

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09441

研究課題名(和文) 房水産生のメカニズムにおけるアクアポリンの役割 緑内障治療剤の開発を目指して

研究課題名(英文) Role of aquaporin-4 in the aqueous humor dynamics

研究代表者

植木 智志 (Ueki, Satoshi)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：90595117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は硝子体を経由し網膜に至る房水の経路におけるアクアポリン4(AQP4)の役割を明らかにした。AQP4ノックアウトマウスおよびコントロールマウスに大腿静脈から注入したH<sub>2</sub>(17)Oによる信号変化を観察する手法であるJJ vicinal coupling proton exchange MRIを行った。硝子体の信号変化はコントロール群に比べてAQP4ノックアウトマウス群で統計学的有意に大きく、マウスの大腿静脈に注入されたH<sub>2</sub>(17)Oは房水となり硝子体に流入し、AQP4ノックアウトマウスでは網膜のミュラー細胞のAQP4を介した硝子体から網膜内への水の流入が停滞している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、網膜内にも脳内のglymphatic flowと呼ばれるシステムが存在する可能性を示した。脳内のglymphatic flowは老化に伴い有病率が増加するアルツハイマー病の病態に深く関わっているため、本研究の結果は老化に伴い有病率が増加する眼科疾患である緑内障や加齢黄斑変性の病態に網膜内のglymphatic flowが関わっている可能性をも示す。本研究は緑内障や加齢黄斑変性の病態の理解さらには治療への新たな扉を開く。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the role of aquaporin-4 in post-iridial flow, the pathway of aqueous humor through the vitreous to the retina. We performed JJ vicinal coupling proton exchange magnetic resonance imaging (JJVCPE MRI), a technique to observe the signal changes induced by H<sub>2</sub>(17)O injected through the femoral vein in aquaporin-4 knockout and control mice. The signal changes in the vitreous body were significantly greater in the aquaporin-4 knockout mice group than in the control mice group. This result suggests that H<sub>2</sub>(17)O injected into the femoral vein of mice becomes as a part of aqueous humor and flows into the vitreous body, and that the inflow of water from the vitreous into the retina via aquaporin-4 in Muller cells of the retina probably be diminished in aquaporin-4 knockout mice. The inflow of water into the retina via aquaporin-4 suggested in this study indicates that the system called glymphatic flow in the brain may also exist in the retina.

研究分野：眼生理学

キーワード：アクアポリン4 post-iridial flow glymphatic flow

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アクアポリンは生体のさまざまな組織の細胞膜に存在する膜タンパクで、細胞内外および組織内外の水の移動に重要な役割を持っており、眼球にも多くのアクアポリンが発現することが知られている。眼球に発現している多くのアクアポリンのなかで、毛様体上皮層に存在するアクアポリンはアクアポリン 1 およびアクアポリン 4 であることが分かっている(Yamaguchi Y, et al., 2006)。毛様体上皮層の主な機能が房水の産生であることを考えると、アクアポリン 1 およびアクアポリン 4 が房水産生に重要な役割を持ち、房水の流排出による眼圧の制御にも深く関わっていることは容易に推察できるが、それらの実際の役割については全くと言いつても分かっていない。網膜神経節細胞死による視機能障害を呈する緑内障は患者数が非常に多く、また中年期以降に発症することが多いことから社会的・経済的にも影響力の高い疾患であるが、その唯一の治療は現在でも眼圧下降であり、より効果的な眼圧下降治療を探るには眼圧の制御と関わる房水産生のメカニズムの解明が不可欠である。これまでに分かっている房水産生のメカニズムの主演は、 $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase、および、炭酸脱水酵素の 2 者であるが、もうひとつの主演としてアクアポリンの存在が注目される。アクアポリン 1 およびアクアポリン 4 ノックアウトマウスでは眼圧が下降することが報告されている(Zhang, et al., 2002)。以上から、本研究の開始当初は、アクアポリンの房水産生における役割を解明することで、アクアポリンを新たな緑内障の治療のターゲットとして臨床につなげていくことが期待された。

