

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462749

研究課題名(和文) 緑内障モデルにおけるカルパイン阻害薬の網膜、中枢神経保護効果の解明

研究課題名(英文) Elucidation of neuroprotective effect of calpain inhibitor in retina and central nerve systems in the model of glaucoma

研究代表者

劉 孟林 (Ryu, Morin)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：70436153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスは緑内障に関与することが報告されている。申請者は酸化ストレス誘導剤であるAAPHを眼球内に投与することにより、マウス緑内障モデルを作成した。この緑内障モデルマウスにおける網膜神経節細胞死はカルパインの活性化により誘導されることが示され、さらにカルパイン阻害剤により網膜神経節細胞死を抑制することができた。本研究の結果は、難治性疾患である緑内障の治療薬としてカルパイン阻害剤が有用である可能性を示しており、新たな治療法の開発に向けて貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：AAPH administration was an effective model of oxidative stress-induced glaucoma, showing that oxidative stress directly activated the calpain pathway and induced RGC death in mice retina. Furthermore, inhibition of the calpain pathway protected the RGCs after AAPH administration. In our study, suppressing calpain activation reduced RGC death, suggesting that it may be a good candidate for neuroprotection therapy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：calpain oxidative stress retinal ganglion cells glaucoma

### 1. 研究開始当初の背景

緑内障は眼圧依存性に視野障害の進行する視神経症と定義される疾患である。我が国において40歳以上の約5%が罹患し、現在失明原因第一位の疾患となっている。働き盛りの成人が失明することによる社会的損失は大きく、失明予防の観点から緑内障治療の研究・開発は大変重要である。現在の緑内障治療は眼圧下降による病状進行の抑制であるが、十分な眼圧下降にも関わらず視野障害の進行する例も多い。このことは、緑内障の病態において眼圧非依存性の因子が存在することを意味する。日本における緑内障患者の約7割は正常眼圧緑内障と呼ばれる病型であり (Iwase ら, *Ophthalmology*, 2004) 患者の眼圧は正常範囲にある。そのため緑内障に対する治療が眼圧下降のみではすべての緑内障患者の進行を抑えることはできない。高齢化社会の到来とともに、増えていく緑内障患者に対し、緑内障の病態に基づいた新たな治療戦略が求められている。申請者らの所属する東北大学眼科学教室では早くよりこの問題に着目し、緑内障病態に基づいた治療法を模索してきた。申請者らは、緑内障における不可逆的視野障害は最終的には「網膜神経節細胞 (RGC) 死」によりもたらされることから、神経細胞死を抑制する神経保護治療開発に努めてきた。緑内障は臨床的に明らかに多因子疾患であり、この開発を達成するためには複雑な RGC 死の機序を細胞レベルで解明することが不可欠である。

### 2. 研究の目的

緑内障の病態の基本は、網膜神経節細胞 (RGC) 死であり、中枢変性神経疾患 (アルツハイマー病、パーキンソン病など) 病態と類似している。慢性的に網膜神経節細胞がストレスに置かれて軸索流障害、軸索変性や細胞突起の退縮そして細胞体障害を起こして、アポトーシスに終着する。カルパインは以前より神経細胞死に深くかかわるプロテアーゼとして知られている。申請者らはこれまでの研究において、軸索流を特異的に薬剤で崩壊させ (軸索障害)、2 次的な網膜神経節細胞死を誘導する新しい正常眼圧緑内障モデルを確立し、その障害にカルパイン阻害剤が神経保護作用を有することを示した (*J Neurosci Res*, 2012)。本研究では、カルパインの活性化が各緑内障の病態モデルでどのような役割を果たすかをタンパク質レベルで明らかにし、カルパイン阻害薬を緑内障神経保護薬として臨床応用する可能性を明らかにすることが目的である。加えて、緑内障における神経保護治療開発の戦略として、RGC 死に関わる基本障害因子 { 圧障害、軸索障害 (軸索流障害)、慢性虚血 (グルタミン酸障害)、慢性炎症、酸化ストレス、一酸化窒素による障害 } の病態への関わりを明らかにすることが重要である。そのためには、RGC (細胞体と軸索) が障害さ

れ細胞死に至るまでに関わる網膜細胞 { グリア細胞 (アストロサイト、ミューラー細胞、マイクログリア、マクロファージ)、血管内皮細胞 } で引き起こされる分子メカニズムについて分子遺伝学的手法を用いて研究する必要がある。それぞれに特異的な治療を開発し、これらの複合的治療として緑内障における神経保護治療を開発することが本研究の基本方針である。

