

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592666

研究課題名(和文) グルタミン酸輸送体を賦活化し網膜神経節細胞を加圧傷害から防御する

研究課題名(英文) Neuroprotection by enhancement of glutamate uptake against pressure-induced injury in a rat glaucoma model

研究代表者

石川 誠 (Ishikawa, Makoto)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10212854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：眼圧上昇は緑内障の発症・悪化の重要な危険因子である。眼圧上昇によってグルタミン酸代謝が抑制された結果、網膜神経節細胞の傷害が誘導される(興奮毒性)ことから、「グルタミン酸輸送体を賦活化すると、網膜神経節細胞を眼圧上昇による傷害から防御できる」との仮説をたてた。本研究では、分離眼球標本による新しい緑内障モデルと緑内障動物実験モデルをもちいて、グルタミン酸代謝を賦活化する薬剤(17 β -estradiolとtamoxifen)によって、網膜神経節細胞の傷害が防御できる可能性を示した。また、神経ステロイドは興奮毒性と拮抗して加圧傷害を抑制したことから、新しい緑内障性神経保護物質である可能性がある。

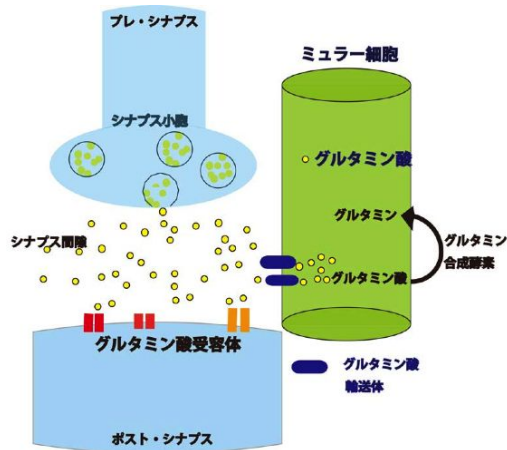
研究成果の概要(英文)：Glutamate transporter (GT) regulates extracellular glutamate accumulation and prevents excitotoxicity. Acute exposure to elevated hydrostatic pressure can cause axonal impairments of retinal ganglion cells via down-regulation of GT expression. 17 β -Estradiol (E2) and tamoxifen (TX), a selective estrogen modulator, have been shown to possess neuroprotection by increase in expression of GT and glutamine synthetase (GS). We have tested our hypothesis that E2 and TX reverse pressure-induced decrease of GT and GS, and results in the protection of axonal damage in the rat ex vivo and in vivo glaucoma model. Additionally, we reveal that neurosteroid, allopregnanolone, may serve as potential therapeutic target for the prevention of pressure-induced excitotoxicity in glaucoma.

研究分野：緑内障の病態の基礎研究

キーワード：緑内障 眼圧 グルタミン酸毒性 グルタミン酸輸送体 グルタミン合成酵素 神経ステロイド 神経保護 GABA受容体

1. 研究開始当初の背景

正常網膜において、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸は、視細胞や双極細胞のプレ・シナプス前終末からシナプス間隙に放出された後、ポスト・シナプスのグルタミン酸受容体に結合する(下図)。過剰なグルタミン酸は、グルタミン酸輸送体(GT)によって、主にミュラー細胞内へ取り込まれた後、グルタミン合成酵素(GS)によって無害なグルタミンとなる。GTやGSが抑制されるとグルタミン酸の細胞外濃度が上昇し、神経細胞死が惹起される(興奮毒性)。



和泉らは、グルタミン酸代謝経路に異常があれば、低濃度のグルタミン酸でも興奮毒性を誘導することができるが、逆に、グルタミン酸代謝が健常ならば、たとえ高濃度のグルタミン酸が存在しても興奮毒性はおこらないことを報告した(Izumi et al. 2004)。原田ら(2008)は、GT欠損マウスの網膜神経節細胞(RGC)が、眼圧に依存することなく経時的に脱落していくことを発見し、同マウスを正常眼圧緑内障モデルとして報告した。これらの報告は、緑内障とグルタミン酸興奮毒性の関係を明らかにする為には、高濃度の細胞外グルタミン酸の存在を証明することより(Dalton. 2001; Dreyer et al. 1996)、グルタミン酸の代謝異常を証明することが優先することを示す重要なものであった。

