

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04999

研究課題名(和文) 正常眼圧緑内障の霊長類モデル確立と神経保護・再生研究

研究課題名(英文) Generation of a marmoset model of normal tension glaucoma and investigation into neuroprotection and neuroregeneration for glaucoma therapy

研究代表者

原田 高幸 (HARADA, Takayuki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・分野長

研究者番号：90345306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：我が国における最大の失明原因は緑内障である。特に我が国で患者数が多い正常眼圧緑内障(NTG)については、眼圧降下療法以外の治療法が求められている。本研究では点眼薬だけでなく、酸化ストレスを抑制する既存薬や食品に含まれる成分、さらにカロリー制限による神経保護効果を報告した。また、よりヒトに近いモデルとして霊長類であるマーモセットを検討する中で、一定数の老齢個体がNTGを自然発症することも見出した。すでに遺伝子探索、血液及び脳脊髄液検査、MRIによる検討を終え、緑内障患者の特徴がいくつも再現されていることを確認済みである。さらに現在は遺伝子改変によるNTGマーモセットを作成中である。

研究成果の概要(英文)：The most common cause of blindness in Japan is glaucoma. Normal tension glaucoma (NTG) is a subtype of glaucoma that presents with statistically normal intraocular pressure (IOP), suggesting that non-IOP-dependent factors may contribute to the disease progression. Interestingly, 70% of glaucoma patients in Japan have NTG. In this project, we demonstrated that some existing drugs, nutrients that suppress oxidative stress and caloric restriction are effective for suppression of retinal degeneration in mouse models of glaucoma. In addition, we found that some aged marmosets, non-human primates, develop spontaneous NTG and we are preparing for generation of genetically modified NTG marmosets.

研究分野：眼科学

キーワード：緑内障 神経保護 視神経再生 疾患モデル動物 マーモセット

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国における最大の失明原因は緑内障である。特に全体の70%を占める正常眼圧緑内障 (NTG) については、眼圧降下療法以外の治療法が求められている。しかし緑内障のような多因子疾患では遺伝子異常の影響は全体の5%程度にしか確認されておらず、遺伝子診断の有用性も限定的である。さらにそれ以外の要因についても十分には解明されておらず、診断や治療法には結びついていないのが現状である。

(2) 新薬の開発には多大な費用と期間が必要なことから、既存薬を活用するドラッグリポジショニング (drug repositioning) に注目が集まっている。既存薬は安全性がある程度確立されており、研究開発コストも低減できることから、高騰する医療費の抑制にもつながる可能性がある。したがって緑内障の疾患モデルを用いた神経保護研究や薬剤効果の検討が世界的に行われているが、海外では多くが高眼圧を示す緑内障であるため、NTGの研究は十分に行われていない。さらに視神経線維を絞扼し、特徴的な視野障害パターンを引き起こすとされる篩状板がマウスでは存在しないことから、よりヒトに近い疾患モデルの開発が望まれていた。

### 2. 研究の目的

本研究では既存薬も含めた神経保護薬の探索と早期治療介入の検討を行った。またこうした研究を推進する目的で、霊長類 NTG モデルを確立するため、高齢マーマセットのスクリーニングに加えて、遺伝子改変マーマセットの作成を開始した。

### 3. 研究の方法

(1) 我々はグルタミン酸輸送体 (GLAST または EAAC1) の欠損マウスでは眼圧が正常であるにも関わらず、酸化ストレスや小胞体ストレスの亢進なども加わることにより、NTG 様の網膜・視神経変性を発症することを報告している (引用文献①)。この疾患モデル、あるいは視神経挫滅を行ったマウスに対して、てんかんや偏頭痛に使用されているバルプロ酸ナトリウム (VPA)、胃粘膜保護薬の主成分である geranylgeranylacetone (GGA)、脳梗塞や筋萎縮性側索硬化症の治療薬であり、強力なフリーラジカル・スカベンジャーである edaravone、ポリアミンの1つであり食品にも含まれる spermidine、等を投与して、神経保護効果を検討した。カロリー制限の検討については、1日ごとの絶食を行った。

