

平成 21 年 6 月 2 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592010  
 研究課題名（和文）緑内障性軸索流障害の原因究明とその治療法の研究  
 研究課題名（英文）Research for mechanisms and treatments of glaucomatous axonal flow damage  
 研究代表者：柏木 賢治（Kenji Kashiwagi）  
 山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授  
 研究者番号：30194723

## 研究成果の概要：

成果 1) 臨床的に重要な正常眼圧緑内障モデルマウスを開発した。  
 成果 2) 緑内障研究を *in vitro* で行うための装置の開発を進め特許を取得した。  
 成果 3) 緑内障における視神経アストロサイトの機能として RGC の生存率と神経突起の形成に影響を与えることを確認した。  
 成果 4) 神経生存に関与するグルタミン酸トランスポーター (GLT) の発現が虚血、緑内障、NMDA 負荷などの負荷によってサブタイプ毎に異なり各条件における関与が異なることを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：緑内障、アストロサイト、グリア細胞、グルタミントランスポーター、ミュラー細胞、軸索障害

### 1. 研究開始当初の背景

重要な後天性失明原因である緑内障の治療は、主に眼圧下降によりなされているが、必ずしも十分ではなく眼圧下降によらない治療法が模索されている。これまでいくつかの一般的な細胞死抑制治療が研究されているが、これらは緑内障に対する特異的治療ではないため問題である。緑内障特有の障害である軸索流障害に対する直接的治療法の研究は不十分である。

### 2. 研究の目的

in vitro ならびに in vivo の実験を中心に緑内障性軸索流障害の機序を解明しこれを応用した新しい緑内障治療法を開発する。

### 3. 研究の方法

(1) 軸索流障害における軸索骨格蛋白の役割をより明確にする。

(2) 軸索流に関連する、細胞外器質とモーター蛋白の関連性を明らかにする。

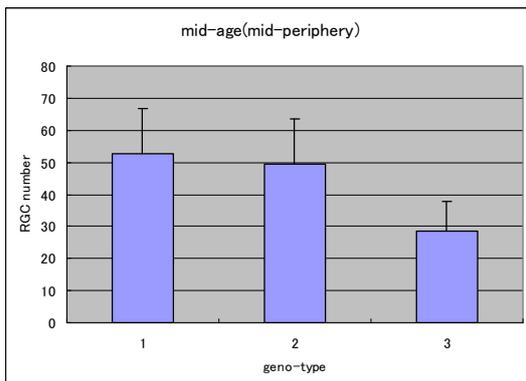
(3) 細胞骨格蛋白の強度コントロールを化学的修飾法ならびに関連酵素遺伝子操作により調整する方法を検討し、RGC 保護効果や障害などに関し、検討する。

(4) 視神経のアストロサイト、ミクログリアを RGC と混合培養し、過重負荷などの特殊負荷環境で、各神経膠細胞のリン酸化酵素活性調整と RGC の軸索流の変化や生存を評価し、これら RGC 周囲細胞、もしくは環境を用いた RGC 保護治療法の開発を検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) 正常眼圧緑内障モデルの作成

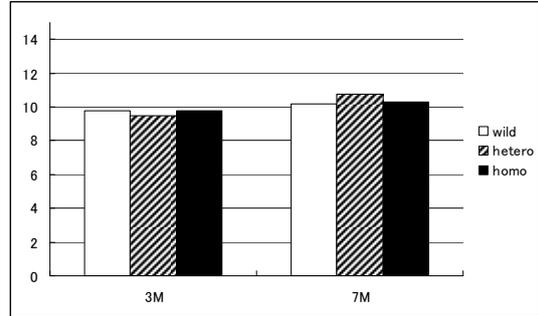
これまで、作成が困難と考えられていた正常眼圧緑内障のモデルマウスの作成を進めた。本マウスは加齢性に網膜神経節細胞(RGC)が脱落することが形態的、RGCの特異mRNAの定量から観察されており、また眼圧は正常域であることも確認されている。有力なモデルマウスになる可能性があり、さらに詳細な検討を進めているところである。



上図は17ヶ月例の網膜標本中のRGC数を測定した結果を示している。RGC数はホモ<ヘテロ<ワイルドの順に減少しており遺伝子改変モデルではRGCの細胞数減少が起こっている。

