

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462689

研究課題名(和文) 正常眼圧緑内障の病態解明と神経保護治療薬の開発

研究課題名(英文) To examine the pathology of normal-tension glaucoma and develop the neuroprotective drug

研究代表者

廣岡 一行(Hirooka, Kazuyuki)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：10325350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アルドステロン全身投与後の網膜におけるアポトーシス関連の遺伝子発現の検討をした。ラットの皮下に浸透圧ポンプを埋め込み、アルドステロン(80 µg/kg/day)と基剤を持続投与した。発現が増加したアポトーシス関連遺伝子24、減少した遺伝子24がマイクロアレイの結果抽出された。これらのうちNADPHオキシダーゼの活性化に関係する遺伝子はCDKN1AとVDRの2つであった。アルドステロン全身投与によりp53を介した細胞死経路の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Since it is important to determine the mechanism of cell death independent of the intraocular pressure (IOP), we examined gene expression changes in the retina after the systemic administration of aldosterone. After the subcutaneous implantation of an osmotic minipump into the mid-scapular region of rats, we administered an 80 µg/kg/day dose of aldosterone. Analysis of the microarray data sets revealed the upregulation of 24 genes and the downregulation of 24 genes of key apoptosis-specific genes. Real-time PCR revealed 5 genes (Bcl3, Cdkn1a, Tbox5, Pf4, and Vdr) were upregulated while 10 genes (Asns, Bard1, Card9, Fcgr1a, Inhba, Kcnh8, Lck, Phlda1, Ptprc, and Sh3rf1) were downregulated. Significant increases or decreases were noted in several genes after the systemic administration of aldosterone. Further studies will need to be undertaken in order to definitively clarify the role of these genes in the eyes of animals with normal-tension glaucoma.

研究分野：緑内障の病態解明と神経保護治療

キーワード：緑内障 アルドステロン 網膜神経節細胞 マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

緑内障は我が国の視覚障害原因の第1位であり、多治見スタディの結果40歳以上の緑内障の有病率が5.0%であることが明らかになり、総計すると365万人の推定患者数になる。緑内障には眼圧が高値を示すものと、正常範囲内にある正常眼圧緑内障があるが、本邦では約70%が正常眼圧緑内障で占められている。そのため、正常眼圧緑内障の病態解明は急務である。以前より我々は網膜虚血再灌流モデルや慢性高眼圧モデルを用いて、これら動物モデルの網膜神経細胞死にレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系が関与していること、またこの系を遮断する薬剤(アンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシンIIタイプ1受容体拮抗薬、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬)を投与すると神経保護効果が得られることを報告してきた^{1)~4)}。更に我々の研究結果から、アルドステロンをラットに持続的に投与することにより、眼圧が正常であるのにも関わらず、網膜神経節細胞のみが障害を受ける、すなわち正常眼圧緑内障と同じ状態になることが明らかになった。

2. 研究の目的

しかし現時点では、アルドステロンを全身投与することによりどのようなメカニズムで神経節細胞死が生じるのか明らかになっていない。今回アルドステロン全身投与後の網膜におけるアポトーシス関連の遺伝子発現の検討をした。

3. 研究の方法

80 µg/kg/日アルドステロン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することにより正常眼圧緑内障モデルを作製する。アルドステロン持続投与1週後に網膜を摘出し、サンプルとする。またアルドステロンを投与していない正常眼の網膜を摘出し、合計2サンプルでマイクロアレイを行う。マイクロアレイ法により基剤投与群(C群)と比較しアルドステロン投与群(A群)で、アポトーシスに関連する遺伝子の発現が2倍以上増加、あるいは1/2以下に減少している遺伝子を抽出した。更にこれらの遺伝子についてリアルタイムPCR(polymerase chain reaction)法にて相対定量を行った。

4. 研究成果

発現が増加したアポトーシス関連遺伝子24、減少した遺伝子24がマイクロアレイの結果抽出された(表1)

