

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11483

研究課題名(和文) アルドステロンによる網膜神経節細胞死のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism of the retina ganglion cell death against aldosterone neurotoxicity

研究代表者

廣岡 一行 (Hirooka, Kazuyuki)

広島大学・病院(医)・准教授

研究者番号：10325350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(RAAS)が網膜神経節細胞死に関わっていることを我々は明らかにしてきた。過剰のグルタミン酸が細胞障害を引き起こすことは以前から知られているが、RAASはグルタミン酸受容体を介する系とは全く異なる経路により網膜神経節細胞死をひこ起こすことを今回の研究で明らかにした。

また血漿中のアルドステロン濃度と網膜神経節細胞死との関係を調べたところ、血漿中のアルドステロン濃度が高いほど、より多くの網膜神経節細胞が障害を受けることを明らかにした。アルドステロンは網膜血流速度を低下させるが、この血流量の低下は細胞死に関わっていないことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障では網膜神経節細胞が障害されるが、この細胞死をもたらす経路を明らかにすることが、緑内障治療において重要である。我々は網膜神経節細胞死を引き起こす新しいメカニズムを明らかにした。さらに血液中のアルドステロンの濃度が高いほど、より多くの網膜神経節細胞が障害を受けることを今回明らかにしたが、これは従来から我々が報告してきたアルドステロンが網膜神経節細胞死を引き起こすことを一層明白にしたものである。今回の研究でアルドステロンによる網膜神経節細胞死のメカニズムが明らかになってきたことから、将来の治療法の開発に繋がり、結果として緑内障による失明を減らすことができるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：We reported that the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) appeared to play an important role with regard to the neuronal degeneration that occurred in the retina.

Glutamate excitotoxicity triggered by overactivation of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors may be a potential risk factor for retinal ganglion cell (RGC) death. Our findings show that there is no relationship between the RAAS and NMDA receptor-mediated signal with regard to RGC death. We investigated the relationship between the plasma concentration of aldosterone and changes in the number of RGCs after systemic administration of aldosterone. There was a negative correlation between the plasma aldosterone concentration and the number of RGCs. Systemic administration of aldosterone caused a decrease in optic nerve head blood flow. Although the blood flow decrease was well correlated with RGC loss, the mild blood flow reduction indicates that retinal ischemia was unlikely to be the primary cause of RGC loss.

研究分野：緑内障

キーワード：緑内障 網膜神経節細胞 アルドステロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) アルドステロンを全身投与すると眼圧が上昇することなく、網膜神経節細胞のみが障害される、すなわち正常眼圧緑内障と同じ病態を呈することを我々は報告した。¹⁾ グルタミン酸輸送体の遺伝子を欠損したマウスでは眼圧が正常であるにも関わらず、ヒトの正常眼圧緑内障の所見と一致し、グルタミン酸受容体阻害薬であるメマンチンを投与すると神経節細胞の変性は抑制されることが報告されている。網膜神経節細胞死にグルタミン酸が重要な役割を果たしていることを示唆する研究結果であるが、グルタミン酸とアルドステロンの関係については明らかになっていない。

(2) アルドステロン投与後の全身の血流速度については腎臓や心臓を中心に報告されているが、血流速度が減少するという報告があれば、増加あるいは不変という報告もあり一定の見解は得られていない。エンドセリン-1 を投与したところ、眼圧が上昇することなく網膜内層に障害が生じることが報告されており、これは血流の低下によるものと考えられている。それではアルドステロン投与後の網膜血流はどうなっているのか？これに関する報告は現時点ではなく、そのためアルドステロン投与により網膜血流が減少し、その結果網膜神経節細胞死が生じる可能性も考えられる。

2. 研究の目的

アルドステロンによる網膜神経節細胞死のメカニズムを解明していくために、研究期間内に、血中アルドステロン濃度と網膜神経節細胞障害の関係、グルタミン酸とアルドステロンの関係、アルドステロンの網膜血流速度に与える影響、の3つに大別して研究を進めていく。

