glaucoma, ISER2010, 2010年7月19日、Hilton Montreal Bonaventure Hotel (カナダ・モントリオール)
 14. 田原昭彦、特別講演 緑内障の手術療法、第156回 大分眼科集会、2010年6月12日、労働福祉会館(大分県)
 15. Miyamoto R, Tawara A, Quercetin induces the expression of peroxiredoxins 3 and 5 through Nrf2/NRF1 transcription pathway, ARVO2010, 2010年5月6日、Broward County Convention Center (米国・フロリダ)
 16. Ishibashi S, Tawara A, Effects of intravitreal bevacizumab on anterior segment neovascularization in neovascular glaucoma, ARVO2010, 2010年5月5日、Broward County Convention Center (米国・フロリダ)
 17. Tawara A, Miyamoto N, TGF- β 2 cocentration in aqueous humor and its localization in trabecular meshwork in glaucomatous eyes, ARVO2010, 2010年5月4日、Broward County Convention Center (米国・フロリダ)
 18. 宮本理恵, 田原昭彦、ケルセチンはNRF1転写システムを介して、線維柱帯細胞を酸化ストレスから防御する、第114回日本眼科学会、2010年4月16日、名古屋国際会議場(愛知県)
 19. 田原昭彦、須田記念講演 緑内障と前房隅角、第20回 日本緑内障学会、2009年11月14日、沖縄(沖縄コンベンションセンター)
 20. 宮本直哉、和泉弘人、宮本理恵、石橋真吾、永田竜朗、河野公俊、田原昭彦、線維柱帯培養細胞を用いたフラボノイドの抗酸化ストレス作用についての実験的検討、第20回 日本緑内障学会、2009年11月13日、沖縄(沖縄コンベンションセンター)
 21. 原田行規、平田亮、田原昭彦、緑内障眼に対するBimanual Phaco Surgery単独手術の眼圧下降効果、第20回 日本緑内障学会、2009年11月13日、沖縄(沖縄コンベンションセンター)
 22. 石橋真吾、田原昭彦、久保田敏昭、相馬利香、Bevacizumab硝子体内注射の前眼部新生血管への影響—蛍光前眼部造影による検討—、第63回 日本臨床眼科学会、2009年10月11日、福岡(福岡国際会議場・福岡サンパレス・マリンメッセ福岡)
 23. 田原昭彦、特別講演 血管新生緑内障、ハイパジールコーワ点眼液 0.25%発売10周年記念講演会、2009年7月25日、新潟(ANAクラウンプラザホテル新潟)
 24. 伊東健、青木瑠美、田原昭彦、久保田敏昭、白内障手術前後での短期間眼圧変化は眼圧計の違いにより差異があるか、第79回 九州眼科学会、2009年5月29日、福岡(アクロス福岡)
 25. 久保田敏昭、特別講演 続発緑内障の病態～落屑症候群・血管新生緑内障と抗VEGF療法～、第8回 宮崎緑内障セミナー、2009年5月23日、宮崎(宮日会館)
 26. 宮本直哉、和泉弘人、宮本理恵、久保田敏昭、河野公俊、田原昭彦、ニブラジロールはPRDX2を誘導し、線維柱帯細胞を酸化ストレスから保護する、第113回 日本眼科学会総会、2009年4月16日、東京(東京国際フォーラム)
- [図書] (計3件)
1. 田原昭彦、株式会社 中山書店、眼科診療のコツと落とし穴 1—手術—全眼一部一、2008、222
 2. 久保田敏昭、田原昭彦、株式会社 メジカルレビュー社、眼科診療のスキルアップ 緑内障編、2008、187
 3. 田原昭彦、株式会社 中山書店、眼科診療のコツと落とし穴 3—検査・診断一、2008、265
- [その他]
ホームページ等
http://www.uoeh-u.ac.jp/kouza/ganka/intro_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田原 昭彦 (TAWARA AKIHIKO)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：90117169

(2) 研究分担者

久保田 敏昭 (KUBOTA TOSHIAKI)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：30205140
(H20→H21：研究分担者)
吉田 茂生 (YOSHIDA SHIGEO)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：50363370

(3) 連携研究者

近藤 寛之 (KONDO HIROYUKI)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40268991
(H22：連携研究者)
永田 竜朗 (NAGATA TATSUO)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：80389460
(H20：連携研究者)
石橋真吾 (ISHIBASHI SHINGO)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：60525442
(H21→H22：連携研究者)