(2) マーマセットは若齢群、高齢群に加えて、NMDA 眼内投与群、NMDA+VPA 投与群を作成した。

(3) 網膜変性や治療効果の解析方法として

は光干渉断層計 (OCT) や多局所網膜電図による *in vivo* imaging に加えて、組織学的な解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) GLAST 欠損マウスに VPA を2週間投与したところ、網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell; RGC) に対する保護効果が得られることがわかった (発表論文 18)。RGC 特異的に神経栄養因子 BDNF の受容体である TrkB を欠損させたマウス (引用文献②) においては、VPA による神経保護効果が有意に低下することから、VPA の効果の一部に、BDNF の産生増大が予想される (発表論文 10 および 16)。BDNF の上昇は主に Müller グリア細胞で観察されたことから、以下のようなメカニズムが考えられる (図 1)。網膜色素変性症患者に数カ月間 VPA を投与すると、視機能の改善が得られたとする報告もあることから (引用文献③)、VPA を投与されている緑内障患者の経過に興味をもたれる結果となった。

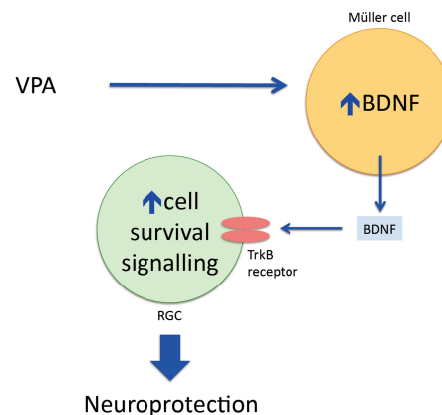


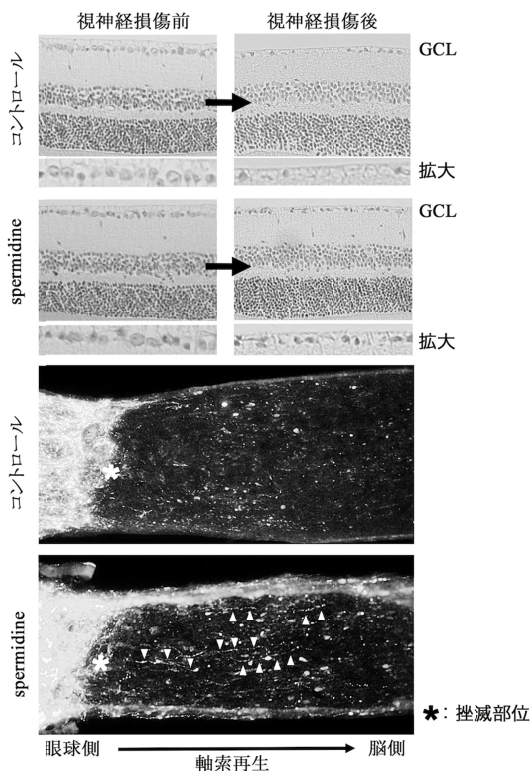
図 1. VPA が網膜神経保護に与える影響

(2) GGA は熱ショック蛋白を誘導するが、中でも heat shock protein 70 (Hsp70) は分子シャペロンとして機能し、抗酸化作用を有することが報告されている。我々が GLAST 欠損マウスに GGA を経口投与したところ、網膜における Hsp70 の発現が上昇して、神経保護効果を発揮することがわかった (発表論文 12)。胃薬の成分である GGA に緑内障の進行抑制効果があるとすれば有用である。

(3) EAAC1 欠損マウスに生後5週から12週まで edaravone を毎日1回腹腔内投与したところ、RGC 死に加えて視機能障害の進行が抑制されていた。免疫組織学的検討からは網膜神経節細胞層における酸化ストレスの抑制効果が認められた。経過中に有意な眼圧の変動はなかったことから、edaravone は眼圧非依存的な神経保護効果を有すると考えられる (発表論文 5)。また視神経外傷の3分後に edaravone を眼内投与すると有意に酸化ストレスが抑制され、受傷1週間後でも