(1) 血中アルドステロン濃度と網膜神経節細胞障害の関係

原発性アルドステロン症のスクリーニング検査では、血中アルドステロン濃度 > 120 pg/ml とアルドステロン・レニン比 > 200 が推奨されている。すなわち一口に原発性アルドステロン症といっても、アルドステロン血中濃度は患者により様々である。ラットを用いた基礎研究では、8 µg/kg/day アルドステロン全身投与では、網膜神経節細胞の減少は認めなかったものの、80 µg/kg/day アルドステロン全身投与では認めた。しかし、どの程度血中アルドステロン濃度が上昇するのかが分かっていない。様々な濃度のアルドステロンを全身投与することで、血中アルドステロン濃度と網膜神経節細胞の障害の程度について明らかにする。

(2) グルタミン酸とアルドステロンの関係

眼内のグルタミン酸の代謝異常により、網膜神経節細胞が変性し、グルタミン酸阻害薬であるメマンチンを投与すると、網膜神経節細胞の変性が抑制されることが知られている。過剰のグルタミン酸が細胞障害を引き起こす事は以前から知られているが、アルドステロンとの関係はわかっていない。過剰のアルドステロンでも同様の病態を呈することから、グルタミン酸が増える事によりアルドステロンが増える、あるいはアルドステロンが増えることによりグルタミン酸が増える、可能性が考えられる。またこの2つは全く独立したものである可能性もある。そこで、今回の研究でグルタミン酸とアルドステロンの関係について明らかにする。

(3) アルドステロンの網膜血流速度に与える影響

エンドセリン-1投与により血流が低下すると網膜内層の障害が生じることからもわかるように、慢性的な虚血が緑内障の病因の一つではないかと考えられている。アルドステロンを投与することにより、血管内皮細胞の機能が低下することが知られており、網膜においても慢性的な虚血が生じ、そのために神経節細胞死が生じている可能性が考えられる。アルドステロンの投与により、網膜の血流がどのように変化するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) グルタミン酸とアルドステロンの関係

グルタミン酸とミネラルコルチコイド受容体阻害薬、アルドステロンと NMDA 受容体拮抗薬 20 mM NMDA を硝子体中に投与することにより、網膜障害を起こす。10 mg/kg/day メマンチン (NMDA 受容体拮抗薬) を毎日経口投与するグループと 10 mg/kg/day スピロノラクトン (ミネラルコルチコイド受容体阻害薬) を毎日経口投与するグループにわけ、1週間後に網膜障害の程度を比較検討する。次に 80 µg/kg アルドステロンを硝子体中に投与することにより、網膜障害を起こす。10 mg/kg/day メマンチンを毎日経口投与するグループと 10 mg/kg/day スピロノラクトンを毎日経口投与するグループにわけ、1週間後に網膜障害の程度を比較検討する。網膜障害の評価方法であるが、上丘に fast blue を注入することにより、逆行性に網膜神経節細胞を染色し、網膜伸展標本を作製し、その数をカウントする。

(2) アルドステロン濃度と網膜神経節細胞障害の程度

アルドステロンを浸透圧ポンプに注入し、10週齢のラットの皮下に埋め込み持続的に全身投与することで、正常眼圧緑内障モデルを作製する。基剤、40、80、160 µg/kg/day アルドステロンを6週間持続投与する。眼圧はトノラボ手持ち眼圧計を用い、血圧はラット・マウス用非観血式自動血圧測定装置を用いて tail-cuff 法で測定する。アルドステロン投与2週後に眼圧と血圧を測定する。アルドステロン持続投与2週後に尾静脈から血液を採取する。採取した血液を血清分離用採血管に入れ、遠心することにより、血清を分離する。分離された血清を用いて ELISA 法にてアルドステロン濃度を測定する。

アルドステロン持続投与 5 週後にハミルトンマイクロシリンジを用いて 3% fast blue (1.5 μ l) を上丘に注入することで、逆行性に網膜神経節細胞を染色する。注入 1 週後(アルドステロン持続投与 6 週後)に網膜伸展標本を作製し、網膜神経節細胞数をカウントする。周辺部網膜と中央部網膜にわけて神経節細胞数をカウントする。