### 2. 研究の目的

本研究の開始当初の目的は、統合脳機能研究センターで開発されたアクアポリン 1 およびアクアポリン 4 の阻害剤で生体に安全であることが分かっている TGN-020 (Huber J, et al., 2009) を用い、緑内障の病態理解に重要な房水産生のメカニズムをアクアポリンの役割の観点から生理学的に解明し、さらに TGN-020 の緑内障治療剤としての可能性を明らかにすることであり、最初の 2 年間でアクアポリンの房水産生のメカニズムを眼圧下降効果の解析を通じて明らかにする予定とした。しかし、初年度に行った実験の結果からイソフルレン吸入麻酔による眼圧下降効果により薬剤の眼圧下降効果がマスクされている可能性が浮上し、次年度からは、既報を参考に(Ding C, et al., 2012)、ハンドリングを十分に行った上での局所点眼麻酔のみでのマウスの眼圧測定を行うことにより、本研究の開始当初の目的を達成することとした。さらに、アクアポリン 4 が毛様体上皮層のみならず網膜のミュラー細胞にも分布していることに着目し、post-iridial flow と呼ばれる硝子体を経由し網膜に至る房水の経路(Araie M, et al., 1991a, Araie M, et al., 1991b, Tsuboi S, 1987)にアクアポリン 4 が関与している可能性を考え、統合脳機能研究センターで開発された脳内の水動態を生体で評価できる JJvicinal coupling proton exchange magnetic resonance imaging (JJVCPE MRI) (Igarashi H, et al., 2014)を後眼部に応用しアクアポリン 4 ノックアウトマウスとコントロールマウスを比較することで、後眼部の水動態におけるアクアポリン 4 の役割を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) DBA2J マウスの局所点眼麻酔のみでの眼圧測定による TGN-020 の眼圧下降効果の評価

予備実験後に、下記の方法で行った。

ハンドリング(検者の手掌内で DBA2J マウスを自由に過ごさせる)を 5 分間×2 回行い、生理食塩水 10  $\mu\text{l}$  を右眼に点眼する。以上を 5 日間行う。

ハンドリングを 5 分間×2 回行い、局所点眼麻酔である 0.4%oxybuprocaine10  $\mu\text{l}$  を右眼に点眼する。以上を 5 日間行う。

ハンドリングを 5 分間×2 回行い、局所点眼麻酔である 0.4%oxybuprocaine10  $\mu\text{l}$  を右眼に点眼し、iCare TONOLAB で右眼の眼圧を測定する。以上を 10 日間行う。

ハンドリングを 5 分間×2 回行い、局所点眼麻酔である 0.4%oxybuprocaine10  $\mu\text{l}$  を右眼に点眼し、iCare TONOLAB で右眼の眼圧を測定する。その後、生理食塩水 10  $\mu\text{l}$  を右眼に点眼し、点眼後 30 分、60 分、90 分、120 分の時点で 0.4%oxybuprocaine10  $\mu\text{l}$  を右眼に点眼し、iCare TONOLAB で右眼の眼圧を測定する。

⑤④と異なる日に、ハンドリングを 5 分間×2 回行い、局所点眼麻酔である 0.4%oxybuprocaine10  $\mu\text{l}$  を右眼に点眼し、iCare TONOLAB で右眼の眼圧を測定する。その後、1%brinzolamide もしくは TGN-020(1 mM)10  $\mu\text{l}$  を右眼に点眼し、点眼後 30 分、60 分、90 分、120 分の時点で 0.4%oxybuprocaine10  $\mu\text{l}$  を右眼に点眼し、iCare TONOLAB で右眼の眼圧を測定する。

合計 20 匹の DBA2J マウスに上記実験を行った(brinzolamide 群は 9 匹、TGN-020 群は 11 匹)。DBA2J マウスの平均月齢は、6.1 月。iCare TONOLAB による眼圧測定においては、6 回測定後にモニターに表示される測定値のうちパーが表示されない信頼性の高い測定値を 3 回取得し、それらの平均値を統計解析のための眼圧値とした。上記実験は全て AM9:00-12:00 の間に行った。統計解析は各群において 2way RM ANOVA followed by Tukey's multiple comparison

test を行い、 $P < 0.05$  を統計学的有意とした。

## 2) アクアポリン 4 ノックアウトマウスの JJVCPE MRI による後眼部の水動態の評価

予備実験後に、下記の方法で研究を行った。予備実験では C57B6 マウスの JJVCPE MRI を行い、JJVCPE MRI により硝子体の水動態を評価し得ることを見出した(図 1)。