RGC が保護されていた。この作用機序として、細胞死を誘導する ASK1 から p38 へ至るシグナル伝達経路（発表論文 7）の不活化が推定された（発表論文 3）。以上の結果から、edaravone は RGC 保護効果を有しており、緑内障治療等にも有用な可能性が示唆された。

(4) 既存薬よりもさらにハードルが低いのが食品やカロリーの摂取法による神経保護である。例えば大豆や茶葉、キノコ類に多く含まれている spermidine は強い抗酸化作用を持つポリアミンの一種で、内因性フリーラジカル・スカベンジャーとして作用する。EAAC1 欠損マウスにおいて spermidine を飲水投与したところ、投与群では RGC 死に加えて、視機能障害の進行も抑制された。経過中に眼圧の下降作用は認められなかった（発表論文 14）。同様の実験を視神経損傷モデルマウスで行うと、やはり有意な RGC 死の抑制が観察された。この作用機序としては酸化ストレスの抑制、ASK1-p38 経路の不活化に加えて、病巣部へのミクログリアの集積と MCP-1 等のケモカインの産生抑制が推定された。さらに spermidine は視神経損傷モデルにおける視神経軸索再生を促進することを見出した（発表論文 15）(図 2)。

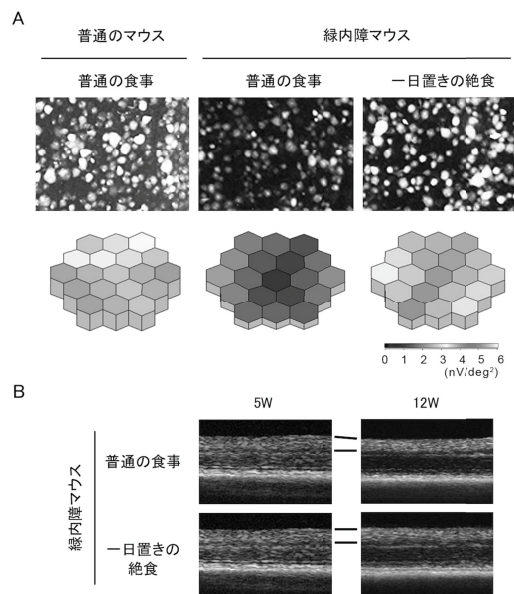


**図 2. Spermidine が視神経損傷による網膜変性に与える影響**

Spermidine 投与群では網膜神経節細胞死が抑制され、視神経軸索の再生効果が確認された。\*: 挫滅部位. 矢頭: 再生した視神経軸索. GCL: ganglion cell layer.

(5) 近年ではカロリー制限が神経保護に有効であることが報告されている。我々は EAAC1 欠損マウスを活用して、一日置き絶食によって RGC 死を抑制できるか検討した。その結果、生後 5 週齢から 12 週齢まで、一日置き絶食をしたマウスでは RGC 死が抑制され、視機能障害も改善することがわかった。このメカニズムを検討したところ、絶食により血中ケトン体濃度や網膜におけるヒストンのアセチル化が上昇し、複数の神経栄養因子や抗酸化ストレス遺伝子の発現量が増加することが確認された（発表論文 11）。以上の結果は食品の選択やカロリー制限が生活習慣病だけでなく、緑内障の進行抑制にも有用な可能性を示唆する。

本課題の総括として、酸化ストレスが緑内障の進行に与える影響に関する総説の発表を行った（発表論文 8）。



**図 3. 一日置き絶食による網膜変性の抑制効果**

A: (上段) 逆行性ラベリングにより、緑内障マウスでは網膜神経節細胞の減少が観察されるが(中)、一日置き絶食により抑制された(右)。(下段) 多局所網膜電位による視機能解析。一日置き絶食をしたマウスでは、網膜機能が保たれていることがわかる。

