

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24040

研究課題名(和文) 活動性マイクログリア制御による緑内障モデル動物の神経保護治療の試み

研究課題名(英文) Active microglia and neuroprotection in glaucoma animal models

研究代表者

前川 重人(Maekawa, Shigeto)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：80625294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、視神経挫滅後のマウス網膜を解析し、活性化マイクログリアの表面マーカー候補として6種類のCD抗原を同定した。そのCD抗原のうちCD69ならびにCD72は培養マイクログリア細胞においては遺伝子発現が増加し、またCD69はフローサイトメトリーでも増加していたことを同定した。CD69は視神経挫滅後の網膜においてもマイクログリア細胞内で活性化することを免疫組織学でも確認した。よって、CD69は活動性マイクログリアのマーカーである可能性が示唆された。また、抗炎症作用のヘスペリジンについて、活性化した培養マイクログリアに投与したところ、炎症性サイトカインが減少したことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障治療において、十分なエビデンスによって確立された眼圧下降に依存しない神経保護薬は未だ存在しない。その理由として緑内障は多因子疾患であり、眼圧非依存的な病因因子が複数存在すると推測される。これまでの基礎および臨床研究から、酸化ストレス、小胞体ストレス、興奮毒性、慢性炎症などが原因とされている。そこで、我々は慢性炎症のoriginのひとつとしてマイクログリアに着目し、活性化マイクログリアの抗原を同定し、それを利用することで慢性炎症の動向や抑制を評価し、新しい緑内障治療につなぐことができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the mouse retina after optic nerve crush and identified six CD antigens as surface marker candidates for activated microglia. Among the CD antigens, CD69 and CD72 were found to have increased gene expression in cultured microglial cells, and CD69 was also found to be increased by flow cytometry. And CD69 was activated in microglial cells even in the retina after optic nerve crush in immunohistochemistry. Therefore, it was suggested that CD69 may be a marker for active microglia. It was also confirmed that hesperidin, which has an anti-inflammatory effect, reduced inflammatory cytokines.

研究分野：緑内障

キーワード：マイクログリア 緑内障 慢性炎症 神経保護

## 1. 研究開始当初の背景

緑内障は網膜神経節細胞死とそれに伴う視野障害を認める眼科疾患であり、中途失明原因の第一位であることが報告されている。また、主要なリスクファクターは眼圧であり、唯一エビデンスのある治療法は眼圧下降治療とされている。一方で、本邦における緑内障患者の多くは眼圧が正常範囲内であり、眼圧下降治療が十分に行われているにもかかわらず視野進行をきたす症例が数多く存在する。当施設を含む多くの研究から、緑内障の発症や進行には近視、遺伝的素因、眼血流循環、酸化ストレスなどの関与が報告されている。しかしながら緑内障は多因子疾患であることが近年広く提唱されており、その病態進行に関わる分子メカニズムについては未だ不明な点が多く、眼圧下降以外の有効な治療方法が未だに確立されていない。

緑内障性視神経障害の要因の一つとして慢性炎症の関与が示唆されている。ヒト緑内障眼の前房水内において炎症性サイトカインである TNF が上昇していること (Sawada et al. 2010)、ヒト網膜において免疫制御に重要なマクロファージや TLR の活性化が認められること (Luo C et al. 2010) など、緑内障と慢性炎症との関連性が報告されている。また基礎研究においても、マウス眼内に TNF- $\alpha$  を投与することで網膜神経節細胞死が誘導されることや (Nakazawa T et al. 2006)、炎症性サイトカインを放出するマイクログリアが高眼圧モデル (Wang et al. 2000) や視神経軸索障害 (Thanos S et al. 1991) などの緑内障動物モデル (Neufeld AH et al. 1999, Yuan L et al. 2001) において増殖、活性化していることが報告されている。このように緑内障と慢性炎症、そしてマイクログリアとの関連性が指摘されている。しかしながら、緑内障眼内における慢性炎症惹起および視神経障害のメカニズムについては不明な点が多く残されている。アルツハイマーや多発性硬化症など脳神経疾患においては炎症と活性化マイクログリアの関与が示唆されており、その分子機構が明らかになりつつある。網膜疾患においてもマイクログリアの疾患への関与が推測されるが、その詳細は不明な点が多い。眼圧非依存的な緑内障患者に対する新規治療法の開発に資する基礎的研究として、マイクログリアに着目した研究は可能性を見出せると考えた。

## 2. 研究の目的

慢性炎症の主体の一つであるマイクログリアに着目し、緑内障性視神経障害とマイクログリアの活性化、ならびにその活性抑制による神経保護の役割を検証する。

## 3. 研究の方法

マイクログリアが蛍光標識された Iba1-EGFP マウスを用い、視神経挫滅したのちに網膜を術後 2, 4, 7 日後に採取した。サンプルは Gent IMAX と酵素処理によりシングルセル化し、FACS でマイクログリアを単離、バルクソートしたのち RNA 抽出し RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析をおこなった。また、in vitro BV2 マイクログリア細胞株における、活性化を示す表面マーカー候補の遺伝子発現を同定した。その上で、in vivo において視神経挫滅モデルにおける活性化マイクログリアと表面マーカー候補との関係性を評価し、さらにフローサイトメトリーを用いた BV2 マイクログリア細胞株における CD69 陽性細胞について評価した。また、LPS 刺激した培養 BV2 マイクログリアに対するヘスペリジンの抗炎症

効果についても検証した。

#### 4 . 研究成果

マイクログリアが蛍光標識された Iba1-EGFP マウスを用い、視神経挫滅したのちに網膜を術後 2 , 4、7 日後に採取した。サンプルは Gent IMAX と酵素処理によりシングルセル化し、FACS でマイクログリアを単離、バルクソートしたのち RNA 抽出し RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析をおこなった。その結果、炎症性サイトカインやマイクログリア活性化マーカーは視神経挫滅後に経時的に増加し、デジタル PCR により再確認したところ同様に有意な発現増加が認められ、活性化マイクログリアの表面マーカー候補として 6 種類の CD 抗原を同定した。この 6 種類の CD 抗原のうち CD69 ならびに CD72 は LPS 刺激後の BV2 マイクログリア細胞株においても遺伝子発現が増加することを qPCR により確認した。さらに、CD69 は視神経挫滅後の網膜において増加し、マイクログリアのマーカーである Iba1 と共局在することを確認した。BV2 マイクログリア細胞株を用いた実験においても LPS 刺激により CD69 陽性細胞が増加することをフローサイトメトリーで確認した。上記から我々が以前抗炎症作用を認めるヘスペリジンがマイクログリアに対しても抗炎症作用を示すかどうかを検討した。その結果培養 BV 2 マイクログリアに対し LPS 刺激したところ CD69 に加えて TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, ccl2 のサイトカインの遺伝子発現が増加し、ヘスペリジンの前処理により CD69 および上述のサイトカイン発現量は有意に減少した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤孝太、前川重人
2. 発表標題 視神経挫滅マウス網膜における活性化マイクログリアのサイトカイン発現
3. 学会等名 第31回日本緑内障学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 佐藤孝太、前川重人
2. 発表標題 神経挫滅マウス網膜のマイクログリア活性化における rhoキナーゼの関与
3. 学会等名 第125回日本眼科学会
4. 発表年 2021年～2022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
---------------------------	-----------------------	----

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