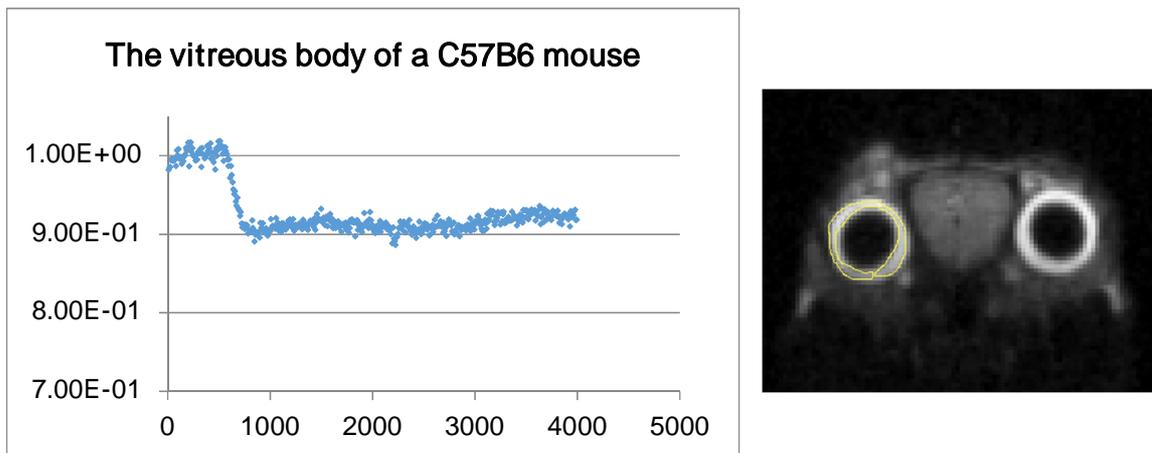


図 1 C57B6 マウスの JJVCPE MRI の結果。左のグラフの縦軸は T2 強調画像の信号(最初の 10 分間の画像の信号の平均値を基に正規化したもの)。左のグラフの横軸は秒。右の T2 強調画像の黄色の線で囲まれている部分は硝子体に設定した region of interest。T2 強調画像撮像開始から 10 分後に 40% $H_2^{17}O$  を含む生理食塩水 0.2 ml をマウスの大腿静脈に留置したカテーテルから注入した。注入後に信号の低下がみられている。

アクアポリン 4 ノックアウトマウスもしくはコントロールマウスにイソフルレン吸入麻酔の上、大腿静脈にカテーテル挿入および左眼瞼結膜と左眼球結膜の縫合・左上下眼瞼の縫合を行う。眼瞼結膜と眼球結膜の縫合は眼球運動の抑制を意図して行い 8-0silk 系を用いる。上下眼瞼の縫合は角膜の保護を意図して行い同じく 8-0silk を用いる。

ウレタンおよびメデトミジン腹腔内注射による麻酔を行い、MRI 測定を行う。MRI は adiabatic double spin-echo シーケンスによる T2 強調画像を 8 秒ごとに 500 枚撮像する。T2 強調画像は 1 mm 厚で、硝子体を含む後眼部に設定する(slab)。測定中に 40% $H_2^{17}O$  を含む生理食塩水 0.2 ml をカテーテルから 30 秒~1 分かけて投与する。測定中は  $O_2$  30%、 $N_2O$  70%を鼻マスクにて自発呼吸下に投与し、自作温度維持装置にて直腸音をモニターしつつ  $37.5 \pm 0.5$  に保つ。

撮像後に画像解析ソフトを用いて硝子体に設定した region of interest の信号変化をプロットする。信号値は最初の 10 分間の画像の信号の平均値を基に正規化したものを用いる。プロットされた経時的信号変化から房水の後眼部動態の大きさを算出する。

7 匹のアクアポリン 4 ノックアウトマウス、5 匹のコントロールマウスに上記実験を行った。マウスの週齢は 11-18 週。統計解析は two-tailed Mann-Whitney U test を用い、 $P < 0.05$  を統計学的有意とした。

