

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2010～2012
課題番号：	22591973
研究課題名（和文）	活性化グリア細胞を介した網膜傷害に対するスタチンの抑制効果の検討
研究課題名（英文）	Determination of neuro-protective effects of statin on the retinal injuries through activated glial cells.
研究代表者	
奥 英弘	(Oku Hidehiro)
	大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：	90177163

研究成果の概要（和文）：スタチン全身投与による神経保護作用を、ラット視神経挫滅モデルを用いて検討した。挫滅創には CD68 陽性細胞の集積がみられ、その周囲で MCP-1 免疫活性が亢進していた。また CD68, MCP-1、TNF- α などの遺伝子発現亢進が認められた。スタチン全身投与はこれら炎症性変化および網膜神経節細胞死を有意に抑制した。また培養アストロサイトの NF- κ B 活性化を抑制した。スタチンはアストロサイトの NF- κ B 抑制を介して、網膜神経節細胞に対し保護作用を示す可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： We determined neuroprotective properties of systemic statin using optic nerve crush model of rats. There was an accumulation of CD68-positive cells at the crushed site, and the immunoreactivity to MCP-1 was intensified around the lesion. There was an increase in the mRNA levels of the CD68, MCP-1, TNF- α , etc. Systemic statin significantly depressed these inflammatory changes, and rescued the retinal ganglion cells (RGCs) after the injury. Statin significantly reduced the NF- κ B activation in cultured astrocytes. Thus, simvastatin may have protective roles on the RGCs possibly through suppression of astroglial NF- κ B activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：スタチン、アストロサイト、CD68、視神経挫滅モデル、網膜神経節細胞、NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

(1) 中枢神経系の変性過程に、炎症反応の関与が強く示唆されている。変性巣にはアストログリオージスが生じ、ミクログリア・マクロ

ファージの遊走が認められ、これらのグリア細胞から産生される、一酸化窒素、TNF- α などが神経障害を増強する可能性が考えられていた。

(2)HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるスタチンには、コレステロール生成抑制以外に、pleiotropic effects とよばれる様々な作用が知られており、神経保護作用も報告されていた。作用機序に関しては不明な点が多いが、イソプレノイド産生低下による Ras、Rho、Rac などの低分子量 GTP 結合タンパク質の減少から、NF κ B 活性を抑制する可能性が示されていた。したがって活性化グリア細胞由来の傷害的応答を抑制する可能性が期待できた。

2. 研究の目的

(1)ラット視神経挫滅モデルを用いて、スタチン全身投与による神経保護作用と機序を明らかにする。

(2)特にグリア細胞の活性化を介した炎症反応に注目し、GFAP で評価される視神経アストロサイトの活性化と、アストロサイトを中心に発現するとされるケモカインである MCP-1 が、ミクログリア・マクロファージの集積に重要な働きをしていると仮定した。

(3)反応性アストロサイトとミクログリア・マクロファージから分泌される TNF- α 、endothelin-1 (ET-1)、誘導型一酸化窒素合成酵素(inducible nitric oxide synthase, iNOS)などの炎症起因性反応に対するスタチン全身投与の抑制作用を明らかにする。

(4)ラット視神経アストロサイトの培養系を用いて、スタチンの NF κ B 活性化抑制作用を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) simvastatin (1mg/kg/day) あるいは溶媒を浸透圧ミニポンプで、視神経挫滅の1週間前から全身投与した。その後、全身麻酔下で1側のラット視神経を挫滅した。

(2)挫滅後3日で視神経を摘出し、免疫組織学的に挫滅巣の炎症反応を観察し、またリアルタイム PCR で炎症反応を定量した。具体的には、ミクログリア・マクロファージのマーカーである CD68 とアストロサイトの活性化マーカーである GFAP、さらに炎症細胞の遊走を刺激する MCP-1 の発現を免疫組織学的