### 3. 研究の方法

活性酸素種 ROS を用いた緑内障病態モデル動物を作成するため、野生型マウス (C57BL/6) マウス眼球内に 30 mM AAPH を 2  $\mu$ l 投与した。網膜神経節細胞の逆行性染色は、AAPH 障害の 7 日前に、ケタミン/キシラジンの全身麻酔科において 2%フルオロゴールドもしくは 3% Dil を中脳上丘部に 2  $\mu$ l 投与した。RGC 細胞数カウントのため、AAPH 投与 7 日後にマウス眼球を摘出し、4% パラホルムアルデヒドで固定し網膜伸展標本作製した。また、酸化ストレス検出のため、AAPH 投与 22 時間後に 100  $\mu$ M CellRox を眼球内に 1  $\mu$ l 投与した。また、アポトーシス細胞を検出するため、Annexin V-Cy3 を眼球内に 1  $\mu$ l 投与した。また、カルパインが活性化された細胞を検出するため、AAPH 投与 21 時間後に蛍光カルパインプローブ ((DABCYL)-TPLK SPPSPRE (EDANS)-RRRRRRR-NH2 calpain substrate IV, Millipore) を投与し、その 3 時間後にマウス眼球を摘出し、網膜伸展標本作製した。マウス網膜のカルパイン活性化を、カルパイン活性指標である  $\alpha$ -fodrin の断片化をウェスタンブロットティングにより確認した。また、カルパイン阻害剤である SNJ-1945 は 4% carboxymethyl-cellulose 含有基材に溶解させ (100 mg/kg)、AAPH 投与前日から 8 日間連続で経口投与させた。その後、マウス眼球を摘出し、4% パラホルムアルデヒドで固定し網膜伸展標本作製し、蛍光顕微鏡で写真を撮影したのち、フルオロゴールド陽性細胞数を計測した。

また、ラタノプロストによる RGC 保護とカルパインの関与を調べる実験については、SD ラット (9-12 週齢、雄) を用いた。ラタノプロストおよび D-saccharic acid 1,4-lactone (DSL) は、軸索切断 15 分前に眼球内に 2  $\mu$ l 投与した。軸索切断 7 日後の網膜内の断片化  $\alpha$ -fodrin およびカルパスタチンのタンパク質発現をウェスタンブロットティングにより検出した。また、軸索切断 3 日後に眼球を摘出し、網膜および網膜色素上皮細胞層に単離したのち、クロトールの遺伝子発現をリアルタイム PCR により、タンパク質発現をウェスタンブロットティングにより検出した。ラタノプロストによる断片化クロトー誘導メカニズムを調べるため、各種阻害剤 (50  $\mu$ M AL8810, 50  $\mu$ M Rifamycin, 100 nM

GF109203X, 10  $\mu$ M TAPI-1) を添加した条件下で網膜を CO<sub>2</sub> インキュベーター内で器官培養した。培養 90 分後に網膜を回収し、ウェスタンブロッティングにより網膜内の断片化クロトータンパク質を検出した。免疫組織化学は、ラット眼球を摘出したのち、4% PFA で一晩固定した。その後、スクロース溶液に置換したのち、OCT compound 内に眼球を凍結包埋した。凍結切片はクライオスタットを用いて 10  $\mu$ m 前後の厚さに作成したのち、免疫染色に使用するまで -30 °C で保存した。凍結切片を Tw-PBS で洗浄したのち、室温で 1 時間のブロッキング処理後、一次抗体で反応させた。その後、Tw-PBS で洗浄したのち、蛍光標識された二次抗体で反応させ、DAPI による核染色をおこなった。染色後の網膜組織は蛍光顕微鏡により観察し、各蛍光色素の写真を撮影した。また、DSL による RGC 生存への影響を調べるため、DSL 投与と軸索切断後に、フルオロゴールドにより RGC を逆行性に染色した。軸索切断 7 日後に眼球を摘出し、網膜伸展標本にしたのち蛍光顕微鏡で観察した。

また、視神経軸索障害後におけるマイクログリアの動態を調べるため、遺伝子組み換えマウスである Iba1-EGFP を軸索障害したのち、全身麻酔下で共焦点走査型ダイオードレーザー検眼鏡 (SLO, F10, NIDEK) により網膜蛍光眼底を観察した。また、2.5  $\mu$ M Sytox Orange を眼球内に 1  $\mu$ l 投与し、その 10 分後に SLO にて網膜眼底を観察した。