B: OCT による網膜のイメージング。同一網膜の観察を 5 週齢(左)と 12 週齢(右)に行った。一日置き絶食マウス(下段)では、12 週齢における網膜内層の厚みが保たれていることがわかる。

(6) 老齢マーモセットの非侵襲的な眼圧測定、前眼部、網膜、篩状板の観察と視機能解析を行い、NTG の自然発症個体を複数見出した。同個体における遺伝子探索、血液及び脳脊髄液の検査、さらには MRI による検討を終え、緑内障患者の特徴がいくつも再現さ

れていることを確認済みである。また実験的なモデルとして、グルタミン酸をマーマセット眼球内に投与することによって RGC 死を誘導し、VPA の眼内投与でこれを抑制する実験に成功した。以上の実験では非侵襲的なモニタリングと組織学的な検索結果、さらに電気生理学的な所見の全てが一致しており、研究手法としても今後の治療研究に有用と考えられる。さらにマーマセット用の遺伝子改変用ベクター作成と受精卵への注入を終えている。遺伝子改変マーマセットでは heterozygous でも NTG が観察できる予定である。もし F1 で NTG が発症すれば、今後は全ての個体が NTG となることから、研究効率が飛躍的に向上する予定である。またこのような霊長類マーマセットが確立すれば世界初の成果となることから、今後も研究を推進していく予定である。

#### <引用文献>

Harada, T. et al. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *Journal of Clinical Investigation* 117, 1763-1770, 2007.

Harada, C. et al. Glia- and neuron-specific functions of TrkB signalling during retinal degeneration and regeneration. *Nature Communications* 2, 189, 2011.

Clemson, C.M. et al. Therapeutic potential of valproic acid for retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 95, 89-93, 2011.

#### 5 . 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 19 件)

1. Akaiwa, K., Namekata, K., Azuchi, Y., Guo, X., Kimura, A., Harada, C., Mitamura, Y. and Harada, T. (2018) Topical ripasudil suppresses retinal ganglion cell death in a mouse model of normal tension glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 59(5), 2080-2089. doi: 10.1167/iovs.17-23276. 査読有
2. Shinozaki, Y., Kashiwagi, K., Namekata, K., Takeda, A., Ohno, N., Robaye, B., Harada, T., Iwata, T. and Koizumi, S. (2017) Purinergic dysregulation causes hypertensive glaucoma-like optic neuropathy. *JCI Insight* 2(19), pii: 93456. doi: 10.1172/jci.insight.93456. 査読有
3. Akiyama, G., Azuchi, Y., Guo, X., Noro, T., Kimura, A., Harada, C., Namekata, K. and Harada, T. (2017) Edaravone prevents retinal degeneration in adult mice following optic nerve

injury. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 58(11), 4908-4914. doi: 10.1167/iovs.17-22250. 査読有

4. Guo, X., Namekata, K., Kimura, A., Harada, C. and Harada, T. (2017) Renin-angiotensin system regulates neurodegeneration in a mouse model of optic neuritis. *American Journal of Pathology* 187(12):2876-2885. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.08.012. 査読有
5. Akaiwa, K., Namekata, K., Azuchi, Y., Guo, X., Kimura, A., Harada, C., Mitamura, Y. and Harada, T. (2017) Edaravone suppresses retinal ganglion cell death in a mouse model of normal tension glaucoma. *Cell Death and Disease* 8, e2934. doi: 10.1038/cddis.2017.341. 査読有
6. Azuchi, Y., Kimura, A., Guo, X., Akiyama, G., Noro, T., Harada, C., Nishigaki, A., Namekata, K. and Harada, T. (2017) Valproic acid and ASK1 deficiency ameliorate optic neuritis and neurodegeneration in an animal model of multiple sclerosis. *Neuroscience Letters* 639, 82-87. doi: 10.1016/j.neulet.2016.12.057. 査読有
7. Guo, X., Namekata, K., Kimura, A., Harada, C., and Harada, T. (2017). ASK1 in neurodegeneration. *Advances in Biological Regulation* 66:63-71. doi: 10.1016/j.jbior.2017.08.003. 査読有
8. Kimura, A., Namekata, K., Guo, X., Noro, T., Harada, C., and Harada, T. (2017). Targeting oxidative stress for treatment of glaucoma and optic neuritis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017, 2817252. doi: 10.1155/2017/2817252. 査読有
9. Kimura, A., Namekata, K., Guo, X., Harada, C., and Harada, T. (2017). Dock3-NMDA receptor interaction as a target for glaucoma therapy. *Histology and Histopathology* 32(3), 215-221. doi: 10.14670/HH-11-820. 査読有
10. Kimura, A., Namekata, K., Guo, X., Harada, C., and Harada, T. (2016). Neuroprotection, growth factors and BDNF-TrkB signaling in retinal degeneration. *International Journal of Molecular Sciences* 17(9), pii: E1584. doi:10.3390/ijms17091584. 査読有
11. Guo, X., Kimura, A., Azuchi, Y., Akiyama, G., Noro, T., Harada, C.,

