

令和 2 年 9 月 7 日現在

機関番号：32607

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06130・19K21246

研究課題名（和文）神経-グリア-血管連関の破綻におけるMMPの意義の解明と新規緑内障治療薬への応用

研究課題名（英文）The role of matrix metalloproteinase in disruption of neuronal-glial-vascular interactions in the retina and the application to novel glaucoma therapeutics

研究代表者

浅野 大樹 (Asano, Daiki)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：90821918

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：網膜における神経-グリア-血管連関の破綻における matrix metalloproteinase (MMP) の意義を理解するために、神経障害後の血管障害における MMP の役割について検討した。その結果、1) MMP 阻害薬が血管障害を抑制すること、2) 血管の脱落に先行して血管の MMP 活性が上昇すること、及び 3) 網膜実質に浸潤した白血球が MMP-9 を産生すること、から神経障害後に網膜実質へ浸潤した白血球が産生した MMP-9 が、血管の MMP 活性を上昇させて血管障害に寄与することが示唆された。本成果は、MMP の機能制御が網膜疾患の新規治療戦略になる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜神経が障害されると、網膜実質へ浸潤した白血球より産生・遊離された MMP-9 が、網膜血管における MMP の基質の分解亢進により血管障害を引き起こし、その結果、血流障害による更なる神経障害を引き越す可能性が示された。本研究結果は、網膜における神経-グリア-血管連関のより深い理解をもたらしたとともに、後天性失明や視力低下の原因として大きな割合を占め、社会的問題となっている緑内障等の網膜疾患に対して、MMP の制御により網膜神経の生存環境を正常化するという、新たな治療戦略の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：To understand the role of matrix metalloproteinase (MMP) in the disruption of neuronal-glial-vascular interactions in the retina, we examined the role of MMP in retinal vascular degeneration following retinal neuronal cell loss. We found that 1) MMP inhibitors prevented retinal vascular degeneration, 2) activated MMP was detected throughout the retinal vasculature before vascular degeneration, and 3) leukocytes infiltrating the retinal tissue produced MMP-9, following retinal neuronal cell loss. These results suggest that MMP-9 produced by leukocytes elevates MMP-9 activity throughout vasculature, resulting in vascular degeneration, in the injured retina. Manipulation of MMPs would be a novel effective strategy for treating retinal diseases

研究分野：医歯薬学

キーワード：網膜 神経 グリア 血管 MMP

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後天性失明原因第 1 位であり、網膜神経が障害される難治疾患として大きな社会問題となっている。現在、緑内障の薬物治療の中心には「眼圧降下薬」が位置づけられているが、視覚障害の進行を完全に抑制できないという事実から、異なる作用機序による治療薬の開発が強く求められている。網膜は中枢神経系に分類され、神経細胞、グリア細胞(アストロサイト/ミクログリア/ミュラー細胞)及び血管構成細胞が情報交換(神経-グリア-血管連関)することにより恒常性を維持している。従って、緑内障の発症と進行を抑制するためには、神経-グリア-血管連関を正常に保ち網膜神経の生存環境を維持することが最優先されるべき治療法と言える。

Matrix metalloproteinase (MMP) には多くのサブタイプが存在するが、網膜においては主に MMP-9 が発現している。MMP-9 は正常な血管新生に関与するのみならず、網膜障害時には視神経節細胞やグリア細胞において過剰に産生又は活性化され、神経細胞死を惹起することが示されている(引用文献)。そこで我々は、緑内障時に MMP-9 の制御機構がどのように変化し、神経-グリア-血管連関の恒常性破綻に関与するのか、を明らかにすることが重要であると考えた。

我々は、これまでに成熟期(7週齢)ラットに *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) の硝子体内投与を行うと、視神経節細胞の脱落に遅れて網膜毛細血管が脱落すること、新生仔期には神経と血管が強く依存しあっているが、その依存度は成熟に伴い減弱していくことを見出している(引用文献)。また最近、NMDA 投与後の網膜において血管の脱落に先行して、1) アストロサイトが活性化すること及び 2) MMP-9 活性が上昇することを見出している。これらの結果は、神経細胞が障害されると、直接又はグリア細胞を介して間接的に MMP-9 が活性化され、血管の構造破綻を招く可能性を示している。従って、新生仔期に NMDA を硝子体内投与して視神経節細胞を著しく脱落させたラット(新生仔網膜神経障害モデルラット)を用いれば、神経-グリア-血管連関の破綻における MMP-9 の意義について効率的に明確にできると考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

