

令和 3 年 8 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11420

研究課題名(和文) 眼圧日内変動リズムにおける発振メカニズムの解明

研究課題名(英文) Detecting the circadian oscillator of the murine intraocular pressure rhythm

研究代表者

杉山 和久 (Sugiyama, Kazuhisa)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：80179168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの虹彩毛様体におけるOpn4およびOpn5の発現がRT-PCRにて確認できたが、虹彩毛様体のみおよび網膜と角膜と共培養をin vitroで行ってもPER2::luciferase knock in マウスで確認できる範囲では光に感受性は認めなかった。Opn4^{-/-};rd1/rd1(melrd)マウスを用いて、wild-typeの日内変動と比較することで眼圧日内変動は光に直接同調することなくSCNのシグナルを受け取っていることを解明した。さらにSCNから眼圧日内変動形成のシグナル伝達物質として、副腎ホルモンであるグルココルチコイドが重要な役割を果たしている可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上記の研究成果により、マウスの眼圧日内変動は体内中枢時計であるSCNによってそのリズムはコントロールされ、SCNから日内変動形成に至るまでのシグナル伝達には副腎皮質ホルモンであるグルココルチコイドが大きな役割を果たしていることを初めて報告した。この知見により、今後グルココルチコイドをターゲットとした眼圧日内変動コントロールを試み、最終的には緑内障の新規治療薬へと繋がっていく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The iris/ciliary body complex expressed Opn4 and Opn5 mRNA; however, unlike in retina and cornea, neither the iris-CB complex nor the co-cultured complex was directly entrained by light-dark cycle in vitro. The diurnal IOP change of Opn4^{-/-};rd1/rd1 mice showed an antiphase pattern to wild-type mice and their rhythms followed the whole-animal behavioral rhythm. In addition, glucocorticoid, the hormone secreted from the adrenal gland, plays an important role in creating the murine circadian IOP rhythm.

研究分野：緑内障

キーワード：緑内障 体内時計 眼圧日内変動 視交叉上核 オプシン グルココルチコイド

1. 研究開始当初の背景

緑内障診療において、眼圧下降は唯一の治療手段である。薬物および手術による加療により眼圧を十分下降させることで緑内障進行を抑えることができるが、その眼圧は日内変動することが知られている。よって通常の外来診療において眼圧の測定値は変動のある一時点を見ているに過ぎない。さらに、緑内障眼では変動幅が大きく、この眼圧変動幅が大きいほど緑内障発症のリスクが大きく、緑内障性視野障害進行のリスクも大きいと報告されている。その変動パターンは個々により大きなばらつきが存在し、診療時間帯に低眼圧を示している症例でも、夜間に高眼圧を呈す場合や、その逆のパターンも見られる。この日内変動のリズムの多様性が、緑内障診療において眼圧の評価や治療方針の決定を困難にしている。理想的にはすべての緑内障患者の眼圧日内変動パターンを把握することが理想的であるが、それは患者・医療者側にも大きな負担を強いることになり、実際には広く行なわれているとは言い難い。この予測困難である眼圧日内変動のメカニズムを予測・把握することができれば、眼圧日内変動をターゲットとした新規治療につながると考えられる。

眼圧は過去より概日リズムを呈する生体现象の一つとして注目され、哺乳類においてそれを裏付けるが過去に多数報告されてきた。申請者らは眼圧日内変動には時計遺伝子が必須であることを初めて明らかにした。生体リズム中枢は視交叉上核であるが、この中枢時計から種々の組織における概日リズム(末梢時計)のコントロールが行なわれている。しかし、特に眼の組織における中枢時計から末梢時計までの伝達経路は不明な点が多く、哺乳類ではいかに眼圧の概日リズムを形成されているかは不明であった。近年網膜における末梢時計は一定条件のもとに、中枢時計からのコントロールを受けることなく、独自の光受容体を介して直接外部の明暗サイクルに同調することが明らかとなった。よって眼組織における末梢時計は特殊なメカニズムでリズムを刻んでいる可能性がある。

2. 研究の目的

眼圧日内変動の制御機構を解明することは緑内障治療における“アンメットニーズ”であること、眼組織は中枢時計から独立してリズムを刻む可能性があること、そのリズム機構をターゲットとした新規治療が発展しうることから、視細胞が萎縮し、さらに Opn4 をノックアウトした、外部の明暗サイクルに同調できない盲状態である Opn4^{-/-};rd/rd マウス、および野生型マウスを用いて、光周期に対する毛様体における時計遺伝子の発現機構、および眼圧日内変動の制御機構を解明するというを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) 房水産生の場合である、マウス虹彩毛様体における Opn4, Opn5 の mRNA 発現の確認を確認
- 2) PER2::LUC マウスを用いて毛様体におけるルシフェラーゼ発光を測定し、時計遺伝子の周期的な発現を *in vitro* にて解析する。また *in vitro* において組織を明暗サイクルへ同期させることで光への応答を確認する。
- 3) 12h/12h 明暗サイクル下での虹彩毛様体における時計遺伝子の経時的な発現を qPCR にて解析
- 4) Mel1rd(Opn4^{-/-};rd1/rd1) マウスを用い、SCN と明暗サイクルを分離して眼圧日内変動を測定、コントロール中枢の特定
- 5) 副腎摘出マウスの眼圧日内変動を測定

