

令和元年5月27日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11308

研究課題名(和文) 遺伝子発現の変化による網膜神経保護と緑内障の治療研究

研究課題名(英文) Retinal protection by changing gene expressions for glaucoma therapy

研究代表者

原田 知加子 (HARADA, Chikako)

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・研究員

研究者番号：20435720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：正常眼圧緑内障モデル動物に対する既存薬(Rho/ROCK阻害点眼薬、脳梗塞に対する治療薬であるEdaravone、去痰薬であるN-acetylcysteine)の投与実験を行い、その神経保護効果のメカニズムを論文発表した。

また神経栄養因子としての機能を持つNeuritinの欠損マウスに視神経外傷を起こすと、野生型マウスよりも神経変性が増悪することを確認した。一方、神経細胞から特異的に神経栄養因子受容体TrkBが欠損するマウスにおいては、加齢により、生後6ヶ月以降で正常眼圧緑内障様の神経変性が生じることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障は我が国における最大の失明原因であり、眼圧降下以外の手法による神経保護療法の開発が期待されている。そこで本研究では複数の緑内障モデル動物を用いて、安全性が確立した既存薬による細胞保護療法の可能性を示した。また特定の遺伝子発現の変化が神経細胞の耐性に与える影響を検討して、将来の薬物開発や新たな疾患モデルの開発に道をつけた。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated the neuroprotective effects of existing drugs, such as Rho/ROCK inhibitor eye drops, edaravone used for cerebral infarction, and N-acetylcysteine used as expectorant, and published these findings. In addition, we found that loss of neuritin, one of the trophic factors, increases neural cell death after optic nerve injury. We also found that loss of TrkB, one of the major neurotrophin receptors, induces normal tension glaucoma-like retinal degeneration after 6 months of age.

研究分野：眼科学

キーワード：緑内障 神経保護

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

緑内障は我が国における最大の失明原因であり、眼圧降下以外の手法による神経保護療法の開発が期待されている。そこで本研究では複数の緑内障モデル動物を用いて遺伝子治療や薬剤による細胞保護および視神経軸索再生療法の可能性を検討する。組織学的な解析に加えて、非侵襲的な光干渉断層計や電気生理学的手法を用いることにより、構造と機能の両面からその治療効果を明らかにする。

2. 研究の目的

(1) 新薬の開発には多大な費用と期間が必要なことから、ドラッグリポジショニング (drug repositioning) に注目が集まっている。そこで本研究では既存薬も含めた神経保護薬の探索を行った。

(2) 神経栄養因子の徐放カプセルの眼内留置が緑内障治療に有効であることが示されつつある。そこで神経栄養因子 Neuritin と脳神経栄養因子 (BDNF) の受容体である TrkB の欠損マウスを解析し、神経保護に与える影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 我々はグルタミン酸輸送体 (EAAC1 または GLAST) の欠損マウスでは眼圧が正常であるにも関わらず、酸化ストレスの亢進などにより、正常眼圧緑内障様の網膜・視神経変性を発症することを報告した (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、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、去痰剤などとして処方されている *N*-acetylcysteine (NAC) を投与して、神経保護効果を検討した。Rho/ROCK 阻害剤は 0.4% および 2% Ripasudil を毎日 1 回点眼投与した。カロリー制限の検討については、EAAC1 欠損マウスにおいて、1 日ごとの絶食を行った。

(2) 神経栄養因子に関する研究には、Neuritin 欠損マウス (引用文献②) および網膜神経節細胞をはじめとする神経細胞から TrkB を欠損させたマウス (引用文献③) を使用した。

4. 研究成果

(1) NAC は cysteine の前駆体として働き glutathione の合成を促進する。酸化ストレスを抑制することは緑内障の有効な治療戦略であり得ることから、今回我々は 2 種類の正常眼圧緑内障モデルマウス (EAAC1 または GLAST 欠損マウス) に対する NAC の神経保護効果を検討した。

EAAC1 欠損マウスの網膜神経節細胞層 (ganglion cell layer; GCL) で観察される glutathione の発現低下と酸化ストレスマーカーおよび autophagy マーカーの発現上昇は NAC 投与により改善された (図 1)。また NAC を投与した EAAC1 欠損マウスでは網膜変性の抑制と視機能の維持が確認されたが、GLAST 欠損マウスでは NAC 投与による改善は見られなかった。