本研究は新潟大学動物実験倫理委員会による審査を経て新潟大学学長の承認を得て行われた。

## 4. 研究成果

### 1) DBA2J マウスの局所点眼麻酔のみでの眼圧測定による TGN-020 の眼圧下降効果の評価

Brinzolamide 点眼 DBA2J マウス群の眼圧値(mmHg)は、点眼直前  $17.6 \pm 1.7$ 、点眼 30 分後  $15.2 \pm 1.6$ 、点眼 60 分後  $13.5 \pm 1.2$ 、点眼 90 分後  $13.2 \pm 1.0$ 、点眼 120 分後  $13.3 \pm 0.8$ (mean  $\pm$  SE)だった(図 2)。統計学的解析の結果、点眼直前と、点眼 30 分後・点眼 60 分後・点眼 90 分後・点眼 120 分後の全ての間に  $P < 0.05$  で統計学的有意差がみられた。

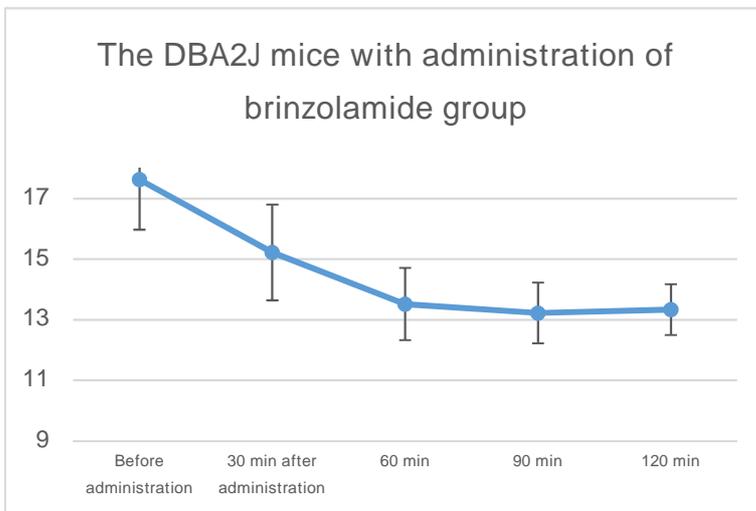


図2 Brinzolamide点眼DBA2Jマウス群の眼圧値。縦軸は眼圧値。眼圧値はmean ± SEで示している。

TGN-020点眼DBA2Jマウス群の眼圧値(mmHg)は、点眼直前15.0 ± 1.3、点眼30分後14.8 ± 1.2、点眼60分後14.0 ± 1.2、点眼90分後13.0 ± 1.1、点眼120分後13.0 ± 0.8(mean ± SE)だった(図3)。統計学的解析の結果、点眼直前と、点眼30分後・点眼60分後・点眼90分後・点眼120分後の全ての間には統計学的有意差はみられなかった。

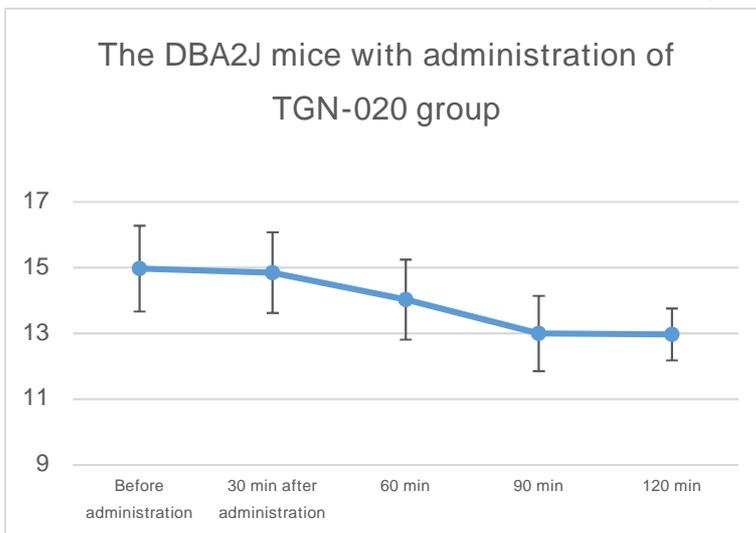


図3 TGN-020点眼DBA2Jマウス群の眼圧値。縦軸は眼圧値(mmHg)。眼圧値はmean ± SEで示している。

実際の臨床に使用されている炭酸脱水素酵素阻害剤である1%brinzolamide点眼では眼圧下降効果が統計学的有意にみられたが、TGN-020(1 mM)点眼ではみられなかった。