(3) アルドステロンの網膜血流速度に与える影響

80 μ g/kg/day アルドステロンを浸透圧ポンプに注入し、10 週齢のラットの皮下に埋め込み持続的に全身投与する。アルドステロン及び基剤投与前に Mean blur rate (MBR)、眼圧、血圧の測定をおこなう。Laser Speckle Flowgraphy (LSFG)を用いて、スペckルパターンの変化率を解析して血流速度を反映した相対的 MBR を測定する。眼圧はトノラボ手持ち眼圧系を用い、血圧はラット・マウス用非観血式自動血圧測定装置を用いて tail-cuff 法で測定する。LSFG Micro による眼底血流測定を同一測定時間で連続 3 回測定する。その後 LSFG Micro で撮影されたスペckル画像を LSFG 解析ソフト、LSFG Analyzer を用いて視神経乳頭微小循環の解析を行う。解析範囲は撮影から作成された血流マップから視神経乳頭中央を中心とした円形指定領域(ラバーバンド)、直径 230 ピクセルの範囲とする。次に LSFG Analyzer に備わっている血管抽出解析機能を用い、乳頭内の大血管 MBR を自動的に除外する。MBR 値は血管領域、血管領域を除いた組織領域、全領域で算出する。各 MBR 値は、各領域内の MBR 値の総和を各領域の面積で除した平均血流値で算出する。LSFG Micro で撮影された同一画角内で、血管径が測定可能な血管を一本選定し、その血管周囲に矩形領域を設定し、LSFG Analyzer に備えられている Cross section EX を用い血管径と相対的血流量を求め経時の変化を測定する。相対的血流量は網膜血流と血管径を反映した相対値で、矩形領域内の血管中心線を直線状に並べ、血管方向に平均化した断面の形状から血管のみの領域を自動的に検出する。この機能により網膜血管領域と血管の背景組織を区分することができ血管部分の血流値を求めることができる。アルドステロン(80 μ g/kg/day) 全身投与と基剤の全身投与後 2 週の MBR、眼圧、血圧の測定をおこなう。2 週目の時点で MBR に違いがみられなかった場合は、更に 2 週後(トータルでは全身投与 4 週後)で MBR、眼圧、血圧の測定をおこなう。ここで MBR に差がみられなかった場合であるが、アルドステロン投与後に血圧が上昇している場合は、この時点で本モデルの神経節細胞数の減少には、血流は関係していないと結論づける。血圧が上昇していない場合は、250 μ g/kg/日アルドステロンに濃度を上げ、再度 MBR を測定する。アルドステロンを全身投与することで視神経乳頭の血流速度が遅くなった場合は、更に研究を進め、150 ng/kg/min アンジオテンシン II を浸透圧ポンプに注入し、皮下に埋め込み持続的に全身投与し、アルドステロンを全身投与した時と同様に投与後 2 週あるいは 4 週の MBR、眼圧、血圧を測定する。アンジオテンシン II を全身投与すると血圧は上昇するはずなので、150 ng/kg/min で血圧が上昇しない場合には血圧が上昇するまで濃度を上昇させる。血圧が上昇した濃度で MBR、眼圧を測定する。基剤投与群、アルドステロン投与群、アンジオテンシン II 投与群の 3 群にわけ、投与 6 週後に神経節細胞数をカウントする。神経節細胞数のカウント方法は、ハミルトンマイクロシリンジを用いて 3% fast blue (1.5 μ l) を上丘に注入することで逆行性に神経節細胞を染色し、注入 1 週間後に網膜伸展標本を作製することにより、神経節細胞数をカウントする。

4. 研究成果

(1) グルタミン酸とアルドステロンの関係

NMDA を投与した群では、基剤、スピロラクトン、メマンチン投与での単位面積 (/mm²) あたりの神経節細胞数はそれぞれ、619 \pm 111、718 \pm 53、1231 \pm 46 であり、いずれもコントロール(2419 \pm 77) に比べて有意に細胞数の減少を認めたと、メマンチン投与では NMDA による障害が抑制された。アルドステロン投与群では基剤、スピロラクトン、メマンチン投与での単位面積 (/mm²) あたりの神経節細胞数はそれぞれ、1905 \pm 43、2480 \pm 107、2056 \pm 92 であり、コントロール(2564 \pm 64) よりも優位に細胞数の減少を認めたと、スピロラクトン投与ではアルドステロンによる障害は抑制された。また NMDA を硝子体中に投与しても硝子体中のアルドステロン濃度の上昇は認めなかった。

以上の結果からレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系と NMDA 受容体を介するシグナルは別の系である可能性が示唆された。