4. 研究成果

マウスの虹彩毛様体における Opn4 および Opn5 の発現が RT-PCR にて確認できた。しかし、同じく Opn4,5 を発現する網膜や角膜とは異なり、虹彩毛様体単独、および網膜と角膜と共培養した組織を左右それぞれ *in vitro* で逆位相の明暗サイクルに 5 日間暴露しても、PER2::LUC マウスで確認できる範囲では光に感受性は認めなかった。

12h/12h の明暗サイクル下で飼育されたマウスから摘出された虹彩毛様体は肝臓などの他の強いリズムを示す組織と同様に qPCR で時計遺伝子の強いリズム発現を示した。

外部の明暗サイクルに同調することのできない mel1rd マウスを用いて、このマウスが野生型マウスと逆位相となる明期に active になったタイミングで 24 時間経時的に眼圧を測定した。明暗サイクルに同調できる野生型マウスは過去の報告と同様に夜間(ZT14)に眼圧の変動ピークを示したが、明期に active となっている mel1rd マウスは明期にピーク(ZT2)をもった、通常とは逆位相の眼圧日内変動を示した。よって、眼圧日内変動は光に直接同調することなく、SCN のシグナルを受け取っていることを解明した。

次に、中枢時計から末梢時計の一つである眼の虹彩毛様体にどのようにシグナル伝達が行なわれているのかという疑問点がでてきた。そこで、副腎ホルモンに着目し、追加実験を行った。まず、先述の方法と同様に 12h/12h 明暗サイクル下で飼育された野生型マウスから 3 時間ごとに虹彩毛様体を摘出し、グルココルチコイドレセプター(GR) mRNA の経時的な発現変化を確認したところ、マウスの虹彩毛様体における GR mRNA の発現は 1 日を通して変化していなかった。次

に PER2::LUC マウスから虹彩毛様体を摘出し、ルシフェラーゼ発光を5日間観察し、その摘出組織における circadian time(CT)を確認した後、vehicle または dexamethasone (100nM) 12 μ l を培地に添加し、グルココルチコイドの虹彩毛様体に対する phase-shifting effect を確認した。その結果、デキサメタゾンの添加により、CT8 から CT12 の間に添加された場合は phase-delay、CT16 から CT20 の間に添加された場合は phase-advance を引き起こすことが判明した。そして最後に、副腎を摘出したマウス(ADX マウス)と偽手術を受けたマウス(Sham マウス)を用いて、12時間の明暗サイクル下で4時間毎の眼圧日内変動測定を行った。副腎摘出により、マウスの眼圧日内変動は消失し、特に夜間の眼圧上昇が消失することが明らかとなった。これらの結果より、グルココルチコイドは虹彩毛様体の概日リズムを変化させ、副腎の機能が正常な眼圧日内変動形成に必須であることが判明した。よって副腎ホルモンであるグルココルチコイドが眼圧リズム形成に大きく関わっている可能性を示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tuchiya S, Higashide T, Toida K, Sugiyama K	4. 巻 42(7)
2. 論文標題 The Role of Beta-Adrenergic Receptors in the Regulation of Circadian Intraocular Pressure Rhythm in Mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Curr Eye Res.	6. 最初と最後の頁 1013-1017
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tuchiya S, Buhr ED, Higashide T, Sugiyama K, Van Gelder RN	4. 巻 12(9)
2. 論文標題 Light entrainment of the murine intraocular pressure circadian rhythm utilizes non-local mechanisms.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plos One.	6. 最初と最後の頁 e0184790
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 土屋俊輔、東出朋巳、杉山和久.
2. 発表標題 吸入麻酔薬(2%イソフルラン)下マウス眼圧測定の有用性：眼圧日内変動における検討.
3. 学会等名 第30回日本緑内障学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土屋俊輔
2. 発表標題 Effects of glucocorticoid on the murine intraocular pressure circadian rhythm
3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土屋俊輔
2. 発表標題 Visual field changes after vitrectomy for epiretinal membranes in glaucoma
3. 学会等名 23rd International Visual Field & Imaging Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土屋俊輔
2. 発表標題 10-2視野セクター別解析による緑内障の黄斑上膜術後視野変化の検討
3. 学会等名 第72回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土屋俊輔
2. 発表標題 Mechanisms of light entrainment of the mammalian ciliary body circadian clock.
3. 学会等名 ARV02017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------