網膜における神経-グリア-血管連関の破綻における MMP の意義の解明を通じて、緑内障の予防・治療戦略開発の新機軸を構築するために、(1) 効率的に顕著な変化が観察される新生仔網膜神経障害モデルラットを用いて、網膜神経が障害された後の毛細血管の脱落に及ぼす MMP-9 阻害薬の影響について検討し、(2) 神経-グリア-血管連関の視点より MMP-9 の産生・活性化を招く機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、まず(1) 新生仔網膜神経障害モデルラットの網膜において生じる MMP-9 の活性化が血管障害を招く機序を、次に(2) 神経が障害された網膜における MMP-9 の発現・活性化の調節機序の解析を行った。

(1) MMP-9 の活性化が血管障害を招く機序

これまでの検討により NMDA(200 nmol) を 1 週齢のラットに硝子体内投与すると、その 2 日後から視神経節細胞の脱落が、7 日後から毛細血管の脱落が生じることが明らかになっている。そこで視神経節細胞は脱落しているが血管は未だ脱落していない NMDA 投与 2 日後に、MMP 阻害薬である CP101537(100 nmol) 又は GM6001(25 nmol) を硝子体内投与し、その 5 日

後に血管内皮細胞を蛍光免疫染色した網膜 *flat-mount* 標本を作製し、網膜血管の組織学的変化を評価した。

(2) 神経が障害された網膜における MMP-9 の発現・活性化の調節機序

NMDA 投与 2 時間後 から 7 日後の網膜における MMP-9 のタンパク質量及び活性の経時変化について、それぞれ Western blot 法及び Gelatin Zymography 法によって評価した。

MMP-9 の発現分布及び活性化 MMP の分布を免疫染色法及び *in situ* Zymography 法によって検討した。また、MMP-9 と神経細胞、グリア細胞及び白血球との共染色により MMP-9 の発現細胞の同定を行った。

4. 研究成果

(1) MMP-9 の活性化が血管障害を招く機序

視神経節細胞の脱落がほぼ最大に達している NMDA 投与 2 日後に CP101537 又は GM60001 を硝子体内投与した 5 日後の網膜において、毛細血管の脱落の抑制が認められた。以上の結果から、視神経節細胞の脱落后に生じる血管の脱落に MMP が関与していることが示された。本モデルラットでは、NMDA 投与 2 日後において視神経節細胞が著しく脱落していることから、視神経節細胞以外の細胞が産生する MMP が血管障害に関与する可能性が考えられた。

(2) 神経が障害された網膜における MMP-9 の発現・活性化の調節機序

MMP-9 のタンパク質量及び活性は、いずれも NMDA 投与 4 時間後から上昇し 6 時間後で最大となった。その後、投与 2 日後まで有意に高いレベルを保ち、4 日後から対照眼と同程度となった。

NMDA 投与 2 日後において、網膜実質への白血球の著しい浸潤が認められた。網膜実質に浸潤した白血球の多くが MMP-9 を発現しており、血管内外に集積した白血球のほとんどが MMP-9 を発現していた。また、網膜血管に集積した MMP-9 発現白血球の周囲において MMP による基質分解が認められた。

以上の結果より、視神経節細胞の脱落后に血管内から網膜実質へ浸潤した白血球から産生された MMP-9 が、網膜血管における MMP の基質分解を亢進させて血管障害に寄与する可能性が示された。

(3) 総括

これまでの研究により、網膜障害時において MMP-9 は視神経節細胞やグリア細胞において過剰に産生又は活性化されて神経細胞死を惹起することが明らかになっていた。本研究において、網膜神経が障害された後、網膜実質へ浸潤した白血球から産生された MMP-9 が、網膜血管における MMP の基質分解を亢進させて網膜血管の脱落に寄与する可能性が示された。網膜神経障害時に、過剰に産生又は活性化された MMP が網膜血管を障害させて更なる神経障害を招く可能性を示唆する本研究成果は、神経 - グリア - 血管連関のより深い理解をもたらしたとともに、緑内障等の網膜疾患の発症及び進行機序の一端を解明したものと考えられる

< 引用文献 >

Zhang, X., Cheng, M., Chintala, S.K. Kainic acid-mediated upregulation of matrix metalloproteinase-9 promotes retinal degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004

Jul;45(7):2374-83.