眼圧上昇は、緑内障の発症・悪化において、最も重要な危険因子である。眼圧上昇が続けば、RGCは著しく障害され、加速度的に脱落する。我々は、眼圧上昇とグルタミン酸代謝の関係に着目し、眼圧が上昇するとグルタミン酸輸送体が機能なくなり、興奮毒性によるRGC傷害を惹起すると考え、正常ラットの分離眼球標本をもちいた急性加圧実験をおこなった。その結果、以下(1)(2)が明らかになった。

(1) 加圧によって、RGCの軸索が障害される(Ishikawa et al. IOVS 2010)。

(2) 加圧によって、まずグルタミン酸輸送体(GT)が抑制され、逐次的にグルタミン合成酵素(GS)が抑制される。その結果、興奮

毒性によるRGC軸索の傷害が誘導される(Ishikawa et al. IOVS 2011)。

これらの結果は、GTやGSが加圧傷害の重要な標的であることを示している。従って、加圧によるGTやGSの抑制を防ぎ、グルタミン酸興奮毒性を回避することができれば、加圧傷害を防御できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「グルタミン酸輸送体(GT)を賦活化し、網膜神経節細胞(RGC)を眼圧上昇による傷害から防御する」とした仮説の検証である。そのため我々は、以下の(1)と(2)を目的として、課題に取り組んだ。課題(3)は当初は予定になかったが、研究遂行中に新たな研究テーマとして加えた。

(1) 加圧障害におけるGLASTの重要性の証明

現在、遺伝子がクローニングされているGTは、GLAST(EAAT1)、GLT-1(EAAT2)、EAAC1(EAAT3)、EAAT4、EAAT5の5種類である。このうち網膜に分布する主なGTは、GLASTとGLT-1である。GLASTはミュラー細胞に分布し、GLT-1は主にRGCに局在する。以前の我々の検討で(Ishikawa et al. IOVS 2011)加圧障害におけるGLASTの関与は明らかになったが、GLT-1の加圧障害への関与は未だ明らかにされていない。

そこで、選択的GT阻害薬を網膜に作用させ、加圧障害に最も関与するグルタミン酸輸送体がGLASTであることの確認を課題とした。

(2) GLAST賦活化による神経保護の可能性の検討

上記(1)で加圧傷害におけるGLASTの重要性を確認した後、これまでGLASTの賦活化が報告されている薬物である17β-Estradiol(Pawlak et al. 2005)およびTamoxifen(Lee et al. 2009)を用いて、「GTを賦活化すれば、RGCを加圧障害から防御できる」との仮説を検証することを課題とした。

(3) 加圧障害に対する新しい内因性神経保護物質(神経ステロイド)の検討

加圧負荷時に、グルタミン酸はRGCに神経傷害的に関与する。一方、興奮抑制性神経伝達物質であるγ-アミノ酪酸(GABA)は、加圧負荷時にグルタミン酸と拮抗して、神経保護的に関与する可能性がある。しかし、加圧傷害に対するGABA自体の神経保護作用については、これまでほとんど報告がない。

神経ステロイド(NS)は、神経系においてコレステロールから合成されるステロイドの総称である。NSは、細胞膜に存在する神経伝達物質受容体に作用して、神経の興奮性を急激に変化させる。Allopregnanolone(AlloP)はGABA_A受容体に作用し、中枢神経系における神経保護効果が報告されている(Zorumski et al. 2013)。そこで我々は、加圧障害に対する神経保護の新たな可能性とし

て、GABA_A 受容体アゴニストである AlloP に着目した。「加圧障害時に、AlloP は内因性神経保護因子として、グルタミン酸興奮毒性に対して拮抗的に作用する」との仮説をたて検証した。さらに、AlloP の GLAST 及び GS に対する賦活化の可能性を調査することを新たな課題とした。神経ステロイドの加圧傷害に対する神経保護作用は、これまで研究されていない新しいテーマである。

