

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20247

研究課題名(和文) 緑内障モデル動物におけるEcel1の機能解析と治療への応用

研究課題名(英文) Functional analysis of Ecel 1 in animal model of glaucoma and its application to therapy

研究代表者

佐藤 孝太 (Sato, Kota)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50732327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障モデルマウスの網膜内で発現上昇するEcel1の発現機序および機能解析を目的とした。qPCR、ウェスタンブロットングおよび免疫染色の結果から、視神経挫滅により網膜神経節細胞障害を誘導したところ、視神経挫滅4日後にEcel1が網膜神経節細胞に高発現することを確認した。また、Ecel1はNMDA障害では誘導されないが、軸索流障害によって軸索挫滅と同程度に高発現を示した。網膜神経節細胞にEcel1を高発現するAAV2-mEcel1ウイルスベクターを作成した。このウイルスを眼内に投与し視神経挫滅を行ったところ、仮説とは異なり、Ecel1高発現群での神経保護効果は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed at the mechanism of expression and functional analysis of Ecel 1, which is expressed in the retina of glaucoma model mice. From the results of qPCR, western blotting and immunostaining, when retinal ganglion cell damage was induced by optic nerve crush, Ecel 1 was highly expressed in retinal ganglion cells 4 days after optic nerve crush. Although Ecel 1 is not induced by oxidative stress or NMDA injury, it is highly expressed by dysfunction of axonal transport as well as optic nerve crush. In order to analyze the function of Ecel1 in the retina, we made AAV2-mEcel1 virus vector which highly expresses Ecel1 in retinal ganglion cell. when this virus was administered in the eyes and optic nerve crush was carried out, unlike the hypothesis, no neuroprotective effect was observed in the group expressing high Ecel 1.

研究分野：医歯薬学

キーワード：緑内障 Ecel1

1. 研究開始当初の背景

緑内障は網膜神経節細胞に障害を来す眼科疾患であり、我が国の中途失明原因のおよそ25%を占める。しかしながら、本疾患の病態進行に関わる分子メカニズムや障害された網膜神経節細胞におけるイベントにおいては未だ不明な点が多い。この問題を明らかにするため、当研究施設では、緑内障の一つの側面を反映すると考えられる軸索障害モデル動物を作製し、網膜視神経障害の早期に変動する遺伝子群を次世代シーケンサーを用いた網羅解析により明らかにした (Yasuda et al. 2014)。この研究によりリストアップされた因子のうち、我々は、障害早期に Ecell という因子の発現が上昇し、その因子が網膜内の神経節細胞層に局在することを予備実験で確認した。

Ecell は膜貫通型のプロテアーゼであり、ストレス障害に対しての細胞死抑制機能を有していることが報告されている (Kiryu-Seo et al. 2000)。また、Ecell は網膜神経節細胞の軸索障害だけではなく、脳神経系の軸索障害時においても発現が上昇することが報告されている (Kiryu-Seo. 2006)。これらの研究から、Ecell は中枢神経系の障害に応答して発現上昇し、神経障害時に生じる酸化ストレスや小胞体ストレスを緩和させることで細胞死を抑制する、いわば内在性の神経保護因子であると推測される。しかしながら、Ecell の細胞死抑制に関わるその詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。そのため、申請者は、軸索障害モデルを用いて Ecell の細胞死抑制におけるシグナル経路を明らかにし、新たな緑内障治療の開発に貢献することを目標としている。神経障害に応答して発現が上昇する内在性の神経栄養因子の存在は広く知られている。網膜障害において発現が誘導される CNTF や bFGF, BDNF などは分泌性の神経保護因子とされる。網膜障害モデルにおいて、これら

の神経保護因子を投与することで、網膜障害が軽減されることが報告されている (Unoki et al. 1994)。また、CNTF については米 Neurotech 社の技術により既に臨床応用が進められている。つまり、内在性の神経保護因子は中枢神経障害に対して高い治療効果を持つことが期待される。内在性の因子は元来生体内に存在する因子であり副作用が少ないと予測される。そのため、同じく内在性因子である Ecell を用いた神経保護は、新たな治療法の可能性を有していると考えられる。この仮説に基づき、AAV を用いて Ecell を過剰発現させることで緑内障モデル動物における網膜神経節細胞の保護を試みる。

2. 研究の目的

緑内障モデル動物において発現する Ecell が神経保護効果をもつかどうかを検証すること。

3. 研究の方法

(1) 緑内障モデル動物の作製と神経節細胞障害の評価

当研究施設では、緑内障の一つの側面を反映するモデル動物として、マウスの視神経挫滅法により網膜神経節細胞死を誘導する軸索障害モデル動物の作製法が確立されている。本研究では、この軸索障害モデル動物を用いた。

上記のモデル動物における神経節細胞障害の評価法には、神経節細胞に特異的に存在する Thy1, Nefh, Brn3a, Brn3b, Brn3c および新規の網膜神経節細胞のマーカーである Rbpms の遺伝子発現量を qRT-PCR により確認する方法を用いた。

(2) 神経節細胞障害時における Ecell の発現変動の解析

上記の軸索障害モデル動物を用いて、神経節細胞障害時における Ecell の経時的な発現変動を解析した。網膜内の遺伝子発現量を qRT-PCR により、タンパク質発現量をウェスタンブロッティングにより調べた。また、網