- Namekata, K. and Harada, T. (2016) Caloric restriction promotes cell survival in a mouse model of normal tension glaucoma. *Scientific Reports* 6, 33950. doi: 10.1038/srep33950. 査読有
12. Dong, Z., Shinmei, Y., Dong, Y., Inafuku, S., Fukuhara, J., Ando, R., Kitaichi, N., Kanda, A., Tanaka, K., Noda, K., Harada, T., Chin, S. and Ishida, S. (2016) Effect of geranylgeranylacetone on the protection of retinal ganglion cells in a mouse model of normal tension glaucoma. *Heliyon* 2(10), e00191. doi: 10.1016/j.heliyon.2016.e00191. 査読有
13. Harada, C., Azuchi, Y., Noro, T., Guo, X., Kimura, A., Namekata, K. and Harada, T. (2015) TrkB signaling in retinal glia stimulates neuroprotection after optic nerve injury. *American Journal of Pathology* 185(12), 3238-3247. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.08.005. 査読有
14. Noro, T., Namekata, K., Azuchi, Y., Kimura, A., Guo, X., Harada, C., Nakano, T., Tsuneoka, H. and Harada, T. (2015) Spermidine ameliorates neurodegeneration in a mouse model of normal tension glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56(8), 5012-5019. doi: 10.1167/iovs.15-17142. 査読有
15. Noro, T., Namekata, K., Kimura, A., Guo, X., Azuchi, Y., Harada, C., Nakano, T., Tsuneoka, H. and Harada, T. (2015) Spermidine promotes retinal ganglion cell survival and optic nerve regeneration in adult mice following optic nerve injury. *Cell Death and Disease* 6, e1720. doi: 10.1038/cddis.2015.93. 査読有
16. Kimura, A., Namekata, K., Guo, X., Noro, T., Harada, C. and Harada, T. (2015) Valproic acid prevents NMDA-induced retinal ganglion cell death via stimulation of neuronal TrkB receptor signaling. *American Journal of Pathology* 185(3), 756-764. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.11.005. 査読有
17. Guo, X., Namekata, K., Kimura, A., Noro, T., Azuchi, Y., Semba, K., Harada, C., Yoshida, H., Mitamura, Y. and Harada, T. (2015) Brimonidine suppresses loss of retinal neurons and visual function in a murine model of optic neuritis. *Neuroscience Letters* 592, 27-31. doi: 10.1016/j.neulet.2015.02.059. 査読有
18. Kimura, A., Guo, X., Noro, T., Harada, C., Tanaka, K., Namekata, K. and Harada, T. (2015) Valproic acid prevents retinal degeneration in a murine model of normal tension glaucoma. *Neuroscience Letters* 588, 108-113. doi: 10.1016/j.neulet.2014. 査読有
19. Yanagisawa, M., Aida, T., Takeda, T., Namekata, K., Harada, T., Shinagawa, R. and Tanaka, K. (2015) Arundic acid attenuates retinal ganglion cell death by increasing glutamate/aspartate transporter (GLAST) expression in a model of normal tension glaucoma. *Cell Death and Disease* 6, e1693. doi: 10.1038/cddis.2015.45. 査読有
- 〔学会発表〕(計12件)
1. 原田高幸. 緑内障疾患モデルを用いた神経保護および軸索再生研究. 生命科学学会合同年次大会 (ConBio), 2017年.
  2. 原田高幸. 緑内障モデル動物における網膜神経節細胞死と軸索再生のメカニズム. 第28回日本緑内障学会, 2017年.
  3. 原田高幸. 網膜神経保護と軸索再生研究. 第37回日本眼薬理学会, 2017年.
  4. 原田高幸. 自然発症緑内障マーマセットを用いた眼疾患研究. 第58回日本神経病理学会総会, 2017年.
  5. 原田高幸. 緑内障基礎研究の進め方: 動物モデルの選択. 第121回日本眼科学会総会, 2017年.
  6. 原田高幸. Neuroprotection and optic nerve regeneration for glaucoma therapy. 第90回日本薬理学会年会, 2017年.
  7. 原田高幸. 自然発症緑内障マーマセットを用いた病態研究の展望. 第6回マーマセット研究会, 2016年.
  8. Harada, T. 他. Neuroprotection and optic nerve regeneration for glaucoma therapy: contribution of oxidative stress in animal models of normal tension glaucoma. XXII International Congress of Eye Research (ISER), 2016年.
  9. 原田高幸. 網膜神経節細胞への介入戦略. 第120回日本眼科学会総会, 2016年.
  10. Harada, T. 他. Neuroprotection by valproic acid and spermidine in a mouse model of normal tension glaucoma. Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2015年.
  11. Harada, T. TrkB signaling in Müller glia stimulates neuroprotection after optic nerve injury. *European*