## 2) アクアポリン4ノックアウトマウスのJVCPE MRIによる後眼部の水動態の評価

アクアポリン4ノックアウトマウスとコントロールマウスの全てでMRI撮像開始10分後のH<sub>2</sub><sup>17</sup>O注入後に信号の低下がみられ、20分以内にプラトーに達した。

アクアポリン4ノックアウトマウス群の信号低下は84.5 ± 2.7%で、コントロールマウス群の信号低下は88.8 ± 1.9%(mean ± SE)だった。統計学的解析の結果、2群間にP < 0.05で統計学的有意差がみられた。

本研究の結果から、マウスの大腿静脈に注入されたH<sub>2</sub><sup>17</sup>Oは房水となり硝子体に流入し、ア

クアポリン 4 ノックアウトマウスでは網膜のミュラー細胞のアクアポリン 4 を介した硝子体から網膜内への水の流入が停滞している可能性が示唆された(図 4)。本研究で示唆されたアクアポリン 4 を介した網膜内への水の流入は脳内にある glymphatic flow と呼ばれるシステムが網膜内にも存在する可能性を示す。

脳内の glymphatic flow は老化に伴い有病率が増加するアルツハイマー病の病態に深く関わっているため、本研究の結果は老化に伴い有病率が増加する眼科疾患である緑内障や加齢黄斑変性の病態に網膜内の glymphatic flow が関わっている可能性をも示す。

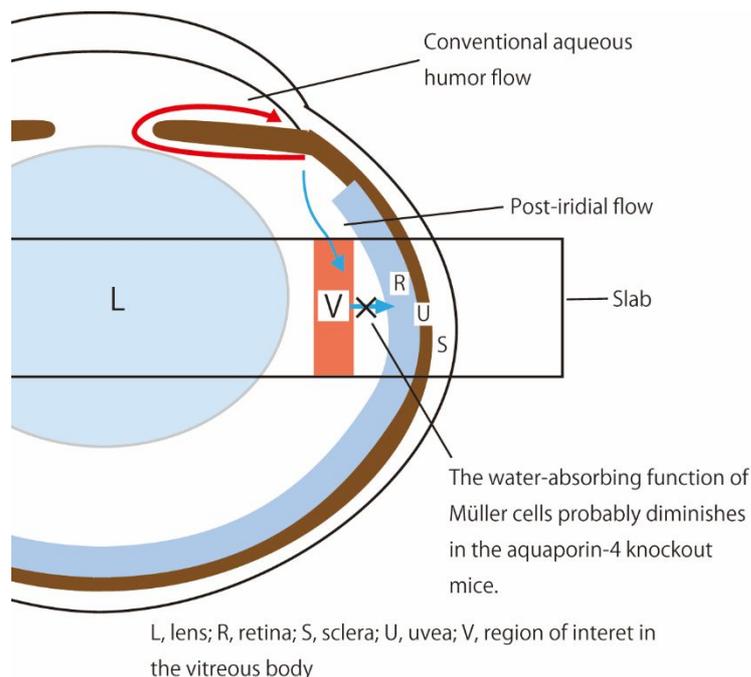


図 4 本研究の結果が示唆する後眼部の水動態のメカニズム。オレンジの長方形は硝子体に設定された region of interest を示す。マウス的大腿静脈から注入された  $H_2^{17}O$  は毛様体上皮層で房水の一部となり、多くは前房内に流入し線維柱帯およびブドウ膜強膜流出路に至るものの一部は post-iridial flow となり硝子体に流入する。硝子体に流入した房水は網膜のミュラー細胞のアクアポリン 4 を介して網膜内に吸収されるが、アクアポリン 4 ノックアウトマウスではその機能が失われているため網膜内への水の流入が減少し、みかけ上硝子体の信号変化がコントロールマウスに比べて大きくなる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Satoshi Ueki, Yuji Suzuki, Hironaka Igarashi	4. 巻 62
2. 論文標題 Retinal aquaporin-4 and regulation of water inflow into the vitreous body	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.62.2.24.	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0件

〔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
研究分担者	Huber Vincent  (Vincent Huber)  (40422620)	新潟大学・脳研究所・准教授    (13101)	2018年10月9日に削除

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関