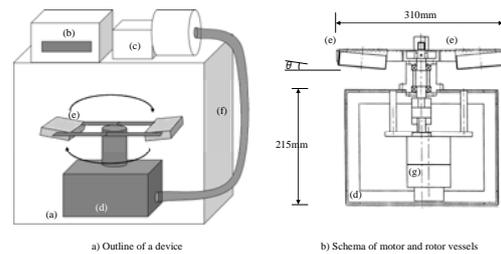
上図は遺伝子改変マウスの眼圧の検討結果を示している。左は8ヶ月齢、右は17ヶ月齢の眼圧値を示しているが、有意な差はすべての改変動物間で認められない。

### (2) in vitro 緑内障実験装置の特許取得



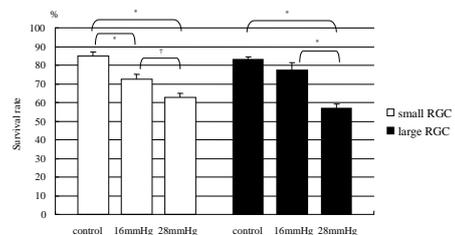
緑内障研究をin vitroで行うための装置の開発を進め特許を取得した。これまでin vitroでの緑内障研究は良好な実験装置がなかったが本装置によってより生体に近い緑内障in vitro実験が可能となった。

Figure 1. Schema of centrifugal force loading device Kashiwagi et al.



上図は作成したin vitro細胞加重装置である。加重圧は0.1mmHgから100mmHg以上まで0.1mmHg間隔で加えることができる。また培養器中で利用することが可能なので、酸素濃度などの調整も可能であり、加重に加え虚血負荷なども与えることができる。

Figure 2. Centrifugal Force Loading and RGC Survival Kashiwagi et al.



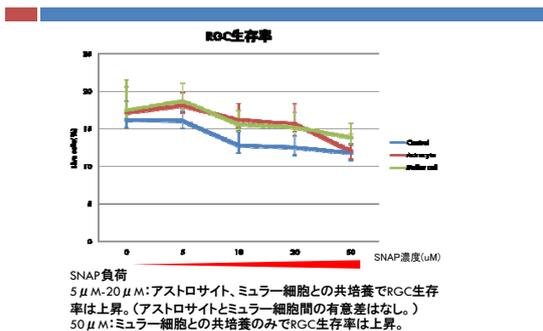
本加重器を用いてRGCに負荷を加えて生存率を検討した結果、加重に比例して生存率が低

下することが確認されている。

### (3) 視神経アストロサイトのRGC生存への影響

緑内障は視神経部分において神経軸索傷害を受けるが、視神経アストロサイトはその際、重要な役割を果していると考えられている。しかしその機能に関しては不明であった。今回in vitroの緑内障実験系を用い視神経アストロサイトがRGCの生存に影響を及ぼすことが判明した。

### RGC生存率(FACS:live cell比率)



上図は眼グリア細胞と共培養されたRGCの生存率を示している。横軸は負荷されたNMDAの濃度である。NMDA濃度に比例してRGCの生存率は低下するが(コントロールは青線)、アストロサイトと共培養されたRGC(赤線)やミュラー細胞と共培養されたRGC(緑線)の生存率はこれに比べ有意に高くグリア細胞がRGCの生存率を向上している。

### 細胞数実数にする、SD、平均値



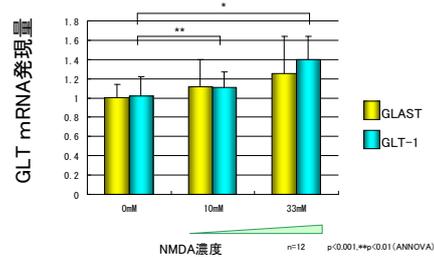
上図は眼グリア細胞と共培養されたRGCの神経突起の伸長を示している。横軸は負荷されたNMDAの濃度である。コントロール(青線)に比べ、アストロサイトと共培養されたRGC(赤線)やミュラー細胞と共培養されたRGC(緑線)では神経突起の伸長が有意に増加していた。また神経突起の伸長作用はアストロサイトにより強く認められた。

### (4) 各種負荷によるミュラー細胞のグルタミン酸トランスポーターの発現の差異とRGC生存への影響

グルタミン酸トランスポーター(GLT)は5種

類のサブタイプが存在し、細胞外のグルタミン酸量を調整することで神経生存に関与すると考えられるがその発現機序は十分には解明されていない。今回虚血、緑内障、NMDA負荷など負荷の差によってGLTのサブタイプの発現パターンが異なることを発見し、RGCへのGLTの作用も負荷条件によって異なることを発見した。今後の治療法の開発にとって重要な発見である。