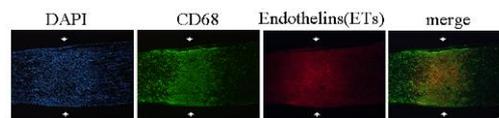
に検討した。また CD68、MCP-1、GFAP、ET-1、TNF α 、iNOS 遺伝子の mRNA レベルの変化を定量し、スタチンによる抑制効果を検討した。

(3)挫滅後7日で網膜を摘出し、網膜神経節細胞死の程度を TUJ-1 染色で定量した。

(4)培養視神経アストロサイトを用いて、TNF- α で NF- κ B を活性化し、p65 のリン酸化と核移行、および NF- κ B の DNA 結合能を western blot およびゲルシフトアッセイで検討し、simvastatin (1.0 μ M) を培地中に添加して、NF- κ B 活性化に対する抑制作用を検討した。

4. 研究成果

(1) 視神経挫滅部ではアストロサイトが活性化され、最終的にはグリア瘢痕を形成する。図1に挫滅7日後の視神経挫滅部免疫染色写真を提示する。免疫組織科学的に、矢印で示した挫滅部には、CD68 陽性のマクロファージ・ミクログリアが遊走し、これら免疫担当細胞が ET を分泌しているのが明らかになった(図1)。また挫滅部周囲でアストロサイトの活性化が生じることが明らかになった。



(図1) 論文3から引用

(2) リアルタイム PCR 法での解析では、挫滅後の視神経では ET-1、CD68、GFAP の遺伝子発現亢進が見られ、さらに炎症に関与する TNF- α および iNOS 遺伝子の発現亢進も認められた。したがって ET-1 や GFAP とともに、炎症性サイトカインや一酸化窒素(NO)を介した炎症反応が、アストロサイトの活性化と密接に関連して生じ、一連の炎症機転が二次的に視神経軸索を傷害する可能性が示唆された。

(3) これらの結果から、視神経傷害による網膜神経節細胞死には、逆行性変性以外に、グリア細胞を介した炎症反応が深く関与していると考えられた。すなわちマクロファージ・ミクログリアから分泌された ET に反応

してアストロサイトは活性化され、ケモカインの発現を介してさらに炎症細胞の遊走を促進する。またマクロファージ・ミクログリアとアストロサイトは ET-1、TNF- α 、NO を介して、autocrine および paracrine loop を形成して互いに活性化し合い、炎症反応を増強する機序が働くと考えられた。

(4) simvastatin 全身投与により、免疫組織学的に、視神経挫滅後 3 日の時点で、視神経挫滅部の CD68 陽性細胞の集積が抑制され、挫滅部周囲のアストロサイトでの MCP-1 の発現亢進が抑制された。

(5) simvastatin は視神経挫滅後 3 日の時点で、CD68、MCP-1、ET-1、GFAP、TNF- α 、iNOS の遺伝子発現を有意に抑制した。

(6) さらに simvastatin は視神経挫滅 7 日の時点で、網膜神経節細胞死を有意に抑制し、神経保護作用を示した。

(7) simvastatin (1.0 μ M) は培養視神経アストロサイトを用いた *in vitro* 実験系で、TNF- α による NF κ B のリン酸化、核移行、DNA 結合能などを有意に抑制することが確認できた。

(8) これらの結果から、スタチンはアストロサイトの活性化を抑制することにより、マクロファージ・ミクログリアの遊走を抑制して、視神経傷害時に生じる炎症反応を抑制する可能性が示唆された。NF κ B は転写因子として、様々な炎症反応性遺伝子発現に関与している。したがってスタチンの作用機序のひとつに、アストロサイトの NF κ B 活性化抑制が考えられた。スタチン製剤は広く高コレステロール血症治療薬として使用されており、様々な神経変性疾患に効果が期待できる可能性が示唆された。

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 9 件)

- (1) Involvement of P2X(7) receptors in retinal ganglion cell death after optic nerve crush injury in rats. Kakurai K, Sugiyama T, Kurimoto T, Oku H, Ikeda T. *Neurosci Lett*.

