

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10888

研究課題名(和文) 神経ステロイドはGABA受容体を介して緑内障性視神経症の発症を防御する

研究課題名(英文) Neurosteroids modulate the effects of high pressure in a rat ex vivo glaucoma model

研究代表者

石川 誠 (Ishikawa, Makoto)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10212854

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)：我々は、独自に開発したラットex vivo緑内障実験モデルを用いて、眼圧上昇時にGABA受容体作用型神経ステロイド(Allopregnanolone, AlloP)とNMDA受容体作用型神経ステロイド(24S-Hydroxycholesterol, 24SH)は、網膜神経節細胞において生成されることを明らかにした。さらに、AlloPと24SHは眼圧上昇時に神経保護的に作用し、AlloPと24SHを同時投与した場合、単独投与した場合と比較して、より効果的に神経保護効果を得られることが明らかとなった。AlloPと24SHは、緑内障神経保護薬として有用である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the present study using a rat ex vivo glaucoma model, we found that the synthesis of neurosteroids, allopregnanolone (AlloP) and 24(S)-hydroxycholesterol (24SH), is facilitated by pressure elevation. Moreover, we found that AlloP and 24SH are neuroprotective against pressure mediated retinal degeneration. Quantitative real-time RT-PCR, ELISA, and immunohistochemistry revealed that elevated pressure facilitated the expression of AlloP and 24SH synthesizing enzymes. LC-MS/MS revealed that AlloP and 24SH levels increased in a pressure-dependent manner. Axonal injury and apoptotic RGC death induced by high pressure was ameliorated by AlloP and 24SH. We also observed that co-administration of 24SH (0.1 micromM) and AlloP (0.1 micromM), concentrations that are only partially effective when administered alone, prevents axonal swelling under high pressure. This apparent enhanced protection indicates strong interaction between the two neurosteroids to preserve neuronal integrity.

研究分野：緑内障の基礎研究

キーワード：緑内障 眼圧 グルタミン酸受容体 GABA受容体 神経ステロイド 神経保護

## 1. 研究開始当初の背景

神経ステロイド (NS) は、神経系においてコレステロールから合成されるステロイドの総称である。NS は、細胞膜に存在する神経伝達物質受容体に作用して、神経の興奮性を急激に変化させる。

網膜において、視覚情報は視細胞から双極細胞、さらに神経節細胞へと伝達される (視覚情報主経路)。グルタミン酸は、視覚情報主経路における主要な興奮性神経伝達物質として、重要な役割を果たす。視細胞や双極細胞のプレ・シナプス前終末から放出されたグルタミン酸は、ポスト・シナプスのグルタミン酸受容体に結合した後、シナプス後細胞の神経興奮を促す。一方、GABA は水平細胞・アマクリン細胞のプレ・シナプス前終末から放出された後、ポスト・シナプスの GABA 受容体に結合し、視覚情報主経路に対して、興奮抑制性に作用する (図 1)。

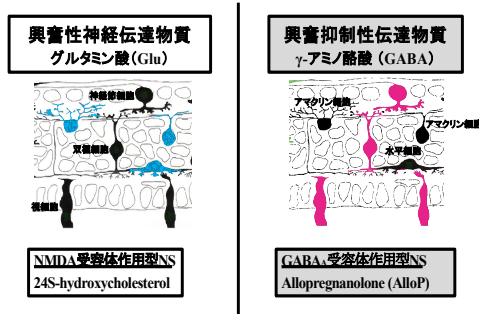


図1. 網膜における神経伝達物質とニューロステロイド

NS は、グルタミン酸受容体 (特に NMDA 受容体) 及び GABA 受容体 (特に GABA<sub>A</sub> 受容体) に作用し、神経興奮を調節すると考えられている (図 1)。

緑内障と NS について、NMDA 受容体作用型 NS である 24S-hydroxycholesterol (24SH) が緑内障と関与するとの報告 (Fourgeux et al. IOVS 2009) があるが、加圧における 24SH の具体的な役割は解明されていない。一方、GABA<sub>A</sub> 受容体作用型 NS である Allopregnanolone (AlloP) については、加圧傷害に対して神経保護的に作用するとの我々の報告 (Ishikawa et al. IOVS 2014) があるが、神経保護のメカニズムについて詳細な検討を要する。

我々は興奮毒性に注目して急性加圧実験を行い、眼圧が上昇するとグルタミン酸代謝が低下した結果、主に NMDA 受容体を介した興奮毒性によって神経節細胞傷害が惹起されることを明らかにした (Ishikawa et al. IOVS 2010, 2011)。加圧傷害の主体が NMDA 受容体を介した興奮毒性であることから、我々は、GABA<sub>A</sub> 受容体を介する興奮抑制系が、加圧傷害に対して神経保護的に作用する可能性があるのではないかと考えた。そこで、NS のうち GABA<sub>A</sub> 受容体の強力な作働性物質である AlloP (GABA 受容体作用型 NS) をもちいた急性加圧実験を行い、AlloP の神経保護効果を