膜内におけるタンパク質の局在を免疫組織化学により確認した。

(3) Ecell1 過剰発現ベクターの作製

過去の報告から、Ecell1 は酸化ストレスを軽減させることで細胞死を抑制する機能を持つことが示唆されている (Kiryu-Seo et al. 2000)。また当研究施設では、軸索障害モデル動物における網膜神経節細胞死が酸化ストレスによるものであることを報告している (Himori et al. 2013, 2014)。これらの研究結果に基づいて、申請者は、Ecell1 を網膜内で過剰発現させることで緑内障モデル動物における神経節細胞の保護を試みた。Ecell1 を過剰発現させるツールとして *in vivo* 用のウイルスベクターを作製した。

(4) 緑内障モデル動物における Ecell1 過剰発現を用いた神経節細胞保護の評価

作製した Ecell1 過剰発現ウイルスベクターを用い、緑内障モデル動物における神経節細胞の保護を試みた。マウス硝子体内に Ecell1 過剰発現ウイルスベクターを投与し、4 週間後に緑内障モデルを誘導した。神経節細胞に対する保護作用は、網膜神経節細胞に特異的に発現する *Thy1*, *Nefh*, *Brn3a*, *Brn3b*, *Brn3c* および *Rbpms* の遺伝子発現量を測定し、緑内障モデルにより減少する網膜神経節細胞マーカーの減少が、Ecell1 を過剰発現させたマウスにおいて抑制されるかどうかを指標とした。また、逆行性ラベルされた神経節細胞数をカウントし、緑内障モデルにおいて減少する神経節細胞数が、Ecell1 を過剰発現させたマウスにおいて抑制されるかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1) 緑内障モデル動物の作製と神経節細胞障害の評価

視神経挫滅により神経節細胞が変性しているかどうかを、網膜神経節細胞のマーカーである *Thy1*, *Nefh*, *Brn3a*, *Brn3b*, *Brn3c* および *Rbpms* の遺伝子発現量を qRT-PCR により

調べた。その結果、視神経挫滅 2 日後、4 日後および 7 日後において経時的に網膜神経節細胞のマーカー遺伝子の発現減少が認められた。

(2) 神経節細胞障害時における Ecell1 の発現変動の解析

軸索挫滅 2 日後、4 日後および 7 日後の網膜において Ecell1 の mRNA 発現量は未処置群と比較して数十倍から数百倍に増加し、Ecell1 のタンパク質発現量も明らかな増加が認められた。免疫染色によりその網膜内局在を調べたところ、網膜神経節細胞が局在する神経節細胞層に多く発現していることが確認された。加えて、Ecell1 の転写レベルは軸索流を阻害するビンブラスチン処理により、軸索挫滅時と同様に発現誘導されたが、神経興奮毒性を誘導する NMDA 処理では有意な差を認めなかった。一方、酸化ストレスを誘導する AAPH 処理群においては、Ecell1 はごくわずかに発現誘導される程度であったことから、軸索挫滅による Ecell1 の発現は主に神経栄養因子やミトコンドリアなどの輸送を阻害することが引き金となっていることが示唆された。

(3) Ecell1 過剰発現ベクターの作製

申請者は過去の報告から、網膜内に発現する Ecell1 は酸化ストレスなどの細胞障害に対する保護効果を有していると推測した。そのため、Ecell1 を過剰発現させることで緑内障モデルにおける網膜神経節細胞死を抑えることができるとの仮説を立てた。そのため、網膜神経節細胞に特異的に Ecell1 を過剰発現させるウイルスベクター AAV2-mEcell1 を作製した。マウス眼球内に AAV2-mEcell1 を投与し、その 4 週間後に眼球摘出をおこない Ecell1 の発現を解析したところ、AAV2-mEcell1 投与マウスの網膜では、Ecell1 の mRNA レベルはおおよそ 300 倍に増加し、タンパク質レベルでも Ecell1 が網膜神経節細胞に過剰発現されていることが確認された。

(4) 緑内障モデル動物における Ecel1 過剰発現を用いた神経節細胞保護の評価

作製した AAV2-mEcel1 を投与し、その 4 週間後に視神経挫滅により緑内障モデルを作成し、Ecel1 過剰発現マウスにおいて網膜神経節細胞の細胞死が抑制されるかどうかを評価した。視神経挫滅後における網膜神経節細胞マーカー遺伝子である Thy1, Nefh, Brn3a, Brn3c および Rbpms の発現量は AAV2-mEcel1 投与群およびコントロールである AAV2-MCS 群との有意な差は認められなかった。一方、Brn3b のみ AAV2-mEcel1 投与群で有意な増加が認められた。また、網膜神経節細胞細胞をフルオロゴールドで逆行性に染色し、視神経挫滅後の残存している網膜神経節細胞数をカウントしたところ、AAV2-mEcel1 投与群およびコントロールである AAV2-MCS 群との有意な差は認められなかった。これらの結果から、Ecel1 は網膜神経節細胞に対する神経保護効果を有していないことが示唆された。

本研究では当初の仮説に基づく予定していた検証実験を行ったが、その結果は申請者の仮説とは異なった結果であり、本研究で対象とした Ecel1 の網膜内機能は不明のままである。しかしながら、軸索挫滅時に発現誘導される Ecel1 は軸索損傷時において重要な機能を持つであろうこと難しくなく、その機能解析の意義は重要であると考え。申請者は今後も Ecel1 の機能解析を続けることを検討しており、これが緑内障病態の分子メカニズムの解明の一助となることを期待している。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

タイトル：
マウス視神経挫滅モデルの網膜神経節細胞障害における Ecel1 の関与

発表者：
志賀由紀浩、佐藤孝太、他 (7 人中 2 番目)
(H27 9/11. 名古屋 (ウインクあいち)、第 26 回 緑内障学会)

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 孝太 (Kota SATO)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号：50732327