3. 研究の方法

今回の研究計画では、一定時間、正確な加圧を負荷できるモデルが必要であり、眼圧以外の他の因子の影響を可及的に排除することが重要である。我々は、独自に開発した分離加圧標本 (*ex vivo* モデル、Ishikawa et al. IOVS2010) をもちいて、今回の実験を行った。*ex vivo* 分離加圧標本は、培養液中でグルコースと酸素を十分に標本に供給したままで加圧を負荷できるため、眼圧上昇に付随する虚血障害の影響を可及的に排除できる。また、液面の高さを変えることによって、負荷圧を自由に設定できることも、本実験法の大きな利点である。

(1) *ex vivo* 分離標本をもちいた加圧実験

加圧障害における GLAST の重要性の証明
加圧障害における GLAST と GLT-1 の役割を精査するため、我々は、選択的 GLAST 阻害薬 UCPH-101 と選択的 GLT-1 阻害薬 WAY213613、および汎 GT 阻害薬 TBOA を *ex vivo* 分離眼球標本に作用させ、加圧した。

GLAST 賦活化による神経保護の可能性

正常ラットから *ex vivo* 分離眼球標本を作成し、加圧を負荷することで誘導される網膜神経節細胞 (RGC) の傷害が、GLAST を賦活化する薬物 17 β -Estradiol (E2) および Tamoxifen (TX) を培養液中に添加することによって防御可能であることを、形態学的、生化学的に調査する。以下に、実験デザインを示す。

生後 30 日齢の SD ラットから、*ex vivo* 分離眼球標本を作成した。標本は培養液を満たしたシリンダーの底部に沈め、静水圧による加圧負荷 (75 mmHg) を 24 時間おこなった。一部の培養液中には 100 nM E2 と 1 μ M TX を添加し、無添加群と形態学的に比較検討した。E2 と TX の濃度設定は、予備実験によって決定した。また、E2 および TX 添加群と無添加群における加圧前後の GS と GLAST の発現変化を、Real-time PCR 法、Western blotting 法によって検討した。

(2) *in vivo* 緑内障ラットをもちいた実験

in vivo 緑内障ラットの背部皮下に TX 徐放ペレットを埋没することによって、RGC の障害が防御可能であることを、形態学的に示す。*in vivo* ラット緑内障モデルは、生後 30 日齢の SD ラット 30 匹の右眼上強膜静脈 3 本を焼灼して作成した。ラット緑内障モデルは、TX 投与群 (15 匹) と TX 非投与群 (15 匹) の 2 群に分けた。TX 投与群および TX 非投与群と

もに、術後 14 日目に眼球を摘出し、視神経乳頭中心部付近を含む光顕切片で、周辺 800 μ m までの RGC 密度を、傍眼 (非手術眼) と比較検討した。眼圧は、トノラボ眼圧計で経時的に測定した。

(3) 神経ステロイドを投与した加圧実験

正常ラットから *ex vivo* 分離眼球標本を作成し、加圧を負荷することで、AlloP が誘導されることを、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) で調査した。さらに、抗 AlloP 抗体をもちいた免疫組織染色を行い、AlloP の網膜内における局在を明らかにした。

次いで、AlloP が加圧障害に対して神経保護的に作用するか、神経障害性に作用するかを明らかにするため、培養液中に AlloP を添加して加圧した。得られた AlloP の効果が GABA_A 受容体を介したものか否かを確認するため、培養液中に AlloP と GABA_A 受容体拮抗薬 (Picrotoxin) を同時投与して加圧した。

AlloP の神経保護効果と GLAST および GS との関連性を検討するため、AlloP 投与群と非投与群において、抗 GLAST 抗体と抗 GS 抗体による免疫染色と GS 活性測定を行った。

4. 研究成果

(1) *ex vivo* 分離標本をもちいた加圧実験

加圧障害における GLAST の重要性の証明
培養液中に選択的 GLAST 阻害薬 UCPH-101 と選択的 GLT-1 阻害薬 WAY213613、および汎 GT 阻害薬 TBOA を添加して、10 mmHg で 24 時間 (30 度) 加圧した。その結果、選択的 GLAST 阻害薬 UCPH-101 添加群では、網膜神経節細胞軸索が著しく腫脹した。汎 GT 阻害薬 TBOA 添加群でも、同様に、神経節細胞軸索の著しい腫脹が認められた。一方、選択的 GLT-1 阻害薬 WAY213613 添加群では、明らかな変化は認められなかった。