明らかにした (Ishikawa et al. IOVS 2014)。

加圧実験の結果に基づき、我々は「神経ステロイドは GABA<sub>A</sub> 受容体を介して緑内障性視神経症の発症を防御する」との仮説をたてた。

## 2. 研究の目的

緑内障は、本邦に於ける主な失明原因の一つである。緑内障の本態は網膜の神経節細胞の傷害であり、眼圧上昇は緑内障の発症・悪化の最も重要な危険因子である。我々は、神経節細胞を眼圧上昇から防御する為、NS に着目した。本研究では、「NS は GABA<sub>A</sub> 受容体を介して緑内障性視神経症の発症を防御する」との仮説をたて、正常ラットの分離眼球標本による加圧実験を行い、AlloP を含む GABA<sub>A</sub> 受容体作用型 NS、及び、NMDA 受容体作用型 NS について、加圧傷害における役割を調査し、両者の相互作用を明らかにする。さらに、AlloP 合成を促進する薬剤の、加圧傷害に対する神経保護効果を調査し、仮説を検証する。

## 3. 研究の方法

今回の研究計画では、眼外からの NS の影響を可及的に排除することが重要である。我々が開発した眼球分離標本を用いた加圧モデル (*ex vivo* モデル) は *in vitro* 分離培養系と *in vivo* 緑内障動物モデルの中間に位置し、純粋に眼圧の効果のみを抽出できる (石川ら、特願 2016-190732)。

眼球分離標本を用いた加圧モデルをもちいて、AlloP と 24SH について、以下の実験①～③を行った。さらに、AlloP 合成を賦活化する薬剤 (PK11195) を用いた実験④を行い、仮説を検証した。

①AlloP は、加圧負荷時に網膜において生成され神経保護的に作用することを、液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) による AlloP 測定と ELISA 法・免疫組織染色による AlloP 合成酵素の発現解析、光顕・電顕による形態解析によって明らかにした。

②24SH は、加圧負荷時に網膜において生成され、神経傷害性に作用することを、LC-MS/MS 法による 24SH 測定と ELISA 法・免疫組織染色による 24SH 合成酵素の発現解析、光顕・電顕による形態解析によって明らかにした。

③AlloP と 24SH の、加圧傷害に対する相互作用を明らかにするため、AlloP 合成酵素阻害薬と 24SH 合成阻害薬を用いて、光顕による形態変化の観察を行った。

④AlloP 合成を賦活化する薬剤 (PK11195) が加圧負荷時に神経保護的に作用することを、LC-MS/MS 法による AlloP 測定、抗 AlloP 合成酵素抗体による免疫組織染色、光顕・電顕観察によって明らかにした。

## 4. 研究成果

## 1) 研究の主な成果

### ①眼圧上昇時の神経ステロイド (NS) 誘導のメカニズムの解明

#### a. AlloP

・LC-MS/MS 法によって、眼圧上昇時に AlloP は網膜において生成されることが明らかになった。

・ELISA 法によって、AlloP 生成の律速段階にある TSPO と 5 $\alpha$ -Reductase Type 1,2,3 の発現が加圧によって上昇することが明らかになった。

・免疫組織染色によって、AlloP は神経節細胞 (RGC) において特異的に生成されることが明らかになった。

・光顕・電顕観察によって、AlloP は加圧傷害に対して神経保護的に作用することが明らかになった。

以上の結果は、*Neuropharmacology* (Ishikawa et al. 2016) に発表した。

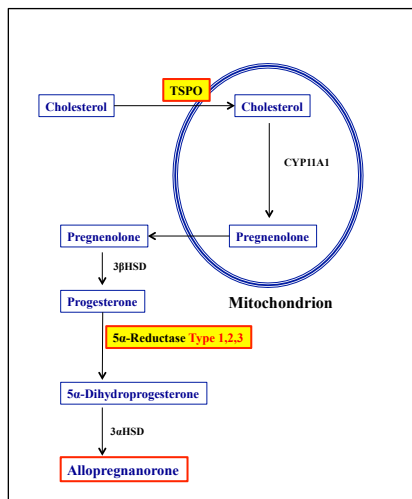


図 2 .AlloP 合成経路

#### b. 24SH

・LC-MS/MS 法によって、眼圧上昇時に 24SH は網膜において生成されることが明らかになった。

・ELISA 法によって、24SH 合成酵素 CYP46A1 の発現が加圧によって上昇することが明らかになった。

・免疫組織染色によって、CYP46A1 は RGC に特異的に局在し、加圧によって発現が上昇することが明らかになった。

・光顕・電顕観察によって、24SH は加圧傷害に対して神経保護的に作用することが明らかになった。

以上の結果は、*Sci Rep* (Ishikawa et al. 2016) に発表した。

#### c. 眼圧上昇時の AlloP と 24SH の相互作用

NMDA 受容体拮抗薬を用いた LC-MS/MS 解析に結果、眼圧上昇時に AlloP と 24SH が NMDA 受容体を介して同時に生成されることが明らかになった。さらに、眼圧上昇時に単独投与 (AlloP, 24SH) では神経保護効果が得られなかった濃度 (100 nM) に着目して、