以上の結果から EAAC1 欠損マウスの網膜変性には cysteine の補充が有効であるが、GLAST 欠損マウスではグルタミン酸毒性の影響が

より強いなど、両者の病態が異なる可能性が示唆された。NAC は前者に該当する背景を持つ緑内障の治療において有用な可能性があると思われる (雑誌論文 2)。

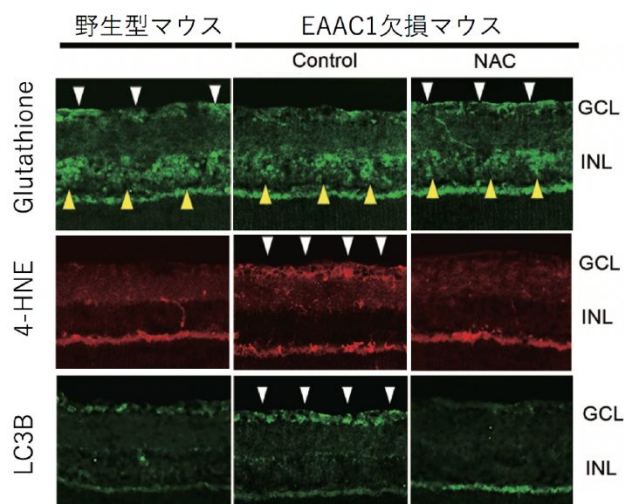


図 1 EAAC1 欠損マウスに対する NAC 投与による各種マーカーの発現変化。

上段: Glutathione, 中段: 4-HNE (酸化ストレスマーカー), 下段: LC3B (autophagy のマーカー) の網膜免疫組織染色像。

GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer.

(2) Ripasudil は Rho/ROCK 阻害剤として初の緑内障点眼薬として使用されているが、眼圧降下以外の作用機序は必ずしも明確ではない。そこで本研究では EAAC1 欠損マウスに対して 0.4% および 2% Ripasudil を、生後 5 週から 12 週にかけて毎日 1 回点眼投与して、その効果を検討した。その結果、Ripasudil 点眼により緑内障様症状の進行が抑制されたが、両濃度における差は見られなかった。またこの効果は後極部でも周辺部でも確認された。0.4% 点眼により眼圧は 13.2 ± 0.6 mmHg から 10.2 ± 0.5 mmHg へと有意に低下した。

一方、EAAC1 欠損マウスでは網膜変性が始まる前の生後 5 週から、神経細胞死を誘導する p38 MAPK が網膜神経節細胞層で活性化されるが、Ripasudil 点眼群では生後 8 週において、その活性化が有意に抑制されていた。以上から Ripasudil 点眼の作用機序としては眼圧降下に加えて、神経保護効果も含まれることが予想される（雑誌論文 4）。

(3) 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 の神経保護効果を検討した。

同じく EAAC1 欠損マウスに毎日腹腔内投与を行ったところ、網膜神経節細胞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（図 2）。

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（雑誌論文 7）。

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の発現量が低下し、受傷 1 週間後でも網膜神経節細胞死の進行が抑制されていた。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の不活化が推定された（雑誌論文 5）。

以上の結果から、edaravone は網膜神経節細胞に対する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) 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網膜神経節細胞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網膜神経節細胞死が抑制され、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（雑誌論文 13）。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。

(5) 野生型マウスに視神経損傷を起こすと、神経栄養因子の 1 つである Neurtin の mRNA が有意に増加する。そこで Neurtin 欠損マウスを用いて、同様の視神経損傷モデルを作成したところ、受傷後 7 日目での網膜神経節細胞死が有意に増加していた。Neurtin 欠損マウスでは視神経損傷後に網膜における ERK および Akt の発現上昇が起きなかったことから、神経保護効果が得られなかったと考えられた（雑誌論文 3）。逆に Neurtin の遺伝子過剰発現などが網膜神経保護に有用な可能性が示唆された。

(6) 研究代表者は TrkB 受容体が網膜神経節細胞をはじめとする神経細胞から欠損する TrkB の領域特異的欠損マウスを作成し、グルタミン酸毒性に対する耐性が低下することを報告した（引用文献③）。このマウスを長期間に渡って観察したところ、生後 6 ヶ月以降で網膜神経節細胞死が進行し、次第に視機能も悪化することがわかった。しかし眼圧は常に正常範囲であることから、新たな正常眼圧緑内障モデルとして活用できる可能性がある。

