

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07123

研究課題名(和文) 神経変性およびグルタミン酸毒性に対する神経保護・再生治療研究

研究課題名(英文) Development of neuroprotective strategies for treatment of neurodegenerative diseases

研究代表者

木村 敦子 (KIMURA, Atsuko)

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・主任研究員

研究者番号：60569143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではグルタミン酸輸送体の一つであるGLASTの過剰発現が網膜神経節細胞(RGC)保護に有効か、実験的緑内障モデルである視神経挫滅モデルにおいて検討した。GLAST過剰発現(GLAST Tg)マウスでは野生型マウスと比べて、RGCの生存率が高いことが明らかになった。この結果からGLASTの過剰発現が緑内障の治療法となる可能性を見出した。さらに、2種類の正常眼圧緑内障モデルマウスにおいて、RGCとipRGCの生存率が他のRGCサブタイプと比べて非常に高いことがわかった。今後はRGCとipRGCの高い障害耐性の理由を明らかにして、新規RGC保護療法の開発に努める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会に突入した我が国では、緑内障の患者数が加齢と共に増大し続けることが予想されている。緑内障の治療法としては眼圧降下法が主流であるが、特に日本人に最も多い「正常眼圧緑内障」に対しては眼圧を下げる治療だけでは限界がある。そこで、神経保護に着目した今回の研究とその発見は緑内障の新たな治療法開発に大きく寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Glaucoma is a neurodegenerative disease of the eye and causes irreversible blindness, which is associated with retinal ganglion cell (RGC) death. Studies indicate multiple factors are involved in the pathogenesis of glaucoma. In this study, we explored potential therapeutic strategies for glaucoma.

We generated a novel mouse line overexpressing a glutamate transporter, GLAST (GLAST Tg). RGC death was reduced in GLAST Tg mice compared with WT mice in the optic nerve injury model, an animal model of glaucoma, suggesting that overexpression of GLAST may be effective for treatment of glaucoma. On the other hand, when we examined RGCs and ipRGCs, subtypes of RGCs, in two glaucoma mouse models, the survival rate of these cell types was very high compared with other RGC cell types. These data suggested understanding characteristics of these cell types might help developing new neuroprotective strategies for glaucoma.

研究分野：神経科学

キーワード：神経変性疾患 緑内障 グルタミン酸毒性 グルタミン酸トランスポーター 網膜神経節細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-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中途失明原因であり、その病因は眼圧上昇などにより生じる視神経変性および網膜神経節細胞 (RGC) 死である。驚いたことに、特に日本においては眼圧上昇が見られない「正常眼圧緑内障」が緑内障患者の約7割を示す特徴がある。そこで、眼圧以外の要因の解明とそれらをターゲットとした治療法が求められている。我々は緑内障の発症要因の一つとして考えられている興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸による RGC に注目しており、これまでの研究から網膜の主要なグルタミン酸輸送体である GLAST または EAAC1 の欠損 (KO) マウスでは、グルタミン酸毒性による神経細胞死が増強され、正常眼圧緑内障 (NTG) と類似した症状を示すことがわかっている (引用文献①)。これはグルタミン酸輸送体の欠損により、網膜内のグルタミン酸濃度が上昇し眼圧非依存的に RGC 死を引き起こすことを示している。研究代表者らはこれらの NTG モデルマウスを用いて、新規治療薬及び治療法の開発を進めており、例えばてんかんの治療薬であるバルプロ酸を GLAST KO マウスの腹腔内に2週間毎日投与すると、バルプロ酸投与群では網膜変性が抑制され、視機能も保たれることがわかった (引用文献②③)。

一方、網膜で得られた視覚情報は、約40種類のサブタイプが存在する RGC の軸索を介して脳に送られる。その中でも最大の体格を有する $\alpha$ RGC やメラノプシン含有の光受容能を保持する内因性光感受性網膜神経節細胞 (ipRGC) は障害・病態時に高い生存率を示すが、正常眼圧緑内障モデルマウスにおける検討はされていない。もしこれらの RGC サブタイプが緑内障において高い耐性を示すのであれば、それらの解析により緑内障で起こる RGC 死についての特徴について理解を深めることができる。

