

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861434

研究課題名(和文)酸化ストレスを基盤にした緑内障神経保護治療開発研究

研究課題名(英文)Neuroprotective treatment of glaucoma

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：基礎研究分野については分取した網膜神経節細胞をマイクロアレイ解析したところ、軸索障害7日後の網膜神経節細胞群は対照群と比較しHO-1が有意に高く発現していた。免疫染色において網膜神経節細胞にHO-1が発現していることも確認した(Himori et al. J Neurosci Res. 2014)。  
臨床研究においては当院緑内障外来通院中の緑内障患者において酸化ストレスマーカーである尿中8OHdGと視神経乳頭血流は相関していることを報告した(Himori et al. Graefe's Archive for clinical and Experimental Ophthalmology. 2016)。

研究成果の概要(英文)：We performed retrograde-labeling of these cells with 4Di-10ASP in adult mice 7 days after NC, purified the RGCs with fluorescence-activated cell sorting. Gene expression in the cells was determined with a microarray, and the expression of Ho-1 was determined with quantitative PCR (QPCR). The microarray and QPCR analyses showed increased expression of Ho-1 in the post-NC RGCs. Immunohistochemistry also showed that HO-1 positive cells were present in the ganglion cell layer after NC.

To evaluate the association between ocular blood flow and biomarkers of systemic oxidative stress, as well as the potential of these biomarkers to assess normal-tension glaucoma (NTG). This study included 73 eyes of 73 patients with NTG. Urinary 8-OHdG were both correlated with tissue-area MBR (P = 0.010, respectively). We suggest that systemic oxidative stress is associated with decreased ocular blood flow and may be involved in the pathogenesis of NTG.

研究分野：緑内障

キーワード：緑内障 酸化ストレス 網膜神経節細胞死

### 1. 研究開始当初の背景

緑内障は、現在日本国内における失明原因第一位の疾患である。現状では唯一エビデンスのある眼圧下降治療により視野進行を遅らせることが緑内障治療の主流となっている。しかし治療により眼圧下降が十分得られても緑内障が進行する患者があり、病態に即した新しい治療法の開発が望まれている。緑内障の基本病態は視神経乳頭陥凹に伴う網膜神経節細胞死であることから、私は神経保護治療に繋がる研究に着目した。

実際、視神経軸索挫滅(緑内障病態)モデルでは、酸化ストレスが組織障害によって生成され、神経節細胞死に関与すること(Levkovitch-Verbin et al. IOVS. 2000) 緑内障患者の視神経乳頭にあるアストロサイトが酸化ストレスに対して Glutathione や抗酸化防御因子の放出を行うこと(Malone et al. Exp Eye Res. 2007)を明らかにしたことから、酸化ストレスに対する分子メカニズムを研究することは重要である。上述したように現在行われている眼圧下降治療は限界を迎えているため、酸化ストレスに対する抗酸化剤は緑内障治療や発症予防補助の候補となりえるか、介入可能な疾患の一つとして考えられるかを明らかにすることも目的とした。

### 2. 研究の目的

緑内障の基本病態は多くの障害因子による視神経乳頭陥凹に伴う網膜神経節細胞死である。中でも酸化ストレスの関与が注目されている。そこで、緑内障網膜神経節細胞死に酸化ストレスのどの系が関与しているのか分取した網膜神経節細胞をマイクロアレイ、定量 PCR を施行し調べる。また、緑内障患者の全身性酸化ストレス指標、抗酸化力、眼科一般検査を施行し、緑内障の発症や進行と酸化ストレスの関与について検討する。また、薬剤スクリーニングを通して抗酸化剤の神経保護作用を検討する。本研究は緑内障における網膜神経節細胞死について酸化ストレスを足掛かりにし、新規神経保護治療(緑内障治療補助)の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### <基礎研究>

10 から 12 週令のマウス網膜神経節細胞をセルソーター使用して単離し、軸索障害 7 日後における抗酸化酵素の発現変化をマイクロアレイ解析、リアルタイム定量 PCR 法によって、軸索障害後の神経保護効果を有する抗酸化酵素を同定する。軸索挫滅後に RGC における抗酸化酵素の一つである HO-1 の局在を蛍光免疫染色法によって検討した。また、軸索障害 1、4、7 日後の網膜神経節細胞層(GCL)の RGC に対する HO-1 陽性の RGC の割合を計測した。蛍光色素で逆行性染色後の野生型マウスに COPP (HO-1 活性化剤)を前投与し、軸索挫滅 7 日後の生存 RGC 密度を計