培養液中に選択的 GLAST 阻害薬 UCPH-101 と汎 GT 阻害薬 TBOA を添加して、75 mmHg で 24 時間 (30 度) 加圧すると、網膜は興奮毒性のため変性した。一方、GLT-1 阻害薬 WAY213613 添加群は、75 mmHg で加圧しても、神経節細胞の軸索腫脹以外の変化は起こらなかった。

以上から、GLAST は GLT-1 に比較して、加圧障害時には重要な役割を果たすと考えられる。

GLAST 賦活化による神経保護の可能性

正常ラットから作成した *ex vivo* 分離眼球標本を 75 mmHg、24 時間加圧して誘導された RGC 軸索の腫脹は、E2 (100 nM) および TX (1 μ M) の投与によって抑制された。Real-time PCR 法と Western blotting 法による GLAST と GS の発現の検討では、中間報告において、E2 (100 nM) および TX (1 μ M) を培養液中に添加して 75 mmHg、24 時間加圧すると、対象群 (75 mmHg 加圧、薬剤無し)

と比較して、GLASTとGSの発現が有意に上昇することを報告した。その後の解析の結果、E2およびTXは、GLASTとGSの発現を圧依存性に变化させることが明らかになった。すなわち、E2およびTX投与群では、mRNAレベルおよびタンパク質レベルにおいて、GLASTとGSの発現は対象群と比較して、10 mmHgでは5倍以上と有意に上昇したが、75 mmHgでは0.5~1.0倍と変動することが明らかになった。

(2) *in vivo* 緑内障ラットをもちいた実験

術後50%以上の眼圧上昇を示したラットのうち、角膜混濁、炎症、40 mmHg以上の高眼圧、および網膜出血を認めたラットは除外して解析を行なった。TX投与群(9匹)のRGC密度は、術後14日目で $85.8 \pm 9.7\%$ であった。一方、TX非投与群(10匹)では、術後14日目のRGC密度は、僚眼に比較して $74.0 \pm 11.3\%$ と減少した。TX投与群は、TX非投与群と比較して、RGC密度が有意に維持された(Student t-検定 $p=0.0266$)。

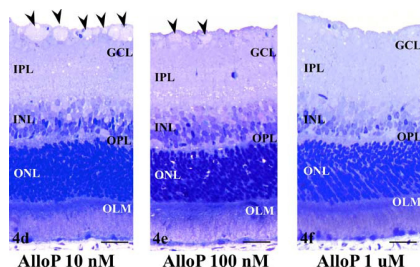
以上の結果、TXは、*in vivo* 緑内障ラットにおいてRGCを保護することが明らかとなった。

(3) 神経ステロイドを投与した加圧実験

ex vivo 分離眼杯に加圧負荷をかけると、RGCにAlloPが発現した。さらに、培養液中にAlloPを投与すると、加圧によるRGC軸索の傷害が防御されたことから、眼圧上昇時にAlloPはRGCを保護することが明らかになった。培養液中にPicrotoxinを投与するとAlloPの神経保護効果が抑制されたことから、AlloPはGABA_A受容体を介して神経保護効果を発揮すると考えられた。

下図(*ex vivo* 加圧標本網膜の準超薄光顕切片写真)は、AlloP投与によって、加圧傷害によるRGC軸索の腫脹(矢頭)が、濃度依存性に抑制されていく様子を示す。

予備実験の結果、AlloPは加圧負荷時にGS活性を上昇させる可能性がある。また、免疫組織学的に、AlloPはGSの発現を75 mmHgにおいて上昇させる可能性がある。



(4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

緑内障は現在、日本人の失明原因の第1位である。現行の緑内障治療は眼圧下降型の治療が主流であり、RGCを直接ターゲットとする神経保護型治療の実用化が急がれる。本研究によって、E2とTXは緑内障の神経保護治療薬の有力な候補である可能性が示された。

さらに我々は、GABA_A受容体の強力な作動性物質であるAlloP(GABA受容体作用型神経ステロイド)の加圧障害に対する神経保護効果を初めて明らかにし、Investigative Ophthalmology & Visual Science誌(IF: 3.661)に発表した(Ishikawa et al. IOVS 2014)。本論文は日本眼科学会編集委員会によって秀逸な論文として選定され、日本眼科学会雑誌「外国語要覧」に掲載が決定した。