### 2. 研究の目的

(1) GLAST の過剰発現が緑内障の新規治療となる可能性について、実験的 normal 眼圧緑内障モデルである視神経挫滅モデルを用いて検討した。

(2) グルタミン酸毒性を伴った2種類の正常眼圧緑内障モデルマウスにおいて、 $\alpha$ RGC と ipRGC の耐性を検討した。

### 3. 研究の方法

(1) グルタミン酸輸送体を過剰発現させれば網膜内のグルタミン酸濃度の制御がより効率的に得られ神経保護につながると考えられることから、GLAST 過剰発現マウス (GLAST Tg マウス) を独自で作製した。始めに野生型 (WT) マウスおよび GLAST Tg マウスにグルタミン酸を眼球投与して、GLAST の過剰発現がグルタミン酸毒性に対して神経保護効果を発揮できるか、残存 RGC 数の計測をフラットマウント網膜において RGC マーカーである RBPMs 抗体による蛍光免疫染色で行い検討した。さらに、実験的 normal 眼圧緑内障モデルである視神経挫滅を WT マウスおよび GLAST Tg マウスに施し、光干渉断層計 (OCT) による網膜の経時的観察を行い、残存 RGC 数の前述と同様に行った。

(2) グルタミン酸受容体の一つである N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体のリガンドである NMDA を眼球投与して RGC を誘導するモデルおよび GLAST KO マウスにおける $\alpha$ RGC と ipRGC の生存率を、網膜の鼻側、耳側、下方、上方の4領域に区分し、そのなかでさらに中心部、中間部、辺縁部に分類してそれぞれを解析し領域特異的な差が見られるか検討した。

### 4. 研究成果

(1) GLAST Tg マウスの網膜形態、RGC 数や RGC 機能を調べたところ、WT マウスとほぼ変わらず発達異常がないことを確認した。

グルタミン酸をマウスの眼球に投与すると、濃度依存的に RGC 死が起こるが、GLAST Tg マウスにおいては WT マウスに比べて RGC 死が抑制されていることを確認した。

マウスに視神経挫滅処置を施すと RGC 死が起こるが、GLAST Tg マウスにおいては視神経挫滅後の RGC 死が顕著に抑制されていることがわかった。これらの結果から、GLAST の過剰発現が RGC 死を抑制し、緑内障の新規治療法となる可能性が示唆された。

(2) NMDA 誘発神経毒性および正常眼圧緑内障モデルマウスにおいては全体の RGC 数の約半数が減少するが、 $\alpha$ RGC と ipRGC は 90%以上の高い生存率を示した。さらに生存  $\alpha$ RGC と ipRGC の分布を調べたところ網膜のどの部位においてもこの特徴が見られた (図 1、2、引用文献④)。これらの結果から  $\alpha$ RGC と ipRGC は緑内障様変性への耐性が高いことが予想される。今後はこの 2つの細胞種が所有する細胞死を阻止するメカニズムを解明することで、緑内障の新たな治療研究に貢献する可能性がある。

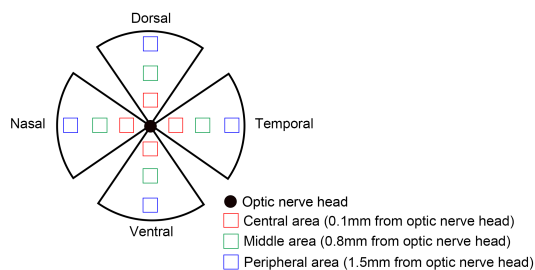


図 1. 本研究で RGC カウントを行った網膜の部位。

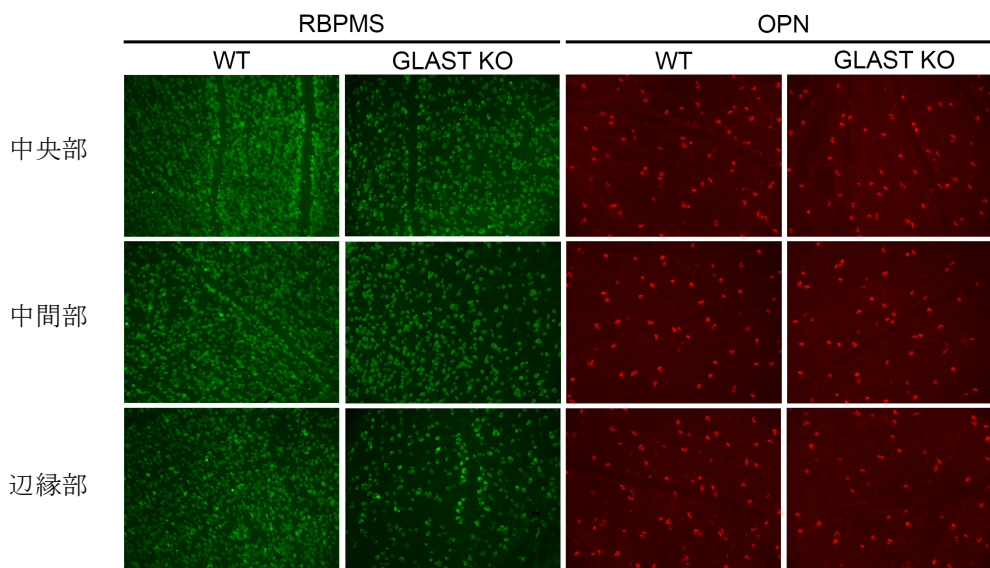


図 2. GLAST KO マウスにおける全体 RGC (RBPMS 抗体) および  $\alpha$ RGC (osteopontin, OPN, 抗体) を検出した。GLAST KO マウスでは全体 RGC の数が減少しているが、 $\alpha$ RGC 数は変わらない。スケールバー, 200  $\mu$ m。