測した。

#### <臨床研究>

当院緑内障外来通院中の緑内障患者、対象患者(白内障、網膜前膜)を対象として尿中の酸化ストレスマーカー(8-OHdG)、血中の酸化ストレスマーカー(抗酸化力; BAP test、酸化ストレス値; d-ROM test)、皮膚 AGE、レーザースペックルフローラフィーを用いて視神経乳頭血流(MBR)を測定する。これらを総合的に比較検討し、緑内障群と対象群における酸化ストレスマーカー値を比較検討する。

### 4. 研究成果

#### <基礎研究>

分取したマウス網膜神経節細胞のマイクロアレイ解析において軸索障害 7 日後の神経節細胞群は対照群(軸索障害を与えていない群)と比較し、HO-1 は高く発現していた。マイクロアレイ解析において軸索挫滅 7 日後の RGC 群は対照群と比較すると HO-1 は高く発現し、リアルタイム定量 PCR では軸索障害 1、4、7 日後で有意な上昇を認めた。免疫染色において無処置状態では GCL に HO-1 を認めないものの、軸索挫滅 1、4、7 日後の GCL に HO-1 のシグナルを確認でき、また HO-1 陽性細胞の割合は 25、64、84% と軸索障害後の日数が経つにつれ上昇を認めた。軸索挫滅 7 日後の RGC 密度は vehicle 群において  $868 \pm 252$  cells/mm<sup>2</sup> に対し、HO-1 活性化剤である COPP 投与群は  $1313 \pm 137$  cells/mm<sup>2</sup> と有意な上昇を認め、本研究により HO-1 は RGC 障害時に RGC における発現増加を惹起し、自己防御として神経保護作用に貢献する可能性が明らかになった(*J Neurosci Res.* 2014)。

#### <臨床研究>

私は当院緑内障外来通院中の正常眼圧緑内障患者(NTG)の酸化ストレスマーカー(尿中 8-OHdG 値、皮膚 AGE)を計測したところ、尿中 8-OHdG はコントロール群( $7.49 \pm 1.40$  ng/mg · C)と比較し、NTG 群( $9.22 \pm 2.79$  ng/mg · C)で有意な上昇を認めた( $p=0.01$ )。NTG 群では MBR と尿中 8-OHdG ( $r=-0.30$ ,  $p=0.01$ )、皮膚 AGE ( $r=-0.32$ ,  $p=0.01$ )が有意に相関した。特に初期 NTG 群では MBR と尿中 8-OHdG ( $r=-0.49$ ,  $p=0.006$ )、皮膚 AGE ( $r=-0.38$ ,  $p=0.03$ ) とより高い相関を認めることを明らかにしたから(*Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2016) 酸化ストレスが眼圧非依存性因子の一つである血流と関連することを強く示唆する結果を得ている。

### 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 12 件)

1, Himori N, Kunikata H, Shiga Y, Omodaka K,

Maruyama K, Takahashi H, Nakazawa T. The association between systemic oxidative stress and ocular blood flow in patients with normal-tension glaucoma. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2016. Feb 254(2):333-41. doi: 10.1007/s00417-015-3203-z. 査読有

2, Fiber-based polarization-sensitive OCT for birefringence imaging of the anterior eye segment. Yamanari M, Tsuda S, Kokubun T, Shiga Y, Omodaka K, Yokoyama Y, Himori N, Ryu M, Kunimatsu-Sanuki S, Takahashi H, Maruyama K, Kunikata H, Nakazawa T. *Biomed Opt Express*. 2015 6(2):369-89. 査読有. doi: 10.1364/BOE.6.000369.

3, Shiga Y, Sato M, Maruyama K, Takayama S, Omodaka K, Himori N, Kunikata H, Nakazawa T. Assessment of Short-Term Changes in Optic Nerve Head Hemodynamics in Hyperoxic Conditions with Laser Speckle Flowgraphy. *Curr Eye Res*. 2014 Nov 7; 1-8. 査読有. doi: 10.3109/02713683.

