

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462763

研究課題名(和文) 視神経浮腫へのアクアポリンの関与と、その制御による治療効果の検討

研究課題名(英文) Involvement of aquaporin in the formation of optic nerve edema and protective effects of blocking the AQP channels.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラット視神経を挫滅すると、AQP4発現は1.8倍に増加した。また視神経アストロサイトに一酸化窒素を暴露すると、AQP4発現亢進と細胞容積の増大が認められた。

AQP4チャネルを TGN-020 (5.0 mg/kg) で阻害すると、網膜神経節細胞はより顕著に減少し、BAX/Bcl-2も神経傷害性を示した。グルタミン酸は視神経挫滅により有意に増加したが、TGN-020はグルタミン酸代謝に関連するタンパク発現を抑制した。またTGN-020はグルタミン酸によるAQP4発現亢進と、グルタミン酸代謝を抑制した。AQP4チャネルの阻害はグルタミン酸代謝を障害し、神経障害を増強する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Crushing the optic nerve of rats caused 1.8 fold increase of aquaporin 4 (AQP4) expression in the optic nerve. Exposure of optic nerve astrocytes to nitric oxide increased AQP4 expression and enlarged their volume.

Blocking the AQP4 channel by TGN-020 (5.0 mg/kg) caused more decrease of f retinal ganglion cells (RGCs). The ratio of BAX/Bcl-2 also supported the idea that blocking the AQP4 channel was neurodestructive. The glutamate level in the optic nerve was significantly increased after crushing the optic nerve, but TGN-020 depressed the expression of glutamate metabolism-related proteins. Exposure of cultured optic nerve astrocytes to glutamate increased the expression of AQP4 that was also depressed by TGN-020. In addition, glutamate uptake was inhibited by TGN-020. These results indicate that an inhibition of AQP4 enhances neuronal damages after crushing the optic nerve. Inhibition of AQP4 impairs glutamate metabolism which may account for these neurodestructive events.

研究分野：眼科

キーワード：aquaporin グルタミン酸 一酸化窒素 視神経挫滅 アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

視神経は炎症や外傷、虚血など、様々な病態で浮腫をきたす。視神経は視神経鞘で覆われ、篩状板、視神経管で拘約されるため、浮腫は軸索をさらに圧迫し、しばしば永続的な視機能障害をきたす。

水チャネルである aquaporin (AQP) は主にアストロサイトに発現し、脳浮腫の発生および吸収の両過程に深く関与している。AQP の発現は、アストロサイトの活性化、増殖とも密接に関連し、その発現機構の解明は、視神経疾患の新たな治療法につながると考えられた。

特に神経障害に深く関与するグルタミン酸と、炎症反応を惹起する一酸化窒素と AQP の関連は、AQP の視神経疾患への関与を理解する上で、非常に重要であると考えられた。

2. 研究の目的

視神経挫滅モデルを用いて、視神経浮腫と AQP4 の関連を明らかにし、AQP4 チャネル阻害剤の神経保護作用を検討することを目的とした。また視神経アストロサイトを用い、AQP4 発現の分子機構の一端を解明することを目指した。特に AQP4 のグルタミン酸代謝への関与、一酸化窒素の AQP4 発現への影響を中心に研究計画を作成した。

3. 研究の方法

ラット視神経を球後 2mm で挫滅し、day1, day2, day 4, day 7, day 14 で屠殺し視神経を摘出し、AQP4, AQP9, GFAP の蛋白レベルの発現変化を western blot で測定した。また免疫組織学的に視神経バリアー機能の破綻程度を検討し、視神経浮腫の程度を湿重量、乾重量の差で定量した。

次いで AQP4 チャネル阻害剤の神経保護作用を検討するため、同チャネル阻害剤である TGN-020 を腹腔内投与し、AQP4 チャネル阻害剤が神経傷害的、神経保護的のいずれの方向に作用するかを免疫組織学的、生化学的に検討した。また TGN-020 がグルタミン酸代謝におよぼす影響を生化学的に検討し、AQP4 がグルタミン酸代謝におよぼす影響につき検討した。

さらにアストロサイトにおける AQP4 発現亢進の分子機構の一端を明らかにするため、培養視神経アストロサイトを用い、一酸化窒素(NO)が AQP4 発現におよぼす影響を生化学的に検討した。

4. 研究成果

AQP4 発現は、視神経挫滅翌日に 1.8 倍に増加した。その後、day 7 を trough level として減少し、day14 で基準値に回復した。視神経浮腫は AQP4 が trough level を示した day 7 で最も顕著となった。また AQP4 発現が減少している部分に限局して、バリアーの破綻が生じていることが組織学的に確認された。