#### 4. 研究成果

緑内障病態には酸化ストレスが関与することが報告されている。申請者は、AAPH を眼球内に投与することで ROS による網膜障害を誘導し、緑内障モデルの作製を試みた。逆行性染色により RGC を標識したマウスに AAPH を投与したところ、AAPH 投与 7 日後のマウスではコントロールに比較して RGC 数が有意に減少した。AAPH 投与 24 時後では、マウス網膜内の酸化ストレスを示す CellRox 陽性細胞とカルパイン活性を示すカルパインプローブ陽性細胞が認められ、これらは逆行性染色された Dil 陽性細胞と共染色されることから、AAPH 投与により酸化ストレスが誘導された細胞ならびにカルパインが活性化された細胞は RGC であることが確認された。さらにカルパイン活性化の指標である断片化 a-fodrin のタンパク質量を測定したところ、AAPH 投与群の網膜における断片化 a-fodrin 量はコントロールに比べ、AAPH 投与 24 時間後において有意に増加していた。さらに、この断片化 a-fodrin 量がカルパイン阻害剤である SNJ-1945 投与により有意に減少した。加えて、SNJ-1945 投与により AAPH 誘導性の RGC 数減少が有意に抑制された。これらの結果は、AAPH 投与による RGC 死細胞はカルパインの活性化により引き起こされていることを示しており、そのカルパイン活性を

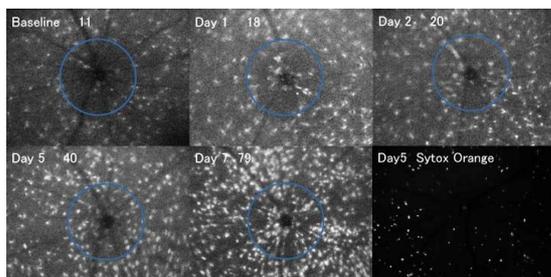
SNJ-1945 で阻害することで RGC 死細胞が抑制されることから、SNJ-1945 阻害剤は酸化ストレスに起因する RGC 障害に対して神経保護作用を示すことが明らかとなった。この研究結果は、SNJ-1945 を始めとするカルパイン阻害剤が未だ根治的な治療法のない緑内障の新規治療薬としての可能性を示唆している。

また、ラタノプロストは網膜神経保護効果があることを過去に当教室で報告したが、その詳しいメカニズムは不明であった。申請者は軸索切断による RGC 障害時におけるカルパイン活性化を調べたところ、ラット軸索切断 7 日後において断片化 a-fodrin のタンパク質量が増加していた。同時に、カルパインの内在性阻害剤であるカルパスタチンのタンパク質量が減少しており、軸索切断時におけるカルパイン活性化はカルパスタチンの減少によるものであることが示唆された。さらに、ラタノプロストを眼球内に投与することにより、RGC 死が抑制されるとともに a-fodrin の断片化やカルパスタチンの減少が抑制されたことから、ラタノプロストはカルパスタチンの減少を抑えることでカルパイン活性化を抑制し、その結果 RGC が保護されることが考えられた。さらに、軸索切断時にラット網膜内および網膜色素上皮細胞においてクロトーの遺伝子発現量がおよびタンパク質量 (断片化クロトー-KL1 および KL2) が減少していたが、ラタノプロストの眼球内投与により、そのクロトーの発現減少は抑制された。加えて、ラタノプロスト投与における断片化クロトーの生成メカニズムを調べたところ、FP レセプターアンタゴニストである AL8810 処理では変化が見られなかったものの、OATP2B1 の阻害剤である Rifmycin 処理により断片化クロトーの生成が抑制された。免疫組織化学の結果から、OATP2B1 と RGC マーカーである C38 は共局在を示し、さらにクロトーの局在が網膜内のガングリオン細胞層 (GCL; RGC が存在する層) に多く発現していたことから、OATP2B1 を介した断片化クロトーの生成は、RGC で起きていることが示唆された。

さらに、PKC 阻害剤である GF109203X 処理と ADAM17 阻害剤である TAPI-1 処理によっても断片化クロトーの生成が抑制された。この結果から、ラタノプロスト投与により生成される断片化クロトーは、OATP1B/PKC/ADAM17 の経路を介して産生されることが示された。加えて、クロトーは b-glucuronidase 活性を持つことが知られており、その阻害剤である DSL の阻害剤を投与し、その後軸索切断を行うと生存 RGC 数が有意に減少した。これより、網膜内のクロトーは RGC に対して神経保護的に働いていることが示唆された。これらの結果は、緑内障病態における RGC 死に対してクロトーを発現量増加ならびに活性化させることで、緑内障の新たな治療方法につながる可能性があることを示している。