Manabe, S., Gu, Z., Lipton, S.A. Activation of matrix metalloproteinase-9 via neuronal nitric oxide synthase contributes to NMDA-induced retinal ganglion cell death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005 Dec;46(12):4747-53.

Asami, Y., Nakahara, T., Asano, D., Kurauchi, Y., Mori, A., Sakamoto, K., Ishii, K. Age-dependent changes in the severity of capillary degeneration in rat retina following *N*-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. *Curr. Eye Res.* 2015 May;40(5):549-53.

Asano, D., Nakahara, T., Mori, A., Sakamoto, K., Ishii, K. Regression of retinal capillaries following *N*-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the neonatal rat retina. *J. Neurosci. Res.* 2015 Feb;93(2):380-90.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Asano Daiki, Hokazono Masaki, Hirano Shogo, Morita Akane, Nakahara Tsutomu	4. 巻 20
2. 論文標題 Cellular Mechanisms of Angiogenesis in Neonatal Rat Models of Retinal Neurodegeneration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4759 ~ 4759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20194759	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 Asano Daiki, Morita Akane, Mori Asami, Sakamoto Kenji, Ishii Kunio, Nakahara Tsutomu	4. 巻 182
2. 論文標題 Involvement of matrix metalloproteinases in capillary degeneration following NMDA-induced neurotoxicity in the neonatal rat retina	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 101 ~ 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2019.03.005	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅野大樹、森田 茜、森 麻美、中原 努
2. 発表標題 新生仔ラット NMDA 誘発神経傷害網膜におけるmatrix metalloproteinase-9 の活性化機序
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 浅野大樹、外園雅生、平野契悟、森田 茜、森 麻美、中原 努
2. 発表標題 網膜神経変性モデルにおいて観察される血管新生におけるグリア細胞の役割：新生仔ラットにおける検討
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 浅野大樹、外園雅生、平野奨悟、森田 茜、森 麻美、中原 努
2. 発表標題 網膜神経変性ラットにおいて生じる網膜血管新生におけるグリア細胞の役割
3. 学会等名 第27回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 浅野大樹、森田 茜、森 麻美、中原 努
2. 発表標題 ラット網膜で観察される神経 - グリア - 血管連関の破綻における MMP の産生・活性化機序
3. 学会等名 第39回日本眼薬理学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 浅野大樹、外園雅生、平野奨悟、森田 茜、森 麻美、坂本謙司、中原 努
2. 発表標題 生仔ラットにおける NMDA 誘発網膜神経傷害後に生じる網膜血管の傷害と新生過程：新規血管新生モデルとしての可能性
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 平野奨悟、浅野大樹、森田 茜、森 麻美、坂本謙司、中原 努
2. 発表標題 新生仔ラットにおける NMDA 誘発網膜神経傷害後に生じる網膜血管新生の機序解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 浅野大樹, 森田 茜, 森 麻美, 坂本 謙司, 中原 努
2. 発表標題 MMP-9 阻害薬は網膜神経血管変性を抑制する：新生仔ラット NMDA 誘発網膜神経毒性モデルにおける検討
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会（大阪）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 浅野大樹, 森田 茜, 森 麻美, 坂本 謙司, 中原 努
2. 発表標題 ラット網膜で観察される神経-グリア-血管連関の破綻における MMP の意義
3. 学会等名 第 38 回日本眼薬理学会（長崎）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 浅野大樹, 森田 茜, 森 麻美, 坂本 謙司, 中原 努
2. 発表標題 ラット網膜において NMDA 誘発神経傷害後に観察される血管退縮に対する MMP阻害薬の保護効果
3. 学会等名 次世代を担う創薬医療薬理シンポジウム2018（福岡）
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ：
<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/molpharm/molpharm/TOP.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----