

機関番号：32612
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791714
 研究課題名（和文）
 緑内障性視神経症における superoxide dismutase 1 の関与
 研究課題名（英文）
 Retinal ganglion cell loss in superoxide dismutase 1 deficiency
 研究代表者
 尾関 直毅 (OZEKI NAOKI)
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：80383826

研究成果の概要（和文）：

【目的】抗酸化酵素 SOD1 のノックアウト(SOD1KO)マウスにおける網膜神経節細胞(RGC)数、機能の加齢に伴う変化を解析した。【方法】SOD1KO、WT の網膜において、切片と逆行性染色を用いて RGC 数を計測した。またパターン ERG を用いて RGC の機能を評価した。眼圧を測定した。【結果】8 週齢では変化がなかったが、24 週齢 SOD1KO では有意に RGC 数が減少していた(24 週齢 WT 3448±153 個/mm², KO 2807±94 個/mm², KO P<0.001)。パターン ERG の振幅は、24 週齢 KO において有意に低値であった(WT7.6±3.3 μV, KO 3.9±1.9 μV, P<0.0001)。眼圧は 8、18、24 週齢で WT および KO 間に有意差を認めなかった。【結論】SOD1 KO マウスでは加齢に伴い RGC 数の減少と機能の低下を認めた。

研究成果の概要（英文）：

Purpose. To investigate the influence of deficiency in superoxide dismutase 1 (SOD1), a major antioxidative enzyme, on retinal ganglion cells (RGCs). **Methods.** In the *SOD1* total knock-out (*SOD1*-deficient) mice, the level of superoxide anion was measured using dihydroethidium. The number of RGCs was counted both in the retinal sections and the flat-mount retinas after retrograde labeling. Thickness of nerve fiber layer (NFL) was measured in the sections and the amount of neurofilament protein was measured by immunoblot analysis. Pattern electroretinogram (ERG) which reflects the function of retinal ganglion cells, dark-adapted ERG, and cone ERG were performed. The intraocular pressure (IOP) was measured with an induction-impact tonometer. **Results.** The level of superoxide anion in the RGC layer was significantly higher in 24-week-old *SOD1*-deficient mice than in wild-type mice. The RGC number was significantly reduced in 24-week-old *SOD1*-deficient mice, although they were not in 8-week-old mice. The NFL thickness and neurofilament protein were reduced in 24-week-old *SOD1*-deficient mice. The amplitude of pattern ERG was significantly reduced, although dark-adapted and cone ERGs showed no impairment, in 24-week-old *SOD1*-deficient mice. The IOP level was not changed in the *SOD1*-deficient mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：酸化ストレス、緑内障、superoxide dismutase 1、網膜神経節細胞、網膜電図

1. 研究開始当初の背景

(1) 緑内障の疾患としての重要性

緑内障は、日本人の中途失明原因の第一位の疾患である。また、日本緑内障学会を中心として岐阜県多治見市にて行われた大規模疫学調査において日本人の40歳以上の緑内障の有病率は5%であることが報告された(多治見スタディ)。またスタディでの緑内障新規発見率は89%であり、日本には約500万人の潜在患者がいると推測されている。緑内障は眼圧が上昇することにより、篩状板にて神経線維束が圧迫され、それにより神経節細胞死が生じる病態とされている。実際、アメリカにおいて行われた多施設無作為化前向き研究において、眼圧を30%下降させることにより、80%の症例において少なくとも5年間緑内障性視神経症の進行が停止すると報告された。本報告は緑内障治療において眼圧下降が唯一のエビデンスのある治療であることを示した。

(2) 活性酸素と眼疾患

活性酸素は呼吸、運動、紫外線、喫煙、放射線、ストレス、金属などの暴露により日常生活のさまざまな場面で絶えず発生している。眼球は網膜という神経組織を有しており、脈絡膜を通じて非常に多量の血液の流入を受け、常に酸素に暴露されている。また角膜や水晶体という透明な組織をとおして光刺激を受けており、角膜、水晶体や網膜において大量の活性酸素が常に発生している。生じた活性酸素はsuperoxide dismutase、glutathione peroxidase、catalaseやビタミンCによって最終的には無害な水へと変換されている。

眼球は前房水中には血中の10倍以上のビタミンCを含み、また網膜においてはルテインやゼアキサンチンといった抗酸化物質を大量に有し、眼球に生じた活性酸素を消去していると考えられている。しかし、抗酸化作用の低下や過剰な活性酸素の発生により網膜や線維柱帯において酸化に伴うDNAやたんぱく質の損傷が蓄積し、それらの機能異常から様々な眼疾患が生じる可能性がある。

(3) 酸化ストレスと緑内障

酸化ストレスの緑内障性視神経症への関与

を示す報告が近年多く出てきている。DNAが酸化損傷を受けると8ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)という物質が蓄積する。緑内障患者の線維柱帯において、白内障患者と比較し有意に8-OHdGが蓄積しており、かつ線維柱帯の8-OHdG量は眼圧や視野と相関が見られたという報告がある。また前房水中の抗酸化物質を検討した報告があり、緑内障患者においては前房水の抗酸化能が白内障患者と比較し64%低値であり、緑内障患者が活性酸素にさらされているエビデンスの一つと考えられる。