(2) アルドステロン濃度と網膜神経節細胞障害の程度

基剤、40、80、160 μ g/kg/day アルドステロン全身投与後の血漿アルドステロン濃度はそれぞれ 212 \pm 18 pg/ml、396 \pm 94 pg/ml、478 \pm 75 pg/ml、1790 \pm 473 pg/ml であり、160 μ g/kg/day アルドステロン投与により血漿中のアルドステロン濃度は有意に上昇した。また網膜神経節細胞数は基剤、40、80、160 μ g/kg/day アルドステロン全身投与で、それぞれ 2688 \pm 407 /mm²、2240 \pm 357 /mm²、2086 \pm 338 /mm²、137 \pm 110 /mm² であり、80 μ g/kg/day 及び 160 μ g/kg/day アルドステロン投与により網膜神経節細胞数は有意に減少した。また血漿アルドステロン濃度と網膜神経節細胞数には負の相関を認めたと (r=-0.911: ピアソンの相関係数)。

(3) アルドステロンの網膜血流速度に与える影響

アルドステロン投与後の変化率は血管領域 (MV): -0.7 \pm 3.9、-14.4 \pm 3.7、-25.2 \pm 6.6、組織領域 (MT): -1.6 \pm 6.9、-19.7 \pm 7.7、-14.5 \pm 10.9% (周辺平均 \pm 標準誤差、1、2、4 週の順) であり、投与前と比べ MV は 2、4 週後、MT は 2 週後に有意に低下した。基剤群は MV で 2 週後に有意に増加し、MV は 2、4、MT は 2 週後でアルドステロン投与群と比較し有意に高値であった。網

膜神経節細胞数ではアルドステロン群 ($244 \pm 44/\text{mm}^2$) は基剤群 ($509 \pm 93/\text{mm}^2$) より有意に少なく、網膜神経節細胞数と、4週目のMV、MTには正の相関を認めた (MV: $r=0.777$, $p < 0.05$. MT: $r=0.958$, $p < 0.001$)。

< 引用文献 >

- 1) Nitta E, Hirooka K, Tenkumo K, et al. Aldosterone: a mediator of retinal ganglion cell death and the potential role in the pathogenesis in normal-tension glaucoma. *Cell Death Dis* 4;4:e711, 2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Aoi Ono, Kazuyuki Hirooka, Yuki Nakano, Eri Nitta, Akira Nishiyama, Akitaka Tsujikawa	4. 巻 62
2. 論文標題 Gene expression changes in the retina after systemic administration of aldosterone	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 499-507
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 有
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 Mamoru Kobayashi, Kazuyuki Hirooka, Aoi Ono, Yuki Nakano, Akira Nishiyama, Akitaka Tsujikawa	4. 巻 58
2. 論文標題 The relationship between the renin-angiotensin-aldosterone system and NMDA receptor-mediated signal and the prevention of retinal ganglion cell death.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 1397-1403
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 有
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 Yukari Takasago, Kazuyuki Hirooka, Yuki Nakano, Mamoru Kobayashi, Aoi Ono	4. 巻 19
2. 論文標題 Elevated plasma aldosterone levels is associated with a reduction in retinal ganglion cell survival.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System	6. 最初と最後の頁 -
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 有
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6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 廣岡一行、高砂縁、中野裕貴、小林守
2. 発表標題 血中アルドステロン濃度と網膜神経節細胞数の関係
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 Yukari Takasago, Kazuyuki Hirooka, Yuki Nakano, Mamoru Kobayashi
2. 発表標題 Elevated plasma aldosterone levels are associated with a reduction in retinal ganglion cell survival
3. 学会等名 Association Research in Vision and Ophthalmology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田康史、東出朋巳、阪口 仁一、長田 敦、廣岡 一行、杉山 和久
2. 発表標題 アルドステロン全身投与によるラット視神経乳頭血流変化の検討
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 小林守、廣岡一行、小野葵、中野裕貴、辻川明孝
2. 発表標題 網膜神経節細胞死におけるレニン・アンジオテンシン系とNMDA受容体シグナルの関連
3. 学会等名 第121回日本眼科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kazuyuki Hirooka, Mamoru Kobayashi, Aoi Ono, Yuki Nakano, Akitaka Tsujikawa
2. 発表標題 The relationship between the renin-angiotensin-aldosterone system and NMDA receptor-mediated signal and the prevention of retinal ganglion cell death.
3. 学会等名 World Glaucoma Council (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 廣岡一行、高砂縁、中野裕貴、小林守、小野葵
2. 発表標題 血漿アルドステロン濃度と網膜神経節細胞数の関係
3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----