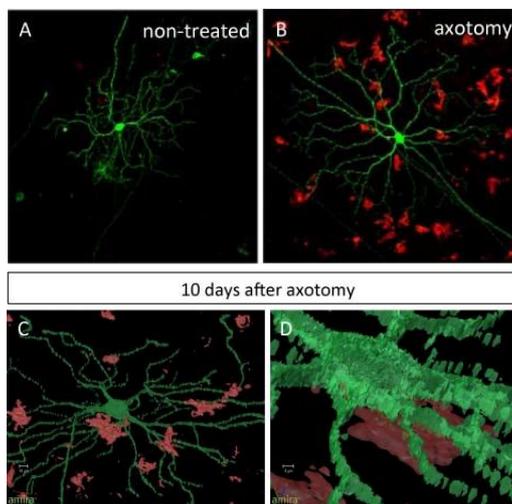
上記の研究成果は国際的な雑誌 (Journal of Neurochemistry) に投稿中である。  
また、上記研究成果を第27回日本緑内障学会にて発表予定である。

一方、緑内障における RGC 死のメカニズムを調べるためには、直接障害を受ける RGC だけではなく、その周辺にある細胞種の動態についてもその詳細を調べる必要がある。マイクログリアは網膜内に存在するグリア細胞の一種であり、RGC 死を間接的に制御している可能性がある。我々は、軸索障害におけるマイクログリアの挙動をリアルタイムに調べるため、マイクログリアを可視化できる Iba1-EGFP マウスを用い、SLO にて網膜眼底を観察した。軸索挫滅前における EGFP 陽性マイクログリアは RGC が存在する網膜表層にごくわずかに観察された。軸索挫滅 1 日後、2 日後、5 日後、7 日後においては、視神経軸索周囲を中心とした網膜表層に EGFP 陽性マイクログリアが多数集積し、その数は軸索切断後に継時的に増加する様子が観察された。(図 1)。また、軸索挫滅 5 日後に Sytox Orange により死細胞を染色したところ、SLO で Sytox Orange 陽性細胞が観察された。これにより、視神経軸索により RGC が障害を受けていることが再確認できた。



(図 1) 視神経軸索挫滅後における Iba1-EGFP マウスのリアルタイム眼底イメージング。左上から右へ向かって、軸索挫滅前、軸索挫滅 1 日後、2 日後、5 日後、7 日後の網膜眼底。視神経挫滅により細胞が障害されていることを Sytox Orange による標識により確認した。

この実験から、視神経挫滅により RGC が障害されると、RGC が存在する網膜表層にマイクログリアが集積することが示唆された。軸索挫滅後の RGC とマイクログリアの関連をさらに詳細に調べるため、ラット視神経軸索を切断し、網膜を器官培養した。視神経切断 7 日後の培養網膜においては、RGC 周囲に CD11b 陽性のマイクログリアが多数観察された(図 2A 及び B)。さらに、この視神経切断 7 日後の RGC とマイクログリアの染色像を 3 次元解析したところ、RGC の細胞体及びシナプス周囲にマイクログリアが接近している様子が観察された(図 2C 及び D)。



(図 2) 視神経軸索切断後における RGC 周囲のマイクログリアの染色。RGC (緑) とマイクログリア (赤)。

本研究において、緑内障モデル動物において RGC 障害及び細胞死にカルパインが関与し、その阻害剤が RGC 保護に対して有効であることが明らかとなった。また視神経軸索障害時にマイクログリアが RGC 周囲に集積することから、RGC 障害に対してマイクログリアが何らかの役割を果たしていると推測されるが、その詳細を今後の研究で明らかにしたいと考えている。

## 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 1 件)

The role of calpain in an in vivo model of oxidative stress-induced retinal ganglion cell damage.

Yu Yokoyama, Kazuichi Maruyama, Kotaro Yamamoto, Kazuko Omodaka, Masayuki Yasuda, Noriko Himori, Morin Ryu, Koji M. Nishiguchi, Toru Nakazawa.

Biochemical and Biophysical Research Communications 451 (2014) 510-515

(査読有)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

劉 孟林 (Ryu, Morin)  
東北大学・大学病院・医員  
研究者番号: 70436153

### (2) 研究分担者

森藤 暁 (Moritou, Satoru)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 20647234  
中澤 徹 (Nakazawa, Toru)  
東北大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 30361075