100 nM AlloP と 100 nM 24SH を混合投与すると、十分な神経保護効果を得られた (Ishikawa et al. 2018 投稿中)。

#### d. PK11195 による神経保護効果

AlloP 合成を賦活化する薬剤 (PK11195) を投与すると、TSPO と 5 $\alpha$ -Reductase Type 2 の発現が上昇し、AlloP が産生された。PK11195 は加圧傷害に対して神経保護的に作用することが明らかになった。

以上の結果は、*Neuropharmacology* (Ishikawa et al. 2016) に発表した。

### ②得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

NS は、従来の神経伝達物質受容体拮抗薬にみられる副作用がなく、臨床応用が期待される。本研究成果は、初めて NS が緑内障の神経保護療法に有益であるというエビデンスを示したものである。

### ③今後の展望

我々は、これまでの加圧実験の結果に基づき、NMDA 受容体作用型 NS である 24SH は神経傷害性に作用すると予想していた。しかし、予想と異なって 24SH が加圧傷害に対して神経保護的に作用したことは、新しい知見であった。しかし、何故 24SH に神経保護効果があるのか、詳細なメカニズムは不明である。我々は、24SH が生体膜に結合した際に膜の流動化をもたらし、AlloP 産生が上昇して神経保護効果をもたらすのではないかと考えている。今後は、24SH と AlloP の相互効果に着目して、24SH の神経保護のメカニズムを解明していきたい。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 9 件)

- ① Ishikawa, M., Yoshitomi, T., Covey, D.F., Zorumski, C.F., Izumi, Y. Neurosteroids and oxysterols as potential therapeutic agents for glaucoma and Alzheimer's disease. *Neuropsychiatry* 8:344-359, 2018. 査読あり
- ② Sawada Y, Araie M, Kasuga H, Ishikawa M, Iwata T, Murata K, Yoshitomi T. Focal lamina cribrosa defect in myopic eyes with non-progressive glaucomatous visual field defect. *Am J Ophthalmol*. 2018 Mar 17. piiS0002-9394(18)30117-X. doi: 10.1016/j.ajo.2018.03.018. 査読あり
- ③ Sawada Y, Araie M, Ishikawa M,

- Yoshitomi T. Multiple temporal lamina cribrosa defects in myopic eyes with glaucoma and their association with visual field defects. **Ophthalmology**. 2017 Nov;124(11):1600-1611.  
doi: 10.1016/j.ophtha.2017.04.027.  
査読あり
- ④ Sawada Y, Hangai M, Ishikawa M, Yoshitomi T. Association of myopic deformation of optic disc with visual field progression in paired eyes with open-angle glaucoma. **PLoS One**. 2017 Jan 23;12(1):e0170733.  
doi: 10.1371/journal.pone.0170733.  
査読あり
- ⑤ Ishikawa M, Yoshitomi T, Zorumski CF, Izumi Y. 24(S)-Hydroxycholesterol protects the ex vivo rat retina from injury by elevated hydrostatic pressure. **Sci Rep**. 2016 Sep 22;6:33886.  
doi: 10.1038/srep33886. 査読あり
- ⑥ Ishikawa M, Yoshitomi T, Covey DF, Zorumski CF, Izumi Y. TSPO activation modulates the effects of high pressure in a rat ex vivo glaucoma model. **Neuropharmacology**. 2016;111:142-159.  
doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.09.001.  
査読あり
- ⑦ Sawada Y, Hangai M, Ishikawa M, Yoshitomi T. Association of myopic optic disc deformation with visual field defects in paired eyes with open-angle glaucoma: a cross-sectional study. **PLoS One**. 2016 Aug 29;11(8):e0161961.  
doi: 10.1371/journal.pone.0161961.  
査読あり
- ⑧ Dong Y, Sawada Y, Cui J, Hayakawa M, Ogino D, Ishikawa M, Yoshitomi T. Dorzolamide-induced relaxation of isolated rabbit ciliary arteries mediated by inhibition of extracellular calcium influx. **Jpn J Ophthalmol**. 2016 Mar;60(2):103 - 110. doi: 10.1007/s10384-015-0423-z.  
査読あり
- ⑨ Sawada Y, Hangai M, Murata K, Ishikawa M, Yoshitomi T. Lamina cribrosa depth variation measured by spectral-domain optical coherence tomography within and between four glaucomatous optic disc phenotypes. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 2015 Sep;56(10):5777-84.  
doi: 10.1167/iovs.14-15942. 査読あり
- 〔学会発表〕(計 12 件)
- ① 2018.4.19-22. 第 122 回日本眼科学会総会(大阪) *ex vivo* 緑内障モデルにおける神経ステロイドのオートファジー活性効果と神経保護. 石川誠, 柴田直哉, 吉富健志, Douglas F. Covey, Charles F. Zorumski, 和泉幸俊.
- ② 2017.5.7-11. ARVO 2017 Annual Meeting, Baltimore, USA. Synergistic protection from high pressure-induced injury by allopregnanolone and 24(S)-hydroxycholesterol in the *ex vivo* rat retina. Ishikawa M, Yoshitomi T, Zorumski CF, Izumi Y.
- ③ 2017.6.28-7.1. World Glaucoma Congress 2017, Felsinki, Finland. Intraocular pressure elevation induces neurosteroid synthesis by NMDA receptors in a rat *ex vivo* retinal preparation. Ishikawa M, Yoshitomi T, Zorumski CF, Izumi Y.
- ④ 2017.4.6.-9. 第 121 回日本眼科学会総会(東京都) *ex vivo* 緑内障モデルにおける神経ステロイドの発現と神経保護作用.

