

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09435

研究課題名(和文) 緑内障病態におけるNrf2を介した硫化水素や補酵素の神経保護作用の検討

研究課題名(英文) We investigate the neuroprotective mechanisms in glaucoma against oxidative stress, the Keap1/Nrf2 pathway.

研究代表者

檜森 紀子 (Himori, Noriko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：20705230

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)：ミトコンドリアは内因性の活性酸素産生器官の一つとして知られており、ミトコンドリア障害と酸化ストレスは密接な関係があると考えられている。酸化ストレスに脆弱なNrf2ノックアウトマウスはComplex I阻害剤・ロテノンによるミトコンドリア障害時、網膜ミュラー細胞が活性化することが明らかになった。そこで、ミュラー培養細胞にComplex I阻害薬のロテノンを添加し、Nrf2KOマウスと野生型マウスにおける神経保護因子・抗酸化酵素分泌メカニズムの違いについて検討したところ、Nrf2KOマウスのミュラー細胞では野生型と比較し、有意な神経保護因子の上昇を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ロテノン存在下、野生型ミュラー細胞では抗酸化酵素の発現が増加して神経保護に働き、Nrf2 KOミュラー細胞では、代償的に神経栄養因子の発現が増強され、神経保護効果をもたらすことが示唆された。ヒトを対象とした臨床研究のみでは限界があり、動物モデルを使った基礎研究の蓄積が重要である。既に緑内障病態への酸化ストレスやグリア細胞の寄与が明らかになっていることから、酸化ストレス暴露時のミュラー細胞の果たす役割が解明され、酸化ストレスに脆弱なヒトに対しグリア細胞を標的とした緑内障治療戦略が展開される可能性が大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria are known as one of the endogenous reactive oxygen species producing organs. Mitochondrial damage and oxidative stress are thought to be closely related. It was revealed that retinal Mueller cells are activated in Nrf2 knockout mice that are vulnerable to oxidative stress when mitochondrial damage is caused by the Complex I inhibitor rotenone. Rotenone was added, and we investigated the difference in neuroprotective factor / antioxidant enzyme secretion mechanism between Nrf2KO mice and wild-type mice. There is a significant increase in neuroprotective factors in the Mueller cells of Nrf2KO mice as compared with the wild type.

研究分野：酸化ストレスと緑内障

キーワード：酸化ストレス 緑内障 神経保護 Nrf2

1. 研究開始当初の背景

現在緑内障に対してエビデンスのある治療は眼圧下降である。実臨床では視野の保持に有用とされる30%の眼圧下降を呈していながら視野進行を認める症例が多く、眼圧下降治療は限界を迎えている。緑内障の基本病態である網膜神経節細胞死に関わる障害因子として軸索障害、慢性虚血(グルタミン酸障害)、血流障害、一酸化窒素、ミトコンドリア障害、酸化ストレスがあげられる。私は中でも酸化ストレスをターゲットに研究を進めている。

ミトコンドリアはATPを産生する際に副産物である活性酸素が亢進するとミトコンドリア機能不全を来すと考えられる。ミトコンドリア機能障害によってATP合成が低下すると、エネルギー産生が不十分となり、チトクロムCやapoptosis inducing factorが放出され網膜神経節細胞死が誘導される。またミトコンドリア障害による活性酸素の増加は蛋白などの変性を生じグリア活性化、グリアタンパク酸化等により網膜神経節細胞への神経栄養因子のサポートが減少すると、網膜神経節細胞死が生じると考えられる。多因子疾患と捉えられている緑内障に対して酸化ストレス発生の主体と考えられるミトコンドリア障害が緑内障治療のターゲットとなりうるか検証することは緑内障病態解明につながる可能性が高いことが予測されている。

2. 研究の目的

緑内障剖検眼により網膜グリア細胞の活性化が認められ、また酸化ストレスによる緑内障モデル動物において、神経障害がまだ認められない早期の段階で網膜グリア細胞の活性化を認めることから、酸化ストレスの網膜グリア細胞に与える影響が緑内障病態に中心的な役割をはたしている可能性がある。我々は酸化ストレス応答の鍵となるKeap1-Nrf2システムに注目した。ミトコンドリア障害は酸化ストレスの発生源として知られていることから、電子伝達系Complex I阻害によるミトコンドリア障害とNrf2の関連についてマウス動物モデルを用い、酸化ストレス暴露時にNrf2ノックアウト(KO)マウスと野生型マウスにおける神経保護因子・抗酸化酵素分泌メカニズムの違いなどの視点から、酸化ストレスとグリア細胞の分子基盤を明らかにし、網膜グリア細胞をターゲットとした神経保護治療への発展を目指す。

3. 研究の方法

(In vivo) 8週齢の野生型(WT)マウスとNrf2 KOマウスにミトコンドリアComplex I阻害剤であるロテノン(30 mg/kg)または0.5% carboxymethyl cellulose(コントロール)を30日間経口投与し、酸化ストレスマーカー8OHdGを使用した免疫染色、RGC数計測、網膜RT-PCR、グリア細胞の免疫染色を施行した。