- Association for Vision and Eye Research (EVER) Congress, 2015 年.  
12. Harada, T. Mechanisms of RGC death in a murine model of normal tension glaucoma. World Glaucoma Congress, 2015 年.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 視神経保護剤  
発明者: 原田高幸、行方和彦、郭 暁麗、他  
権利者: 公益財団法人東京都医学総合研究所  
種類: 特許  
番号: 特許願 2015-092696  
出願年月日: 平成 27 年 4 月 30 日  
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
未来を話そう! プロジェクト研究の紹介 (一般向け)  
<http://www.igakuken.or.jp/project/to-to-min/to-pro26.html>

プロジェクト研究等 医学研で行われている研究活動  
<http://www.igakuken.or.jp/project/detail/retina.html>

網膜・視神経変性疾患の病態解明と治療法 (研究者向け)  
<http://www.igakuken.or.jp/retina/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原田 高幸 (HARADA, Takayuki)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・  
運動・感覚システム研究分野・分野長  
研究者番号: 90345306

### (2) 研究分担者

岡原 純子 (OKAHARA, Junko)  
公益財団法人実験動物中央研究所・マーモ  
セット研究部 分子発生学研究室・室長  
研究者番号: 20464175

### (3) 連携研究者

佐々木 えりか (SASAKI, Erika)  
公益財団法人実験動物中央研究所・マーモ  
セット研究部 応用発生学研究センター・  
センター長  
研究者番号: 70390739

石田 晋 (ISHIDA, Susumu)  
北海道大学・医学部・教授  
研究者番号: 10245558

三田村 佳典 (MITAMURA, Yoshinori)  
徳島大学・医学部・教授  
研究者番号: 30287536

一條 秀憲 (ICHIJO, Hidenori)  
東京大学・薬学部・教授  
研究者番号: 00242206

徳野 博信 (TOKUNO, Hironobu)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・  
認知症・高次脳機能システム研究分野・  
副参事研究員  
研究者番号: 40212071

行方 和彦 (NAMEKATA, Kazuhiko)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・  
運動・感覚システム研究分野・  
副参事研究員  
研究者番号: 70392355