(5) 今後の展望

加圧傷害における内因性AlloPの神経保護作用について、さらに詳細なメカニズムを検討する予定である。AlloPと拮抗するNMDA作用型神経ステロイドの効果についても、検討を行う。

<引用文献>

- 1) Izumi et al. Glia. 2004; 48:44-50.
- 2) Harada et al. J Clin Invest. 2008;117:1763-70.
- 3) Dalton. Nature. 2001;411:129-130.
- 4) Dreyer et al. Arch Ophthalmol.1996;114:299-305.
- 5) Ishikawa et al. IOVS. 2010; 51:6414-23.
- 6) Ishikawa et al. IOVS. 2011; 52:6604-16.
- 7) Pawlak et al. Brain Res Mol Brain Res. 2005 138:1-7.
- 8) Lee et al. J Neurochem. 2009; 110:530-44.
- 9) Zorumski et al. 2013 Jan;37(1):109- 122
- 10) Ishikawa et al. 2014; 55:8531-41.

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 8 件)

Ishikawa M、Yoshitomi T、Zorumski CF、Izumi Y、Experimentally induced mammalian models of glaucoma、*BioMed Research International*、査読有、2015 巻、2015、1-11、Article ID 281214.

Ishikawa M、Sawada Y、Yoshitomi T、Structure and function of the interphotoreceptor matrix surrounding retinal photoreceptor cells、*Experimental Eye Research*、査読有、133 巻、2015、3-18、DOI: 10.1016/j.exer.2015.02.017.

Ishikawa M, Jin D, Sawada Y, Abe S, Yoshitomi T,
Future therapies of wet age-related macular degeneration,
Journal of Ophthalmology, 査読有、2015
巻、2015、1-10、Article ID 138070.
DOI: 10.1155/2015/138070.

Ishikawa M, Yoshitomi T, Zorumski CF,
Izumi Y,
Neurosteroids are endogenous neuroprotectants in an ex vivo glaucoma model,
Investigative Ophthalmology & Visual Science, 査読有、55 巻、2014、8531-8541、
DOI: 10.1167/iovs.14-15624.

Ishikawa M,
Abnormalities in glutamate metabolism and excitotoxicity in the retinal diseases,
Scientifica (Cairo), 査読有、2013 巻、2013、
1-13、Article ID 528940.
DOI: 10.1155/2013/528940.

Abe S, Watabe H, Takaseki S, Aihara M, Yoshitomi T,
The effects of prostaglandin analogues on intracellular Ca²⁺ in ciliary arteries of wild-type and prostanoid receptor- deficient mice,
Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, 査読有、29 巻、2013、55-60、
DOI: 10.1089/jop.2011.0197.

Sawada Y, Fujiwara T, Yoshitomi T,
Morning glory disc anomaly with contractile movements,
Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 査読有、
250 巻、2012、1693-1695、
DOI: 10.1007/s00417-012-2115-4.

石川 誠、吉富 健志、Zorumski CF、
和泉 幸俊、
神経ステロイドは神経節細胞に軸索を加圧障害から防御する、
日眼会誌「外国誌要覧」、査読なし、2015、
308.

[学会発表](計 13 件)

World Ophthalmology Congress 2014.
(4/2~4/6 於 : Tokyo, Japan)
Ishikawa M, Yoshitomi T, Izumi Y,
Pressure-dependent changes of glutamate transporters in the ex vivo rat retinal preparation, WOC Tokyo.

World Glaucoma Congress 2013
(7/17~7/20 於 : Vancouver, Canada)
Ishikawa M, Yoshitomi T, Izumi Y,
Pressure-dependent changes of GLT-1 splice

variants in the isolated rat retinal preparation,

Asi-Pacific Glaucoma Congress 2012.
(12/7-12/9 於 : Bali, Indonesia)

Ishikawa M, Yoshitomi T, Izumi Y,
Protective effects of tamoxifen against pressure-induced injury in a rat ex vivo hydrostatic pressure model.