(In vitro) 生後5-8日の野生型(WT)及びNrf2 KOマウスからミューラー細胞を調製しロテノン(3-100 μ M)投与下の細胞生存率と活性酸素分子種(ROS)量をalarBlue assay、CellROX Green染色で調べた。ロテノン30 μ M下の神経栄養因子の遺伝子発現を時間毎にリアルタイムPCRで検討した。

4. 研究成果

(In vivo) WT・Nrf2 KOマウスともロテノン投与群ではコントロールと比べ8OHdG陽性細胞数の増加を認めたが($p=0.021$, $p=0.019$)、RGC数では有意差を認めなかった。RT-PCRではロテ

ロンを投与した Nrf2 KO マウス群において、WT 群と比較して GFAP、Vimentin の発現上昇を認め ($p=0.021$, $p=0.001$)、免疫染色では GFAP のシグナル増強を認め、網膜ミュラー細胞が活性化することを明らかにした。

(In vitro) Nrf2KO マウスのミュラー細胞培養において WT と比べ Nrf2 KO ミュラー細胞の生存率はロテノン存在下で有意に低く ($p < 0.05$)、ロテノン 30、100 μM 下の KO ミュラー細胞内 ROS は有意に増加した ($p < 0.05$)。また、ロテノン投与 6、24 時間後の Nrf2 KO ミュラー細胞において神経栄養因子 (BDNF、bFGF、NGF) の有意な発現上昇を認めた ($p < 0.05$)。

以上より、ミトコンドリア障害は Nrf2 活性化を通して減弱したという報告も認め (Oliveira et al. *Mol Neurobiol.* 2017.) ことから、Nrf2 の活性化や抗酸化物質摂取によって活性酸素を消去することでミトコンドリア障害を抑制し、網膜神経節細胞死を抑制できる可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Himori N, Ogawa H, Ichinose M, Nakazawa T	4. 巻 258
2. 論文標題 CPAP therapy reduces oxidative stress in patients with glaucoma and OSAS and improves the visual field	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 439-441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00417-019-04483-z	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 Uchida Keiko, Himori Noriko, Hashimoto Kazuki, Shiga Yukihiro, Tsuda Satoru, Omodaka Kazuko, Nakazawa Toru	4. 巻 10
2. 論文標題 The association between oxidative stress and corneal hysteresis in patients with glaucoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 545
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-57520-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yabana Takeshi, Sato Kota, Shiga Yukihiro, Himori Noriko, Omodaka Kazuko, Nakazawa Toru	4. 巻 14
2. 論文標題 The relationship between glutathione levels in leukocytes and ocular clinical parameters in glaucoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0227078
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0227078	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 Inoue-Yanagimachi M, Himori N, Sato K, Kokubun T, Asano T, Shiga Y, Tsuda S, Kunikata H, Nakazawa T.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Association between mitochondrial DNA damage and ocular blood flow in patients with glaucoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Br J Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bjophthalmol-2018-312356.	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8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 檜森紀子、柳町真希、志賀由己浩、面高宗子、津田聡、國方彦志、中澤徹
2. 発表標題 緑内障患者における複合サプリメント摂取による酸化ストレス、抗酸化力の変動
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 檜森紀子
2. 発表標題 緑内障における酸化ストレスとミトコンドリア障害
3. 学会等名 第31回緑内障学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 檜森紀子、柳町真希、志賀由己浩、面高宗子、津田聡、國方彦志、中澤徹
2. 発表標題 複合サプリメント摂取による白内障患者の全身酸化ストレスの変動
3. 学会等名 第74回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Noriko Himori, Erika Yamada, Hiromasa Ogawa, Masakazu Ichinose, and Toru Nakazawa
2. 発表標題 The effectiveness of continuous positive airway pressure therapy in glaucoma patients with obstructive sleep apnea syndrome
3. 学会等名 ARVO
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 檜森紀子、田子絵里香、小川浩正、一ノ瀬正和、中澤徹
2. 発表標題 睡眠時無呼吸症候群に対するCPAP治療前後の酸化ストレスと緑内障視野進行の検討
3. 学会等名 第30回緑内障学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriko Himori, Taiki Kokubun, Yukihiro Shiga, Kazuko Omodaka, Hiroshi Kunikata, Toru Nakazawa
2. 発表標題 The association between oxidative stress and circumpapillary retinal nerve fiber layer thickness in patients with normal-tension glaucoma
3. 学会等名 ARVO Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 檜森紀子
2. 発表標題 緑内障と遺伝性視神経の乳頭血流
3. 学会等名 第29回緑内障学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 檜森紀子、國方彦志、加藤圭一、吉田清香、志賀由己浩、斎藤慶治、中山雅晴、中澤徹
2. 発表標題 MMWINを活用したデータベースの構築、病診連携システムの確立
3. 学会等名 第29回緑内障学会
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
研究 分担 者	中澤 徹 (Nakazawa Toru) (30361075)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	

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
---------	---------