2013;534:237-41. doi:

10.1016/j.neulet.2012.11.060. (査読あり)

- (2) Involvement of glial cells in the autoregulation of optic nerve head blood flow in rabbits. Shibata M, Sugiyama T, Kurimoto T, Oku H, Okuno T, Kobayashi T, Ikeda T. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:3726-32. doi: 10.1167/iovs.11-9316. (査読あり)
- (3) Blocking endothelin-B receptors rescues retinal ganglion cells from optic nerve injury through suppression of neuroinflammation. Tonari M, Kurimoto T, Horie T, Sugiyama T, Ikeda T, Oku H. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:3490-500. doi: 10.1167/iovs.11-9415. (査読あり)
- (4) Nitric oxide potentiates TNF- α -induced neurotoxicity through suppression of NF- κ B. Nakaizumi A, Horie T, Kida T, Kurimoto T, Sugiyama T, Ikeda T, Oku H. *Cell Mol Neurobiol*. 2012;32:95-106. doi: 10.1007/s10571-011-9739-5. (査読あり)
- (5) Changes in optic nerve head blood flow, visual function, and retinal histology in hypercholesterolemic rabbits. Shibata M, Sugiyama T, Hoshiga M, Hotchi J, Okuno T, Oku H, Hanafusa T, Ikeda T. *Exp Eye Res*. 2011;93:818-24. doi: 10.1016/j.exer.2011.09.014. (査読あり)
- (6) Disruption of gap junctions may be involved in impairment of autoregulation in optic nerve head blood flow of diabetic rabbits. Shibata M, Oku H, Sugiyama T, Kobayashi T, Tsujimoto M, Okuno T, Ikeda T. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:2153-9. doi: 10.1167/iovs.10-6605. (査読あり)
- (7) Effects of fasudil, a Rho-associated protein kinase inhibitor, on optic nerve head blood flow in rabbits. Sugiyama T, Shibata M, Kajiura S, Okuno T, Tonari M, Oku H, Ikeda T. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Jan 5;52:64-9. doi: 10.1167/iovs.10-5265. (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

- (1) Systemic simvastatin rescues death of retinal ganglion cells from optic nerve injury possibly through suppression of glial NF- κ B activation. Morishita S, Oku H, Tonari M,

Kida T, Horie T, Ikeda T. Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2013年05月5日～9日. Seattle, USA.

- (2) ラット視神経傷害に対する statin 全身投与の神経保護作用. 奥 英弘, 栗本拓治, 戸成匡宏, 堀江妙子, 杉山哲也, 池田恒彦. 日本眼科学会総会 2012年04月04日～8日、東京
- (3) ラット視神経傷害時の endothelin を介した瘢痕形成と ETB 受容体遮断剤の神経保護作用. 奥英弘, 栗本拓治, 戸成匡宏, 堀江妙子, 杉山哲也, 池田恒彦. 日本眼科学会総会 2011年5月12日～15日、東京

[その他]

ホームページ等

大阪医科大学眼科学教室

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/opt/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥 英弘 (Oku Hidehiro)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90177163

(2) 研究分担者

高井 真司 (Takai Shinji)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80288703

福原 雅之 (Fukuhara Masayuki)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00238510

奥野 高司 (Okuno Takashi)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：20411366

石崎 英介 (Ishizaki Eisuke)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：70530434

小林 崇俊 (Kobayashi Takatoshi)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：10567093

(3) 連携研究者

原 英彰 (Hara Hideaki)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20381717

(4) 研究協力者

杉山 哲也 (Sugiyama Tetsuya)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：20298764

栗本 拓治 (Kurimoto Takuji)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：50388815

堀江 妙子 (Horie Taeko)

大阪医科大学・医学部・研究助手

戸成 匡宏 (Tonari Masahiro)

大阪医科大学・医学部・大学院生

森下 清太 (Morishita Seita)

大阪医科大学・医学部・大学院生