表1 マイクロアレイの結果

増加	倍率	減少	倍率
Acvr1	2.028	Acvr1c	0.384

Alox15	11.059	Adamtsl4	0.489
Birc3	13.423	Asns	0.224
Bcl3	9.804	Bard1	0.386
C7	2.454	Bdnf	0.364
C-C motif	7.972	Card9	0.199
Cdkn1a	3.071	C5ar1	0.168
Cdkn2c	2.031	C6	0.424
Fcgr2b	3.092	Casp7	0.385
Fosl1	13.808	Cd3g	0.443
Htaitp2	6.056	Cdh1	0.273
Il1rn	2.527	Crh	0.374
Tnfrsf8	17.7	Cryaa	0.473
Txnip	3.764	ErbB3	0.298
Vegfa	2.315	Fcgr1a	0.482
Vdr	2.003	Gimap5	0.372
Lgals7	2.973	Inhba	0.488
Mael	5.791	Kcnh8	0.12
Msx1	2.034	Lck	0.206
Myc	2.234	Ndufaf4	0.141
Pf4	2.545	Phlda1	0.444
Snca	48.514	Ptprc	0.466
Tbx5	14.656	Ripk3	0.443
Terc	2.766	Sh3rf1	0.048

これら48の遺伝子をそれぞれPCRで定量した結果、発現が増加した遺伝子は3、減少した遺伝子は11であった(表2, 3)。我々の以前の研究結果より、アルドステロンはNADPHオキシダーゼを活性化することにより、活性酸素を産生することが示唆されていた。NADPHオキシダーゼの活性化に関係する遺伝子はCDKN1AとVDRの2つであった。アルドステロン全身投与によりCDKN1AとVDRの発現の増加が認められたことから、p53を介した細胞死経路の可能性が示唆された。

表2 増加した遺伝子のPCR結果

	基剤投与群 (n=10)	アルドステロン投与群 (n=10)	P値
Acvr1	0.73±0.09	0.60±0.06	<0.01
Alox15	0.76±0.26	0.49±0.36	0.073
Bcl3	0.77±0.12	0.96±0.44	<0.01

Birc3	0.60±0.07	0.65±0.11	0.29
C7	1.23±0.27	1.04±0.12	0.07
C-C motif	0.93±0.20	0.89±0.17	0.64
Cdkn1a	0.95±0.18	1.66±0.47	<0.01
Cdkn2c	0.79±0.16	0.60±0.08	<0.01
Fcgr2b	1.09±0.19	1.14±0.26	0.68
Fosl1	0.74±0.23	0.72±0.14	0.892
Htatip2	0.45±0.08	0.49±0.22	0.579
Il1rn	3.61±1.76	1.47±0.90	<0.01
Lgals7	1.40±0.69	0.94±0.13	0.067
Mael	0.55±0.34	0.55±0.11	0.992
Msx1	0.58±0.18	0.66±0.28	0.483
Myc	0.79±0.10	0.75±0.16	0.541
Pf4	0.58±0.10	0.99±0.24	<0.01
Snca	1.05±0.09	0.75±0.06	<0.01
Tbx5	0.68±0.36	0.86±0.08	<0.01
Terc	1.07±0.05	0.87±0.16	<0.01
Tnfrsf8	0.62±0.31	0.86±0.24	0.07
Txnip	0.78±0.09	0.68±0.35	0.382
Vegfa	0.98±0.12	0.64±0.09	<0.01
Vdr	0.95±0.18	1.13±0.19	0.046

表3 減少した遺伝子のPCR結果

	基剤投与群 (n=10)	アルドステロン 投与群(n=10)	P値
Acvr1c	2.59±4.87	0.65±0.16	0.241
Adamtsl4	0.81±0.17	1.01±0.26	0.059
Asns	0.92±0.15	0.20±0.04	<0.001
Bard1	0.62±0.15	0.46±0.05	0.013
Bdnf	1.00±0.09	1.00±0.12	0.970
Card9	0.86±0.11	0.77±0.03	0.033
C5ar1	0.87±0.16	0.97±0.27	0.322
C6	0.46±0.18	0.61±0.21	0.110
Casp7	0.88±0.03	0.86±0.18	0.778
Cd3g	0.48±0.12	0.38±0.15	0.161
Cdh1	0.51±0.24	0.46±0.07	0.561
Crh	2.48±3.99	0.78±0.10	0.212
Cryaa	0.52±0.29	0.49±0.21	0.847
Erbp3	0.52±0.36	0.35±0.18	0.187
Fcgr1a	0.52±0.20	0.32±0.09	0.012