Asi-Pacific Glaucoma Congress 2012.
(12/7-12/9 於 : Bali, Indonesia)

Watanabe S, Ishikawa M, Sato N, Sawada Y, Yoshitomi T,
Detection of primary angle closure using scanning peripheral anterior chamber depth analyzer in Japanese community health screening.

World Ophthalmology Congress 2012.
(2/16-2/20 於 : Abu Dhabi, United Arab Emirates)

Ishikawa M, Yoshitomi T,
Pathological findings of experimental dacryocystitis.

World Ophthalmology Congress 2012.
(2/16-2/20 於 : Abu Dhabi, United Arab Emirates)

Hayakawa M, Abe S, Jin D, Watabe H, Ishikawa M, Fujiwara T, Yoshitomi T,
A study of choroidal thickness and scleral thickness of highly myopic eye.

World Glaucoma Congress 2011
(6/29-7/2 於 : Paris, France)

Ishikawa M, Sawada Y, Sato N, Abe S, Yoshitomi T,
Risk factors for primary open-angle glaucoma in Japanese subjects attending community health screenings.

第 25 回日本緑内障学会、
平成 26 年 9/19-9/21、大阪

石川 誠、吉富 健志、和泉 幸俊、
ラット ex vivo 加圧モデルにおけるアロプ
レグナノロンの発現。

第 24 回日本緑内障学会、
平成 25 年 9/21-9/23、東京

石川 誠、吉富 健志、和泉 幸俊、
ex vivo 眼杯標本をもちいた新しい閉鎖系
加圧実験装置の開発。

第 33 回日本眼薬理学会、
平成 25 年 9/21-9/22、東京

神大介、石川 誠、吉富 健志、和泉 幸
俊、
ラット ex vivo 網膜標本における急性加圧

障害と網膜内 ATP 量の変化.

**第 117 回日本眼科学会総会、
平成 25 年 4/4～4/7、東京**

石川 誠、吉富 健志、和泉 幸俊、
タモキシフェンの *in vivo* ラット緑内障モデルにおける神経保護効果.

**第 23 回日本緑内障学会、
平成 24 年 9/28～30、金沢**

石川 誠、吉富 健志、和泉 幸俊、
DNA マイクロアレイ法によるタモキシフェンの急性眼圧上昇時の神経保護効果の検討.

**第 116 回日本眼科学会総会、
平成 24 年 4/5～4/8、東京**

石川 誠、吉富 健志、和泉 幸俊、
タモキシフェンの急性眼圧上昇に対する神経保護効果.

[図書](計 5 件)

Ishikawa M、Yoshitomi T、Izumi Y、
InTech Europe Publisher (Croatia) 、
Excitotoxicity and glaucoma 、
"Ophthalmology – Current Clinical and
Research Update" (Editor: PG. Davey)、査読有、2014、523- 542.

Sato N、Ishikawa M (corresponding)、et al.、
InTech Publisher (Croatia) Aging effect on
peripheral anterior chamber depth in Japanese
subjects attending community 、 health
screenings. "Glaucoma - Basic and Clinical
Aspects"、(Editor: S. Rumelt)、査読有、
2013、251-266.

Ishikawa M、Yoshitomi T、
Nova Science Publisher, New York.
Intravitreal injection of peanut agglutinin
results inspecific labeling of
long-wave-lengthsensitive cone photo-
receptors. "Photoreceptors: Physiology,
Types and Abnormalities"、(Editor:
Akutagawa、E, Ozaki K)査読有、2012、
163-170.

石川 誠、
毛様体レーザーの治療、「緑内障クローズ
アップ」、編集：木内 良明、メジカルレ
ビュー社、査読なし、2014、162-165.

石川 誠、
第 4 章 . □薬物療法 . B . 単剤治療の考え
方、「All About 開放隅角緑内障」、山本哲
也、谷原秀信編、医学書院、査読なし、2013、
255-266.

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石川 誠 (ISHIKAWA, Makoto)
秋田大学大学院医学研究科病態制御系
眼科学講座・准教授
研究者番号：10212854

(2)研究分担者

吉富 健志 (YOSHITOMI, Takeshi)
秋田大学大学院医学研究科病態制御系
眼科学講座・准教授
研究者番号：60191623

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

高関 早苗 (TAKASEKI, Sanae)
秋田大学大学院医学研究科病態制御系
眼科学講座・実験補助員