- 石川誠, 吉富健志 (秋田大) 和泉幸俊 (ワシントン大)
- ⑤ 2017.9.29-31.第 28 回日本緑内障学会 (広島市) シンポジウム 13「薬物治療」神経保護治療. 石川誠.
- ⑥ 2016.5.1-5. 2016 ARVO Annual Meeting. Seattle, Washington. TSP0 modulates retinal axonal swelling in a rat ex vivo glaucoma model. Ishikawa M, Yoshitomi T, Covey DF, Zorumski CF, Izumi Y.
- ⑦ 2016.3.24-27. The 31th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress. Taipei. Pressure elevation induces upregulation of allopregnanolone synthesizing enzyme in an ex vivo rat glaucoma model. Ishikawa, M., Yoshitomi, T., Zorumski C.F., Izumi, Y.
- ⑧ 2016.4.7-10. 第 120 回日本眼科学会総会 (仙台) 神経ステロイド 24S-hydroxycholesterol の ex vivo 緑内障モデルにおける神経保護効果. 石川誠, 吉富健志, Zorumski CF, 和泉幸俊.
- ⑨ 2016.9.17-19. 第 28 回 日本緑内障学会 (横浜) シンポジウム 実践! 緑内障基礎研究のノウハウ. 圧傷害モデル研究の実践. 石川誠.
- ⑩ 2015. 6.6-9. World Glaucoma Congress 2015. Hong Kong, China. Upregulation of neurosteroid synthesizing enzyme in an ex vivo rat glaucoma model. Ishikawa, M., Yoshitomi, T., Izumi, Y.
- ⑪ 2015. 9.5-6. 第 35 回日本眼薬理学会 (東京) 眼圧上昇と 24S-hydroxycholesterol の発現上昇の関連について. 石川誠, 吉富健志, 和泉幸俊.
- ⑫ 2015.9.11-13. 第 26 回日本緑内障学会 (名古屋) 眼圧上昇時の神経ステロイドの誘導メカニズム. 石川誠, 吉富健志, 和泉幸俊. 優秀展示賞受賞
- 〔図書〕 (計 0 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 1 件)
- 名称: 緑内障の病態を再現できる実験装置及びこれを用いたスクリーニング方法.  
 発明者: 石川誠, 吉富健志, 神大介, 高関早苗.  
 権利者: 石川誠, 吉富健志, 神大介, 高関早苗.  
 種類: 特願  
 番号: 特願 2016-190732.  
 出願年月日: 2016-09-29  
 国内外の別: 国内
- 取得状況 (計 0 件)
- 〔その他〕  
 ホームページ等  
 なし
6. 研究組織  
 (1)研究代表者  
 石川 誠 (ISHIKAWA Makoto)  
 秋田大学・大学院医学研究科病態制御医学系眼科学講座・准教授  
 研究者番号: 10212854
- (2)研究分担者  
 吉富 健志 (YOSHITOMI Takeshi)  
 秋田大学・大学院医学研究科病態制御医学系眼科学講座・教授  
 研究者番号: 60191623
- (3)連携研究者  
 なし
- (4)研究協力者  
 高関 早苗 (TAKASEKI Sanae)