<引用文献>

- ① Harada, T., Harada, C., Nakamura, K., Quah, H.M., Okumura, A., Namekata, K., Saeki, T., Aihara, M., Yoshida, H., Mitani, A. and Tanaka, K. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *Journal of Clinical Investigation* 117:1763-1770, 2007.
- ② Kimura, A., Namekata, K., Guo, X., Noro, T., Harada, C. and Harada, T. Valproic acid prevents NMDA-induced retinal ganglion cell death via stimulation of neuronal TrkB receptor signaling. *American Journal of Pathology* 185:756-764, 2015.
- ③ Kimura, A., Guo, X., Noro, T., Harada, C., Tanaka, K., Namekata, K. and Harada, T. Valproic acid prevents retinal degeneration in a murine model of normal tension glaucoma. *Neuroscience Letters* 588:108-113, 2015.
- ④ Honda, S., Namekata, K., Kimura, A., Guo, X., Harada, C., Murakami, A., Matsuda, A. and Harada, T. Survival of alpha and intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in NMDA-induced neurotoxicity and a mouse model of normal tension glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 60:3696-3707, 2019.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kimura Atsuko, Noro Takahiko, Harada Takayuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Role of animal models in glaucoma research	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neural Regeneration Research	6. 最初と最後の頁 1257 ~ 1258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/1673-5374.272578	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Noro Takahiko, Namekata Kazuhiko, Kimura Atsuko, Azuchi Yuriko, Hashimoto Nanako, Moriya-Ito Keiko, Komaki Yuji, Lee Chia-Ying, Okahara Norio, Guo Xiaoli, Harada Chikako, Kim Euido, Nakano Tadashi, Tsuneoka Hiroshi, Inoue Takashi, Sasaki Erika, Tokuno Hironobu, Harada Takayuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Normal tension glaucoma-like degeneration of the visual system in aged marmosets	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51281-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Honda Sari, Namekata Kazuhiko, Kimura Atsuko, Guo Xiaoli, Harada Chikako, Murakami Akira, Matsuda Akira, Harada Takayuki	4. 巻 60
2. 論文標題 Survival of Alpha and Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells in NMDA-Induced Neurotoxicity and a Mouse Model of Normal Tension Glaucoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 3696 ~ 3707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.19-27145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Harada Chikako, Kimura Atsuko, Guo Xiaoli, Namekata Kazuhiko, Harada Takayuki	4. 巻 103
2. 論文標題 Recent advances in genetically modified animal models of glaucoma and their roles in drug repositioning	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 British Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 161 ~ 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bjophthalmol-2018-312724	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sano Hiroki, Namekata Kazuhiko, Kimura Atsuko, Shitara Hiroshi, Guo Xiaoli, Harada Chikako, Mitamura Yoshinori, Harada Takayuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Differential effects of N-acetylcysteine on retinal degeneration in two mouse models of normal tension glaucoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-019-1365-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Atsuko, Namekata Kazuhiko, Guo Xiaoli, Noro Takahiko, Harada Chikako, Harada Takayuki	4. 巻 2017
2. 論文標題 Targeting Oxidative Stress for Treatment of Glaucoma and Optic Neuritis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oxidative Medicine and Cellular Longevity	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2017/2817252	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 本田沙里、行方和彦、木村敦子、郭 曉麗、松田彰、村上晶、原田高幸
2. 発表標題 緑内障モデルマウスにおけるaRGCおよびipRGCの障害耐性
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsuko Kimura, Kazuhiko Namekata, Xiaoli Guo, Yuriko Azuchi, Chikako Harada, Takayuki Harada
2. 発表標題 Manipulation of retinal glutamate levels by overexpression of GLAST reduces retinal ganglion cell death in an experimental model of glaucoma
3. 学会等名 19th International Congress of Neuropathology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsuko Kimura, Kazuhiko Namekata, Xiaoli Guo, Yuriko Azuchi, Chikako Harada, Takayuki Harada
2. 発表標題 Can valproic acid treat neurodegenerative diseases?
3. 学会等名 International Conference on Neurovascular and Neurodegenerative Diseases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	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、プロジェクトリーダー  (82609)	
研究協力者	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  (82609)	
研究協力者	郭 曉麗  (GUO Xiaoli)	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・主任研究員  (82609)	