2. 研究の目的

現在では眼圧下降薬の点眼ならびに眼圧下降目的の手術のみが緑内障治療とされているが、生活習慣の改善、抗酸化作用を有する食品の摂取によって緑内障性視神経症の進行を抑制しうるとのエビデンスとなり、あたらしい治療法へと続く可能性がある。我々はSOD1Knockout miceを用いることにより、SOD1と網膜神経節細胞死の関与を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

本研究の主体は酸化ストレス防御酵素であるSOD1をノックアウトしたマウスの神経節細胞が加齢に伴い選択的に減少するかを検討する。24週令のSOD1KOマウスを用い、網膜切片の網膜神経節細胞数をWTとKOと比較する。またフルオロゴールドの逆行性染色を用いて網膜神経節細胞数を同様に比較検討する。続いて機能評価のためにパターンERGを行いWTとKO間で機能の評価を行う。

4. 研究成果

図 1

SOD1KO マウスにおいて、網膜神経節細胞中に DHE にて蛍光を発する活性酸素種が WT と比較し有意に存在する。

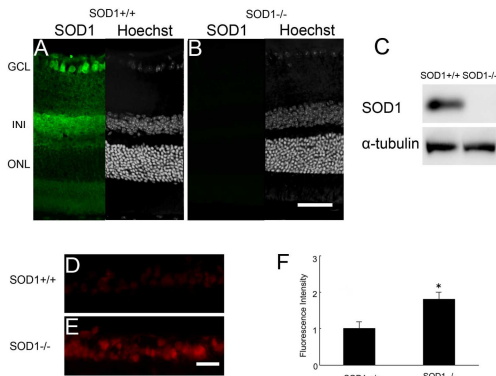


図 2

24 週令 SOD1KO マウスにおいて WT と比較し有意な網膜神経節細胞数の減少がみられる。8 週令では網膜神経節細胞数の減少は認められない。

Figure 2

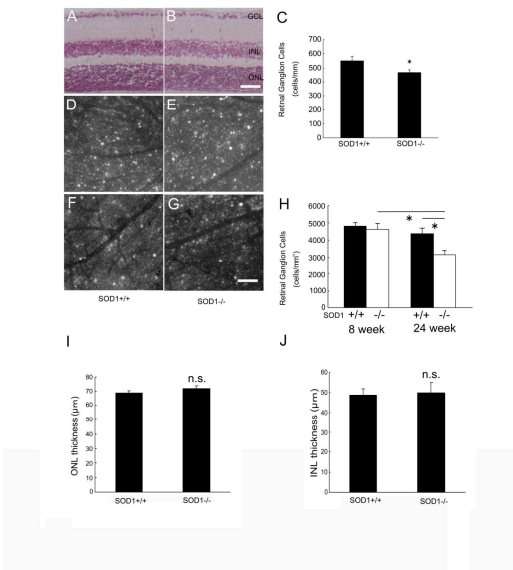


図 3

24 週令 SOD1KO マウスでは WT と比較し、パターン ERG の結果から網膜神経節細胞の機能低下が認められる。また全層の機能は低下してはなかった。

Figure 3

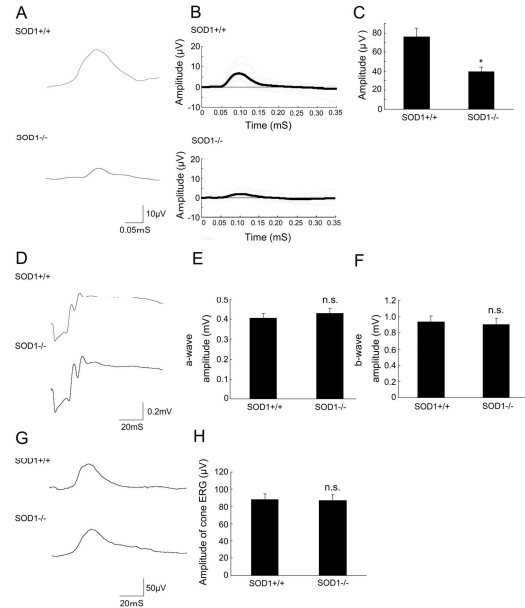
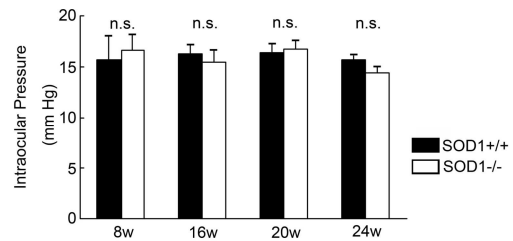


図 4

SOD1KO マウスの眼圧は 24 週令までの経過中、WT と比較し統計学的な有意差を認めなかった。



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 1 件)

Retinal ganglion cell loss in superoxide dismutase 1 deficiency

Kenya Yuki, Yoko Ozawa, Tetsu Yoshida, Toshihide Kurihara, Manabu Hirasawa, Naoki Ozeki, Daisuke Shiba, Kosuke Noda, Susumu Ishida, Kazuo Tsubota IOVS 2011

Mar 18 (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

尾関 直毅(OZEKI NAOKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号:80383826

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし