慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	眼内血管新生疾患におけるNrf2の役割
Sub Title	Role of Nrf2 in ocular neovascular disease
Author	永井, 紀博(Nagai, Norihiro)
Publisher	
Publication year	2014
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2013.)
JaLC DOI	
Abstract	転写因子NF-E2-related factor 2 (Nrf2)は、酸化ストレス防御酵素群の遺伝子発現をオンにして、酸化ストレスに対する生体防御応答を活性化する。Nrf2ノックアウトマウスでは網膜血管炎症が増大しており、Nrf2は網膜血管炎症を抑制することが示された。糖尿病網膜症や加齢黄斑変性ではともに酸化ストレスと網膜血管炎症が病態形成に重要である。最近、抗VEGF製剤が網膜血管や新生血管からの浮腫や出血の抑制のために硝子体内投与という方法で臨床応用されたが、その効果は十分でない。Nrf2の制御はこれらの疾患の新たなストラテジーとなる可能性があり、臨床応用に向けさらなる検討が必要である。 Nrf2, a basic leucine zipper redox-sensitive transcription factor, regulates the inducible expression of antioxidant and cytoprotective genes by binding to the cis-acting enhancer sequence known as the antioxidant response element. We tested whether the Nrf2 is involved in regulating the vascular inflammation and oxidative damage in the retinal inflammation model. Retinal vascular inflammation was increased in Nrf2 deficient mice and Nrf2 protected retinal inflammation. Currently, the mainstay of therapy for diabetic retinopathy and age-related macular degeneration involves intravitreal injection of anti-vascular endothelial factor agents, which has limited effects. Treatment targeting the Nrf2 pathway may be a possible new therapy for these retinal vascular diseases.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2012～2013 課題番号：24791875 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
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24791875seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ５ 月 ３０ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2012～2013
課題番号：２４７９１８７５

研究課題名（和文）眼内血管新生疾患におけるＮｒｆ２の役割

研究課題名（英文）Role of Nrf2 in ocular neovascular disease

研究代表者
永井　紀博（Nagai, Norihro）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：１０３２７６１１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,000,000円、（間接経費）　900,000円

研究成果の概要（和文）：転写因子NF-E2-related factor 2 (Nrf2)は、酸化ストレス防御酵素群の遺伝子発現をオンにして、酸化ストレスに対する生体防御応答を活性化する。Nrf2ノックアウトマウスでは網膜血管炎症が増大しており、Nrf2は網膜血管炎症を抑制することが示された。糖尿病網膜症や加齢黄斑変性ではともに酸化ストレスと網膜血管炎症が病態形成に重要である。最近、抗VEGF製剤が網膜血管や新生血管からの浮腫や出血の抑制のために硝子体内投与という方法で臨床応用されたが、その効果は十分でない。Nrf2の制御はこれらの疾患の新たなストラテジーとなる可能性があり、臨床応用に向けさらなる検討が必要である

研究成果の概要（英文）：Nrf2, a basic leucine zipper redox-sensitive transcription factor, regulates the inducible expression of antioxidant and cytoprotective genes by binding to the cis-acting enhancer sequence known as the antioxidant response element. We tested whether the Nrf2 is involved in regulating the vascular inflammation and oxidative damage in the retinal inflammation model. Retinal vascular inflammation was increased in Nrf2 deficient mice and Nrf2 protected retinal inflammation. Currently, the mainstay of therapy for diabetic retinopathy and age-related macular degeneration involves intravitreal injection of anti-vascular endothelial factor agents, which has limited effects. Treatment targeting the Nrf2 pathway may be a possible new therapy for these retinal vascular diseases.

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：網膜　炎症　酸化ストレス

１．研究開始当初の背景

難治性の糖尿病網膜症や加齢黄斑変性に対する治療は、最近の硝子体手術や分子標的療法(薬剤療法)などの開発に伴い、大きく発展した。これらの疾患では、新生血管が病態の基本を成し、そのために二次的に網膜神経細胞が障害されることで視機能障害を来す。重症例では、失明に至ることもある重要な疾患である。

眼球は直接光に暴露する数少ない臓器であり、光による酸化ストレスを受けやすい。特に網膜視細胞外節は不飽和脂肪酸が豊富で過酸化反応を受けやすいことが知られている。過酸化反応を受けた視細胞は消化されにくくなり、網膜視細胞内に蓄積し過酸化水素を発生する。その結果、網膜色素上皮細胞が傷害され脈絡膜血管新生の原因となる。臨床的にも米国における加齢黄斑変性の抗酸化剤の前向き臨床試験では抗酸化剤の有用性が報告されており、加齢黄斑変性の病態に酸化ストレスが関与することが示唆された（AREDS study group. Arch Ophthalmol. 2002)。

一方、網膜血管新生を中心病態とする増殖糖尿病網膜症でも酸化ストレスが上昇しており、活性酸素は VEGF の産生を亢進することからも、酸化ストレスは網膜血管新生の病態に関与することが示唆されている。そこで酸化ストレスの制御も炎症と並び、網膜・脈絡膜血管新生の治療標的となることが示唆される。最近、抗 VEGF 薬が臨床応用されたが、その効果は限定的である。

これに対し、申請者らは、VEGF の上流の因子としてのレニン・アンジオテンシン系の糖尿病網膜症、加齢黄斑変性に対する作用を血管生物学、神経科学の両面から解析を行った。そして、アンジオテンシン II 1 型受容体シグナルの阻害によって糖尿病網膜症・加齢黄斑変性モデルにおいて、網膜・脈絡膜血管新生を抑制し、同時に神経障害も予防できることを示した。(Nagai, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005, Nagai,et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006, Kurihara, Nagai et al. Diabetes 2008)。

NF-E2-related factor 2 (Nrf2)は、酸化ストレス応答の遺伝子発現を司る転写因子であり、細胞に酸化ストレスが暴露されると Keap1 から解放されて核へ移行し、酸化ストレス防御酵素群の遺伝子発現をオンにして、酸化ストレスに対する生体防御応答を活性化する。

糖尿病網膜症では網膜虚血により誘導された網膜血管新生が、炎症細胞浸潤によって硝子体腔に異所性に侵入する。脈絡膜血管新生でも脈絡膜におけるマクロファージなどの炎症細胞浸潤が、血管新生を促進する。ともに網膜血管における炎症が病態を促進する。しかしながら、網膜血管における Nrf2 の作用は明らかでない。

２．研究の目的

失明の主因である加齢黄斑変性と糖尿病網膜症は、炎症性血管新生と二次的は神経障害という病態を有し、酸化ストレスが病態に関与する。酸化ストレスに対する生体防御システムである転写因子 NF-E2-related factor 2 (Nrf2)の本研究では Nrf2 の眼内血管新生の基盤となる網膜血管炎症への作用を動物モデルを用いて解析した。

３．研究の方法

(1) 網膜血管炎症モデルの作製。

①マウスぶどう膜炎モデルの作成

C57/B6 マウスにリポポリサッカライドを腹腔内投与し、全身および眼内の急性炎症を誘導した。このモデルでは、網膜血管における白血球接着の増加、眼内サイトカインの誘導などが 24 時間以内に誘導される。

炎症細胞浸潤については、Concanavalin A レクチンによる灌流ラベル法を用いて同時に評価した。

②マウス高脂肪負荷モデルの作成

5 週齢の Balb/C マウスに高脂肪食、コントロール食餌を 2 ヶ月間投与し、高脂肪食動物モデルを作成した。

(2) Nrf2 下流分子、血管新生因子、炎症性サイトカイン関連分子の発現解析。

動物モデルにおける Nrf2 下流分子の発現、網膜血管への白血球接着や浸潤を制御する接着分子 ICAM-1, 炎症性サイトカインであり特に重要な血管新生因子である VEGF、インターロイキン 6 などの発現を定量的 RT-PCR 法を用いて、mRNA レベルで解析した。

(3) 炎症細胞浸潤の解析。

炎症細胞浸潤については、Concanavalin A レクチンによる灌流ラベル法を用いて同時に評価した。この方法では、麻酔後にマウスの心臓から蛍光標識された Concanavalin A レクチンを灌流し、網膜の展開標本を作製して蛍光顕微鏡で観察する。Concanavalin A レクチンは血管内皮細胞と白血球に付着するため、網膜血管に接着した白血球を同時に観察できる。

(4) 網膜における酸化ストレスの解析。

眼球の凍結切片を作製し、網膜における酸化ストレスをスーパーオキサイド (O2·-)を検出するジハイドロエチジウム (DHE)染色

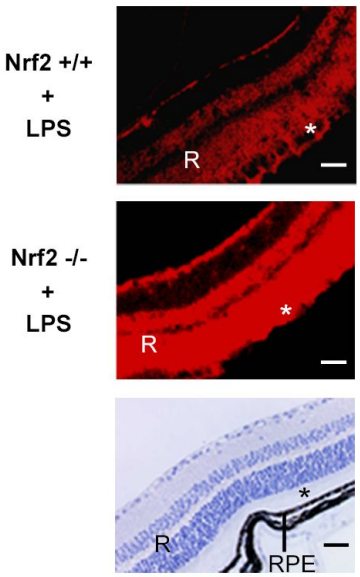
法で解析した

４．研究成果

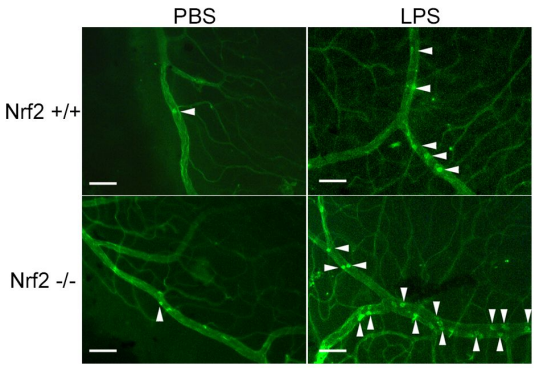
(1) Nrf2 ノックアウトマウス、コントロールマウスではリポポリサッカライドにおける急性炎症を誘導した。

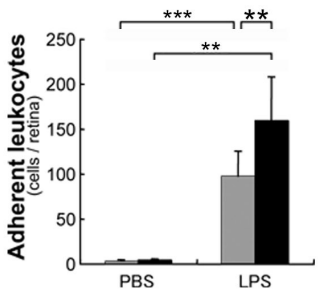
Nrf2 ノックアウトマウスではコントロールマウスに比較し以下のことが検出された。

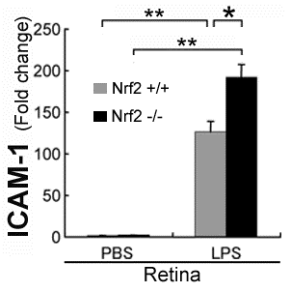
① DHE 染色における網膜の染色性が増しており、網膜における酸化ストレスが増大していた。



② 網膜血管への白血球接着が接着分子 ICAM-1 の発現とともに上昇していた。
（矢頭：網膜血管接着白血球）
(* P<0.05, **P<0.01)

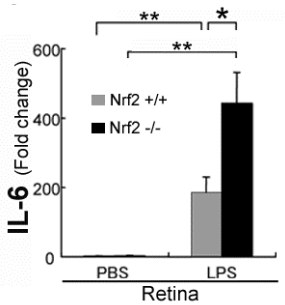






(* P<0.05, **P<0.01)

③ 網膜におけるインターロイキン６の発現が上昇していた。



(* P<0.05, **P<0.01)

(2) 高脂肪食モデルでは網膜における VEGF の発現が上昇しており、網膜における ho-1 の発現が減少していた。

以上のように Nrf2 ノックアウトマウスでは網膜血管炎症が増大しており、Nrf2 は網膜血管炎症を抑制することが示された。糖尿病網膜症や加齢黄斑変性ではともに酸化ストレスを基盤とした網膜血管炎症が病態形成に重要である。最近、抗 VEGF 製剤が網膜血管や新生血管からの浮腫や出血の抑制のために硝子体内投与という方法で臨床応用されたが、その効果は十分でない。Nrf2 の制御はこれらの疾患の新たなストラテジーとなる可能性があり、臨床応用に向けさらなる検討が必要である。

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１件）

(1) 永井紀博、坪田一男、ホウレンソウ、ケールに含まれるルテインの加齢黄斑変性、ドライアイに対する作用、内分泌・糖尿病・代謝内科、査読無し、第 36 巻第 4 号、2013 年、276－271

〔学会発表〕（計７件）

(1) 永井紀博、抗 VEGF 療法に反応不良の滲出型加齢黄斑変性に対するアフリベルセプ

トの作用、第 67 回日本臨床眼科学会、平成 25 年 10 月 31 日、横浜
(2) 永井紀博、加齢黄斑変性の治療戦略、第 131 回広島県眼科医会講習会、平成 25 年 9 月 29 日、広島
(3) 永井紀博、レスベラトロールによる脈絡膜新生血管の抑制、第 117 回日本眼科学会総会、平成 25 年 4 月 7 日、東京
(4) 永井紀博、健常者における黄斑色素密度と血清カロテノイド濃度の相関、第 66 回日本臨床眼科学会、平成 24 年 10 月 27 日、京都
(5) 永井紀博、レニン・アンジオテンシン系と炎症の抑制による網脈絡膜疾患の制御 -動物モデルによる解析-、第 15 回眼科若手研究者の会、平成 24 年 10 月 26 日、京都
(6) 小林文貴、永井紀博、若年者における黄斑色素密度の検討、第 116 回日本眼科学会総会、平成 24 年 4 月 7 日、東京
(7) 永井紀博、レスベラトロールによる脈絡膜新生血管の抑制、第 116 回日本眼科学会総会　、平成 24 年 4 月 7 日、東京

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

６．研究組織

(1)研究代表者
永井　紀博（Nagai Norihiro）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：10327611