また以上のような疾患モデルを用いた研究手法と既存薬検討に関する最近の研究成果を総説として報告した（雑誌論文 1）。

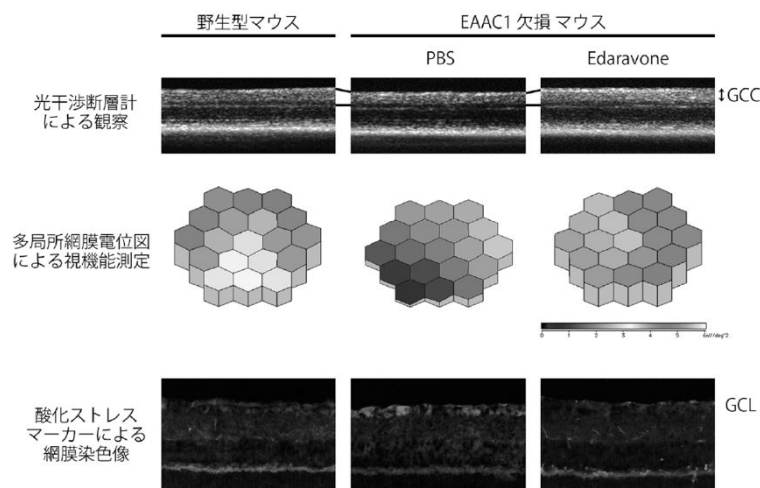


図 2 Edaravone による正常眼圧緑内障様症状の軽化。
 上段：光干渉断層計による網膜の観察。
 中段：多局所網膜電位図の 3D イメージ。
 下段：酸化ストレスマーカーの 4-HNE による網膜免疫組織染色像。

Edaravone 投与群では網膜形態と視機能の改善、酸化ストレスの低下が認められた。

PBS: Phosphate buffered saline, GCC: ganglion cell complex, GCL: ganglion cell layer.

<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.
 Shimada et al. Neurtin mediates activity-dependent axonal branch formation in part

via FGF signaling. *Journal of Neuroscience* 36, 4534-4548, 2016.

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

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

1. [Harada, C.](#), Kimura, A., Guo, X., Namekata, K. and Harada, T. (2019). Recent advances in genetically modified animal models of glaucoma and their roles in drug repositioning. *Br J Ophthalmol* 103(2), 161–166. doi: 10.1136/bjophthalmol-2018-312724. 査読有
2. Sano, H., Namekata, K., Kimura, A., Shitara, H., Guo, X., [Harada, C.](#), Mitamura, Y. and Harada, T. (2019) Differential effects of *N*-acetylcysteine on retinal degeneration in two mouse models of normal tension glaucoma. *Cell Death and Disease* 10(2), 75. doi: 10.1038/s41419-019-1365-z. 査読有
3. Azuchi, Y., Namekata, K., Shimada, T., Guo, X., Kimura, A., [Harada, C.](#), Nishigaki, A., Yamagata, K. and Harada, T. (2018) Role of neuritin in retinal ganglion cell death in adult mice following optic nerve injury. *Scientific Reports* 8(1), 10132. doi: 10.1038/s41598-018-28425-7. 査読有
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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

[学会発表](計 17 件)

1. Takayuki Harada, Takahiko Noro, Kazuhiko Namekata, Atsuko Kimura, Nanako Hashimoto, Keiko Moriya-Ito, Xiaoli Guo, [Chikako Harada](#), Tadashi Nakano, Takashi Inoue, Erika Sasaki. Spontaneous normal tension glaucoma in aged marmosets. *World Glaucoma Congress*, 2019
2. Yuriko Azuchi, Kazuhiko Namekata, Tadayuki Shimada, Xiaoli Guo, Atsuko Kimura, [Chikako Harada](#), Atsuko Nishigaki, Kanato Yamagata, Takayuki Harada. Loss of neuritin accelerates RGC loss and retinal degeneration in adult mice following optic