4, Yamamoto K, Maruyama K, Himori N, Omodaka K, Yokoyama Y, Shiga Y, Morin R, Nakazawa T. The novel Rho kinase (ROCK) inhibitor K-115: a new candidate drug for neuroprotective treatment in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Oct 2; 7126-36. 査読有. doi: 10.1167/iovs.13-13842.

5, Omodaka K, Kurimoto T, Nakamura O, Sato K, Yasuda M, Tanaka Y, Himori N, Yokoyama Y, Nakazawa T. Artemin augments survival and axon regeneration in axotomized retinal ganglion cells. *J Neurosci Res*. 2014 Jul 9; 1637-46. 査読有. doi: 10.1002/jnr.23449.

6, Yokoyama Y, Maruyama K, Yamamoto K, Omodaka K, Yasuda M, Himori N, Ryu M, Nishiguchi KM, Nakazawa T. The role of calpain in an in vivo model of oxidative stress-induced retinal ganglion cell damage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Sep 5; 451(4):510-5. 査読有. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.009.

7, Himori N, Maruyama K, Yamamoto K, Yasuda M, Ryu M, Omodaka K, Shiga Y, Tanaka Y, Nakazawa T. Critical neuroprotective roles of heme oxygenase-1 induction against axonal injury-induced retinal ganglion cell death. *J Neurosci Res*. 2014; Sep; 92 (9):1134-42. 査読有. doi: 10.1002/jnr.23398.

8, Takayama S, Shiga Y, Kokubun T, Konno H, Himori N, Ryu M, Numata T,

Kaneko S, Kuroda H, Tanaka J, Kanemura S, Ishii T, Yaegashi N, Nakazawa T. The traditional kampo medicine tokishakuyakusan increases ocular blood flow in healthy subjects. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014; 2014:586857. 査読有. doi:10.1155/2014/586857.

9, 檜森紀子 中澤徹、緑内障の未来予想図、Retina Medicine vol.4 no.1, 25-28, 2015、査読無.

10, 檜森紀子 中澤徹、緑内障の神経保護治療の変遷、眼科 Vol.57, No.10, 1235-1241, 2015、査読無し.

11, 檜森紀子 中澤徹、緑内障とアンチエイジング医学、あたらしい眼科 31(4):517-522, 2014、査読無.

12, 檜森紀子 中澤徹、緑内障の薬物治療、神経保護治療の可能性、日本の眼科 85 (6), 2014、査読無.

〔学会発表〕(計6件)

1, 第69回日本臨床眼科学会、2015年10月24日、名古屋国際会議場、ANAクラウンホテルグランコート名古屋(名古屋)、ランチョンセミナー・いまさら聞けない緑内障3、緑内障と鑑別を要する疾患にはどのようなものがありますか?、檜森紀子

2, 第26回日本緑内障学会 2015年9月11日から13日、ウインクあいち(名古屋) 正常眼圧緑内障患者における酸化ストレスと視神経乳頭循環との関連 檜森紀子、志賀由己浩、面高宗子、相澤奈帆子、丸山和一、國方彦志、中澤徹

3, World Glaucoma Congress 2015、2015年6月6日から9日、The Hong Kong convention center(香港) 中国 The association between increased urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine/creatinine levels and decreased ocular blood flow in patients with normal-tension glaucoma. Himori N, Kunikata H, Shiga Y, Omodaka K, Maruyama K, Takahashi H, Nakazawa T.

4, 第119回 日本眼科学会総会 2015年4月16日から18日、ロイトン札幌(札幌)、教育セミナー 緑内障基礎研究に役立つ知識、視神経圧迫モデル、檜森紀子

5, 第14回日本抗加齢医学学会総、2014年6

月6日から8日、大阪国際会議場（大阪）  
マウス軸索障害に対する heme oxygenase-1  
の内在性神経保護作用、檜森紀子、丸山和一、  
山本耕太郎、安田正幸、劉孟林、面高宗子、  
志賀由己浩、中澤徹

6, WOC, APAO 2014、2014年4月2日から6  
日、東京国際フォーラム（東京）、Critical  
neuroprotective roles of heme oxygenase-1  
induction against axonal injury-induced retinal  
ganglion cell death. Noriko Himori, Kazuichi  
Maruyama, Kotaro Yamamoto, Keiko Taguchi,  
Morin Ryu, Masayuki Yamamoto, Toru  
Nakazawa

〔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〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 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