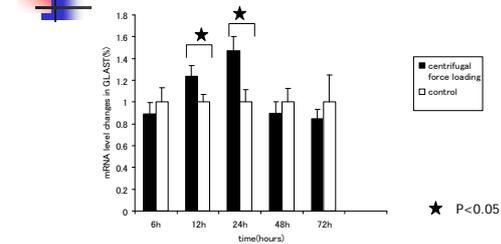
### 結果



NMDA33mMでGLT(GLAST, GLT-1)mRNA発現量が増加する。

上図は、NMDA負荷によってGLASTとGLT-1のmRNAの発現量が増加していることを示す。

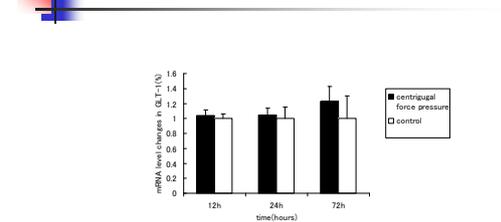
### Result 1: GLAST mRNA level



GLAST mRNA level measured by quantitative realtime PCR induced to centrifugal force pressure.

上図は過重負荷を与えた際のミュラー細胞におけるGLASTの発現変化を示す。GLASTは過重負荷によって発現量が増加する。

### GLT-1 mRNA level



GLT-1 mRNA level measured by Realtime RT-PCR induced to centrifugal force pressure.

上図は加重負荷を与えた際のミュラー細胞におけるGLT-1の発現変化を示す。GLT-1は発現を変化させていない。このように負荷刺激によってGLTの発現は調整を受けている。

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 4 件)

1. K KASHIWAGI, T TSUMURA, S TSUKAHARA, Long-term Effects of Latanoprost Monotherapy on Intraocular Pressure in Japanese Glaucoma Patients, J Glaucoma, 2008, 17(8):662-666(査読あり)

2. K ABE, K KASHIWAGI, Additive Effect of Brinzolamide on Diurnal Changes in Intraocular Pressure in Latanoprost-treated Eyes, The Open Ophthalmology J, 2008, 2:1-4(査読あり)

3. K KASHIWAGI, S TSUKAHARA, Case finding of angle closure Glaucoma in public health examination with scanning peripheral anterior chamber depth analyzer J Glaucoma, 2007, 16(7):589-593(査読あり)

4. 柏木 賢治緑内障視神経障害評価のこれから、あたらしい眼科、2007、24(4):465-467(査読なし)

[学会発表] (計 5 件)

1. K KASHIWAGI: Role of Glial Cell in Glaucomatous Optic Neuropathy and New Approach for Neuroprotection, Glaucoma Summer Camp, 2008/8/30, Hyogo

2. T HAN, T FURUYA, K KASHIWAGI Modification of Glutamate Transporters in Rat Muller cells Under Centrifugal force pressure, 2008/5/3, ARVO, USA

3. K Kashiwagi : Translating basic science to clinical practice in Glaucoma Asian-Oceanic Glaucoma Society : 2007/12/12 : タイ

4. 柏木賢治: 正常眼圧緑内障に関する基礎研究と新技術への期待: アジア・オセアニア緑内障学会: 2007/12/12 : タイ

5. F MABUCHI, K KASHIWAGI, Z YAMAGATA, H IJIMA, S TSUKAHARA Association between the BDNF gene polymorphism and normal tension glaucoma, World Glaucoma Congress 2007/7/11, Singapore

[図書] (計 2 件)

柏木賢治: メディカル出版, あたらしい眼科, 眼科医のための先端医療 緑内障視神経障害評価のこれから. 2007;24:465-467.

柏木賢治: 文光堂, 眼科プラクティス, 【視野】 controversy 神経細胞消失率と感度低下率の関係. 2007;15:112-113.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称: 生体細胞又は組織の加重培養方法および装置

発明者: 柏木賢治

権利者: 柏木賢治

種類: 通常

特許番号: 特許第 4086183 号

取得年月日: 平成 20 年 2 月 29 日

国内外の別: 国内

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柏木 賢治(Kenji Kashiwagi)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授

研究者番号: 30194723

(2) 研究分担者

加藤 梧郎(Goro Kato)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号: 60177441

間瀬 文彦(Fumihiko Mabuchi)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号: 20322125

前田 秀一郎(Shuichiro Maeda)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号: 10117244

(3) 連携研究者

なし