Gimap5	0.58±0.28	0.50±0.06	0.382
Inhba	0.74±0.13	0.64±0.04	0.028
Kcnh8	0.79±0.20	0.50±0.08	0.001
Lck	0.78±0.16	0.63±0.09	0.025
Ndufaf4	0.57±0.27	0.43±0.05	0.127
Phlda1	0.95±0.21	0.64±0.19	0.040
Ptprc	0.79±0.16	0.49±0.10	<0.001
Ripk3	0.62±0.17	0.79±0.36	0.204
Sh3rf1	0.78±0.25	0.57±0.10	0.026

参考文献

- 1) Fukuda K, Hirooka K, Mizote M, et al. Neuroprotection against retinal ischemia-reperfusion injury by blocking the angiotensin II type 1 receptor. Invest Ophthalmol Vis Sci 51:3629-3638, 2010.
- 2) Fujita T, Hirooka K, Nakamura T, et al. Neuroprotective effects of angiotensin II type 1 receptor (AT1-R) blocker via modulating AT1-R signaling and decreased extracellular glutamate levels. Invest Ophthalmol Vis Sci 53:4099-4110, 2012.
- 3) Liu Y, Hirooka K, Nishiyama A, et al. Activation of the aldosterone/mineralocorticoid receptor system and protective effects of mineralocorticoid receptor antagonism in retinal ischemia-reperfusion injury. Exp Eye Res 96:116-123, 2012.
- 4) Yang H, Hirooka K, Fukuda K, Shiraga F. Neuroprotective effects of angiotensin II type 1 receptor blocker in a rat model of chronic glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci 50:5800-5804, 2009.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Kazuyuki Hirooka, Kana Misaki, Eri Nitta, Kaori Ukegawa, Shino Sato, Akitaka Tsujikawa. Comparison of Macular Integrity Assessment (MAIA), MP-3, and the Humphrey Field Analyzer in the evaluation

- of the relationship between the structure and function of the macula. PLoS One 11(3):e0151000, 2016 査読有
2. Kazuyuki Hirooka, Shino Sato, Eri Nitta, Akitaka Tsujikawa. The relationship between vision-related quality of life and visual function in glaucoma patients. Journal of Glaucoma 25:505-509, 2016 査読有
 3. Kazuyuki Hirooka, Saeko Izumibata, Kaori Ukegawa, Eri Nitta, Akitaka Tsujikawa. Estimating the rate of retinal ganglion cell loss to detect glaucoma progression: An observational cohort study. Medicine Jul;95(30):e4209, 2016 査読有
 4. Takeru Shimazaki, Kazuyuki Hirooka, Yuki Nakano, Eri Nitta, Kaori Ukegawa, Shino Sato, Akitaka Tsujikawa. Relationship between oxygen saturation of the retinal vessels and visual field defect in glaucoma patients: comparison with each hemifield. Acta Ophthalmologica 94:e683-e687, 2016 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 廣岡一行、新田恵里、請川香里、佐藤志乃、辻川明孝. 異なる視野計による黄斑の機能と構造の関係 第 69 回日本臨床眼科学会 2016 年 10 月 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
2. 泉端紗枝子、廣岡一行、真鍋紗季、請川香里、新田恵里、佐藤志乃、辻川明孝. 神経節細胞数の変化による緑内障進行評価の可能性 第 119 回日本眼科学会 2016 年 4 月 東京国際フォーラム (東京都・千代田区)
3. 小野葵、廣岡一行、請川香里、新田恵里、藤田智純、辻川明孝. アルドステロン全身投与後の網膜における遺伝子発現解析 第 119 回日本眼科学会 2016 年 4 月 東京国際フォーラム (東京都・千代田区)

4. 真鍋紗季、廣岡一行、泉端紗枝子、請川香里、新田恵里、佐藤志乃、辻川明孝. 緑内障の進行評価における視野障害変化と網膜神経線維層厚変化の有用性 第 25 回日本緑内障学会 2015 年 9 月 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣岡 一行 (HIROOKA, Kazuyuki)
香川大学・医学部・准教授
研究者番号: 10325350