AQP4 発現が、傷害直後に増加したのに対し、TGN-020 を腹腔内投与したところ、AQP4 チャネル阻害剤は網膜神経節細胞死を増強し、BAX/Bcl2 比を増大させ、神経傷害的に作用することが明らかになった。その機序として、AQP4 チャネルはグルタミン酸代謝に関与し、同チャネルを阻害すると、グルタミン酸からグルタミンへの変換が障害され、その結果、細胞外グルタミン酸濃度が増加し、毒性が増強される機序が明らかとなった。

視神経アストロサイトに一酸化窒素(NO) 供与体である SNAP を投与したところ、AQP4 発現は有意に亢進し、アストロサイトの容積を増大させた。その分子機構として、cGMP の増加を介した PKG の活性化が関与していると考えられた。NO は炎症反応に深く関与しており、視神経で炎症が生じると、アストロサイトの腫脹を介し、視神経浮腫が生じる機序が考えられた。

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 7 件)

1. Negative impact of AQP-4 channel inhibition on survival of retinal ganglion cells and glutamate metabolism after crushing optic nerve. Nishikawa Y, Oku H, Morishita S, Horie T, Kida T, Mimura M, Fukumoto M, Kojima S, Ikeda T. *Exp Eye Res.* 2016;146:118-127. doi: 10.1016/j.exer.2015.

2. Nitric Oxide Increases the Expression of Aquaporin-4 Protein in Rat Optic Nerve Astrocytes through the Cyclic Guanosine Monophosphate/Protein Kinase G Pathway. Oku H, Morishita S, Horie T, Kida T, Mimura M, Fukumoto M, Kojima S, Ikeda T. *Ophthalmic Res.* 2015;54:212-21. doi: 10.1159/000440846.

3. NADPH Oxidase-Mediated ROS Production Determines Insulin's Action on the Retinal Microvasculature. Kida T, Oku H, Horie T, Matsuo J, Kobayashi T,

Fukumoto M, Ikeda T. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015;56:6754-61. doi: 10.1167/iov.15-17534

4. Changes in Expression of Nestin, CD44, Vascular Endothelial Growth Factor, and Glutamine Synthetase by Mature Müller Cells After Dedifferentiation. Hosoki A, Oku H, Horie T, Kida T, Sugiyama T, Nakamura K, Ikeda T. J Ocul Pharmacol Ther. 2015;31:476-81. doi: 10.1089/jop.2014.0117.

5. Changes in expression of aquaporin-4 and aquaporin-9 in optic nerve after crushing in rats. Suzuki H, Oku H, Horie T, Morishita S, Tonari M, Oku K, Okubo A, Kida T, Mimura M, Fukumoto M, Kojima S, Takai S, Ikeda T. PLoS One. 2014 ;9:e114694.doi:10.1371/journal.pone.0114694.

6. Systemic simvastatin rescues retinal ganglion cells from optic nerve injury possibly through suppression of astroglial NF- κ B activation. Morishita S, Oku H, Horie T, Tonari M, Kida T, Okubo A, Sugiyama T, Takai S, Hara H, Ikeda T. PLoS One. 2014;9:e114694. doi: 10.1371/journal.pone.0114694.

7. 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.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 奥 英弘, 森下 清太, 堀江 妙子, 三村 真士, 福本 雅格, 喜田 照代, 池田 恒彦: 視神経挫滅モデルにおける aquaporin4 阻害剤による神経保護作用の検討. 第 119 回日本眼科学会総会. 2016 年. 仙台国際センター (宮城県・仙台市)

2. 奥 英弘, 森下 清太, 堀江 妙子, 大久保 安希子, 喜田 照代, 池田 恒彦: 低酸素負荷による視神経アストロサイトでの AQP4 および AQP9 の発現変化と一酸化窒素の関与. 第 118 回日本眼科学会総会. 2015 年. ロイトン札幌. (北海道・札幌市)

3. 奥 英弘, 森下 清太, 戸成 匡宏, 堀江 妙子, 喜田 照代, 池田 恒彦: ラット視神経傷害時の aquaporin4(AQP4)および AQP9 の発現変化. 第 117 回日本眼科学会総会. 2014 年. 東京国際フォーラム. (東京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

大阪医科大学眼科学教室ホームページ
<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/opt/gyouseki.html>

Research gate

https://www.researchgate.net/profile/Hidehiro_Oku

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

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

小林 崇俊 (Kobayashi Takatoshi)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10567093

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

池田 恒彦 (Ikeda Tsunehiko)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70222891

石崎 英介 (Ishizaki Eisuke)
大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：70530434

高井 真司 (Takai Shinji)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：80288703

喜田 照代 (Kida Teruyo)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：90610105

(3)連携研究者

原 英彰 (Hara Hideaki)
岐阜大学・薬学部・教授
研究者番号：20381717

(4)研究協力者

森下 清太 (Morishita Seita)
大阪医科大学・医学部・大学院生

家久来 啓吾 (Kakurai Keigo)
大阪医科大学・医学部・大学院生

堀江 妙子 (Horie Taeko)
大阪医科大学・研究補助員