- nerve injury. Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2018
3. Atsuko Kimura, Kazuhiko Namekata, Xiaoli Guo, Yuriko Azuchi, Chikako Harada, Takayuki Harada. Can valproic acid treat neurodegenerative diseases? International Conference on Neurovascular and Neurodegenerative Diseases, 2018
 4. Kazuhiko Namekata, Xiaoli Guo, Atsuko Kimura, Nobutaka Arai, Chikako Harada, Takayuki Harada. DOCK8 regulates microglial activity in neuroinflammation. International Congress of Neuropathology, 2018
 5. Atsuko Kimura, Kazuhiko Namekata, Xiaoli Guo, Yuriko Azuchi, Chikako Harada, Takayuki Harada. Manipulation of retinal glutamate levels by overexpression of GLAST reduces retinal ganglion cell death in an experimental model of glaucoma. International Congress of Neuropathology, 2018
 6. Takayuki Harada, Kei Akaiwa, Kazuhiko Namekata, Yuriko Azuchi, Xiaoli Guo, Atsuko Kimura, Chikako Harada, Yoshinori Mitamura. Topical ripasudil prevents retinal ganglion cell death in a mouse model of normal tension glaucoma. European Glaucoma Society Congress, 2018
 7. Xiaoli Guo, Kazuhiko Namekata, Yuriko Azuchi, Atsuko Kimura, Takahiko Noro, Chikako Harada, Takayuki Harada. Dock10 deficiency reduces neuroinflammation in optic neuritis. ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting, 2018
 8. 赤岩慶、行方和彦、安土ゆり子、郭 暁麗、木村敦子、原田知加子、三田村佳典、原田高幸、正常眼圧緑内障モデルマウスを用いた Edaravone による網膜神経節細胞保護効果の検討、日本眼科学会総会、2018
 9. 郭 暁麗、木村 敦子、安土 ゆり子、秋山 悟一、野呂 隆彦、原田知加子、行方 和彦、原田 高幸、カロリー制限による正常眼圧緑内障モデルにおける網膜神経節細胞及び視機能の保護、日本眼科学会総会、2017
 10. 行方和彦、郭 暁麗、木村敦子、原田知加子、新井信隆、原田高幸、神経炎症における Dock8 の機能解析、日本神経病理学会総会、2017
 11. 郭 暁麗、行方和彦、木村敦子、原田知加子、新井信隆、原田高幸、細胞種特異的な ASK1 遺伝子の欠損が神経炎症に与える影響の検討、日本神経病理学会総会、2017
 12. Yuriko Azuchi, Atsuko Kimura, Chikako Harada, Kazuhiko Namekata, Takayuki Harada. Role of glial and neuronal TrkB signaling in protection of retinal ganglion cells following optic nerve injury. Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2017
 13. 仙波賢太郎、行方和彦、郭 暁麗、原田知加子、原田高幸、レニン-アンジオテンシン系は正常眼圧緑内障モデルマウスにおける神経変性を制御する、日本眼科学会総会、2016
 14. Yuriko Azuchi, Atsuko Kimura, Xiaoli Guo, Takahiko Noro, Goichi Akiyama, Magdalena Drożdż, Chikako Harada, Atsuko Saito, Kazuhiko Namekata, Takayuki Harada. ASK1 deficiency and valproic acid synergistically reduce demyelination and visual impairment in experimental autoimmune encephalomyelitis. Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2016
 15. Takayuki Harada, Kazuhiko Namekata, Atsuko Kimura, Takahiko Noro, Chikako Harada. Neuroprotection and optic nerve regeneration for glaucoma therapy: contribution of oxidative stress in animal models of normal tension glaucoma. Major identified players in glaucoma – genes and signaling pathways. International Congress of Eye Research, 2016
 16. Kazuhiko Namekata, Xiaoli Guo, Atsuko Kimura, Chikako Harada, Takayuki Harada. Dock8 deficiency suppresses microglial migration and neuroinflammation. Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2016
 17. Xiaoli Guo, Kazuhiko Namekata, Atsuko Kimura, Takahiko Noro, Goichi Akiyama, Yuriko Azuchi, Chikako Harada, Takayuki Harada. Dietary restriction promotes cell survival in a mouse model of normal tension glaucoma. Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2016

〔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

<http://www.igakuken.or.jp/project/to-tomin/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

<http://www.igakuken.or.jp/retina/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：原田 高幸

ローマ字氏名：(HARADA, takayuki)

研究協力者氏名：行方 和彦

ローマ字氏名：(NAMEKATA, kazuhiko)

研究協力者氏名：郭 暁麗

ローマ字氏名：(KAKU, gyorei)

研究協力者氏名：木村 敦子

ローマ字氏名：(KIMURA, atsuko)